

MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS

CLONAGEM, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO  
DO GENE *recA* DE *Herbaspirillum seropedicae*  
ESTIRPE Z78

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências — BIOQUÍMICA.

CURITIBA  
1994

MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS

CLONAGEM, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *recA* DE  
*Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPE Z78

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa (Orientador)

Universidade Federal do Paraná

Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

Universidade de São Paulo

Dr. José Ivo Baldani

EMBRAPA

Dr<sup>a</sup> Irene Silveira Schrank

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr<sup>a</sup> Glaci Terezinha Zancan

Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 26 de agosto de 1994

ORIENTADORES:

Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Dr<sup>a</sup>. Liu Un Rigo

Existe uma virtude - e uma só - a que muito amo: - a obstinação. Não atribuo o mesmo valor a todas as virtudes de que falam os livros e os professores. Entretanto, poderíamos abranger sob uma só palavra todas as virtudes inventadas pelo homem. Virtude é - obedecer!. Toda a questão está em sabermos a quem obedecer!... Também a obstinação é obediência. Mas todas as outras virtudes, tão estimadas e decantadas, são obediência a leis feitas pelos homens. Só a obstinação é que não dá a menor importância a tais leis....O obstinado obedece à outra lei, à lei única, absolutamente sagrada: - à lei em si mesma, ao sentido (der Sinn) de seu próprio ser (das Eigenen)."

Hermann Hesse  
(1877 - 1972)

A memória de meus avós  
Angela e Leonardo,  
pelas alegrias que me proporcionaram  
e pela saudade que deixaram.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Fixação de Nitrogênio, pela orientação das atividades desenvolvidas, pelo exemplo de honestidade científica e administrativa e especialmente pela confiança e amizade com que me distinguiu no decorrer destes anos.

À Dr<sup>a</sup> Liu Un Rigo, pela orientação das atividades desenvolvidas, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e a família, pelo entusiasmo contagiante, pela confiança depositada e pela amizade demonstrada em todos os momentos.

Aos Drs. Shigehiro Funayama e Emanuel Maltempi de Souza, pelo acompanhamento das atividades, pelas sugestões apresentadas, pelas discussões que tanto contribuíram para o desenvolvimento de minha formação científica, pela amizade e confiança demonstradas.

À Dr<sup>a</sup> Glaci Terezinha Zancan, pelo exemplo de sua dedicação à pesquisa e à formação de novos pesquisadores, pelo apoio oferecido e pela leitura da tese.

À Dr<sup>a</sup> Muriel Mourão Vieira, pela leitura da tese e sugestões apresentadas.

Aos coordenadores que estiveram à frente do Curso de Pós-Graduação, na pessoa da Dr<sup>a</sup> Fani Reicher, pelo atendimento e colaboração dispensados.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, pelo conhecimento compartilhado.

Aos coordenadores que estiveram à frente do Departamento de Bioquímica, na pessoa da Dr<sup>a</sup> Momoyo Nakano, pela colaboração dispensada.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Dona "Ju", Marilza, e Dona Margarida, pela colaboração e atenção constantes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/BID), pelo suporte financeiro.

As bibliotecárias Telma T. Stresser e Mariza Kampfert, pela colaboração e pela gentileza no atendimento prestado.

Aos colegas de curso Nilce, Marco, Caren e Luis Fernando, e Eneida, pela amizade cultivada e pelo apoio demonstrado em todos os momentos.

A Jaísa, Emanuel, Hidevaldo e Edilene, pela atenção com que me receberam no Laboratório e pela amizade e confiança mantidas todos estes anos.

A Giseli, Elaine, Angelita, Maria Lúcia, Sofia, Delmara, Marcos, Marisa, Carla, Ana Cláudia, Jaqueline e Ana Paula pela amizade cultivada, pelo apoio e confiança demonstrados.

A Selma, Maria Eliane, Iara, "Vani" e Aristeu, pela amizade e estímulo compartilhados.

A Ana Paula pelo auxílio na confecção dos desenhos da tese.

Aos professores Edno e Oldemir (fisiologia), Iglênir e Sérgio (genética), e Virgílio (Farmacologia), pelo exemplo de dedicação ao progresso do ensino e da pesquisa.

A "Bia", "Beta", "Zê" e ao "Dan", pelo carinho e por ajudarem a tornar o tempo de nossa "República Familiar" inesquecível.

A meus pais, pelo amor que sempre me dedicaram e pelo tanto que fizeram para que eu conquistasse este momento em minha vida.

A meus irmãos, irmãs, cunhadas, cunhado e sobrinhos, pela amizade, apoio e estímulo oferecidos e pelas alegrias compartilhadas.

A meu esposo Gert, pela alegria que me conquistou, pelo amor que me faz feliz, pelo otimismo que me faz acreditar, pelo apoio que me faz persistir.

## SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS .....	xiii
	LISTA DE TABELAS .....	xv
	LISTA DE ABREVIATURAS .....	xvii
	RESUMO .....	xx
1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	O GENE <i>recA</i> DE <i>Escherichia coli</i> E SEU PRODUTO ...	11
1.1.1	Estrutura e Estados de Agregação da Proteína RecA de <i>Escherichia coli</i> .....	13
1.2	PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA RecA NA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA .....	18
1.3	FORMAÇÃO DE MOLÉCULAS DE DNA HETERODUPLEX PROMOVIDA PELAS PROTEÍNAS RecA E RecBCD .....	27
1.4	FUNÇÃO AUXILIAR DA PROTEÍNA SSB NA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA .....	35
1.5	FUNÇÃO DA PROTEÍNA RecA NA RESPOSTA SOS EM <i>Escherichia coli</i> .....	38
1.5.1	Regulação e Desenvolvimento da Resposta SOS ....	45
1.6	FUNÇÃO DA PROTEÍNA RecA NA MUTAGÊNESE SOS EM <i>Escherichia coli</i> .....	55
1.7	PRESENÇA DE PROTEÍNAS ANÁLOGAS À PROTEÍNA RecA DE <i>Escherichia coli</i> EM ORGANISMOS PROCARIOTOS E EUCARIOTOS .....	62
1.8	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 .....	70
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
2.1	BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E BACTERIÓFAGO .....	73
2.2	REAGENTES.....	73

2.3	MEIOS DE CULTURA.....	76
2.4	TAMPÃO PARA DILUIÇÃO E ESTOCAGEM DE FAGOS .....	80
2.5	ANTIBIÓTICOS .....	80
2.6	PREPARO DE SOLUÇÕES DE RNase, PRONASE E DENHARDT.	81
2.7	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FENOL, CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO E FENOL-CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO.	82
2.8	CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS MICRORGANISMOS .....	82
2.9	MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS E PREPARO DOS PRÉ-INÓCULOS. ....	83
2.10	PURIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DE <i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> Z78 .....	83
2.11	PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS .....	84
2.11.1	Purificação de plasmídeos em gradiente de cloreto de céσιο .....	84
2.11.2	Minipreparação de plasmídeos .....	85
2.12	QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	86
2.13	ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE .....	87
2.14	CONDIÇÕES DE DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	88
2.15	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE PARCIAL PARA O DNA DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 .....	89
2.16	CLIVAGEM DO DNA DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 EM LARGA ESCALA .....	90
2.17	SELEÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE <i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> Z78 APÓS CLIVAGEM EM LARGA ESCALA ...	90
2.18	CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pLAFR3 .....	90
2.19	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE <i>Herbaspirillum</i> <i>seropedicae</i> Z78 .....	91

2.19.1	Empacotamento do DNA recombinante em partículas de fago lambda "in vitro" .....	92
2.19.2	Infecção de <i>E. coli</i> HB101 com partículas de fago lambda contendo DNA recombinante .....	93
2.19.3	Avaliação da eficiência de ligação entre o DNA-inserto e o vetor .....	94
2.19.4	Cálculo da representatividade do banco de genes .	95
2.20	CONTAGEM DE CÉLULAS BACTERIANAS VIÁVEIS .....	95
2.21	SELEÇÃO DE CLONES DO BANCO DE GENES RESISTENTES AO METANOSULFONATO DE METILA .....	96
2.22	TRANSFORMAÇÃO POR TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM CLORETO DE CÁLCIO .....	97
2.22.1	Transformação clássica .....	97
2.22.2	Transformação rápida .....	98
2.23	TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO .....	99
2.23.1	Preparo das células competentes .....	99
2.23.2	Eletroporação .....	100
2.24	EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE CÉLULAS BACTERIANAS .....	101
2.25	EFEITO DO METANOSULFONATO DE METILA SOBRE CÉLULAS BACTERIANAS .....	102
2.26	TESTE DE ESTABILIDADE PARA ESTIRPES Hfr DE <i>Escherichia coli</i> .....	102
2.27	TESTE DE PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO .....	103
2.28	CONJUGAÇÃO .....	104
2.29	PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO .....	105
2.30	SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA .....	106
2.30.1	Preparo do vetor .....	107

2.30.2	Preparo do DNA-inserto .....	107
2.30.3	Ligação .....	108
2.31	MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR SÍNTESE E UTILIZANDO HEXADESOXINUCLEOTÍDEOS COMO "PRIMER" .	108
2.32	DETERMINAÇÃO DA RADIOATIVIDADE INCORPORADA AO DNA-SONDA .....	109
2.33	TRANSFERÊNCIA DE FRAGMENTOS DE DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NYLON .....	110
2.34	HIBRIDIZAÇÃO .....	112
2.35	DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA HIBRIDIZADOS .....	112
2.36	CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE RESTRIÇÃO DE PLASMÍDEOS ..	113
2.37	PREPARO E TITULAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO LAMBDA::Tn5 .....	114
2.37.1	Preparo de células de <i>E. coli</i> para infecção por fago lambda::Tn5 .....	114
2.37.2	Infecção de <i>E. coli</i> com fago lambda Tn5 .....	114
2.37.3	Coleta e acondicionamento de partículas do fago lambda::Tn5 .....	115
2.37.4	Titulação do estoque de fago lambda::Tn5 .....	115
2.38	MUTAGÊNESE DE PLASMÍDEOS COM TRANSPOSON Tn5 .....	115
2.39	TESTE PARA SELEÇÃO DE COLÔNIAS CONTENDO PLASMÍDEOS RECOMBINANTES <i>recA:Tn5</i> .....	116
3.	RESULTADOS .....	118
3.1	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 .....	118
3.2	ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTENDO O GENE <i>recA</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78.....	120
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA COMPLEMENTAÇÃO DO FENÓTIPO <i>RecA</i> DE <i>Escherichia coli</i> HB101 PELO PLASMÍDEO pBMR5 ..	125

3.3.1	Efeito da radiação ultravioleta na indução da Resposta SOS em <i>E. coli</i> HB101(pBMR5) .....	125
3.3.2	Efeito do metanosulfonato de metila na indução da Resposta SOS em <i>E. coli</i> HB101(pBMR5) .....	126
3.3.3	Proficiência de recombinação de <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR5) .....	129
3.4	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5 .....	134
3.5	DETECÇÃO DE UM GENE ESTRUTURALMENTE HOMÓLOGO AO GENE <i>recA</i> DE <i>E. coli</i> NO PLASMÍDEO pBMR5 .....	138
3.6	SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pBMR5 ....	141
3.7	MUTAGÊNESE DO PLASMÍDEO pBMR5 POR INSERÇÃO DO TRANSPOSON <i>Tn5</i> .....	151
3.8	EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM <i>E. coli</i> DH5(pBMR26.2) E HB101(pBMR26.2) .....	158
3.9	EFEITO DO METANOSULFONATO DE METILA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM <i>E. coli</i> DH5(pBMR26.2) E <i>E. coli</i> HB101(pBMR26.2) .....	160
3.10	PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR26.2) .....	164
	DISCUSSÃO .....	166
	CONCLUSÕES .....	175
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	176

## LISTA DE FIGURAS

1	MODELO DE HOLLIDAY (1964) PARA A RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA .....	3
2	MODELO DE MESELSON E RADDING (1975) PARA A RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA .....	4
3	ESTRUTURA DE UM MONÓMERO DA PROTEÍNA RecA .....	16
4	MODELO PARA A REAÇÃO DE TROCA ASSIMÉTRICA DE PROMOVIDA PELA PROTEÍNA RecA .....	21
5	FASES DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PROMOVIDA PELA PROTEÍNA RecA .....	22
6	MODELO PARA A RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PROMOVIDA PELAS PROTEÍNAS RecA E RecBCD .....	31
7	MODELO PROPOSTO PARA A INTEGRAÇÃO DE UM FRAGMENTO DE DNA Hfr ATRAVÉS DA VIA DE RECOMBINAÇÃO RecBCD .....	34
8	MODELO PROPOSTO PARA O MECANISMO DE CLIVAGEM DO REPRESSOR LexA .....	51
9	MODELO DE REGULAÇÃO DO SISTEMA SOS .....	54
10	ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 .....	119
11	PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DO BANCO DE GENES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 CLIVADOS COM SalI .....	121
12	PERFIL ELETROFORÉTICO DE SEIS CLONES DO BANCO DE GENES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 CLIVADOS COM HindIII .....	124
13	EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR5) .....	127

14	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MMS NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR5) .....	128
15	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS ISOLADOS DOS TRANSCONJUGANTES <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 E <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29 .....	132
16	EXEMPLO DE ELETROFORESE ANALISADA DURANTE A ELABORAÇÃO DO MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5 .....	136
17	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5 .....	140
18	HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5 COM O FRAGMENTO <i>Bam</i> HI ISOLADO DO PLASMÍDEO pJC859 .....	142
19	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR501 .....	145
20	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR502 .....	147
21	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR503 .....	149
22	EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR503) ...	152
23	DETERMINAÇÃO DO PONTO DE INSERÇÃO DO TRANSPOSON <i>Tn5</i> NO PLASMÍDEO pBMR5 .....	156
24	LOCALIZAÇÃO DO TRANSPOSON <i>Tn5</i> NO PLASMÍDEO pBMR5 .....	159
25	EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM <i>Escherichia coli</i> DH5(pBMR26.2) E <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR26.2) .....	161
26	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MMS NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM <i>Escherichia coli</i> DH5(pBMR26.2) E <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR26.2) .....	163

## LISTA DE TABELAS

I	EXEMPLOS DE ORGANISMOS PROCARIOTOS PORTADORES DE GENES ANÁLOGOS AO GENE <i>recA</i> DE <i>Escherichia coli</i> ....	63
II	ESTIRPES DE BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E BACTERIÓFAGO ....	64
III	FREQUÊNCIA DE APARECIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>Escherichia coli</i> HB101 RESISTENTES AO MMS .....	123
IV	PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR5) .....	130
V	CRESCIMENTO DOS TRANSCONJUGANTES <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 E <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (R68.45)T729 EM MEIO MÍNIMO .....	133
VI	SOBREVIVÊNCIA DOS TRANSCONJUGANTES <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 E <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29 EM PRESENÇA DE MMS .....	135
VII	TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR5 COM DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.	137
VIII	TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS PELA CLIVAGEM DOS FRAGMENTOS <i>Bam</i> HI COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	139
IX	TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR501 COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	144
X	TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR502 COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	146
XI	TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR503 COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	148
XII	COMPLEMENTAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> HB101 PELOS SUBCLONES DERIVADOS DO PLASMÍDEO pBMR5 .....	150

XIII	PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR503) .....	153
XIV	ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS pBMR5::Tn5 .....	154
XV	TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR26.2 COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	157
XVI	PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> HB101(pBMR26.2) .....	165

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	=	angström
ADP	=	5'-difosfato de adenosina
Amp	=	ampicilina
ATP	=	5'-trifosfato de adenosina
ATP <sub>γ</sub> S	=	5'-O-3-tiotrifosfato de adenosina
°C	=	grau Celsius
Cb	=	carbenicilina
Ci	=	Curie
μCi	=	microCurie
cm	=	centímetro
cm <sup>2</sup>	=	centímetro quadrado
Cm	=	cloranfenicol
dAPT	=	5'-trifosfato de 2'-desoxiadenosina
α- <sup>32</sup> P-dCTP	=	5'-[α- <sup>32</sup> P] trifosfato de desoxicitidina
dGTP	=	5'-trifosfato de 2'-desoxiguanosina
dTTP	=	5'-trifosfato de 2'-desoxitimidina
DDVP	=	dimetilfosfato de 2,2 diclorovinil
DFP	=	fluorfosfato de diisopropila
DNA	=	ácido desoxiribonucleico
D. O. <sub>260</sub>	=	densidade óptica a 260 nm
D. O. <sub>280</sub>	=	densidade óptica a 280 nm
D. O. <sub>550</sub>	=	densidade óptica a 550 nm
D. O. <sub>600</sub>	=	densidade óptica a 600 nm
DTT	=	ditiotreitól
DTE	=	ditioeritritol
e	=	base dos logarítimos neperianos (2,7182)

EDTA	=	ácido etilenodiamino-tetra-acético
EGTA	=	ácido etileno bis (óxi-etilenonitrilo) tetracético
EMS	=	metasulfonato de etila
FR	=	forma replicativa
Hfr	=	alta frequência de recombinação
g	=	grama
µg	=	micrograma
ng	=	nanograma
x g	=	força centrífuga
X-gal	=	5- bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactosídeo
IPTG	=	isopropil-β-D-tio-galactopiranosídeo
kb	=	quilobase (1000 pares de bases)
kDa	=	quilodalton
Km	=	canamicina
l	=	litro
ml	=	mililitro
µl	=	microlitro
ln	=	logaritmo neperiano
mg	=	miligrama
min	=	minuto
M	=	molar
mM	=	miliomolar
mm	=	milímetro
MMS	=	metanosulfonato de metila
MNU	=	N-metil N-nitrosouréia
MT	=	O <sup>6</sup> -metil-guanina DNA transferase
N	=	normal
Nal	=	ácido nalidíxico
nm	=	nanômetro

4NQO	=	óxido de 4-nitroquinolina
NTG	=	N'-metil N'-nitro-N-nitrosoguanidina
Pi	=	fosfato inorgânico
PCR	=	reação em cadeia da enzima polimerase
pH	=	$-\log$ (concentração de íons $H^+$ )
r	=	resistente à
RNA	=	ácido ribonucleico
rpm	=	rotações por minuto
SDS	=	dodecilsulfato de sódio
Sm	=	estreptomicina
SSB	=	proteína que se liga ao DNA de fita simples
TAGII	=	3- metil-guanina DNA glicosilase II
Tc	=	tetraciclina
Tris	=	tris(hidroximetil)-aminometano
U	=	unidade enzimática
UFC	=	unidade formadora de clônia
UFP	=	unidade formadora de placa de lise
UV	=	ultravioleta
W	=	Watt

## RESUMO

A partir de um banco genômico de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78, construído no cosmídeo vetor pLAFR3, foi isolado um gene análogo ao *recA* por complementação interespecífica da estirpe mutante *Escherichia coli* HB101 (*recA*<sup>-</sup>). Seis plasmídeos recombinantes "pLAFR3::DNA de *H. seropedicae* Z78" foram isolados e passaram a constituir a série pBMR1 a pBMR6. O plasmídeo pBMR5 foi escolhido para estudos mais detalhados. Resultados quantitativos de sobrevivência mostraram que este plasmídeo foi capaz de conferir resistência à radiação ultravioleta e ao metanosulfonato de metila (MMS) à estirpe *E. coli* HB101. Além disto, o plasmídeo pBMR5 restaurou a proficiência de recombinação homóloga após conjugação de *E. coli* HB101. Estudos de hibridização DNA/DNA revelaram a existência de homologia estrutural entre o gene *recA* de *E. coli* K12 e o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 contido no plasmídeo pBMR5. O DNA inserto deste plasmídeo apresentou sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI e *Hind*III. O fragmento *Hind*III de 3,65 kb que continha o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 foi subclonado no vetor pTZ18R dando origem ao plasmídeo pBMR503. Este plasmídeo conferiu à *E. coli* HB101 níveis de complementação fisiológica iguais aqueles obtidos para pBMR5. Um derivado *recA*<sup>-</sup> do plasmídeo pBMR5 foi obtido por inserção do transposon *Tn5*. Este plasmídeo, denominado pBMR26.2, foi incapaz de restaurar a proficiência de recombinação ou de conferir resistência à radiação ultravioleta ou ao MMS às estirpes HB101 e DHS de *E. coli*. Os dados obtidos neste trabalho sugerem fortemente a existência de um gene tipo *recA* em *H. seropedicae* Z78, bem como a funcionalidade de um sistema de reparo e recombinação análogo ao Sistema SOS de *E. coli*.

## 1 INTRODUÇÃO

A variabilidade genética desenvolvida ao longo da evolução e originada pelas mutações tem na recombinação gênica um fenômeno capaz de amplificá-la. As mutações introduzem novas informações no genoma, através de lentas e sucessivas modificações do código genético. As recombinações, desde o evento relativamente simples de quebra e reunião até mecanismos altamente especializados de mitose e meiose, envolvem a permuta de material genético para formar novas combinações gênicas. Através da recombinação a variabilidade genética de uma espécie aumenta e pode ser transmitida sem necessidade de novas mutações. A recombinação envolvendo a reação onde sequências homólogas de DNA são trocadas entre dois cromossomos, é denominada recombinação homóloga (COX e LEHMAN, 1987). As moléculas resultantes desta permuta são ditas recombinantes e contém informações genéticas originalmente presentes em cada uma das moléculas parentais (COX e LEHMAN, 1987; SMITH, 1988).

ROBIN HOLLIDAY (1964) foi o primeiro a formular um modelo molecular envolvendo trocas de seqüências nucleotídicas entre moléculas de DNA duplex para explicar os padrões de conversão gênica observados durante a meiose no processo de reprodução do fungo *Ustilago maydis* (Figura 1). HOLLIDAY chamou de conversão gênica a segregação desigual de um par de alelos entre os quatro produtos da meiose, ocasião em que um dos alelos aparentemente "se converte" no outro. Esta "conversão" resulta do reparo do pareamento incorreto de alelos situados muito próximos, ou mesmo dentro, de uma região de permuta do DNA. A

segregação 3:1 ou 6:2 só é possível quando ocorre reparo em ambas as cromátides. Quando o reparo ocorre em uma só, observava-se a segregação pós-meiótica ou 3:5 e se nenhuma das cromátides é reparada, resulta em segregação pós-meiótica dupla ou 4:4 a qual é considerada aberrante (HOLLIDAY, 1974).

A característica mais importante do Modelo de Holliday é a associação entre duas moléculas de DNA duplex através de uma junção heteroduplex, conhecida como Estrutura de Holliday (etapa 6 da Fig. 1) e que, em virtude de sua capacidade de migração espontânea, pode gerar longas regiões de DNA heteroduplex. Estas regiões podem explicar a heterozigose que é frequentemente observada nos cromossomos recombinantes (SODERGREN e FOX, 1979). Devido à sua simetria, a estrutura de Holliday pode ser processada ao longo de seu eixo horizontal ou vertical para produzir moléculas recombinantes nas quais os alelos parentais que margeiam as regiões potencialmente heterozigotas são conservados em sua posição original ou são trocados reciprocamente (etapas 7a e 7b da Fig. 1).

Uma modificação do modelo de Holliday para a recombinação homóloga foi apresentada em 1975 por MESELSON e RADDING (Figura 2). Segundo estes pesquisadores, é suficiente que apenas uma das fitas da molécula de DNA contenha um ponto de quebra para dar início à formação da estrutura de Holliday. Neste modelo, não é considerada a participação das duas fitas de DNA, uma vez que a fita simples permutada torna-se uma fita dupla permutada por isomerização eliminando a necessidade do ponto de quebra nas duas fitas de DNA envolvidas. Esta consideração foi importante para o desenvolvimento dos estudos do mecanismo da recombinação homóloga porque é experimentalmente demonstrável

FIGURA 1 (legenda)

- (1) Dois segmentos homólogos de DNA cromossomal, I e II, estão pareados. A,B,C,D,E,F,G representam sete genes distintos e a,b,c,d,e,f,g seus alelos.
- (2) Uma nuclease corta uma das fitas de cada DNA duplex. Os sítios de restrição são homólogos e as fitas de mesma polaridade.
- (3) e (4) As extremidades das duas fitas cortadas são trocadas e religadas .
- (5) Migração da junção e formação de uma região de DNA heteroduplex
- (6) A parte inferior do complexo sofre rotação de 180°.  
(6a) Forma-se a Estrutura de Holliday (6b).
- (7) Duas alternativas de resolução da Estrutura de Holliday:  
(7a) Um corte ao longo do eixo horizontal seguido de ligação não produz recombinação mas devido a migração, forma-se uma região heteroduplex ao nível do gene D.  
(7b) Um corte ao longo do eixo vertical seguido de ligação, produz recombinação recíproca para A, B, C, E, F, e G e uma região heteroduplex em D.

FIGURA 1 - MODELO DE HOLLIDAY (1964) PARA A RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

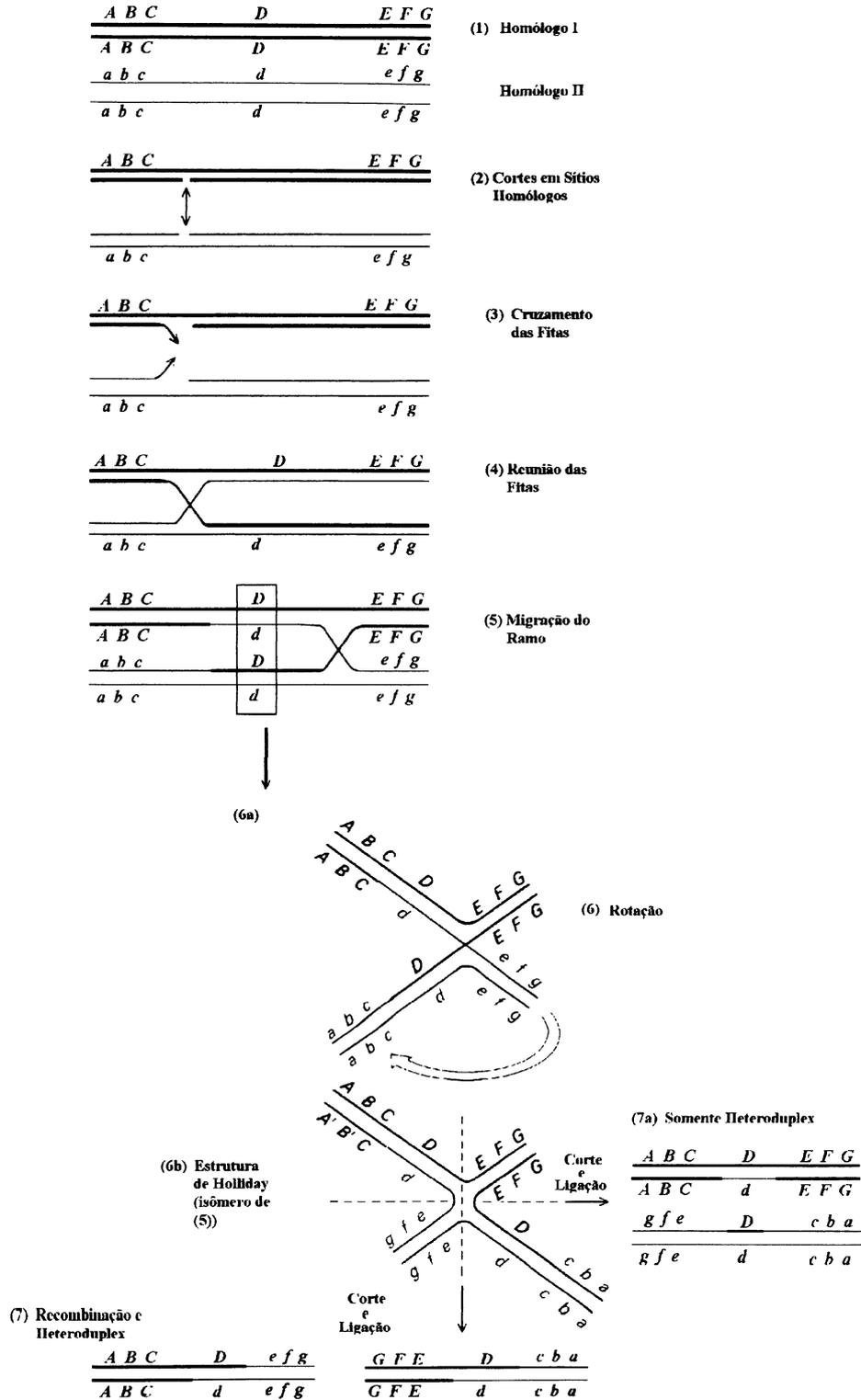
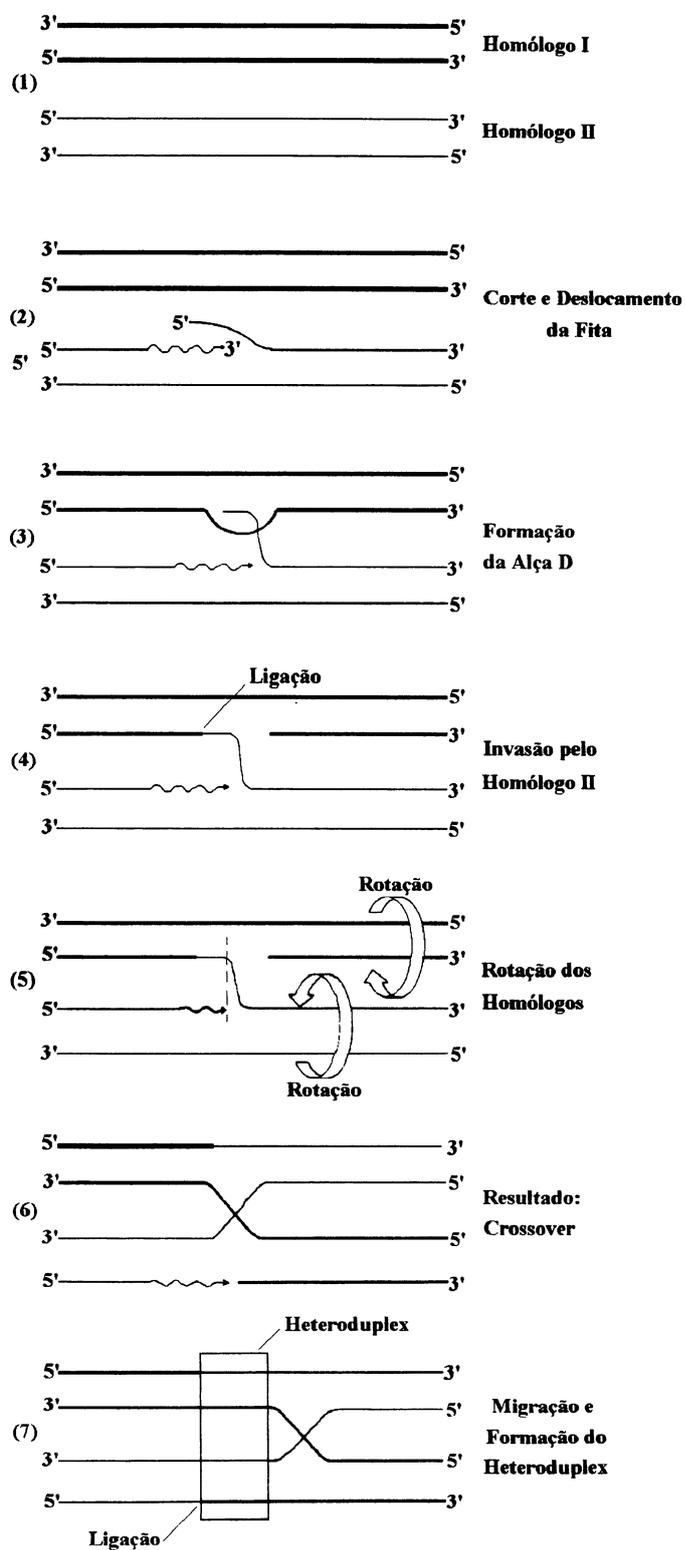


FIGURA 2 (legenda)

- (1) Dois segmentos homólogos de DNA cromossomal, I e II, estão pareados.
- (2) Reinício da síntese do DNA a partir de uma extremidade 3' gerada pelo corte de uma de suas fitas. A expansão da nova fita promove o deslocamento da extremidade 5' pré-existente.
- (3) A extremidade 5' deslocada invade o cromossomo I. A hibridização entre esta extremidade do cromossomo II com uma região do cromossomo I provoca a formação de um segmento não pareado neste último (alça D).
- (4) A alça D é clivada e removida. Os dois cromossomos tornam-se unidos por um segmento de DNA unifilamentar.
- (5) Rotação dos cromossomos sobre o ponto de crossover.
- (6) As fitas de mesma polaridade se inter cruzam.
- (7) A migração da junção forma a região heteroduplex.

A resolução da Estrutura de Holliday para a formação dos recombinantes se processa de acordo com os passos 6 e 7 da figura 1.

FIGURA 2 - MODELO DE MESELSON E RADDING (1975) PARA A  
RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA



que uma fita simples de DNA pode ser utilizada "in vitro" para dar início ao processo da recombinação (CUNNINGHAM *et al.*, 1980, DAS GUPTA *et al.*, 1980, COX e LEHMAM, 1981b, FLORY e RADDING, 1982, WU *et al.*, 1982, TAKAHASHI *et al.*, 1986). O modelo proposto por Holliday e posteriormente o modificado por MESELSON e RADDING, têm formado a estrutura conceitual nas investigações dos mecanismos moleculares da recombinação homóloga.

Paralelamente às investigações realizadas por HOLLIDAY (1964), CLARK e MARGUILES (1965) e HOWARD-FLANDERS e THERIOT (1966), relataram o isolamento de estirpes de *Escherichia coli* deficientes em promover recombinação. As estirpes isoladas foram classificadas fenotipicamente como Rec<sup>-</sup>. Estes fatos deram origem a uma série de estudos bioquímicos, genéticos, físicos e fisiológicos das etapas do mecanismo da recombinação homóloga. Inicialmente foram descritos os loci *recA*, *recB* e *recC* (CLARK e MARGUILES, 1965; WILLETS *et al.*, 1969) e subsequentemente os loci *recD* (AMUNDSEN *et al.*, 1986; BIEK e COHEN, 1986), *recE*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recK*, *recL*, *recN* (COX e LEHMAM, 1987; CLARK, 1991), *recO*, *recQ* (WEST, 1988) e *recR* (UMEZU *et al.*, 1990). O gene *recL* foi identificado como sendo o gene *uvrD* cujo produto é a enzima DNA helicase II (MAPLES e KUSHNER, 1982; OSSAMA e MOUNT, 1989).

A maioria das proteínas codificadas por estes genes em *E. coli*, foram identificadas e caracterizadas. A proteína RecA está envolvida na recombinação homóloga, no reparo do DNA, na indução da fase lítica do fago lambda (ROCA e COX, 1990) e na replicação estável do DNA de mutantes *rnh* (KOGOMA *et al.*, 1985; SKARSTAD e BOYE, 1988; CAO e KOGOMA, 1993). Os genes *recB*, *recC*

e *recD* codificam as três subunidades da proteína RecBCD envolvida na recombinação homóloga, no reparo do DNA, na degradação de DNA exógeno ou danificado e na manutenção da viabilidade celular (CAPALDO-KIMBALL, 1971; CLARK, 1973; MARSIC *et al.*, 1993). A proteína RecE é uma exonuclease (GILLEN *et al.*, 1981). Recentemente HALL *et al.* (1993) identificaram a proteína RecT cuja função é promover a renaturação de sequências de DNA de fita simples. Esta proteína é codificada por uma região do gene *recE* (HALL *et al.*, 1993). A proteína RecF liga-se ao DNA de fita simples e/ou dupla e participa da recombinação e do reparo do DNA (BLANAR *et al.*, 1984; MADIRAJU e CLARK, 1992). RecJ é uma exonuclease 5' → 3' específica para DNA de fita simples (LOVETT e CLARK, 1984; LOVETT e KOLODNER, 1989). A proteína RecO promove a renaturação de segmentos de DNA de fita simples complementares (UMEZU *et al.*, 1993). RecQ é uma helicase (UMEZU *et al.*, 1990). UMEZU *et al.* (1993) sugeriram que o produto do gene *recR* participa juntamente com RecF e RecO de um mesmo passo durante a recombinação, e que estas três proteínas interagem com a proteína RecA. Embora identificados, os produtos dos genes *recG*, *recK* e *recN* ainda constituem objeto de investigação. Dentre todos estes loci o *recA* é considerado o mais importante uma vez que mutações neste gene chegam a reduzir o potencial de recombinação de *E. coli* em mais de mil vezes (COX e LEHMAM, 1987).

Estudos genéticos do processo de recombinação homóloga em *E. coli*, demonstraram a existência de diferentes vias pelas quais pode ocorrer a recombinação (CLARK, 1971, CLARK, 1973; CLARK, 1991). Análises preliminares identificaram as proteínas RecA, RecB e RecC como componentes da principal via de

recombinação em estirpes selvagens de *E. coli*. Inicialmente designada Via RecBC (CLARK, 1973) esta via ficou conhecida como Via RecBCD após a identificação do gene *recD* por AMUNDSEN e colaboradores (1986). Através desta via ocorre a recombinação durante a conjugação ou a transdução (SMITH, 1991a). As enzimas Polimerase I, DNA ligase, DNA girase e a Proteína que se liga ao DNA de fita simples (Proteína SSB ou Single Strand Binding Protein), também fazem parte desta via (SMITH, 1987). Mutações em RecBCD reduzem a eficiência de recombinação para 0,3-2% do valor normal (HORII e CLARK, 1973).

Duas outras vias de recombinação, consideradas alternativas em *E. coli*, foram subsequentemente identificadas através do isolamento e análise de mutantes que revertiam o efeito de mutações nos genes *recB* e *recC* (CLARK, 1973). Os genes responsáveis por estas reversões são *sbcA*, *sbcB* e *sbcC*. Historicamente, a via de recombinação verificada em mutantes *recB recC* e contendo a mutação supressora *sbcA* foi chamada Via RecE (QUILLARDET *et al.*, 1982). A via de recombinação observada em mutantes *recB recC* contendo mutações supressoras *sbcB* e *sbcC* foi chamada de Via RecF (HORII e CLARK, 1973). De maneira geral, a via RecF promove a recombinação entre plasmídeos em células selvagens enquanto que a via RecE é responsável por este evento em mutantes *recBCD sbcA* (KORNBERG, 1992). Entretanto, diversos pesquisadores consideram esta divisão de vias e funções muito simplificada e argumentam que os produtos gênicos necessários para a recombinação parecem depender da estrutura secundária das moléculas de DNA envolvidas bem como de sua disponibilidade na célula (FISHEL *et al.*, 1981; GILLEN *et al.*, 1981, LABAN e COHEN, 1981; JAMES *et al.*, 1982; COHEN e

LABAN, 1983; SYMINGTON *et al.*, 1985; KOLODNER *et al.*, 1985).

A recombinação homóloga em estirpes mutantes *recB recC scbA* tem-se mostrado particularmente complexa. SYMINGTON *et al.* (1985) referem-se a esta via como Sistema RecE dado os múltiplos efeitos causados pela mutação *sbcA* no processo de recombinação. A mutação deste gene permite a indução da síntese da enzima exonuclease VIII, produto do gene *recE* e uma nuclease 5 → 3' específica para DNA duplex (GILLEN *et al.*, 1981; SYMINGTON *et al.*, 1985). Esta exonuclease atua em pontos de quebra do DNA duplex, gerando segmentos de DNA de fita simples potencialmente recombinantes. Estudos enzimológicos detalhados demonstraram que a exonuclease VIII é similar à exonuclease  $\lambda$ , embora as duas enzimas difiram significativamente no peso molecular (JOSEPH e KOLODNER, 1983a; JOSEPH e KOLODNER, 1983b). A via RecE é considerada mecanisticamente semelhante a via  $\lambda$  Red, um sistema de recombinação homóloga verificado entre o DNA cromossomal de células de *E. coli* e o DNA do fago lambda (MUNIYAPA e RADDING, 1986; BERGER, 1989; SMITH, 1989).

A análise genética de estirpes de *E. coli* com mutações em *recB recC sbcB sbcC*, revelou que as mutações em *sbcB* e *sbcC* têm efeito supressor sobre mutações em *recB* e/ou *recC* (CLARK, 1971). Esta supressão foi interpretada como o resultado da ativação indireta da via RecF. Mutações no gene *sbcB* inativam seu produto, a enzima exonuclease I (uma nuclease 3' → 5') (PHILLIPS e KUSHNER, 1987), permitindo que moléculas com segmentos de DNA de fita simples e extremidades 3' livres possam persistir tempo suficiente para serem utilizadas em recombinação (CLARK, 1991). Os efeitos diretos das mutações no gene *sbcC* permanecem indefinidos (LLOYD e BUCKMAN, 1985). Esta

via funciona normalmente em níveis baixos em *E. coli*, aparentemente devido a ação da exonuclease I a qual, degradaria um de seus compostos intermediários (HORII e CLARK, 1973; JAMES *et al.*, 1982).

GILLEN *et al.* (1981) sugeriram o produto do gene *recA* como um ponto comum entre as três vias embora o interrelacionamento mais intenso se dê entre as vias RecE e RecF, uma vez que ambas envolvem em primeira análise, os produtos dos genes *recA*, *recF*, *recJ*, *recN*, *recO*, *recQ*, *ruvA*, *ruvB* e *ruvC* (LLOYD *et al.*, 1987; SMITH, 1989). As proteínas RuvA e RuvB, da mesma forma que RecA, promovem a migração da junção de Holliday enquanto que a proteína RuvC está envolvida na clivagem desta junção (DUNDERDALE *et al.*, 1991). Com exceção da proteína RecA, as proteínas codificadas pelos demais genes não participam da via RecBCD (SMITH, 1989). Devido ao fato da proteína RecA ter sido identificada como um componente presente nas três vias citadas, não foi definida a via de recombinação RecA (CLARK, 1971).

Segundo SMITH (1989), a sobreposição das vias através do envolvimento da proteína RecA representa um agente interferente mas não invalida o conceito de três vias independentes. Como a via RecBCD não envolve produtos gênicos das outras vias além da proteína RecA, a maior controvérsia limita-se às vias RecE e RecF onde quanto maior a sobreposição de elementos menor a distinção entre elas. Além disso, quando se analisa a recombinação por conjugação, transdução e transformação ou ainda, a recombinação intermolecular ou intramolecular de plasmídeos (recombinação inter ou intraplasmidial), devem ser observados os seguintes fatos:

1. a via RecBCD é considerada a principal via de recombinação

nos eventos de conjugação, mas experimentos recentes apontam para o envolvimento da via RecF neste processo (UMEZU *et al.*, 1993).

2. na ausência da função RecBCD, a via RecF torna-se a principal via por onde correm os eventos de recombinação homóloga em *E. coli* (SMITH, 1988; SMITH, 1989).

3. a recombinação por transdução ocorre pela via RecBCD como na conjugação (SMITH, 1988).

4. quando se considera a recombinação inter ou intraplasmidial, ampliam-se a complexidade dos mecanismos e as possibilidades de envolvimento de uma ou de outra via. Utilizando plasmídeos portadores de sequências repetidas do gene de resistência para tetraciclina (*tetA*), separadas por sequências intermediárias, LABAN e COHEN (1981) demonstraram que tanto a recombinação interplasmidial como a intraplasmidial independem da via RecBCD e ocorrem pela via RecF. Além disso, segundo KOLODNER *et al.* (1985) somente os genes *recJ*, *recO* e *ssb* da via RecF são necessários na recombinação interplasmidial e que este processo está regulado, em parte, pelo regulon *recA/lexA*.

Quando a via ativa é a RecE, a recombinação intraplasmidial torna-se independente da função da proteína RecA enquanto que a interplasmidial permanece RecA-dependente (LABAN e COHEN, 1981). A recombinação do fago lambda pela via RecE ou pela via  $\lambda$ Red também é RecA-independente quando a replicação do DNA não está bloqueada (LABAN e COHEN, 1981).

Ao reconsiderarem a participação da via RecF na recombinação plasmidial, COHEN e LABAN (1983) observaram que a atividade do gene *recF* favorece a recombinação interplasmidial e não depende da inativação da enzima RecBCD. Quando presente,

esta enzima é envolvida somente na recombinação intraplasmidial pela via RecF. Buscando novas informações sobre a recombinação intraplasmidial, BI e LIU (1994) estudaram a regeneração do fenótipo de resistência para tetraciclina em reações com plasmídeos contendo sequências duplicadas dentro do gene *tetA*. Neste caso, ao contrário do método empregado por LABAN e COEHN (1983), as sequências não estavam separadas e sim alinhadas. Os resultados obtidos mostraram que a recombinação intraplasmidial pode ocorrer tanto por um mecanismo RecA-independente como por um RecA-dependente. Os fatores que determinam o mecanismo a ser seguido dependem segundo BI e LIU (1994), do número de pares de bases que compõem as sequências homólogas e da distância que as separa.

Estas contradições suportam a sugestão de que a dependência ou não da proteína RecA, bem como a via de recombinação utilizada, refletem as diferenças entre os substratos presentes em cada reação bem como a disponibilidade dos produtos gênicos envolvidos.

### 1.1 O GENE *recA* DE *Escherichia coli* E SEU PRODUTO

O gene *recA* de *E. coli* foi clonado e sequenciado simultaneamente por HORII *et al.* (1980) e SANCAR *et al.* (1980). O códon que marca o início da transcrição encontra-se a seis pares de bases acima da sequência Pribnow TATAATT (-13/-7). A extremidade 5' desta sequência sobrepõe-se à sequência palindrômica ATACTGTATGA.GCATACAGTAT (-32/-11) que corresponde ao sítio operador onde se liga a proteína repressora LexA

(LITTLE *et al.*, 1981). A região codificadora do produto do gene *recA* contém 1059 nucleotídeos com o códon de início da tradução na posição +49 e o sinal de término na posição +1109 (TAA). O códon AUG está situado seis nucleotídeos abaixo da sequência AGGAG predita como sítio de ligação ao ribossomo (SHINE e DELGARNO, 1975).

A caracterização bioquímica e a posterior purificação do produto do gene *recA* contribuíram efetivamente para explicar sua participação no processo de recombinação homóloga. Em estudos independentes, a proteína RecA foi purificada a partir de extratos celulares de *E. coli* por MCENTEE (1977), GUDAS e MOUNT (1977) e LITTLE e KLEID (1977). Estes pesquisadores demonstraram que mutações no gene *recA* alteravam a mobilidade eletroforética e o ponto isoelétrico de uma proteína com massa molecular de cerca de 40 kDa conhecida previamente como proteína X. Esta proteína havia sido identificada como um polipeptídeo cuja síntese era fortemente estimulada por um grupo de agentes inibidores da síntese do DNA ou causadores de alterações em sua estrutura (GUDAS e PARDEE, 1976; WITKIN, 1976). O término prematuro da síntese, bem como a degradação do DNA são verificados quando células de *E. coli* são submetidas à radiação ionizante ou tratadas com ácido nalidíxico, bleomicina ou mitomicina C (GUDAS e PARDEE, 1976; WITKIN, 1976). Na fase exponencial de crescimento uma célula de *E. coli* AB1157 pode conter de 1.000 a 1.500 moléculas de proteína RecA que correspondem a 0,02% do total de proteínas solúveis (SALLES e PAOLETTI, 1983). Em células induzidas por radiação ultravioleta o número de moléculas de proteína RecA por célula pode chegar a 30.000-50.000 (SALES e PAOLETTI, 1983). A descoberta da

participação da proteína RecA na regulação de um dos sistemas de reparo do DNA, a Resposta SOS, em *E. coli* (WITKIN, 1976) e, em particular, na auto-regulação do gene *recA* possibilitou a integração de conhecimentos adquiridos isoladamente (BRENT, 1982; LITTLE, 1983; WITKIN e KOGOMA, 1984). Além disso, a determinação da via de regulação de transcrição do gene *recA* permitiu a obtenção de estirpes de *E. coli* nas quais este gene era expresso constitutivamente (HORII *et al.*, 1980; UHLIN e CLARK, 1981; HICKSON *et al.*, 1981; ROBERTS e ROBERTS, 1981; SEDGWICK e YARRANTON, 1982). A síntese constitutiva da proteína e sua purificação em larga escala (UHLIN e CLARK, 1981), facilitada pela clonagem do gene *recA* em plasmídeos de alto número de cópias (SANCAR e RUPP, 1979), contribuiu significativamente para a análise de sua estrutura e função.

#### 1.1.1 Estrutura e Estados de Agregação da Proteína RecA de *Escherichia coli*

A proteína RecA de *E. coli* é composta por 352 resíduos de aminoácidos e tem massa molecular de 37.842 daltons (HORII *et al.*, 1980; SANCAR *et al.*, 1980). Quanto ao seu conteúdo de aminoácidos, sua porção carboxi terminal contém cerca de 75% dos aminoácidos básicos e 80% dos aminoácidos aromáticos totais. A porção amino terminal contém os três únicos resíduos de cisteína (Cys90, Cys116 e Cys129) e os dois únicos resíduos histidina (His97 e His163), aminoácidos que fazem parte do sítio ativo de várias proteínas com atividade proteolítica (SANCAR *et al.*, 1980). Com a intenção de associar a análise da

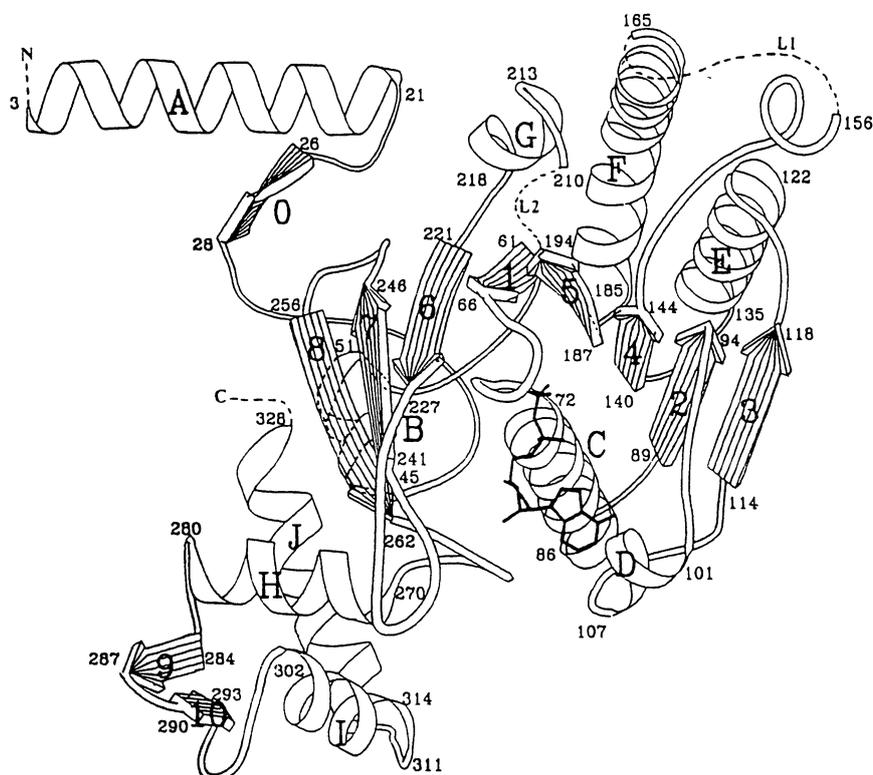
sequência de aminoácidos a uma das funções da proteína RecA, isto é, clivagem da proteína repressora LexA, SANCAR *et al.* (1980) ressaltaram a homologia das sequências Asp-Ile-Ala-Leu, Ala-Glu-His-Ala e Gly-Asp-Ser com sequências de sítios ativos de diversas serina-proteases (KRAUT, 1977; KOSSIAKOFF e SPENCER, 1981). A importância desta homologia foi revista por LITTLE (1984) ao demonstrar, em experimentos "in vitro", que a proteína RecA apenas favorece a autoclivagem da proteína LexA e da proteína repressora do fago lambda. Posteriormente, SLILATY e LITTLE (1987) propuseram que o mecanismo de clivagem de LexA é semelhante àquele das serina-proteases. Devido aos estudos destes e de outros pesquisadores, RecA passou a ser considerada uma proteína que participa de forma indireta na clivagem da proteína LexA (LITTLE, 1991), da proteína UmuD que está envolvida na mutagênese SOS (BUCKHARDT *et al.*, 1988) e da proteína repressora do fago lambda e/ou de outros fagos (EGUCHI *et al.*, 1988; GIMBLE e SAUER, 1989).

Com referência à organização tridimensional da proteína RecA, a análise de imagens obtidas em ultramicrografias possibilita apenas a observação de estruturas de baixa resolução onde filamentos da proteína podem ou não estar ligados a moléculas de DNA de fita simples ou dupla (CUNNINGHAM *et al.*, 1980; DAS GUPTA *et al.*, 1980; FLORY e RADDING, 1982; WILLIAMS e SPENGLER, 1986; AMREIN *et al.*, 1988; EGELMAN e YU, 1989). Visando um melhor entendimento da função através do estudo detalhado da estrutura, STORY *et al.* (1992) estabeleceram e aperfeiçoaram à resolução de 2,3 angströms a estrutura da proteína RecA por cristalografia de raios X. A estrutura desta proteína, segundo estes pesquisadores, está

representada na figura 3 e assim descrita:

A proteína RecA consiste de um domínio central maior, delimitado por dois domínios menores, o amino terminal e o porção carboxi terminal. O domínio central está formado por um conjunto de oito sequências em  $\beta$ -conformação dispostas paralelamente entre si e intercaladas por sequências em  $\alpha$ -hélice. A região amino terminal da molécula, incluindo os resíduos 1 a aproximadamente 30, forma a  $\alpha$ -hélice A e a sequência em  $\beta$ -conformação zero (0). Esta unidade  $\alpha/\beta$  é importante na formação do polímero RecA. O domínio carboxi terminal, que inclui os resíduos 270 a 328, consiste de três sequências em  $\alpha$ -hélice e duas sequências em  $\beta$ -conformação. Estes dois domínios projetam-se da molécula estabilizando a formação dos polímeros e contribuindo para a estabilidade do cristal. Devido à ausência de densidade eletrônica correspondente aos resíduos 157-164 (alça L<sub>1</sub>) e 195-209 (alça L<sub>2</sub>), no mapa de densidade eletrônica, eles foram considerados "presumivelmente desordenados". STORY *et al.* (1992) sugeriram que as alças L<sub>2</sub> e L<sub>1</sub> contém os sítios primário e secundário de ligação do DNA dentro do filamento RecA. A alça contendo os resíduos 232-236 também situa-se em uma área de pouca densidade eletrônica e ainda está pouco definida. Os últimos vinte e cinco resíduos de aminoácidos não são visíveis no mapa de densidade eletrônica estando também, presumivelmente desordenados. Como em outras proteínas que se ligam a mono ou dinucleotídeos, o nucleotídeo liga-se a uma região próxima à porção carboxi terminal da sequência em  $\beta$ -conformação, com seus fosfatos ligados a uma região próxima da porção amino terminal da sequência limítrofe em  $\alpha$ -hélice.

FIGURA 3 - ESTRUTURA DE UM MONÔMERO DA PROTEÍNA RecA



Representação esquemática da estrutura tridimensional da proteína RecA obtida por cristalografia de raios x (Story et al., 1992). As estruturas em  $\alpha$  hélice estão identificadas por letras (A-J) e as em  $\beta$  conformação estão representadas por setas numeradas (0 a 10) de acordo com sua posição a partir da extremidade amino terminal da molécula (N). A numeração de 3 a 328 indica a sequência dos resíduos de aminoácidos na cadeia protéica. Uma molécula de ADP está ligada a  $\alpha$  hélice C. As seqüências correspondentes a alças L1 e L2 estão representadas por linha interrompida.

Quanto ao estado de agregação do polipeptídeo em solução, a proteína RecA pode assumir diversas formas oligoméricas, sendo que o equilíbrio entre as espécies é determinado pela concentração protéica, pelo pH e força iônica do meio e também pela temperatura (BRENNER *et al.*, 1988; WILLSON e BENIGHT, 1990). BRENNER *et al.* (1988) observaram quatro estados de agregação da proteína RecA na ausência de DNA e uma concentração protéica de 0,5-2mg/ml, : a) monômeros, b) partículas esféricas com 12 nm de diâmetro, c) bastonetes com 10 nm de diâmetro e 50-200 nm de comprimento e, finalmente, d) feixes de bastonetes. A formação de feixes é favorecida por níveis milimolares de cloreto de magnésio e inibida por cloreto de sódio, ATP, ADP ou altas concentrações do tampão. Segundo MORRICAL e COX (1985), o processo de formação dos feixes de proteína RecA compete com a ligação do DNA, indicando que estes feixes não ligam DNA. Em estudos utilizando gradiente de ultracentrifugação, BRENNER *et al.* detectaram monômeros, trimeros, hexâmeros, dodecâmeros e oligômeros de RecA em equilíbrio, com a distribuição determinada pelas características da solução (ROCA e COX, 1990). As formas predominantes para a permuta de sequências de DNA são as partículas de 12 nm e os bastonetes pequenos sendo que, as primeiras constituem a espécie que melhor representa a unidade fundamental a partir da qual forma-se o nucleofilamento RecA-DNA (BRENNER *et al.*, 1988). HEUSER e GRIFFITH (1989) observaram por análise de eletromicrografias, que estas partículas de 12 nmm são de fato anéis fechados e compostos por 6 a 8 monômeros. WILSON e BENIGH (1990) observaram em ensaios "in vitro" que a associação de formas oligoméricas é

entrópicamente orientada e que a cinética de agregação é bifásica. Na primeira fase ocorre simples associação de filamentos protéicos e na segunda fase, devido a interação lateral dos filamentos, formam-se os feixes. A formação de filamentos (ou bastonetes) envolve a captação de um próton e uma molécula de cloreto de magnésio do meio de reação e a liberação de 5 ou 6 moléculas de cloreto de sódio. A associação, neste caso, é orientada pela liberação de cerca de 70 moléculas de água.

## 1.2 FUNÇÃO DA PROTEÍNA RecA NA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Embora as células bacterianas sejam, em geral, geneticamente haplóides, a formação de pares heterozigotos necessária para se detectar recombinação homóloga pode ocorrer em uma célula em várias circunstâncias. A célula pode ser transitóriamente diplóide devido à introdução de DNA exógeno por conjugação, transdução ou transformação. As moléculas de DNA introduzidas e viáveis para participar da recombinação podem ser circulares ou lineares, de fita simples ou dupla ou, ainda, uma mistura destas e definirão o mecanismo molecular de recombinação (RADDING, 1989). Estudos genéticos têm demonstrado que, em *E. coli*, o processo de recombinação homóloga é dependente de diversas proteínas dentre as quais destacam-se a proteína RecBCD, a proteína RecA e a proteína SSB (ROMAN e KOWALCZYKOWSKI, 1986; WEST, 1988; SMITH, 1988; ROMAN e KOWALCZYKOWSKI, 1989c). As primeiras sugestões de que o produto do gene *recA* poderia desempenhar função direta durante a

recombinação resultaram de experimentos com mutantes *recA* sensíveis à radiação ultravioleta (WILLETS, 1969) e da descoberta que a proteína RecA apresenta atividade ATPásica dependente da presença de DNA de fita simples e de ions magnésio (WEST *et al.*, 1980).

"In vitro" ou "in vivo", a proteína RecA é capaz de promover troca recíproca de segmentos de nucleotídeos entre duas moléculas de DNA. Esta troca ou permuta se processa através da formação de uma estrutura em X ou em cruz, a estrutura de Holliday (Figura 1). As regiões onde se verificam estas trocas são ditas heteroduplex, uma vez que estão formadas por uma fita de cada molécula de DNA parental.

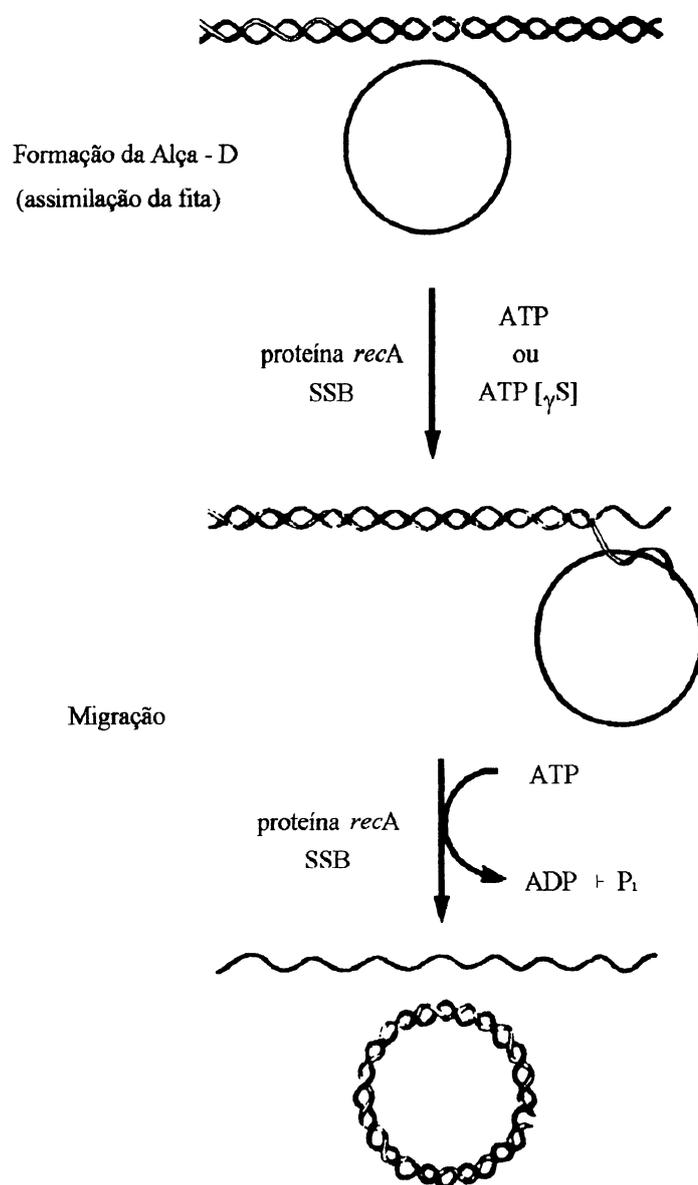
A capacidade de uma cadeia polipeptídica de tamanho relativamente pequeno, como o da proteína RecA, em executar o complexo processo de permuta de segmentos entre duas moléculas de DNA, pode ser atribuída à capacidade de complexação desta proteína ao DNA para formar filamentos nucleoprotéicos helicoidais e sinérgicamente orientados que favorecem o pareamento e a troca de segmentos (FLORY *et al.*, 1984; BRYANT *et al.*, 1985; MÜLLER *et al.*, 1990). "In vitro" a proteína RecA promove o pareamento de duas fitas simples de DNA complementares em uma reação de renaturação ATP-independente (BRYANT e LEHMAM, 1985; RAMDAS *et al.*, 1989); de uma fita simples de DNA com uma molécula de DNA duplex ou ainda, de duas moléculas de DNA duplex (CUNNINGHAM *et al.*, 1980; DAS GUPTA *et al.*, 1980). Nos dois últimos casos, o pareamento é seguido de troca de segmentos que resulta em recombinação.

A reação que tem servido de modelo para a descrição das fases da recombinação promovida pela proteína RecA "in vitro",

é aquela que descreve a formação de um DNA heteroduplex a partir de um segmento de DNA duplex linear e uma molécula de DNA de fita simples circular, ambos derivados de bacteriófago (COX e LEHMAN, 1981a, COX e LEHMAN, 1981b) (Figura 4). Pelo fato de esta reação não envolver permuta propriamente dita, ela é conhecida como reação de troca assimétrica (asymmetric exchange) (RADDING, 1989). Da reação de troca assimétrica resultam moléculas DNA heteroduplex circulares e segmentos de DNA de fita simples lineares. Em presença da proteína SSB (MEYER e LAINE, 1990), moléculas da proteína RecA ligam-se ao DNA de fita simples circular promovendo seu pareamento com moléculas de DNA duplex. Como consequência deste pareamento de bases tem-se a transferência de segmentos homólogos de uma molécula para outra. Devido ao avanço das pesquisas esta reação está atualmente dividida em três fases distintas, a pré-sinapse, a sinapse e a migração que completa a troca das fitas (FLORY *et al.*, 1984; KAHN e RADDING, 1984; JULIN *et al.*, 1986) (Figura 5).

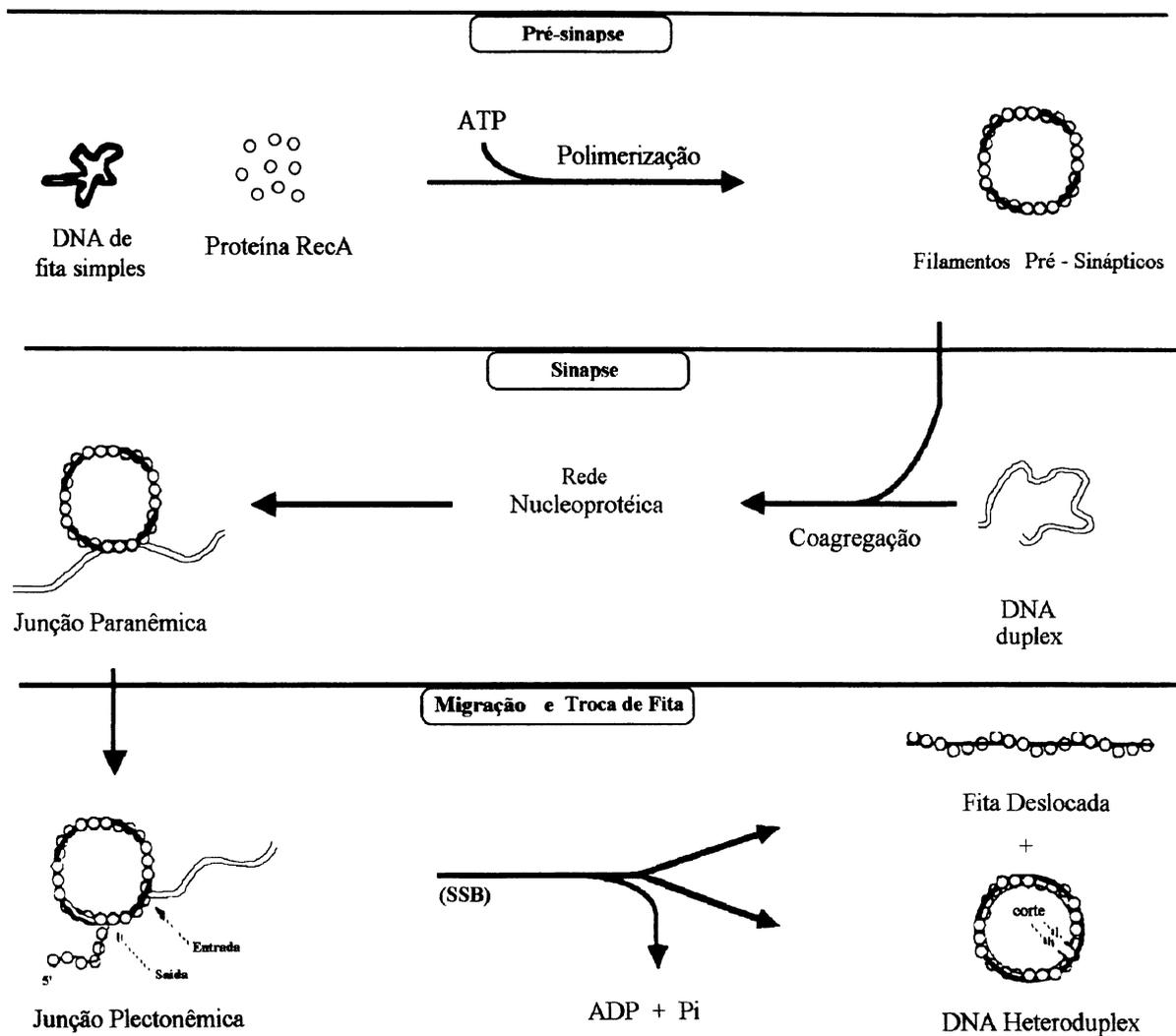
Na pré-sinapse moléculas de proteína RecA polimerizam-se envolvendo o DNA de fita simples circular na direção 5' → 3' (REGISTER III e GRIFFITH, 1985, KONFORTI e DAVIS, 1990), dando origem aos complexos nucleoprotéicos "RecA-DNA de fita simples" chamados complexos de iniciação. A ligação das moléculas protéicas ao DNA é cooperativa e ATP-dependente (REGISTER III e GRIFFITH, 1985; KONFORTI e DAVIS, 1990; PINSINCE *et al.*, 1993) e, o sentido reflete a polaridade da reação de migração (STASIAK *et al.*, 1988). A complexação da proteína RecA ao DNA na forma B promove 40-50% de desenrolamento e extensão da dupla hélice (STASIAK e DI CAPUA, 1982; PUG e COX, 1987a). O passo

FIGURA 4 - MODELO PARA A REAÇÃO DE TROCA ASSIMÉTRICA DE  
PROMOVIDA PELA PROTEÍNA RecA



Representação esquemática da formação de moléculas de DNA heteroduplex pela transferência de uma fita simples de um DNA duplex para um DNA de fita simples circular (Cox e Lehman, 1981a).

FIGURA 5 - FASES DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PROMOVIDA PELA  
PROTEÍNA RecA



Esquema da divisão do processo de recombinação homóloga em três fases: pré-sinapse, sinapse e migração seguida de troca completa das fitas de DNA (Rao *et al.*, 1990).

por par de base eleva-se de 3,4 Å para 5,1 Å enquanto que o passo por volta da hélice reduz-se de 34,3 Å para 19,4 Å (EGELMAN e STASIAK, 1986). A formação destes complexos, inicialmente dificultada pela estrutura secundária do DNA de fita simples, é favorecida pela presença da proteína SSB que se liga em alguns pontos do mesmo DNA estabilizando-o em fita simples não pareada (MUNIYAPPA *et al.*, 1984; MORRICAL e COX, 1990). BRYANT *et al.* (1985) observaram através de titulação da ligação do DNA de fita simples do fago  $\phi$ X174 com a proteína RecA e em presença de ATP, que a estequiometria de ligação RecA/DNA é de 1 monômero de RecA para 3,7 nucleotídeos de DNA. Este valor foi muito próximo ao valor de 1 monômero de RecA para 4 nucleotídeos relatado por MORRICAL e COX (1985) após investigarem a ligação RecA/DNA pela técnica de dispersão da luz. Depois de formados, os complexos de iniciação pareiam aleatoriamente com as moléculas de DNA duplex para formar a rede nucleoprotéica da sinápse. Neste momento ocorrem múltiplas interações entre os complexos de iniciação e as moléculas de DNA duplex a proteína RecA apresenta capacidade única de parear moléculas de DNA homólogas por pequenos períodos de tempo (HONIGBERG *et al.*, 1986; RADDING, 1989). Esta propriedade permite a um DNA-sonda identificar seu fragmento de DNA duplex homólogo mesmo que este esteja disperso entre milhares de moléculas de DNA heterólogo (HONIGBERG *et al.*, 1986).

Procurando explicar o mecanismo de reconhecimento das seqüências homólogas durante o pareamento, RADDING (1978) sugeriu que a formação das pontes de hidrogênio entre as seqüências complementares das duas moléculas de DNA é precedida pela separação das duas fitas de DNA duplex. Em contraposição,

HOWARD-FLANDERS *et al.* (1984) sugeriram que o pareamento homólogo estabelece-se antes da separação das fitas e através da formação de novas pontes de hidrogênio entre as bases complementares. Em ambos os casos a proteína RecA envolve totalmente o DNA de fita simples enquanto o DNA duplex permanece livre. Ensaio realizado por RAO *et al.* (1990, 1991, 1993), UMLAUF *et al.* (1990) e por CHIU *et al.* (1993) confirmaram que a proteína RecA promove, como parte do mecanismo de recombinação, a formação de estruturas intermediárias compostas pelas três fitas de DNA. Eletromicrografias de moléculas recombinantes mostraram que o DNA duplex homólogo é captado para o interior do complexo nucleoprotéico em uma estequiometria de um par de bases para um nucleotídeo (MÜLLER *et al.*, 1990). À medida que o filamento nucleoprotéico e o DNA interagem, o DNA duplex também assume uma configuração estendida (em média 37% em relação a sua forma B) que permite a busca da seqüência homóloga (PUG e COX, 1988). Quando as regiões homólogas são finalmente alinhadas, cessa-se a busca e forma-se um complexo pareado estável (HOWARD-FLANDERS *et al.*, 1984).

No pareamento sináptico podem ser distinguidas duas estruturas distintas com base em suas características topológicas e de estabilidade, as junções paranêmicas e as junções plectonêmicas (RIDDLES e LEHMAN, 1985a; RIDDLES e LEHMAN, 1985b; ZLOTNICK *et al.*, 1990). Nas junções paranêmicas ocorre pareamento entre as moléculas de DNA de fita simples e a de DNA duplex sem, no entanto, ocorrer ligação entre as bases. A formação deste complexo de contato é acompanhada de pequeno desenrolamento da molécula de DNA duplex e não requer hidrólise

de ATP (FLORY *et al.*, 1984). Este tipo de junção pode ocorrer na ausência de extremidades livres na molécula de DNA duplex e é instável em temperaturas elevadas (LEWIN, 1990). As junções paraméricas formam-se muito rapidamente e são presumivelmente precursoras das junções plectonômicas (JULIN *et al.*, 1986). Nas junções plectonômicas, a fita de DNA circular invade a molécula de DNA duplex através de sua extremidade 3' e enrola-se com seu segmento de DNA complementar (KONFORTI e DAVIS, 1987; KONFORTI e DAVIS, 1990). Este tipo de junção ocorre somente se a molécula de DNA duplex possuir a extremidade 3' livre e complementar à fita simples de DNA circular (KONFORTI e DAVIS, 1987; KONFORTI e DAVIS, 1990). A formação das junções plectonômicas requer hidrólise de ATP (COX e LEHMAM, 1987) e depois de formadas, estas junções são estáveis em temperaturas elevadas (RIDDLES e LEHMAN, 1985b). O produto da sinapse é portanto um complexo ternário que contém o complexo RecA-DNA de fita simples e o DNA duplex.

A migração da fita simples de DNA inicia-se logo após a formação do complexo ternário. Durante a migração, a junção heteroduplex nascente é estendida até que ocorra a transferência total da fita de DNA complementar. Esta fase não foi considerada por RIDDLES e LEHMAN (1985b) um passo independente na troca assimétrica e sim uma etapa de continuação da junção plectonômica. Entretanto, KOWALCZKOWSKI (1987) contrargumenta que estas duas fases podem ser distinguidas experimentalmente uma vez que para a formação da junção plectonômica são necessários aproximadamente trezentos pares de bases homólogas enquanto que o processo de migração envolve em torno de seis mil pares de bases homólogas.

Observações de que a migração da fita de DNA linear ao longo do complexo RecA-DNA de fita simples circular requer a hidrólise de ATP e se processa no sentido único indicaram o envolvimento da proteína RecA como catalisadora da reação de migração (COX e LEHMAM, 1987). A reação de migração entre a fita simples do DNA circular e a fita simples do DNA linear se processa na direção  $3' \rightarrow 5'$  em relação à fita negativa do DNA duplex a qual serve de acceptora durante a formação do heteroduplex (COX e LEHMAN, 1981b; JAMES *et al.*, 1982) (Figura 3). KONFORTI e DAVIS (1990 e 1991) demonstraram que não ocorre reação de migração quando somente a extremidade 5' da fita positiva do DNA duplex está disponível para parear com o DNA circular de fita simples.

A proteína RecA contribui com duas importantes propriedades para a migração de um dos ramos da molécula de DNA duplex. Ao promover uma orientação única de migração ela garante que moléculas de DNA heteroduplex contendo milhares de pares de bases sejam formadas eficientemente. Enquanto que novecentos e cinquenta pares de bases migram em dez minutos num processo de migração espontânea, na reação de migração catalisada pela proteína RecA três mil pares de bases migram no mesmo período de tempo (COX e LEHMAM, 1987). Ao contrário do processo espontâneo, a migração da fita de DNA favorecida pela proteína RecA pode prosseguir eficientemente na presença de pequenos segmentos com bases não pareadas ou na presença de lesões contendo bases não codificadoras como os dímeros de pirimidina (LIVNEH e LEHMAN, 1982; DAS GUPTA e RADDING, 1982; CHOW *et al.*, 1986).

Estudos de sistemas de proteção das três fitas de DNA envolvidas na troca assimétrica contra a ação de nucleases,

mostraram que a proteína RecA permanece ligada à fita simples circular originalmente presente no complexo pré-sináptico (CHOW *et al.*, 1986). Além disso, a fita simples linear (positiva) que vai sendo liberada torna-se progressivamente protegida pela proteína RecA a partir de sua extremidade 5' (CHOW *et al.*, 1986; PUGH e COX, 1987b).

### 1.3 FORMAÇÃO DE MOLÉCULAS DE DNA HETERODUPLEX PROMOVIDA PELAS PELAS PROTEÍNAS RecA E RecBCD

Como mencionado anteriormente, a complexação da proteína RecA ao DNA durante a catálise da recombinação homóloga requer a presença de segmentos de DNA de fita simples. No modelo descrito (Figuras 4 e 5), o DNA de fita simples foi representado na forma de uma molécula de DNA de fita simples circular ao qual a proteína RecA se liga, dando início ao processo de incorporação de um segmento DNA homólogo. Entretanto, a formação de DNA heteroduplex durante a recombinação não está restrita a substratos em que uma das moléculas envolvidas seja previamente um DNA de fita simples. Um novo modelo para a recombinação homóloga baseado nas propriedades das proteínas RecA e RecBCD e na divisão das vias da recombinação sugerida por CLARK (1973), foi proposto por Smith e colaboradores em 1985. Este modelo focaliza o processo da recombinação do fago lambda e descreve a participação da proteína RecBCD (Figura 6). A presença de um segmento de DNA de fita simples iniciador do processo, está condicionada à existência de uma molécula de DNA duplex contendo uma

extremidade livre a qual a proteína RecBCD possa ligar-se.

A proteína RecBCD, ou exonuclease V, é um complexo enzimático heterotrimérico com atividade de nuclease (MacKAY e LINN, 1974; MacKAY e LINN, 1976), adenosinatrifosfatase (ROMAN e KOWALCZYKOWSKI, 1989a) e helicase (ROMAN e KOWALCZYKOWSKI, 1989b). Os polipeptídeos RecB, RecC e RecD apresentam, respectivamente, massa molecular de 134 kDa, 129 kDa e 67 kDa (EGGLESTON e KOWALCZYKOWSKI, 1993).

A holoenzima RecBCD degrada, de forma exonucleolítica, segmentos de DNA de fita dupla e de fita simples. Cliva de forma endonucleolítica segmentos de DNA de fita simples. Apresenta atividade nucleásica específica para determinada seqüência de nucleotídeos presente no DNA de *E. coli*, o sítio  $\chi$  (Chi). Promove desenrolamento de segmentos DNA duplex associado às atividades de helicase e ATPase, produzindo regiões de DNA de fita simples acessíveis às proteínas SSB e RecA. Todas as atividades da enzima RecBCD dependem da hidrólise de ATP, exceto a atividade de endonuclease sobre o DNA de fita simples, que utiliza o ATP como um efetor positivo (EGGLESTON e KOWALCZYKOWSKI, 1993). Sua atividade nucleásica é inibida por altas concentrações de ATP (MENETESKI e KOWALCZYKOWSKI, 1989), pela proteína SSB e por íons cálcio (ROMAN e KOWALCZYKOWSKI, 1989a), fatos que auxiliaram na caracterização de sua atividade de helicase (ROMAN e KOWALCZYKOWSKI, 1989b e 1989c).

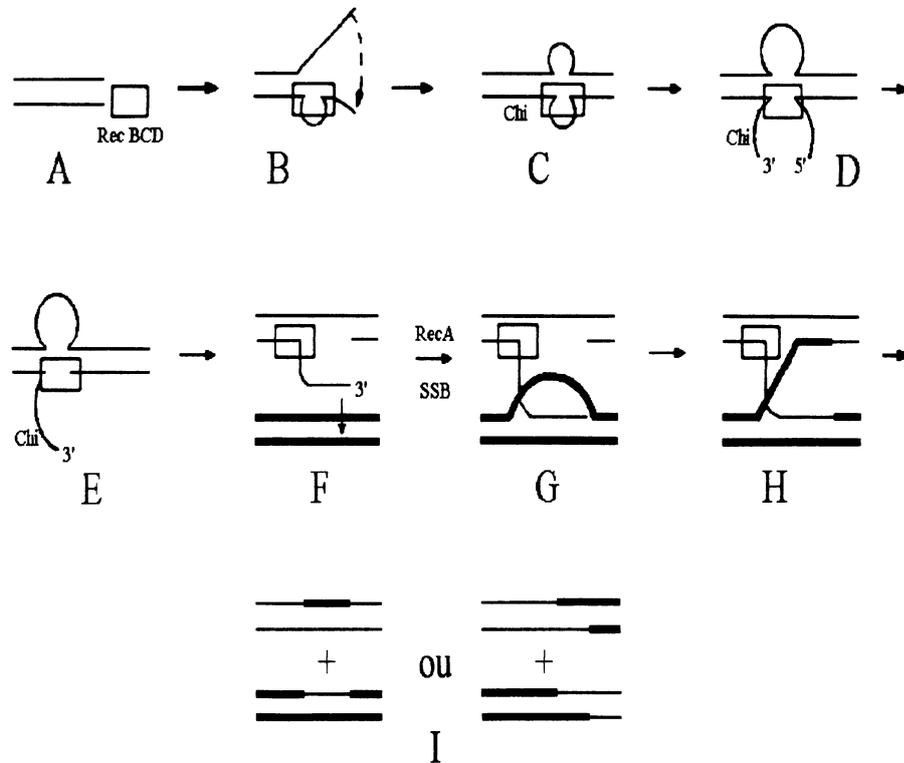
Informações sobre as funções de cada subunidade na catálise pela holoenzima foram obtidas em diversas análises, incluindo o estudo das unidades individuais (BOEHMER e EMERSON, 1992; MASTERSON *et al.*, 1992), de combinações (PALAS e KUSHNER, 1990; MASTERSON *et al.*, 1992) e de mutações (KORANGY e

JULIN, 1992a; 1992b; 1992c) das subunidades, e comparações entre seqüências de aminoácidos (GORBALENYA *et al.*, 1988). Embora diante de resultados e conclusões contraditórios, é de consenso atribuir-se atividade de ATPase DNA-dependente e DNA-helicase ao par RecBC. Sugere-se ainda, que a subunidade RecD apresente atividade de nuclease (PALAS e KUSHNER, 1990; KORANGY e JULIN, 1993) sem no entanto, desconsiderar que esta subunidade liga-se ao ATP (JULIN e LEHMAN, 1987) e compartilha homologia de aminoácidos com outras helicases (GORBALENYA *et al.*, 1988).

Células em crescimento ativo apresentam regiões de DNA de fita simples durante a replicação e a transcrição, nas falhas pós-replicação e também por digestão exonucleolítica ao nível de um ponto de corte em uma fita simples ou de um ponto de quebra em uma fita dupla (WEST, 1988; MAGGE e KOGOMA, 1990). Formam-se então nestes locais condições ideais para o início da recombinação. Além disso, encontram-se distribuídos no genoma do fago lambda e de *E. coli* sítios preferenciais para recombinação (WEST, 1988). Um destes sítios chamado sítio Chi ( $\chi$ ) foi identificado em *E. coli* e no bacteriófago lambda por Stahl *et al.* (STAHL, 1979). A análise das seqüências de nucleotídeos demonstrou que os sítios Chi consistem de uma seqüência de oito nucleotídeos, 5'-G-C-T-G-G-T-G-G-3', que é reconhecida pela enzima RecBCD. A análise de fragmentos *EcoRI* do DNA de *E. coli* clonados no fago lambda, revelou a existência de sítios Chi a cada 5 kb em média (MALONE *et al.*, 1978; FAULDS *et al.*, 1979). A presença destes sítios no cromossomo do fago lambda estimula a recombinação pela via RecBCD mas não pelas vias  $\lambda$ Red, RecE ou RecF (CHENG e SMITH, 1984).

No modelo representado na Figura 6, a enzima RecBCD entra por uma extremidade do DNA duplex linear e move-se rapidamente através dele desenrolando-o a partir da direita para a esquerda (passos A e B). Uma deselicoidização eficiente inicia-se a partir de pontas retas, não coesivas, ou que tenham pequenos segmentos de fita unifilamentar contendo até 20-30 nucleotídeos (TAYLOR *et al.*, 1985a; HEITMAN *et al.*, 1989). Moléculas de DNA duplex circulares, seja superenroladas, cortadas ou contendo falhas de 10 a 774 nucleotídeos ou ainda moléculas lineares com extremidades de DNA de fita simples com mais de 30 nucleotídeos não são desenroladas pela enzima RecBCD (TAYLOR e SMITH, 1985a). Ao encontrar uma seqüência Chi a enzima RecBCD cliva a fita de DNA ao nível de três a seis nucleotídeos abaixo da ponta 3' do octâmero (TAYLOR *et al.*, 1985a; CHENG e SMITH, 1987). Esta clivagem produz um segmento de DNA unifilamentar que servirá como região de complexação para a proteína RecA. A presença da proteína SSB, previne o reenrolamento imediato das fitas garantindo um segmento de DNA de fita simples apto a se complexar com a proteína RecA para formar o complexo RecA-DNA de fita simples (MEYER e LAINE, 1990). O complexo RecA-DNA-SSB invade o segmento de DNA duplex homólogo produzindo uma estrutura em forma de alça, a alça D (passo G). A fita unifilamentar deslocada durante a invasão une-se a extremidade livre da primeira molécula para formar a junção de Holliday (passo F). A migração e posterior resolução desta junção dará origem às moléculas recombinantes (passo I). Lacunas existentes após a clivagem da junção de Holliday serão preenchidas pela enzima DNA polimerase e seladas pela enzima DNA ligase (SMITH, 1988).

FIGURA 6 - MODELO PARA A RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA PROMOVIDA PELAS PROTEÍNAS RecA E RecBCD



Representação esquemática do reconhecimento dos sítios "Chi" pela enzima RecBCD. A clivagem do DNA nestes pontos produz uma extremidade unifilamentar por onde se iniciará o processo de recombinação. Este modelo foi proposto por Smith e colaboradores para explicar a recombinação do fago lambda pela Via RecBCD (Smith, 1988).

TAYLOR e SMITH (1990) investigaram a possibilidade da enzima RecBCD ser capaz de resolver intermediários de recombinação contendo junções de Holliday. Para esta análise foi utilizada como substrato uma junção sintética de DNA em forma de X. Como resultado, estes pesquisadores observaram que a enzima RecBCD purificada pode clivar o substrato para formar produtos de recombinação mas somente se a mesma puder acessar a junção através de duas extremidades lineares livres. Esta condição mostrou-se contrária à formação de DNA recombinante em cruzamentos do fago lambda pela via RecBCD. Nestes cruzamentos a enzima tem acesso somente a uma ponta livre e oposta ao sítio cos após este ter sido clivado pela enzima terminase (STAHL *et al.*, 1983). Esta permuta simples garante contudo, em presença de moléculas parentais completas, recombinantes viáveis. Assim, TAYLOR e SMITH (1990) concluíram que a enzima RecBCD intracelular não pode clivar junções de Holliday pré-existentes embora possa clivar aquelas cuja formação participou. Em investigações posteriores MÜLLER *et al.* (1991) relataram resultados complementares aos de TAYLOR e SMITH (1990) sobre a participação da enzima RecBCD na resolução das junções de Holliday. Nestes ensaios foram utilizadas como substrato junções geradas pela proteína RecA "in vitro", uma reação que mimetiza a reação "in vivo". As conclusões apresentadas ratificaram aquelas de que a enzima RecBCD é incapaz de promover a resolução específica da estrutura de Holliday e indicaram uma possível participação da proteína RuvC neste processo. Evidências de que esta proteína é capaz de resolver intermediários da recombinação promovida pela proteína RecA foram apresentadas posteriormente, por DUNDERDALE e

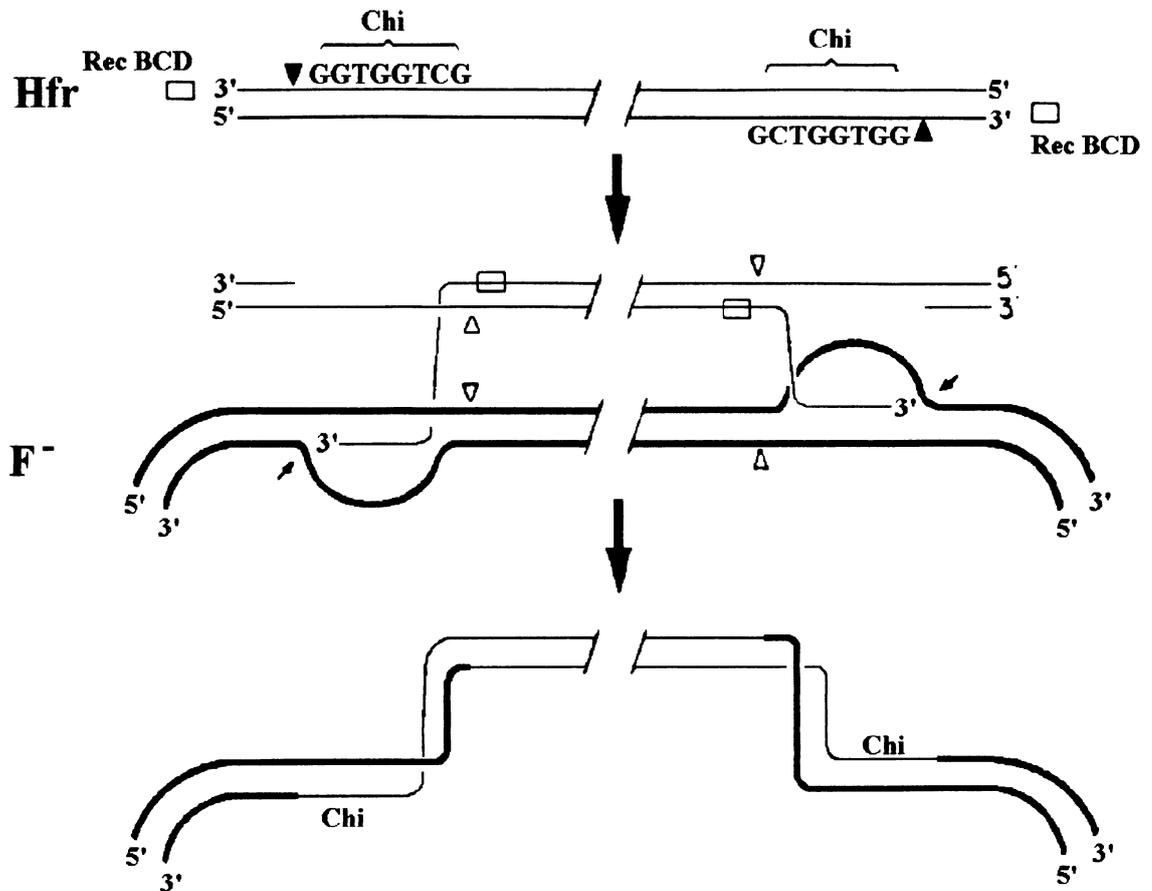
colaboradores (1991).

Uma extensão do modelo de Smith a ambas as extremidades de um fragmento Hfr está representada na Figura 7. Duas moléculas da enzima RecBCD, uma em cada extremidade, catalisam o processo de recombinação. Segundo ROMAN e KOWALCZYKOWISKI (1989a), devido a alta afinidade da enzima RecBCD por pontas livres de DNA duplex, ambas as pontas do fragmento Hfr são rapidamente envolvidas em recombinação. TAYLOR, citado por SMITH (1991), sugere que a enzima RecBCD purificada é capaz de reconhecer apenas um sítio Chi e clivar o DNA apenas em um ponto após o que, torna-se inativa. Isto indica que uma molécula de RecBCD promoveria exatamente uma permuta de segmentos ao clivar a fita de DNA ao nível do sítio Chi mais próximo da extremidade livre da molécula de DNA. Assim, as duas pontas do segmento Hfr garantiriam duas permutas necessárias para a formação de um recombinante. Quando o segmento Hfr estivesse dividido em duas partes, quatro permutas poderiam ser produzidas.

O modelo que envolve a proteína RecBCD difere daquele proposto por COX e LEHMAN (1981a; 1981b) (Figura 4) principalmente no que se refere a origem da fita única de DNA. Este modelo não invalida aquele anteriormente descrito uma vez que, "in vitro", a proteína RecA é capaz de usar a fita simples de DNA criada pela atividade de helicase da proteína RecBCD sobre o DNA duplex, bem como a fita simples obtida por desnaturação do DNA duplex após aquecimento (ROMAN *et al.*, 1991).

Aos modelos descritos seguiram-se dois novos modelos propostos por ROMAN e KOWALCZYKOWISKI (1989c) e ROMAN *et al.* (1991). Ambos enfocam o pareamento homólogo dependente da

FIGURA 7 - MODELO PROPOSTO PARA A INTEGRAÇÃO DE UM FRAGMENTO DE DNA Hfr ATRAVÉS DA VIA DE RECOMBINAÇÃO RecBCD



Representação esquemática da aplicação do modelo da figura 6 para ambas as extremidades de um fragmento DNA Hfr durante sua integração em parte de um DNA cromossomal circular F<sup>-</sup> (Smith, 1991).

atividade de helicase da proteína RecBCD. O primeiro modelo é uma reação entre um DNA de fita simples circular e um DNA duplex linear, dependente da capacidade da proteína RecA promover renaturação. O segundo é uma reação entre um DNA duplex linear e um DNA duplex circular superenrolado, dependente da capacidade da proteína RecA em invadir o DNA duplex linear por uma de suas extremidades. Em ambas as reações, o desenrolamento do DNA duplex linear pela enzima RecBCD é considerado essencial. ROMAM *et al.* (1991) sugerem que a segunda reação pode ser representativa de uma situação presente na via de recombinação RecBCD "in vivo". Além disso, a formação de DNA heteroduplex através da renaturação promovida por RecA pode representar um mecanismo alternativo para o reparo de lesões causadas pela radiação ultravioleta. Assim, tanto a capacidade de renaturação do DNA bem como a de invadir moléculas de DNA duplex conferidas à proteína RecA, podem ser significativas "in vivo" e dependentes da condição celular.

#### 1.4 FUNÇÃO AUXILIAR DA PROTEÍNA SSB NA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Embora a proteína RecA promova uma variedade de reações de permuta de segmentos entre moléculas de DNA, o processo da recombinação homóloga como um todo não pode ser creditado unicamente a esta proteína. Como citado anteriormente, a ligação da proteína RecA ao DNA da fita simples circular acontece na presença da proteína SSB (FLORY e RADDING, 1982), uma proteína que se liga unicamente à segmentos de DNA fita simples pelos quais tem alta afinidade (DRESSLER e POTTER,

1982; MEYER e LAINE, 1990).

A proteína SSB tem massa molecular de 18.500 Daltons e liga-se ao DNA de fita simples na forma de um tetrâmero (MEYER e LAINE, 1990). Através desta ligação, a proteína SSB favorece o desenrolamento do DNA duplex e, sob certas condições, pode promover a reassociação da fita simples à fita duplex (SMITH, 1988).

Durante a replicação do DNA, a proteína SSB desempenha importantes e variadas funções (MEYER e LAINE, 1990): a) acentua a desestabilização da dupla hélice de DNA pelas helicases, b) previne o reanelamento de filamentos simples e protege-os contra digestão por nucleases, c) auxilia na organização e estabilização das origens de replicação, d) contribui para a associação dos polissomos, e) intensifica a fidelidade da enzima DNA polimerase III podendo promover sua ligação ao DNA molde e, f) favorece o deslocamento da polimerase através da desestabilização da estrutura secundária do DNA a qual, pode causar interrupção temporária da replicação ou mesmo dissociação da enzima.

Sua participação nas reações de troca de segmentos entre moléculas de DNA é considerada importante por afetar a ligação da proteína RecA ao DNA de fita simples favorecendo, o processo de permuta ou de transferência de segmentos. A proteína SSB facilita as reações promovidas pela proteína RecA provavelmente através de sua ligação ao excesso de regiões de DNA de fita única permitindo à proteína RecA concentrar-se nas regiões de permuta propriamente ditas (KOWALCZYKOWSKI *et al.*, 1987; KOWALCZYKOWSKI e KRUPP, 1987). Além disso, sua presença contínua estabiliza os filamentos pré-sinápticos através da

remoção da estrutura secundária da fita simples de DNA (MORRICAL *et al.*, 1986; KOWALCZYKOWSKI *et al.*, 1987; MORRICAL e COX, 1990). Esta propriedade está de acordo com o papel de proteína SSB como uma proteína que promove a desestabilização da hélice de DNA e com a observação de que outras proteínas desestabilizadoras da hélice podem substituí-la nas reações de troca de segmentos de DNA "in vitro" (KOWALCZYKOWSKI, 1987). CHOW *et al.* (1988) demonstram que a proteína SSB impede a reversão da reação de recombinação devida à invasão do DNA heteroduplex pela fita de DNA descolada. Desta forma, a proteína SSB garante a estabilidade das moléculas heteroduplex formadas. Esta invasão foi considerada responsável pela lentidão e possível não conclusão da troca de segmentos em reações onde somente a proteína RecA está presente (CHOW *et al.*, 1988). Pela supressão da reversão, a proteína SSB contribui para a diminuição das barreiras topológicas que podem interferir na propagação da troca de segmentos.

A interação da proteína SSB com a enzima RecBCD, reflete as diversas funções deste complexo protéico (MEYER e LAINE, 1990). Estudos de ligação indicaram que a proteína RecBCD prefere segmentos de DNA de fita simples como substratos para sua atividade de helicase (TAYLOR e SMITH, 1985b). Ao contrário da especificidade observada no desenrolamento da dupla hélice de DNA, ensaios "in vitro" indicaram uma ampla interação com o substrato durante a função nucleásica. Esta interação torna-se mais evidente na ausência da proteína SSB quando o DNA de fita simples não está protegido da digestão. Em presença da proteína SSB, o DNA de fita simples torna-se resistente às atividades de endo e exonuclease de RecBCD (MacKAY e LINN, 1974). Segmentos

de DNA duplex lineares continuam sendo desenrolados. DNA duplex circular contendo pequenas segmentos de fita simples também são resistentes à hidrólise em presença da SSB (MackAY e LINN, 1976). Assim, a proteína SSB favorece a atividade de helicase de RecBCD enquanto, inibe sua atividade de exonuclease.

Com relação a recombinação pela via RecBCD, estudos "in vitro" suportam a necessidade de ambas as proteínas na geração de segmentos de DNA de fita simples, os substratos da reação de recombinação. Neste caso, SSB está envolvida novamente na desestabilização da hélice de DNA, na proteção contra ataques nucleolíticos e na prevenção da renaturação. Em conclusão, embora não esteja envolvida diretamente na formação dos produtos de recombinação, a proteína SSB é essencial para manutenção da disponibilidade e estabilidade dos substratos.

#### 1.5 FUNÇÃO DA PROTEÍNA RecA NA RESPOSTA SOS EM *Escherichia coli*

Os seres vivos estão continuamente expostos a uma variedade de agentes naturais ou sintéticos que podem danificar seu DNA. Lesões no DNA representam um sério desafio para a célula bacteriana uma vez que favorecem o aparecimento de mutações diversas ou causam sua morte. A possibilidade destas células sobreviverem em um meio hostil ao seu DNA pode ser diretamente relacionada à sua capacidade de reparar de alguma forma, eventuais danos introduzidos. Estudos envolvendo *E. coli*, permitiram dividir as lesões indutoras de mutação em dois grupos de acordo com efeito do agente causador e o meio de reparo da lesão (WALKER, 1984). O primeiro grupo inclui lesões

que conduzem a mutações por erros no pareamento de bases durante a replicação do DNA. Dentre os agentes causadores destas mutações estão N-metil N-nitrosouréia (MNU), N'-metil N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) e metanosulfonato de etila (EMS) os quais produzem uma proporção relativamente alta de O<sup>6</sup>-alquilguanina e O<sup>4</sup>-alquiltimina (BRAKIER e VERLEY, 1970; SCHENDAL *et al.*, 1978; SCHENDAL e DEFAIS, 1980; ECKERT e DRINKWATER, 1987; GORDON *et al.*, 1988; HORSFALL *et al.*, 1990). As bases modificadas podem produzir pares incorretos durante a replicação, dando origem às mutações por transição G-C → A-T ou A-T → G-C (SINGER, 1986; COUTO *et al.*, 1989). Estas lesões podem ser corrigidas pela enzima O<sup>6</sup> metil-guanina DNA transferase (MT), produto do gene *ada*, a qual reconhece a base alquilada no DNA duplex e remove o grupo alquil para para um resíduo de aminoácido da própria cadeia protéica (WALKER, 1985; VERICAT *et al.*, 1988). Quando ocorre ligação de um radical alquil ao N<sup>3</sup> da adenina, forma-se uma base modificada, a N<sup>3</sup>-metiladenina, que bloqueia a forquilha de replicação e pode, se não houver correção, causar a morte da célula (KARRAN e LINDAHL, 1980). Nestes caso, verifica-se a atividade da enzima 3-metil-guanina DNA glicosilase II (TAGII), produto do gene *alkA*, que remove purinas alquiladas na posição N<sup>3</sup> ou N<sup>7</sup> e pirimidinas alquiladas na posição O<sup>2</sup> (KARRAN *et al.*, 1982; EVENSEN e SEEBERG, 1982; WALKER, 1985). Os sítios apurínicos e apirimidínicos resultantes são reparados por um processo "livre de erro" que envolve endonucleases específicas para estes sítios (endonucleases AP), DNA polimerase I e DNA ligase (FOSTER e EISENSTADT, 1985). Estes dois tipos de reparo caracterizam o processo conhecido como Resposta Adaptativa

(JEGGO *et al.*, 1977; TEO *et al.*, 1986).

O segundo grupo inclui lesões causadas pela radiação ultravioleta (UV), metanosulfonato de metila (MMS), óxido de 4-nitroquinolina (4NQO), aflotoxina B<sub>1</sub>, bleomicina C e dimetilfosfato de 2,2 diclorovinil (DDVP ou diclorvos) (KONDO *et al.*, 1970; BRIDGES *et al.*, 1973; DRAKE e BALTZ, 1976; POVIRK e HOULGRAVE, 1988; BECKER e WANG, 1989; HORSFALL *et al.*, 1990). A radiação ultravioleta causa a incorporação incorreta de nucleotídeos durante a replicação. Este erro se deve a presença de fotoprodutos de radiação no DNA molde (LOVETT Jr. *et al.*, 1989b; BECKER e WANG, 1989). Os principais fotoprodutos produzidos pela luz ultravioleta são dímeros de pirimidina ciclobutano e, menos frequentemente, as lesões dipimídicas 6-4 (ROSENBERG e ECHOLS, 1990). Os agentes químicos por sua vez, promovem pela alquilação ou oxidação de bases a substituição das mesmas durante a replicação do DNA. Desta forma, ocorrem mutações pontuais por transição G-C → A-T e por transversão G-C → T-A. A proporção de transversões em relação as transições é consideravelmente mais elevada (KONDO *et al.*, 1970; SHINURA *et al.*, 1983). O reparo das lesões causadas por este grupo de agentes depende da indução de um sistema celular especial que pode levar ao aparecimento de novas mutações (WITKIN, 1976; WALKER, 1984). Este sistema é conhecido como Resposta SOS (SOS response), Reparo SOS (SOS repair), Sistema SOS (SOS system), Função SOS (SOS function) (WALKER, 1984) ou ainda, Reparo propenso a erro (error-prone repair) (SEDGWICK, 1975). Esta última designação deve-se ao fato da sobrevivência celular estar intrinsecamente relacionada à ocorrência de mutação.

O limite entre estes dois grupos confunde-se em determinados momentos uma vez que em certos casos torna-se difícil determinar se um agente lesivo ao DNA pertence ao primeiro ou ao segundo grupo. Como exemplo, FOSTER e EINSENSTADT (1985) relataram que a indução de transversões em *E. coli* por NTG é um processo SOS-dependente enquanto que as transições (citadas acima) permanecem SOS-independentes e relacionadas à resposta adaptativa (COUTO *et al.*, 1989). Além disso, existem lesões causadas por agentes como os ácidos nalidíxico e oxolínico que manifestam seu caráter SOS-dependente de forma indireta (McPARTLAND *et al.*, 1980). Estes antibacterianos interrompem a replicação do DNA pela inibição da subunidade A da enzima DNA girase (GELLERT *et al.*, 1977; SUGINO *et al.*, 1977) podendo também induzir a formação de um complexo DNA-enzima que leva à clivagem do DNA duplex (GELLERT *et al.*, 1977; SNYDER e DRLICA, 1979). As pontas de DNA de fita simples expostas durante estas clivagens constituem provavelmente os verdadeiros substratos para o reparo SOS-dependente (McPARTLAND *et al.*, 1980; SASSANFAR e ROBERTS, 1990).

Em 1971, DEFAIS *et al.* propuseram a "hipótese SOS" a qual foi posteriormente, desenvolvida por Radmam (WITKIN, 1976). Segundo esta hipótese, os genes *recA* e *lexA* de *E. coli* regulam um grupo de funções passíveis de desrepressão coordenada em resposta à lesões no DNA (WITKIN, 1976). A resposta SOS foi caracterizada a nível molecular como sendo o resultado da desrepressão de diversos genes não ligados mas regulados por *recA* e *lexA* (COHEN *et al.*, 1981; GUDAS e PARDEE, 1975; GUDAS e MOUNT, 1977; ROBERTS e ROBERTS, 1981; BLANCO *et al.*, 1982). A proteína LexA reprime a transcrição dos genes envolvidos na

resposta SOS, inclusive o *recA* e o próprio *lexA* (LITTLE, et al., 1981).

A designação SOS está relacionada com a existência de lesão no DNA e com a origem de um sinal regulador que causa a desrepressão simultânea de várias funções, provavelmente envolvidas no processo de sobrevivência celular (WITKIN, 1976). A natureza do "sinal indutor" e o processo que conduz à ativação da proteína RecA após a lesão do DNA permanecem controversos, refletindo a ampla variedade de tratamentos que levam a Resposta SOS (SMITH, 1985). Entretanto, os eventos bioquímicos que ocorrem no início e no final deste processo são conhecidos. A indução começa quando o DNA bacteriano passa a apresentar variadas formas de lesões, como por exemplo dímeros de pirimidina causados por luz ultravioleta (LOVETT Jr. et al., 1989b; BECKER e WANG, 1989) ou bases metiladas produzidas pelo agente alquilante MMS (MARGISON e O'CONNOR, 1973). O evento final, clivagem de repressores e de outras proteínas foi bem caracterizado em experimentos bioquímicos realizados por CRAIG e ROBERTS (1980); PHIZICKY e ROBERTS (1980); SHINAGAWA et al. (1988); BURCKHARDT et al. (1988) e NOHMI et al. (1988). COM o objetivo de detectar quantitativamente o produto imediato do sinal indutor, a proteína RecA ativada, SASSANFAR e ROBERTS (1990) utilizaram sistemas experimentais onde poderiam medir a velocidade de desaparecimento do repressor LexA intacto. Segundo estes pesquisadores, a clivagem do repressor LexA inicia-se logo após o dano no DNA e persiste até o desaparecimento do sinal indutor. Por este método foi demonstrado que o sinal indutor, após exposição das células à radiação ultravioleta, consiste de lesões que interrompem a

forquilha de replicação. Dímeros de pirimidina formados após irradiação, bloqueiam o progresso da replicação mas não previnem a separação das fitas, permitindo que a replicação possa ser reiniciada abaixo do ponto lesado. Ao contrário, lesões como as causadas pela mitomicina C, previnem a separação das fitas de DNA bloqueando de forma definitiva a replicação e a transcrição (SASSANFAR e ROBERTS, 1990). Neste caso, a formação do sinal indutor requer um processo celular independente da replicação descontínua do DNA. O reparo destas lesões depende da enzima exonuclease UvrABC a qual, introduz cortes em ambos os lados da lesão produzindo regiões de DNA de fita simples onde se inicia o reparo por recombinação (WALKER, 1985; SANCAR e SANCAR, 1988). Baseados nos resultados obtidos, SASSANFAR e ROBERTS (1990) interpretaram a ativação de RecA após exposição das células à luz ultravioleta, como uma consequência da criação um segmento de DNA unifilamentar por síntese descontínua e não da interrupção da forquilha de replicação. Empregando a mesma metodologia, estes dois pesquisadores demonstraram que o produto do gene *recF* também está envolvido na ativação de RecA em células irradiadas com luz ultravioleta, sugerindo que a proteína RecF participa, de alguma forma, no progresso da forquilha de replicação do DNA (SASSANFAR e ROBERTS, 1991).

A necessidade de uma forquilha de replicação ativa para a indução do sistema SOS após irradiação com luz ultravioleta, é contrária ao modelo apresentado por Lu e Echols para o reparo das mesmas lesões (LU e ECHOLS, 1987). Estes pesquisadores atribuem aos dímeros de pirimidina e/ou outras lesões causadas pela radiação ultravioleta no DNA duplex, a ativação direta da

proteína RecA. SASSANFAR e ROBERTS (1990) contrargumentam que a pouca ativação da proteína RecA "in vitro" (LU e ECHOLS, 1987), não seria suficiente para promover a autoclivagem de LexA "in vivo".

Em uma nova abordagem e empregando metodologia que dispensa a ação de um agente causador de lesão, HIGASHITANI *et al.* (1992) demonstraram que a simples presença de um segmento de DNA de fita simples é capaz de induzir o Sistema SOS em *E. coli*. Estes pesquisadores observaram que células bacterianas infectadas pelo fago filamentosso mutante R377, deficiente na iniciação da síntese de sua fita simples complementar, manifestam a resposta SOS nos mesmos moldes daquelas expostas a agentes danosos. Ao contrário do selvagem, o fago mutante R377 é incapaz de converter seu DNA de fita simples circular para a forma DNA duplex circular replicativa FR (FR = forma replicativa). A indução da resposta SOS foi monitorada pela indução da  $\beta$ -galactosidase em uma estirpe contendo o gene *lacZ* sob o controle do gene SOS *dinD* e também pela indução da síntese da proteína RecA. Resultados de indução positivos foram observados somente após infecção das células com o mutante R377. Uma vez que o DNA de fita simples do mutante R377 não serve como molde para a síntese do primer de RNA, HIGASHITANI *et al.* (1992) propuseram que esta fita de DNA sem uma forquilha de replicação é reconhecida provavelmente como um sinal pela proteína RecA. As observações destes pesquisadores complementam aquelas de SASSANFAR e ROBERTS (1990) e reforçam as indicações de que o sinal indutor da Resposta SOS é o próprio DNA de fita simples.

### 1.5.1 Regulação e Desenvolvimento da Resposta SOS

O sistema de reparo SOS é responsável pela resposta das células bacterianas a uma variedade de danos impostos ao seu DNA. Quanto a sua regulação, este sistema apresenta-se em dois estados, o estado de repressão em que a célula encontra-se em fase normal de crescimento e o estado de ativação, induzido pela exposição da célula à condições adversas que podem comprometer sua sobrevivência. Estudos genéticos e bioquímicos do mecanismo de indução deste sistema em *E. coli*, sustentam a função central da proteína RecA em sua regulação (LITTLE, 1983; LARMINAT e DEFAIS, 1989). Esta proteína é ativada "in vivo" por um estímulo ou sinal indutor produzido após a lesão do DNA (WITKIN e KOGOMA, 1984; SASSANFAR e ROBERTS, 1990; HIGASHITANI *et al.*, 1992). Nesta condição ela promove a autólise de repressores específicos e também contribui para a mutagênese decorrente da introdução de erros durante o reparo do DNA (mutagênese SOS). "In vitro", RecA é ativada por ligação estequiométrica ao DNA de fita simples, em presença de nucleosídeo trifosfato (ATP ou dATP) ou de seu análogo não hidrolisável (ATP $\gamma$ S) (CRAIG e ROBERTS, 1980; CRAIG e ROBERTS, 1981; TAKAHASHI e SCHNARR, 1989). Sua forma ativada é comumente representada como RecA\* (WITKIN e KOGOMA, 1984).

A participação da proteína RecA na resposta SOS e sua função na regulação deste processo foi sendo elucidada ao longo dos anos através da análise de diversos mutantes *recA* (McPARTLAND, 1980; ROBERTS e ROBERTS, 1981; LITTLE, 1983; KAWASHIMA *et al.*, 1984; TESSMAN e PETERSON, 1986; LARMINAT e DEFAIS, 1989). Entre as principais classes de mutações que

produzem proteínas deficientes em participar da resposta SOS e/ou da recombinação homóloga, estão os alelos *recA1* (mutantes Defeituosos ou Def), *recA730* e *recA441* (mutantes "Protease" Constitutivos ou  $\text{Prt}^{\text{C}}$ ) e *recA430* (mutantes "Protease" Deficientes). Os mutantes Def são extremamente sensíveis aos vários agentes mutagênicos e são incapazes de promover recombinação homóloga (WALKER, 1984). Quando células destas estirpes são expostas a estes agentes, sua proteína RecA é incapaz de promover a clivagem do repressor LexA e de repressores de fagos prevenindo assim, o reparo do DNA e o crescimento lítico dos fagos. A estirpe *recA411* ( $\text{Prt}^{\text{C}}$ ) expressa constitutivamente a resposta SOS a 42°C, sendo capaz de sofrer mutagênese SOS (KAWASHIMA *et al.*, 1984). A proteína RecA411 promove a clivagem de repressores de certos fagos temperados bem como a clivagem da proteína LexA em temperaturas elevadas e na ausência de tratamento com agentes danosos ao DNA (TESSMAN e PETERSON, 1985; LAVERY e KOWALCZYKOWSKI, 1988). A estirpe RecA730 que também pertence a classe  $\text{Prt}^{\text{C}}$  apresenta características similares as da estirpe RecA441, exceto que a expressão da resposta SOS corre a 30°C (LAVERY e KOWALCZYKOWSKI, 1992). Os mutantes RecA430 são capazes de promover recombinação homóloga mas são deficientes na indução das funções de reparo e mutagênese SOS (KAWASHIMA *et al.*, 1984).

Outra proteína de importância fundamental na regulação do sistema SOS em *E. coli* é o repressor LexA (LITTLE e HARPER, 1979; LITTLE e MOUNT, 1982). Produto do gene *lexA*, a proteína LexA é um monômero de 24 kDa composto por 202 resíduos de aminoácidos distribuídos entre um domínio amino terminal, um domínio carboxi terminal e uma região central que conecta os

dois domínios (BRENT e PTASHNE, 1980a; LITTLE e HARPER, 1979; THLIVERIS e MOUNT, 1992). O domínio amino terminal reconhece as sequências para a ligação do repressor no DNA alvo e o carboxi terminal é responsável pela formação e manutenção dos dímeros de LexA (HURSTEL *et al.*, 1988; THLIVERIS e MOUNT, 1992; KIM e LITTLE, 1992). Em sua forma dimérica o repressor LexA inibe pleiotrópicamente a expressão de cerca de 20 genes ao ligar-se aos sítios de seus operadores (BRENT e PTASHNE, 1981b; LITTLE *et al.*, 1981; BRENT, 1982; SCHNARR *et al.*, 1985; KIM e LITTLE, 1992). Dentre os genes reprimidos estão o *sulA*, *umDC*, *hima*, *dinA*, *dinB*, *dinC*, *dinF*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *ruvA*, *recA* e o próprio *lexA* (BRENT e PTASHNE, 1980a; WALKER, 1984; BACKMAN, 1990). Juntos eles compõem o "Regulon SOS" e são também conhecidos como genes induzidos por dano ("din genes" onde *din* = damage-inducible). A comparação das sequências de DNA situadas acima dos genes SOS revelou a sequência consenso TA CTGT ATATA-A-A CAG TA, que foi denominada "SOS box" (WALKER, 1984). A análise de mutantes *recA* e/ou *lexA* associada ao fato dos operadores SOS apresentarem a sequência consenso 5'-CTGT, confirmaram a sequência CTGT-N<sub>g</sub>-ACAG como o principal sítio de reconhecimento para LexA (WERTMAN e MOUNT, 1985; HURSTEL *et al.*, 1988). Recentemente KUAN *et al.* (1991a) propuseram que LexA também é capaz de ligar-se ao promotor do gene *tnp* e reprimir sua expressão. Este gene codifica uma transposase e está localizado no componente IS50R do transposon *Tn5*. Esta proposição baseou-se em resultados de experimentos "in vitro" onde certas mutações em LexA causam aumento da frequência de transposição deste transposon. Ao realizarem experimentos "in vivo" KUAN e TESSMAN (1991b) verificaram que os novos

resultados de inibição da atividade gênica de *tnp* coincidiam com os obtidos "in vitro" e confirmavam que este gene é reprimido por LexA. Após outras investigações envolvendo proteínas RecA ativadas constitutivamente, KUAN e TESSMAN (1992) relataram novas evidências do envolvimento de RecA no incremento da transposição de *Tn5*.

A auto-regulação de LexA favorece a manutenção de um nível constante deste repressor em células em crescimento exponencial permitindo-lhe também, atingir rapidamente o estado de equilíbrio (steady state) durante o retorno da célula ao seu estado normal (LITTLE e MOUNT, 1982; BRENT, 1982). Além disso, possibilita ao Sistema SOS responder mais rapidamente à variação do nível de proteína RecA e prevenir sua indução desnecessária (LITTLE, 1983; SMITH, 1985). Os genes reprimidos por LexA são coordenadamente induzidos após a exposição das células de *E. coli* a agentes lesivos ao DNA e/ou durante sua replicação descontínua (ENNIS *et al.*, 1989; SASSANFAR e ROBERTS, 1990). Esta desrepressão incrementa o reparo do DNA por excisão, a mutagênese SOS, o reinício da replicação contínua do DNA e inibe a divisão celular. Se a célula contém profago, após clivagem de seu repressor, observa-se a indução da fase lítica (LITTLE, 1983; SANCAR e SANCAR, 1988; PETERSON, 1988).

A desrepressão do regulon SOS depende da inativação do repressor LexA através de autoclivagem estimulada por RecA (LITTLE *et al.*, 1980). A capacidade de promover a própria proteólise foi atribuída à proteína LexA após LITTLE (1984) demonstrar, em experimentos "in vitro", que tanto LexA quanto os repressores de fagos sofrem autólise RecA-independente em pH

alcalino. Baseado em suas observações Little sugeriu que a proteína RecA não desempenha função real de protease e propôs a expressão "proteína RecA em forma ativada" para indicar sua participação indireta, mas essencial, no processo de inativação "in vivo". Os termos "protease" e "atividade proteolítica" ainda encontrados na literatura refletem a tendência em conservar vocábulos já consagrados mesmo que com novo significado. Atualmente, é consenso mencionar que "em condições fisiológicas, a proteína RecA ativada (RecA<sup>\*</sup>) estimula a clivagem de repressores" sem, no entanto, submetê-la à uma definição clássica de protease. Pela leitura de bibliografia recente (LITTLE, 1991; KIM e LITTLE, 1993) pode-se constatar também, que o termo coprotease vem sendo empregado com a finalidade de conferir caráter "parcialmente enzimático" à proteína RecA.

Em condições fisiológicas e tanto "in vivo" como "in vitro", a autodigestão de LexA é consequência de sua interação com RecA e requer como cofatores, nucleosídeo trifosfato e DNA de fita simples ou DNA duplex lesado por radiação ultravioleta (LITTLE *et al.*, 1980; LIN e LITTLE, 1989; FREITAG e MCENTEE, 1989; TAKAHASHI e SCHNARR, 1989; DI CAPUA *et al.*, 1992). Quando o DNA duplex está totalmente íntegro, o nível de ativação de RecA reduz-se em 80% reduzindo-se consequentemente a interação e clivagem de LexA (DICAPUA *et al.*, 1992). Ao investigarem, por cromatografia de afinidade, as interações estabelecidas por RecA<sup>\*</sup> com outros componentes da resposta SOS, FREITAG e MCENTEE (1989) observaram que LexA não reconhece RecA isoladamente, mas liga-se fortemente ao complexo RecA-DNA de fita simples-ATP.

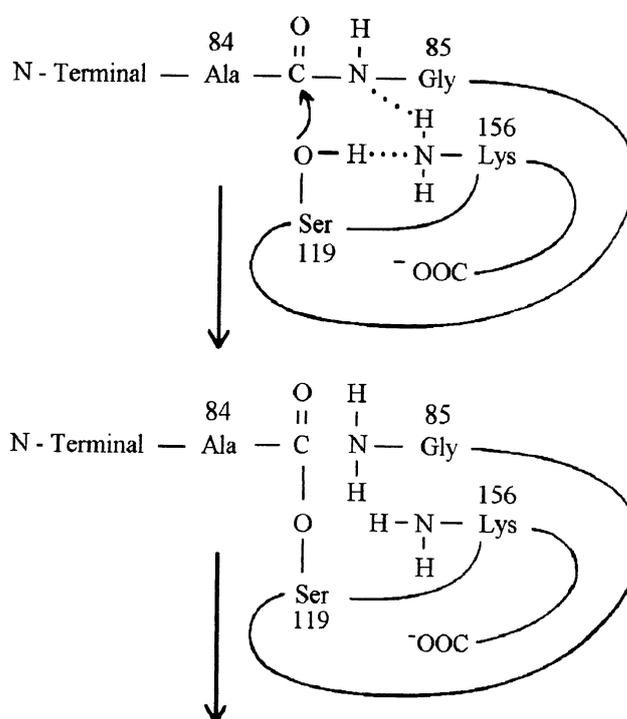
Estudos genéticos e bioquímicos da inativação de LexA

(LITTLE,1984; SLILATY *et al* ,1986), resultaram na proposição de um modelo para o mecanismo de autodigestão baseado no mecanismo de hidrólise das proteases serina e tiol dependentes (SLILATY e LITTLE, 1987) (figura 8). Estes últimos envolvem transferência de prótons e formação de um intermediário covalente (KRAUT, 1977).

De acordo com o esquema, a estrutura dobrada da cadeia protéica provoca a aproximação do aminoácido serina 119 (Ser-119) com o aminoácido lisina 165 (Lys-156) e de ambos com o par alaninas<sup>4</sup>-glicinas<sup>5</sup> (Ala<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>). A clivagem de LexA é consequência de um ataque nucleofílico da hidroxila da Ser-119 sobre a carbonila da ligação Ala<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>. A forma desprotonada do grupo  $\epsilon$ -amino da Lys-156 responde pela ativação da hidroxila da Ser-119 e pela transferência de um próton para o grupo NH<sub>2</sub> incipiente.

A importância dos aminoácidos Ser-119 e Lys-156 foi confirmada pela substituição de um ou de outro aminoácido por um resíduo de alanina (Ala) (LIN e LITTLE, 1988). Proteínas contendo Ala-119 ou Ala-156 mantêm sua atividade repressora mas são totalmente deficientes em sofrer autodigestão ou clivagem RecA-dependente. Esta característica também foi considerada uma prova de que o mecanismo proposto é adequado para ambas as reações de clivagem. Quanto a sua similaridade com o mecanismo das serina proteases, ROLAND e LITTLE (1990) apresentaram evidências desta analogia em reações de autodigestão conduzidas na presença e na ausência de fluorfosfato de diisopropila (DFP), um inibidor de serina proteases. Por este estudo foi demonstrado que a autodigestão de LexA é inibida por altas concentrações de DFP e que este composto reage seletivamente

FIGURA 8 - MODELO PROPOSTO PARA O MECANISMO DE CLIVAGEM DO REPRESSOR LexA



Fragmento N-Terminal + Fragmento C-Terminal

O dobramento da cadeia de LexA provoca a aproximação dos aminoácidos Ser-119 e Lys-156 entre si e de ambos com o par Ala<sub>84</sub>-Gly<sub>85</sub>. O grupo hidroxila da serina é o nucleófilo que ataca a carbonila da ligação peptídica Ala-Gly. A forma desprotonada do grupo  $\epsilon$ -amino da lisina serve como ativador do

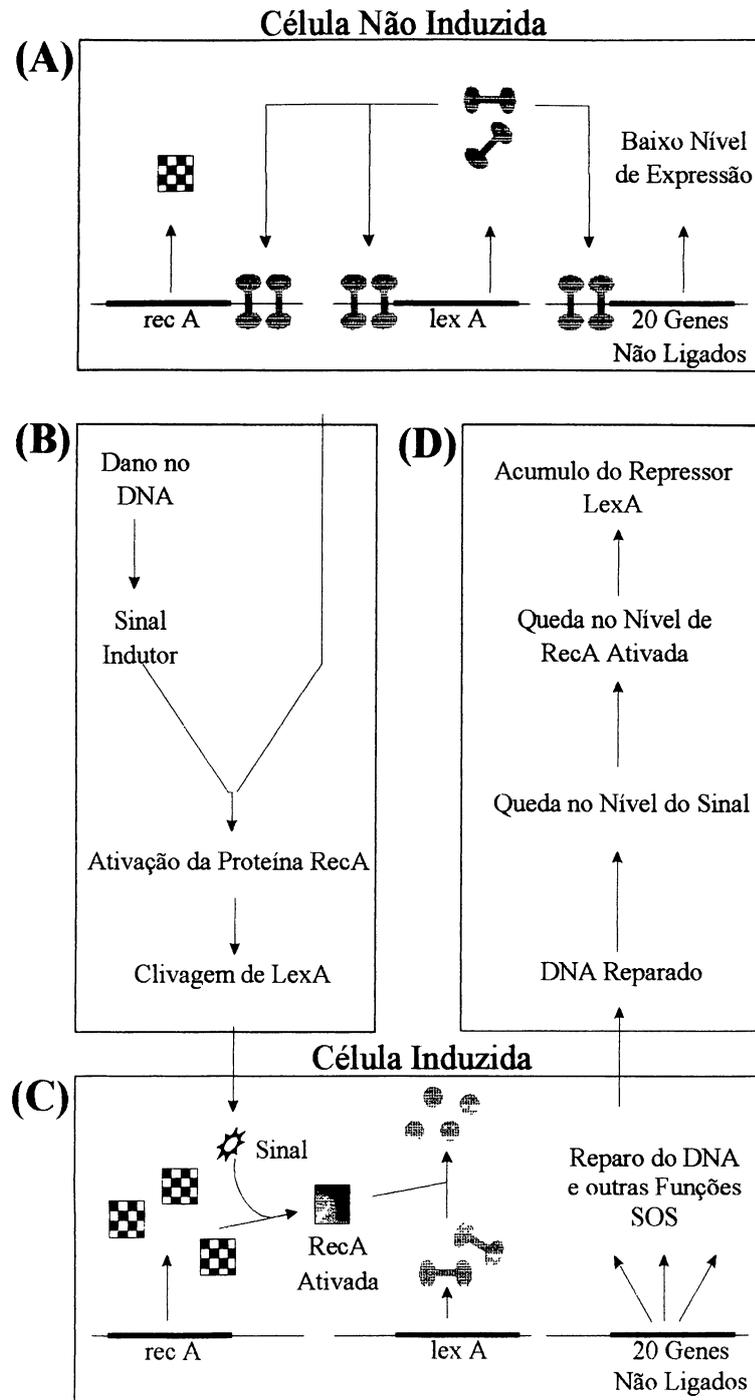
com o resíduo de Ser-119 formando Ser-DFP que é inativo na reação de proteólise.

Em outra abordagem do estudo do mecanismo de inativação, LIN e LITTLE (1989) purificaram proteínas LexA mutantes e analisaram suas propriedades em reações de autodigestão e clivagem RecA-dependente. Sobre os resultados observados estes pesquisadores concluíram que, ao invés de promover um ataque proteolítico direto sobre LexA, RecA liga-se ao repressor estabilizando-o na conformação ideal para a autoclivagem. Baseados na análise de mutações no gene *recA* que afetam a autólise de LexA, STORY *et al.* (1992) sugeriram que os resíduos 229 e 243 de RecA estão envolvidos na interação LexA-RecA e que, durante este processo ocorre mudança conformacional na estrutura de ambas as proteínas o que levaria LexA a ligar-se ao encaixe formado pela união de duas moléculas RecA adjacentes. As sugestões de mudança conformacional foram confirmadas por YU e EGELMAN (1993) ao examinarem a ligação de LexA ao complexo "RecA-DNA-nucleosídeo trifosfato" através de microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto, foi demonstrado pelo mesmo método que ao contrário do sugerido por STORY *et al.* (1992), o repressor LexA liga-se ao sulco helicoidal profundo do filamento RecA, em duas regiões de contato que emparelham duas unidades RecA adjacentes. Um dos contatos, o sítio A, contém os aminoácidos 229 e 243 e é consistente com sítio de ligação de LexA proposto por STORY *et al.* (1992) para a estrutura em cristal. O segundo ponto de contato, o sítio B, contém os aminoácidos 156 e 165 (alça L<sub>1</sub> na figura 3) e corresponde à região que foi considerada o segundo sítio de ligação para o DNA. YU e EGELMAN (1993) consideram que

a superposição do sítio B e alça L<sub>1</sub> poderia explicar a inibição total da clivagem de LexA por altas concentrações de DNA de fita simples, observada por TAKAHASHI e SCHNAR (1989) e por DiCAPUA e colaboradores (1992). O excesso de DNA ligar-se-ia ao segundo sítio de ligação impedindo assim, a ligação e a clivagem de LexA.

Um esquema básico que resume o mecanismo da regulação do sistema SOS a nível molecular, está representado na Figura 9. Em uma célula não induzida (Figura 9-A), a proteína LexA atua como repressora dos genes SOS ao ligar-se a sequências operadoras similares à frente de cada gene. Alguns loci como o *recA*, tem um único sítio operador que é reconhecido por Lex, enquanto outros como o *umuDC* e o próprio *lexA* tem dois sítios operadores. Muitos dos genes SOS, entre eles *recA* e *lexA*, são transcritos em níveis significantes mesmo quando o sistema SOS está em estado de repressão. A quantidade de proteína RecA presente na célula deve ser suficiente para sua função no processo de recombinação homóloga e para que possa responder rapidamente ao sinal indutor. A partir do instante que a célula bacteriana passa a manifestar o efeito de sua exposição a agentes lesivos químicos ou físicos, o sinal indutor da resposta SOS é gerado (Figura 9-B). Este sinal ativa a proteína RecA que será envolvida na reação de inativação de LexA. Nesta fase, monômeros de LexA que interagem com RecA\* têm sua cadeia protéica clivada ao nível da ligação peptídica Ala84-Gly85 (LITTLE, 1984; KIM e LITTLE, 1992). Como o dois fragmentos resultantes são ineficientes em manter a repressão, inicia-se a transcrição dos diversos genes SOS. Assim, a resposta SOS que corresponde à somatória das funções desempenhadas pelos

FIGURA 9 - MODELO DE REGULAÇÃO DO SISTEMA SOS



Modelo proposto por Little e Mount (1982) para regulação do Sistema SOS em *E. coli*. (A) Estado não induzido e células em fase exponencial de crescimento. (B) Transição para o estado induzido. (C) Estado induzido: RecA está ativada, ocorre a clivagem de LexA e a desrepressão dos genes do sistema SOS. (D) Transição para o estado não induzido.

produtos destes genes pode ser observada.

A proporção de moléculas de LexA inativadas depende diretamente da intensidade da lesão e consequente nível de ativação de RecA (LITTLE, 1983; SMITH, 1985). Genes com operadores onde a proteína LexA liga-se fracamente são os primeiros a serem expressados (LITTLE e MOUNT, 1982; BRENT, 1982). Se o tratamento for suficientemente intenso (Figura 9-C), um número maior de proteínas RecA será sintetizado e ativado estimulando a clivagem de mais moléculas de LexA. Quando a concentração do repressor atinge níveis muito baixos, aqueles genes com operadores onde ele se liga com maior afinidade vão sendo desreprimidos e expressados em seu nível máximo (BRENT, 1982). A diferença de afinidade apresentada por LexA está provavelmente associada às pequenas variações observadas na parte central dos diferentes operons SOS. À medida que as lesões são reparadas e restaura-se a capacidade de sobrevivência da célula, o sinal indutor da resposta SOS vai sendo eliminado e as moléculas da proteína RecA retornam ao estado "inativado" favorecendo a estabilidade das moléculas do repressor. Desta forma, LexA volta a ocupar os sítios operadores para restabelecer a condição inicial de repressão do Sistema de Reparo SOS (Figura 9, C → A).

#### 1.6 FUNÇÃO DA PROTEÍNA RecA NA MUTAGÊNESE SOS EM *Escherichia coli*

As mutações causadas por radiação ultravioleta ou ionizante, óxido de 4-nitroquinolina e metanosulfonato de

metila entre outros, não resultam de um processo passivo. Ao contrário, resultam da indução da Resposta SOS que ocorre quando o DNA lesado é processado com o objetivo de reparar lesões existentes e garantir a viabilidade celular. Este processamento foi inicialmente reconhecido como um "reparo propenso a erro" (error-prone repair) (SEDGWICK, 1975; WITKIN, 1976; VILANI, 1978), expressão proposta com base em observações que sugeriam que os eventos celulares envolvidos na indução da mutações a partir do DNA lesado estão intimamente associados com eventos que conferem resistência aos efeitos letais do DNA danificado. Com o avanço das pesquisas ficou estabelecida a participação da holoenzima DNA polimerase III (DNA pol III) e das proteínas RecA, UmuD e UmuC no reparo propenso a erro que sugeriam que os eventos celulares envolvidos na indução da mutações a partir do DNA lesado estão intimamente associados com eventos que conferem resistência aos efeitos letais do DNA danificado. Com o avanço das pesquisas ficou estabelecida a participação da holoenzima DNA polimerase III (DNA pol III) e das proteínas RecA, UmuD e UmuC no reparo propenso a erro induzido pela radiação ultravioleta (SCHENDEL e DEFAIS, 1980; BLANCO *et al.*, 1982; ELLEDGE e WALKER, 1983; SHINOURA *et al.*, 1983; HAGENSEE *et al.*, 1987). Como estas três proteínas fazem parte do Regulon SOS, a expressão "mutagênese SOS" foi adotada em substituição ao anterior com a intenção de indicar a necessidade de desrepressão deste regulon e o caminho pelo qual são introduzidas as mutações. Referindo-se à mutagênese SOS, PETERSON *et al.* (1988) propuseram que mutações decorrentes da indução da resposta SOS podem representar uma forma de tolerância da célula às lesões apresentadas por seu DNA e não

uma forma de reparo do mesmo DNA.

A respeito das proteínas consideradas essenciais para este tipo de mutagênese, a holoenzima DNA pol III catalisa a replicação do DNA e se caracteriza por sua precisão durante a adição das bases e seu caráter de continuidade (ECHOLS e GOODMAN, 1991). A forma ativada da proteína RecA tem a função de mediar a clivagem de LexA (LITTLE, 1984) e UmuD (SHINAGAWA *et al.*, 1988). Pela inativação do repressor LexA ocorre a desrepressão do regulon SOS e a consequente transcrição do operon *umuDC* e pela clivagem de UmuD forma-se o fragmento ativo na mutagênese SOS. Além disso, foi atribuída à proteína RecA a capacidade de ligar-se aos fotoprodutos da radiação ultravioleta no DNA e inibir a atividade exonucleásica 3' → 5' da subunidade  $\epsilon$  da DNA pol III (FERSHT e KNILL-JONES, 1983).

As proteínas UmuD (15 kDa) e UmuC (45 kDa) constituem os produtos das transcrição do operon *umuDC* (ELLEIDGE e WALKER, 1983; KITAGAWA *et al.*, 1985; WALKER, 1985). Quando os genes deste operon apresentam mutações, o processo de mutagênese SOS-dependente é eliminado sem afetar no entanto, a função de reparo por recombinação (SEDGWICK e GOODWIN, 1985). BRIDGES e WOODGATE (1985) sugeriram que a função das proteínas UmuD e UmuC é de permitir a alongação da fita de DNA após a inserção de bases corretas ou não em sítios opostos aos pontos de lesão no DNA-molde, por um processo que envolveria outras proteínas. Ao investigarem a inibição da subunidade  $\epsilon$  da DNA pol III pela proteína RecA, LU *et al.* (1986) propuseram três funções bioquímicas para as proteínas UmuD e UmuC. Elas facilitariam a ligação da proteína RecA ao DNA na presença de pequenas distorções introduzidas pela lesão e também, a ligação da DNA

pol III à região deformada do DNA prevenindo a dissociação e permitindo múltiplas tentativas de dar continuidade à replicação. Finalmente, elas promoveriam desobstrução do sítio lesado através do desligamento da enzima DNA pol III da proteína RecA ou do desligamento da proteína RecA do DNA. Evidências da interação física e/ou funcional entre RecA e UmuD/C foram demonstradas pela combinação entre alelos mutantes de *recA* e *umuDC* (WITKIN *et al.*, 1987). Além disso, a possível interação proteína-proteína foi confirmada pela descoberta de que UmuD sofre clivagem RecA-dependente (BUCKHARDT *et al.*, 1988; SHINAGAWA, 1988; NOHMI *et al.*, 1988).

A proteína UmuD apresenta sequência de aminoácidos homóloga à sequência de LexA, incluindo a região correspondente ao sítio de clivagem do repressor (PERRY *et al.*, 1985). Entretanto, o par Ala84-Gly85 que define o sítio de proteólise de LexA e de outros repressores está substituído por um par Cys24-Gly25 mais próximo portanto, da porção aminoterminal da molécula (SEDGWICK e GOODWIN, 1985; PERRY *et al.*, 1985). A hipótese de que a homologia entre LexA e UmuD poderia indicar a existência de um sítio de interação entre RecA e UmuD (PERRY *et al.*, 1985) foi confirmada em experimentos onde a proteína RecA\* é capaz de estimular a clivagem da proteína UmuD tanto "in vitro" (BUCKHARDT *et al.*, 1988) como "in vivo" (SHINAGAWA *et al.*, 1988). Desta clivagem origina-se um fragmento carboxi-terminal de 12 kDa conhecido como UmuD' o qual foi demonstrado mais tarde, ser o fragmento ativo na mutagenese SOS (NOHMI *et al.*, 1988). Por outro lado, moléculas intactas de UmuD podem desempenhar a função de moduladoras da mutagenese UmuD'-dependente. Ao analisarem o efeito de mutações no gene

*umuD*. BATTISTA *et al.* (1990) observaram que a dominância de certos alelos *umuD*<sup>-</sup> favorece a formação de heterodímeros UmuD-UmuD' inibindo assim, sua clivagem RecA-dependente e a atividade de UmuD'. Diante destes resultados, BATTISTA *et al.* (1990) atribuíram um caráter de regulor negativo à proteína UmuD.

Devido à sua complexidade, ainda não foi determinado um mecanismo molecular para a mutagênese SOS comum às diferentes lesões causadas pelos diferentes agentes (FERSHT e KNILL-JONES, 1983; LU *et al.*, 1986; SLATER e MAURER, 1991). As várias tentativas de se propor um modelo adequado, ficaram restritas às mutações causadas pela radiação ultravioleta e se basearam na hipótese de que a inibição da subunidade  $\epsilon$  da DNA pol III deve ser o passo crítico na progressão desta enzima através do sítio lesado. Estes modelos consideram que o evento mutagênico envolve a replicação por caminho alternativo ("replication bypass" ou "translesion replication"). As diversas proposições fundamentaram-se em resultados de pesquisas desenvolvidas ao longo dos anos e listadas a seguir:

1. A replicação do DNA é interrompida "in vivo" e "in vitro" pelos fotoprodutos da radiação ultravioleta (VILANI *et al.*, 1978; ECHOLS e GOODMAN, 1991). A DNA pol III provavelmente interrompe a replicação diante de uma distorção do DNA-molde que não permite o reconhecimento efetivo dos pares de bases do DNA-molde.

2. A propriedade de editora conferida à subunidade  $\epsilon$  da DNA pol III (FERHST e KNILL-JONES, 1983; LU *et al.*, 1986; HAGENSEE *et al.*, 1987; SLATER e MAURER, 1991). Esta holoenzima pode dissociar-se da fita nascente e reiniciar a síntese além da

lesão bloqueadora ou pode estender a fita nascente através da mesma lesão. Na primeira alternativa as falhas introduzidas serão reparadas por recombinação em um processo predominantemente livre de erro. Na segunda, a síntese por caminho alternativo é mutagênica devido à deformidade introduzida pela lesão no DNA-molde.

3. A necessidade da desrepressão do regulon SOS através da clivagem do repressor LexA estimulada pela proteína RecA ativada (WALKER, 1984).

4. A transcrição do operon *umuDC* que leva à síntese das proteínas UmuD e UmuC (KITAGAWA *et al.*, 1985).

5. Estirpes *umuC*<sup>-</sup> só exibem mutação por exposição à radiação ultravioleta após remoção das lesões que bloqueiam a forquilha de replicação através da fotoreativação (BRIDGES e WOODGATE, 1985).

6. O processamento pós-traducional de UmuD em uma reação de clivagem similar àquela sofrida por LexA e que dá origem ao fragmento ativo UmuD' (BUCKHARDT *et al.*, 1988; SHINAGAWA *et al.*, 1988). Fragmentos UmuD' obtidos por modificação do gene *umuD* "in vitro", complementam a deficiência de sofrer mutagênese SOS de células onde a proteína RecA mutante é incapaz de induzir a clivagem de UmuD (NOHMI *et al.*, 1988).

7. Muitas linhas de evidências apontam para um terceiro papel da proteína RecA na mutagênese SOS cuja natureza ainda não foi definida (ENNIS *et al.*, 1989; DUTREIX *et al.*, 1989; SWEASY *et al.*, 1990). Esta função seria indireta e diferente das anteriores onde RecA atuaria como reguladora da indução da resposta SOS e da clivagem de UmuD.

8. O excesso da subunidade  $\epsilon$  inibe a mutagênese por luz

ultravioleta "in vitro", provavelmente pela inibição do desvio da lesão (JONCZYK *et al.*, 1988).

9. Fragmentos UmuD' obtidos por modificação do gene *umuD*, complementam a deficiência de promover mutagênese SOS em células onde a proteína RecA mutante é incapaz de induzir a clivagem de UmuD (BATTISTA *et al.*, 1990).

10. UmuC associa-se com UmuD' em extratos celulares e quando purificada, forma complexos com UmuD' em solução (WOODGATE *et al.*, 1989; RAJAGOPALAN *et al.*, 1992). Em ambos os casos, a proporção é de uma molécula de UmuC para duas de UmuD' e esta associação é mais forte que aquela entre UmuC e UmuD. Woodgate *et al.* (1989) propuseram que o complexo UmuC-UmuD' é provavelmente o complexo ativo durante a mutagênese.

11. A atividade replicadora da DNA pol III através de sítios apurínicos ou apirimidínicos é muito eficiente em presença das proteínas RecA e UmuD/C. Presume-se que a mutagênese SOS envolva "repliação além da lesão" catalisada pela DNA pol III e dependente de sua baixa fidelidade (CHEVRONI e LIVNEH, 1989; RAJAGOPALAN *et al.*, 1992).

Segundo um dos modelos propostos para a mutagênese SOS (Woodgate *et al.*, 1989), ao nível da lesão forma-se um agregado protéico que inclui a holoenzima DNA pol III e as proteínas RecA, UmuD e UmuC. Este agregado foi chamado de mutassomo. Na mesma linha de investigação, FRANK *et al.* (1993) relataram que RecA interage fisicamente tanto com UmuD como UmuD'. O significado desta interação foi demonstrado através da análise da alteração do padrão de migração do DNA em gel de agarose. Em presença de DNA e da proteína RecA, as proteínas UmuD e UmuD' que usualmente não apresentam afinidade pelo DNA (WOODGATE *et*

*al.* 1989) migram na mesma posição de migração do complexo RecA-DNA. Em face destes resultados, FRANK *et al.* (1993) sugeriram que o primeiro passo no processo mutagênico é a ligação de UmuD' à proteína RecA seguida da adição de UmuC.

#### 1.7 PRESENÇA DE PROTEÍNAS ANÁLOGAS À PROTEÍNA RecA DE *Escherichia coli* EM ORGANISMOS PROCARIOTOS E EUCARIOTOS

Nos últimos anos estão sendo acumuladas evidências consideráveis que sistemas de reparo e mutagênese análogos ao regulon SOS são funcionais em organismos procarióticos e eucarióticos. Genes homólogos ao gene *recA* de *E. coli* foram descritos em diversas espécies bacterianas (Tabela I). Em geral, bancos genômicos dos organismos de interesse são introduzidos em células de *E. coli* contendo mutações no gene *recA*, e os clones onde um ou mais dos efeitos pleiotrópicos da mutação são complementados são isolados e caracterizados. Esta complementação interespecífica do fenótipo RecA<sup>-</sup> foi verificada em células *E. coli*, pelo aumento de sua resistência à radiação ultravioleta e ao metanosulfonato de metila, pela restauração de sua capacidade de recombinação, pela mutagênese UV-induzida e através da indução do estado lítico de fagos após exposição à luz ultravioleta. Alternativamente, genes análogos ao *recA* podem ser isolados através de complementação do fenótipo Fec<sup>-</sup> do fago lambda EMBL3 em estirpes *recA*<sup>-</sup> de *E. coli* (BARCAK *et al.*, 1989; MARTINEZ-SALAZAR *et al.*, 1991; DE MOT *et al.*, 1993) ou ainda pela técnica de "PCR" com o emprego de "primers" degenerados (DYBVIK *et al.*, 1992; RAYMOND-DENISE e GUILLEN,

TABELA I - EXEMPLOS DE ORGANISMOS PRÓCARIOTOS PORTADORES DE GENES ANÁLOGOS AO GENE *recA* DE *Escherichia coli*

ORGANISMO	GENE	PROTEÍNA	REFERÊNCIAS
	CLON/SEQ	REC/SOS	
<i>Proteus mirabilis</i>	+/+	+/+	88, 346
<i>Rhizobium meliloti</i>	+/	+/+	18
<i>Proteus vulgaris</i>	+/+	+/+	154, 160
<i>Erwinia carotovora</i>	+/+	+/+	154, 160, 361
<i>Shigella flexneri</i>	+/+	+/+	154, 160
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+/+	+/+	162, 228, 286
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	+/	+/+	92
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+/+	+/+	94, 226
<i>Methylophilus methylotrophus</i>	+/	+/+	100
<i>Vibrio cholerae</i>	+/	+/+	113
<i>Synechococcus</i> sp	+/+	+/+	238
<i>Pseudomonas syringae</i>	+/	+/	128
<i>Anabaena variabilis</i>	+/	+/-	242, 243
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+/	+/	108, 169
<i>Aeromonas caviae</i>	+/	+/	270
<i>Aquaspirillum magnetotacticum</i>	+/+	+/+	16
<i>Vibrio anguillarum</i>	+/	+/+	303
<i>Serratia marcescens</i>	+/+	+/+	08, 346
<i>Azospirillum brasilense</i>	+/	+/+	64
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+/+	+/+	69, 239
<i>Rhizobium phaseoli</i>	+/+	+/+	217
<i>Leptospira biflexa</i>	+/	+/+	319
<i>Lactococcus lactis</i>	+/+		80
<i>Bacillus subtilis</i>	+/+	+/+	47, 203, 267
<i>Thermus thermophilus</i>	+/+	/+	152
<i>Haemophilus influenzae</i>	+/+	+/+	10, 363
<i>Streptococcus gordonii</i>	+/	+/	344
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+/+	+/+	71

clon.= clonado, seq.= sequenciado, rec.= atividade recombinante  
SOS= induz resposta SOS.

1992; DUWAT *et al.*, 1992; KATO e KURAMITSU, 1993). Este último método baseia-se na amplificação de um segmento interno do gene *recA* (*recAint*) e permite a recuperação do segmento genômico total sem o passo da complementação interespecífica e foi desenvolvido para suprir a dificuldade da expressão de sequências gênicas de bactérias Gram positivas em células de *E. coli* (RAYMOND-DENISE e GUILLEN, 1992).

Em muitos estudos, os genes *recA*-análogos foram isolados e mutagenizados pela inserção de transposons e os clones *recA*<sup>-</sup> reintroduzidos nas espécies originais com a finalidade de se construir estirpes mutantes para o gene *recA* (FAELEN *et al.*, 1985; GOLDBERB e MEKALANOS, 1986; KOOMEY e FALKOW, 1987; RESNICK e NELSON, 1988; CROES *et al.*, 1990). Estes mutantes são úteis no estudo dos sistemas de recombinação e mecanismos de reparo e mutagenese dos diferentes microrganismos.

A análise de sequências completas de genes *recA* clonados e sua comparação com a sequência do gene *recA* de *E. coli*, revelou casos de extensa homologia, como em *Serratia marcescens* (BALL *et al.*, 1990; VRIES e WACKRNAGEL, 1992), onde as sequências de nucleotídeos são 85% idênticas. O mesmo foi observado para *Proteus mirabilis* com 73% (EITNER *et al.*, 1982; VRIES e WACKERNAGEL, 1992) e *Erwinia carotovora* com 78% de homologia (KEENER *et al.*, 1984). Um alto nível de conservação da sequência de nucleotídeos estende-se também à região regulatória situada à frente dos genes *recA*, os prováveis "SOS box" ou seja, possíveis sítios de ligação para um regulador negativo. Como exemplo, a sequência "SOS box" de *S. marcescens* cujo gene é induzido por mitomicina C, difere da sequência consenso de *E. coli* em apenas uma base (MILLER e KOKJOHN,

1990). Esta característica é atribuída à presença de um mecanismo de regulação dos genes *recA*-análogos similar ou até mesmo igual, aquele apresentado por *E. coli* (FERNANDEZ DEHENESTROSA *et al.*, 1991; LOVETT Jr. *et al.*, 1993).

A comparação entre as sequências de aminoácidos das proteínas RecA-análogas e da proteína RecA de *E. coli* também indicou um grau de homologia significativo. Em sua maioria, os códons que orientam a tradução são sinônimos, pois diferem apenas na terceira base. A sequência de nucleotídeos de *S. flexneri* é 99% idêntica à sequência de *E. coli* K12 e as sequências de aminoácidos de ambas as proteínas são 100% idênticas (KEENER *et al.*, 1984; MILLER e KOKHJOHN, 1990). Comparando a sequência de aminoácidos da proteína RecA de *Pseudomonas fluorescens* OE28.3 com as sequências de proteínas RecA de outras bactérias, De Mot *et al.* (1992) elaboraram um dendrograma indicando o percentual de homologia entre elas. Neste trabalho, os pesquisadores ressaltam a similaridade entre proteínas de bactérias filogeneticamente relacionadas: *P. fluorescens* tem 87,8% de seus aminoácidos idênticos aos de *P. aeruginosa*, enquanto que somente 69,5% são idênticos aos de *E. coli* e 59,3% aos de *Anabaena variabilis*. Similaridade filogenética evidente foi observada também por Dybvig *et al.* (1992) ao compararem as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de genes *recA* e seus produtos, isolados de bactérias Gram positivas, com as sequências correspondentes de *E. coli*. *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes* apresentam 84% de seus nucleotídeos e 100% de seus aminoácidos idênticos. Quando comparadas com as sequências de *E. coli*, a homologia de nucleotídeos e aminoácidos reduz-se

respectivamente para 61% e 70% em *S. mutans* e para 62% e 70% em *S. pyogenes*. Dentre as demais bactérias Gram positivas, *B. subtilis* é a melhor estudada (LOVETT Jr. *et al.*, 1989a; DYBVIG *et al.*, 1992; RAYMOND-DENISE e GUILLEN, 1992; CHEO, 1993). Este microorganismo apresenta 67% de seus nucleotídeos e 75% de seus aminoácidos idênticos aos de *E. coli* (DYBVIG *et al.*, 1992).

Com relação às funções das proteínas RecA-análogas isoladas dos diversos gêneros de procariotos, resultados de complementação interespecífica demonstraram sua capacidade de induzir a resposta SOS e restaurar a capacidade de recombinação em estirpes *recA* mutantes de *E. coli*. Embora os níveis de complementação não tenham, na totalidade dos casos, atingido aqueles apresentados pelas estirpes de *E. coli* controles, pesquisadores envolvidos nestes estudos foram unânimes em concluir que os resultados observados apontam para a existência de sistemas de recombinação e de indução da resposta SOS comuns aos diferentes microrganismos. Além disso, foi demonstrado que algumas das proteínas RecA-análogas desempenham funções distintas daquelas já descritas para *E. coli* (ZINK *et al.*, 1985; LOVETT Jr. *et al.*, 1989a; BALL *et al.*, 1990; MARTINEZ-SALAZAR *et al.*, 1990). Esta característica foi interpretada como uma adaptação às características individuais de cada microrganismo (MILLER e KOKJOHN, 1990). Em *S. marcescens*, a inativação de seu gene *recA* por transposon impede a expressão do gene *nuc* cujo produto é uma nuclease extracelular (BALL *et al.*, 1990). "In vivo" e em condições normais de crescimento, este gene é induzido por mitomicina C e radiação ultravioleta (BALL *et al.*, 1990). Em *E. carotovora*, a produção de pectina liase (uma enzima pectinolítica) e

carotovoricina (uma bacteriocina) induzida por mitomicina C, ácido nalidíxico e radiação ultravioleta depende da ativação de sua proteína RecA (ZINK *et al.*, 1985). "In vivo", o aumento da síntese destas duas proteínas está relacionado ao aumento da virulência de *E. carotovora*. Em *B. subtilis*, a proteína RecA é induzida por agentes causadores de danos ao DNA e também durante o desenvolvimento da competência para transformação (LOVETT Jr. *et al.*, 1989a; CHEO *et al.*, 1993). Em *Rhizobium phaseoli* a análise da instabilidade simbiótica que compromete a habilidade de nodulação revelou que a deleção de parte do plasmídeo simbiótico pSym é um evento RecA-dependente (MARTINEZ-SALAZAR *et al.*, 1991).

Relatos sobre o isolamento de proteínas análogas à proteína RecA de *E. coli* em células de organismos eucariotos são ainda raros. O conhecimento dos aspectos da recombinação homóloga em eucariotos advém, em grande parte, de estudos com fungos. Uma proteína com propriedades similares àquelas da proteína RecA e com capacidade de reanelar fitas simples de moléculas de DNA complementares "in vitro", foi purificada de células mitóticas de *Ustilago maydis* (MILLER E KOKJOHN, 1990). Proteínas com atividade recombinante foram purificadas de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por três grupos de pesquisas distintos (KOLODNER *et al.*, 1987; SUGINO *et al.*, 1988; HALBROOK e McENTEE, 1989). A proteína purificada por KOLODNER *et al.* (1987) a partir de células vegetativas da levedura, promove uma reação de troca entre moléculas de DNA duplex linear e DNA de fita simples circular no sentido 3'→5'. O polipeptídeo descrito por SUGINO e colaboradores (1988) foi obtido a partir de células meióticas de *S. cerevisiae* e a

transferase de HALBROOK e McENTEE (1989) purificada de células mitóticas, catalisa o pareamento homólogo de sequências de DNA de fita simples.

Pesquisas recentes levaram à identificação de outras três proteínas envolvidas na recombinação e no reparo do DNA em *S. cerevisiae*: DMC1, RAD51 e RAD57 (BISHOP *et al.*, 1992; SHINOHARA *et al.*, 1992). DMC1 é necessária para a recombinação meiótica, para a formação do complexo sinaptonêmico e para o progresso das divisões meióticas (BISHOP *et al.*, 1992). RAD51 e RAD57 participam do reparo de quebras no DNA duplex mitótico e também da recombinação meiótica (SHINOHARA *et al.*, 1992). As proteínas RAD51 e DMC1 apresentam 45% de identidade entre si e 20-30% de identidade com as proteínas RecA de procariotos (BISHOP *et al.*, 1992; SHINOHARA *et al.*, 1992) enquanto que RAD57 apresenta 50% de identidade com RAD51 e 27% com a proteína RecA (BASILE *et al.*, 1992). Buscando evidências da existência de relação estrutural entre proteínas envolvidas em recombinação, STORY *et al.* (1993) compararam as sequências primárias de proteínas RecA bacterianas, da proteína DMC1 e da proteína UvsX entre si e com relação à estrutura tridimensional da proteína RecA de *E. coli* (STORY *et al.*, 1992). UvsX é derivada do bacteriófago T4 e é a proteína de recombinação que apresenta menor índice de identidade com RecA ( $\approx 20\%$ ) (ROCA e COX, 1990). Esta análise comparativa confirmou a existência de homologia estrutural entre as proteínas sugerindo que elas pertencem a uma única família originada de um ancestral comum (STORY *et al.*, 1993).

Investigando a existência de um possível gene *recA* em vegetais superiores, CERUTTI *et al.* (1992) detectaram uma proteína imunologicamente relacionada à RecA de *E. coli* na

fração estromal de cloroplastos de ervilha e *Arabidopsis thaliana*. Resultados observados após o tratamento dos cloroplastos de ervilha com mitomicina C sugeriram o envolvimento desta proteína no reparo e recombinação do DNA. Utilizando como prova o gene *recA* da cianobactéria *Synechococcus* sp. (MURPH *et al.*, 1987) estes mesmos pesquisadores clonaram de um banco genômico de *A. thaliana* um gene altamente homólogo ao *recA* de eubactérias. Através de ensaios de complementação PANG *et al.* 1992 isolaram do mesmo banco genômico de *A. thaliana* um gene cujo produto, a proteína DRT100, complementa parcialmente o fenótipo  $RecA^-$  de *E. coli*. Baseados nos resultados obtidos CERUTTI *et al.* (1992) e PANG *et al.* (1992) concluíram que as plantas também apresentam mecanismos de reparo e recombinação e que estes sistemas estão de alguma forma relacionados com aqueles descritos para os procariotos.

Estudando células fibroblásticas FR 3T3 de rato ANGULO *et al.* (1989) identificaram um polipeptídeo nuclear de 120 kDa, capaz de reagir com o anticorpo anti-RecA de *E. coli*. A concentração desta proteína, chamada KIN, varia de acordo com a fase do crescimento celular e sua síntese é induzida por mitomicina C ou radiação ultravioleta. Frações protéicas com a mesma mobilidade eletroforética da proteína KIN foram também obtidas a partir de extratos de células 3T3 de camundongos, células de macacos, fibroblastos humanos e de células embrionárias de ratos e camundongos (ANGULO *et al.* 1989). Uma proteína com peso molecular igual ao da proteína Kin foi purificada de células T imaturas e obtidas de linhagem leucêmica (MOORE e FISHEL, 1990). Este polipetídeo humano

conhecido como HPP-1 (homologous pairing protein) catalisa uma reação de transferência de segmentos de DNA complementares de um substrato duplex para um substrato de fita única e circular. Ao contrário da proteína RecA esta reação ocorre na direção 5' → 3' e não envolve hidrólise de ATP. Por outro lado, da mesma forma que RecA, HPP-1 é capaz de reconhecer sequências de DNA homólogas e dispersas entre um excesso de sequências não homólogas. Segundo Moore e Fishel (1990), proteínas como KIN e HPP-1 devem fazer parte de um complexo protéico envolvido no processo de recombinação e que em eucariotos apresenta um nível de complexidade significativamente superior àquele dos procariotos.

### 1.8 *Herbaspirillum seropedicae*

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica isto é, capaz de utilizar  $N_2$  como única fonte de nitrogênio, originalmente isolada da rizosfera e da superfície de raízes de arroz, milho e sorgo e classificada como um membro da família Spirillaceae (BALDANI *et al.* 1984; BALDANI *et al.*, 1986).

Este microrganismo foi inicialmente descrito como uma nova espécie do gênero *Azospirillum* (BALDANI *et al.* 1984) cujas outras espécies também ocorrem em associação raízes de gramíneas (TARRAND *et al.*, 1978; MAGALHÃES *et al.* 1983; REINHOLD *et al.*, 1985; KHAMAS *et al.*, 1989). Entretanto, resultados de hibridização rRNA/DNA revelaram apenas 9-22% de homologia entre *H. seropedicae* e as espécies de *Azospirillum* (FALK *et al.* 1986). Por este método foi também observado que *H.*

*seropedicae* está muito mais próximo de *Rhodospirillum tenue* com o qual apresenta 47% de homologia de rRNA. Novos estudos de hibridização rRNA/DNA e DNA/DNA (GILLIS *et al.*, 1990) apontaram para a existência de um alto grau de homologia entre *H. seropedicae* e *Pseudomonas rubrisubalbicans* um fitopatógeno que também é capaz de fixar nitrogênio (PIMENTEL *et al.*, 1991). Com o avanço dos estudos de taxonomia, *P. rubrisubalbicans* foi incluída no gênero *Herbaspirillum* sob a designação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, comunicação pessoal). Devido a estas informações, a distribuição ecológica de *H. seropedicae* também foi revisada (BALDANI *et al.*, 1992), sendo observado que este microrganismo pode ser encontrado em colmos e folhas de arroz e de cana-de-açúcar e também em raízes de plantas daninhas que acompanham a cultura da cana. Além disso, bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram isoladas da rizosfera e da superfície de raízes de gramíneas forrageiras e de sorgo, confirmando os resultados prévios sobre sua ocorrência em associação com cereais (BALDANI *et al.*, 1986). Por outro lado, foi observado também que *Herbaspirillum* não sobrevive em solos mantidos sem cultivo e livre de raízes (BALDANI *et al.*, 1992). Estes resultados revelaram um caráter endofítico para *H. seropedicae* (DÖBEREINER, 1992a).

Morfológicamente células desta bactéria são vibrióides e apresentam um, dois ou três flagelos em um dos polos ou divididos entre ambos (BALDANI *et al.*, 1986). São móveis e crescem com formação de película em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado, demonstrando atividade de nitrogenase. Esta enzima suporta variações de pH na faixa de 5,0-8,0 e, é menos sensível ao oxigênio que aquela de *A. amazonense*, *A. lipoferum*

ou *A. brasilense* (BALDANI et al., 1986).

A importância conferida ao gênero *Herbaspirillum* se deve ao seu potencial como bactéria fixadora de nitrogênio e à sua associação com gramíneas de interesse econômico (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1992b). Devido a estas características e às perspectivas de uma possível utilização na agricultura vários estudos sobre a fisiologia e genética da fixação de nitrogênio, em *H. seropedicae* têm sido desenvolvidos (PEREIRA et al., 1989; FU e BURRIS, 1989; SOUZA et al., 1991; KLASSEN et al., 1994; SOUZA et al., 1994). Recentemente os genes *nifA* e *nifB* (SOUZA, 1990), *nifHDK* (MACHADO et al., 1994) e os genes do operon *glnAntrBC* (TEIXEIRA, 1992) de *H. seropedicae* estirpe Z78 foram clonados e caracterizados revelando a existência de um sistema de regulação da fixação de nitrogênio semelhante àquele de *Klebsiella pneumoniae* e outros diazotrofos.

Buscando aprofundar a análise genética de *Herbaspirillum seropedicae* Z78 iniciamos este projeto de pesquisa com o objetivo de:

- 1 - Identificar e isolar um gene de recombinação e reparo do DNA tipo-*recA*, em *H. seropedicae* estirpe Z78.
- 2 - Caracterizar fisiologicamente o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 através de sua capacidade de complementar estirpes *recA*<sup>-</sup> de *E. coli*.
- 3 - Caracterizar fisicamente o *recA* de *H. seropedicae* Z78.
- 4 - Mutagenizar o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 através de mutagênese sítio dirigida, visando a futura obtenção de derivados *recA*<sup>-</sup> desta estirpe.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E BACTERIÓFAGOS

As estirpes de bactérias, os plasmídeos e o bacteriófago utilizados neste trabalho estão listados na Tabela II.

### 2.2 REAGENTES

Metanosulfonato de metila foi adquirido de Aldrich Chemical Company. Carbenicilina foi adquirida de Boheringer Mannheim Biochemica. Fenol e etanol foram adquiridos de E. Merck. Tetraciclina, ácido nalidíxico, estreptomicina, canamicina, Tris-base, 8-hidroxiquinoleína, L-prolina, L-leucina, L-metionina, albumina bovina, Ficoll, formamida, polivilpirrolidona, DNA de esperma de salmão foram adquiridos de Sigma Chemical Company. As enzimas de restrição e as enzimas T4-DNA ligase, fosfatase alcalina, pronase e RNase foram adquiridas de Pharmacia LKB Biotechnology, Bethesda Research Laboratories Inc.(BRL), Boheringer Mannheim Biochemica e de Sigma Chemical Company. Fragmento Klenow (fragmento maior da DNA polimerase I) foi adquirido de Pharmacia LKB Biotechnology.

Os desoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP) e hexadesoxinucleotídeos foram adquiridos de Boehringer e Mannheim Biochemica. O desoxinucleotídeo marcado com fósforo radioativo [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (>3000 Ci/mmol) foi adquirido de Amershan International Corporation. Padrão de tamanho molecular

TABELA II - ESTIRPES DE BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E BACTERIÓFAGO

BACTÉRIAS/ PLASMÍDEOS/ BACTERIÓFAGO	GENÓTIPO/FENÓTIPO RELEVANTE	REFERÊNCIA OU FONTE
<i>H. aeropedicae</i>		
Z78	Nif <sup>+</sup>	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
<i>E. coli</i>		
RR1	F <sup>-</sup> <i>hsdS20 proA2 Sm<sup>r</sup></i> <i>recA<sup>+</sup></i>	BOLIVAR <i>et al.</i> , 1977
HB101	F <sup>-</sup> <i>hsdS20 proA2 Sm<sup>r</sup></i> <i>recA13</i>	BOYER e ROULLAND- DUSSOIX, 1969
DH5	<i>endA recA1 hsdR17 Nal<sup>r</sup></i>	HANAHAH, 1983
JC14773	F <sup>-</sup> <i>proA2 recA56</i>	A. J. CLARK
HfrC	HfrC	M. MERRICK
C600	<i>supE λcIts857 Sam7</i>	FUND. OSWALDO CRUZ
S17.1	RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 Tra <sup>+</sup> Sm <sup>r</sup> <i>recA<sup>+</sup></i>	SIMON <i>et al.</i> , 1983
71-18	Δ( <i>lac-pro</i> ) F' <i>lacI<sup>q</sup></i> Z M15 <i>pro<sup>+</sup> Sm<sup>r</sup></i>	MESSING <i>et al.</i> , 1977
MC1061	<i>hsdR mcrB Sm<sup>r</sup></i>	CASADABAN e COHEN, 1980
1230	<i>pro met recA<sup>-</sup></i>	A. W. B. JOHNSTON

(Continua)

TABELA II - ESTIRPES DE BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E BACTERIÓFAGO  
(Continuação)

---

PLASMÍDEOS

pLAFR3	sítio <i>cos</i> do fago lambda IncP-1 Tc <sup>r</sup>	STASKAWICZ <i>et al.</i> , 1987
R68.45	<i>tra</i> <sup>+</sup> <i>mob</i> <sup>+</sup> IncP-1 Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	HAAS e HOLLOWAY, 1978
pJC859	gene <i>recA</i> de <i>E. coli</i> K12 Ap <sup>r</sup>	A. J. CLARK
pSUP202	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Mob <sup>+</sup>	SIMON <i>et al.</i> , 1983
pTZ18R	Ap <sup>r</sup> <i>lacZ</i> f1 IG	MEAD <i>et al.</i> , 1986
pBMR1-6	pLAFR3::DNA <i>Herbaspi-</i> <i>rillum seropedicae</i>	Este trabalho
pBMR501	pSUP202::frag. <i>Hind</i> III de 4,90 kb do pBMR5	Este trabalho
pBMR502	pSUP202::frag. <i>Bam</i> HI de 3,45 kb do pBMR5	Este trabalho
pBMR503	pTZ18R::frag. <i>Hind</i> III de 3,65 kb do pBMR5	Este trabalho
pBMR26.2	pBMR5 <i>recA</i> :: <i>Tn5</i>	Este trabalho

BACTERIÓFAGO

Lambda::Tn5	<i>rex</i> :: <i>Tn5</i> <i>cI857</i> Km <sup>r</sup>	BRUIJN e LUPSKI, 1984
-------------	---	-----------------------

---

"1 kb ladder" foi adquirido de BRL. DNA do fago lambda clivado com enzima *Hind*III foi adquirido de Sigma Chemical Company ou preparado no próprio laboratório. Os demais reagentes foram provenientes das mais diversas fontes, pró-análise e de alto grau de pureza.

### 2.3 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para o cultivo de *Herbaspirillum seropedicae* Z78 foi o meio NFbHP (PEDROSA e YATES, 1984) que apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2 \times 10^{-1}$
NaCl	$1 \times 10^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	$2 \times 10^{-2}$
Ácido nitrilo triacético	$5,6 \times 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,	$2 \times 10^{-2}$
Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1 \times 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \times 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \times 10^{-3}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$2,8 \times 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8 \times 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \times 10^{-4}$

Como fonte de nitrogênio foi utilizado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM. As soluções de fosfatos e de cloreto de amônio foram autoclavados separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso. Quando completo, o meio apresentou pH 6,8 e passou a ser denominado NFbHPN. O meio NFbHPN sólido foi obtido pela adição de ágar (12g/l) ao meio líquido.

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *Escherichia coli* foram: Luria-Broth (LB) (MANIATIS *et al.*, 1982), Triptona-Broth (TB) (MANIATIS *et al.*, 1982), SOB e SOC (BETHESDA RESEARCH TECH., INC.) e Minimal-Medium Agar (MMA) (MILLER, 1974).

O meio LB apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH foi corrigido para 7,0 com NaOH 1N. Os meios sólido e semi-sólido foram obtidos pela adição de ágar nas concentrações de 12g/l e 6g/l ao meio líquido, respectivamente.

O meio TB apresenta os seguintes componentes:

	gramas/litro
Cloreto de Sódio	8,0
Triptona	10,0

Como suplemento foram utilizados maltose e tiamina nas concentrações finais de 0,2% e 5 mg/l, respectivamente. As soluções estoque de maltose (20%) e tiamina (10mg/ml) foram preparadas e esterilizadas separadamente por filtração em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m. O meio TB acrescido de ágar (12g/l) é denominado Triptona-Ágar (TA).

O meio SOB apresenta os seguintes componentes:

	gramas/litro
Triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de Sódio	0,5

Estes componentes foram dissolvidos em água destilada e a seguir foram acrescentados 10 ml de uma solução de cloreto de potássio 250 mM para se obter uma concentração final de 2,5 mM. O pH final da solução foi então ajustado para 7,0 e o volume para 1 litro. Antes do uso foram acrescentados cloreto de magnésio 2 M e sulfato de magnésio 2 M em quantidades suficientes para se obter concentrações finais de 10 mM. Tanto o meio de cultura quanto as soluções estoque de cloreto e sulfato de magnésio foram esterilizadas por autoclavação a 1 atmosfera por 20 minutos.

O meio SOC apresentou a mesma composição do meio SOB, exceto que continha 20 mM de glucose. Uma solução estoque de glucose 1M foi preparada, esterilizada por filtração em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m e acrescentada ao meio SOB no momento de uso.

O meio MMA apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
$K_2HPO_4$	10,5
$KH_2PO_4$	4,5
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
Citrato trissódico dihidratado	0,5
Ágar	12,0

Os sais foram dissolvidos em 200 ml de água destilada para se obter uma solução 5 vezes concentrada. O ágar foi dissolvido em 800 ml de água destilada. Agar e solução salina foram autoclavados separadamente. No momento de uso o meio MMA foi obtido pela adição da solução salina (1 parte) ao agar recém fundido (5 partes). O pH final deste meio foi 7,0.

Este meio foi suplementado com:

	concentração final/litro
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Tiamina	5,0 mg
Glucose	0,2%
Leucina	40 $\mu$ g
Metionina	40 $\mu$ g
Prolina	40 $\mu$ g

Soluções estoque de sulfato de magnésio (20%) e glucose (20%) foram preparadas e esterilizadas em separado por autoclavação. As soluções de tiamina (10 mg/ml) e de aminoácidos (4 mg/ml) foram esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m. Estas soluções foram mantidas sob refrigeração (4°C) sendo adicionadas ao meio no momento de uso

A esterilização por autoclavação dos meios de cultura ou de seus componentes isolados foi feita a 1 atmosfera (120°C) durante 20 minutos.

#### 2.4 TAMPÃO PARA DILUIÇÃO E ESTOCAGEM DE FAGOS

A solução utilizada no preparo de suspensões do bacteriófago lambda::Tn5 para estocagem ou para diluições foi a solução tampão SM (MANIATIS *et al.*, 1982). Esta solução apresenta a seguinte composição:

	em 1 litro de solução
NaCl	5,8 g
MgSO <sub>4</sub> 7.H <sub>2</sub> O	2,0 g
Tris.HCl 1M (pH 7,5)	50 ml
Gelatina 2%	5 ml

Esta solução foi preparada em água destilada e autoclavada a 1 atm durante 20 minutos e estocada a 4°C.

#### 2.5 ANTIBIÓTICOS

As concentrações finais dos antibióticos utilizados nos meios de cultivo para *E. coli* foram: estreptomicina (Sm) 50 µg/ml; cloranfenicol (Cm) 30 µg/ml; tetraciclina (Tc) 10 µg/ml; carbenicilina (Cb) 100 µg/ml; ácido nalidíxico (Nal) 10 µg/ml; ampicilina (Ap) 100 µg/ml e canamicina (Km) 50 µg/ml. As soluções estoque de tetraciclina (10 mg/ml) e cloranfenicol (30

mg/ml) foram preparadas em etanol 50% e 95%, respectivamente. As soluções estoque de estreptomicina (20 mg/ml), ampicilina (100 mg/ml), canamicina (20 mg/ml) e carbenicilina (100 mg/ml) foram preparadas em água destilada e esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m. A solução de ácido nalidíxico (10 mg/ml) foi preparada em água destilada, neutralizada com NaOH 1N para completa solubilização e esterilizada por filtração. As soluções estoque de antibióticos foram mantidas a 0°C.

## 2.6 PREPARO DE SOLUÇÕES DE RNase, PRONASE E DENHARDT

A solução estoque de RNase (10 mg/ml) foi preparada em tampão Tris.HCl 10mM pH 7,5 contendo 15 mM de NaCl e fervida durante 10 minutos para inativação de DNases e outras nucleases contaminantes.

A solução estoque de pronase (20 mg/ml) foi preparada em água bidestilada estéril e autodigerida por 2 horas a 37°C.

A solução de Denhardt (100 vezes concentrada) apresentou a seguinte composição: 2% de albumina bovina, 2% de Ficcol e 2% de polivilpirrolidona. Esta solução foi preparada em água bidestilada, filtrada em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m e estocada a -20°C.

As demais soluções foram preparadas em água destilada ou bidestilada e esterilizadas por autoclavação ou por filtração em filtro Millipore 0,45  $\mu$ m.

## 2.7 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FENOL, CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO E FENOL-CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO

O fenol foi equilibrado com tampão Tris.HCl seguindo procedimento descrito por MANIATIS *et al.*, 1982. Fenol cristalino foi fundido a 65°C, acrescido de 8-hidroxiquinoleína (0,1%) e 1 volume de Tris base 0,5 M. A fase aquosa foi removida após decantação e a fase fenólica foi extraída com tampão Tris.HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, até que o pH da fase aquosa fosse igual ou superior a 7,5. A solução de clorofórmio:álcool isoamílico foi preparada misturando 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico. A solução de fenol-clorofórmio:álcool isoamílico foi preparada misturando 1 parte de fenol tamponado e 1 parte de clorofórmio:álcool isoamílico.

## 2.8 CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

*Herbaspirillum seropedicae* Z78 foi cultivado em meio líquido NFbHPN a 30°C, sob agitação de 130 rpm durante 20-30 horas. As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB a 37°C, sob agitação constante de 130 rpm, até atingirem a fase estacionária, salvo indicações ao contrário. Em todas as culturas foi mantida a relação de 1/5 entre o volume de meio e o volume total do frasco empregado, visando com isso, garantir a mesma aeração durante o crescimento dos microrganismos. As bactérias foram estocadas em suspensão de glicerol 50% a -20°C.

## 2.9 MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS E PREPARO DOS PRÉ-INÓCULOS

As estirpes bacterianas utilizadas foram mantidas a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  em suspensão de glicerol 50%. Para o preparo dos pré-inóculos, aliquotas de 50-150  $\mu\text{l}$  destas suspensões foram transferidas para o meio líquido adequado e incubadas a  $30-37^{\circ}\text{C}$  durante 12-24 horas.

## 2.10 PURIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Células de cem mililitros de uma cultura recente (D.O.  $550 \approx 1,5$ ) de *H. seropedicae* Z78 em meio NFbHPN foram coletadas por centrifugação ( $1960 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos), lavadas com solução tampão Tris.HCl 50 mM pH 8,0 contendo EDTA 20 mM ( $T_{50}E_{20}$ ) e ressuspensas em 15 ml de  $T_{50}E_{20}$  contendo 100 mM de NaCl. Após completa ressuspensão das células, foram adicionadas soluções de SDS (10%) até a concentração de 1%, pronase (20 mg/ml) até a concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3-4 horas. O lisado bruto foi então desproteínizado várias vezes com 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), até que não houvesse precipitado de proteína na interface. A seguir a solução de DNA foi dialisada por 72 horas, com pelo menos 3 trocas de tampão, contra 1.000 volumes de uma solução tampão Tris.HCl 10 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM ( $T_{10}E_1$ ), em saco de diálise previamente tratado. Depois de dialisada, a solução de DNA foi tratada com RNase na concentração final de 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 3 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguida

de novas desproteínizações e diálises. A concentração de DNA bem como sua pureza foram estimados espectrofotometricamente (2.12) e seu tamanho foi determinado por eletroforese em gel de agarose (0,6 %), utilizando como referência o DNA do fago  $\lambda$ cIts857 Sam7 intacto (48,5 kb).

## 2.11 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

### 2.11.1 Purificação de plasmídeos em gradiente de cloreto de céσιο

A purificação de plasmídeos de *E. coli* em larga escala, foi feita em gradiente de cloreto de céσιο/brometo de etídio segundo método descrito por MANIATIS *et al.*, 1982. Células de cem mililitros de uma cultura saturada de *E. coli* (D.O.  $550 \cong 2,0$ ) contendo o plasmídeo de interesse foram coletadas por centrifugação a  $2.800 \times g$  e a  $5^\circ\text{C}$  por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 8 ml de solução tampão Tris.HCl 25 mM pH 8,0 contendo glucose 50mM e EDTA 10 mM (solução de lise I) e incubadas a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Após a incubação foram adicionados 16 ml de NaOH 0,2 N contendo 1% de SDS (solução de lise II). Esta preparação foi cuidadosamente homogeneizada por inversão e incubada em banho de gelo por 10 minutos. O lisado de células foi precipitado pelo acréscimo de 12 ml de uma solução constituída por acetato de potássio 3,0 M e ácido fórmico 1,8 M e incubação em banho de gelo por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado após centrifugação ( $11.600 g$ ,  $4^\circ\text{C}$  por 20 minutos) e o DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volumes

de isopropanol e nova centrifugação por 15 minutos a  $17.600 \times g$  e  $15^\circ\text{C}$ . O precipitado foi lavado com 8 ml de etanol absoluto e dissolvido em 5 ml de solução tampão  $T_{10}E_1$ . Em seguida, 5,25 gramas de cloreto de cézio foram lentamente adicionados à preparação. Após a completa dissolução do cloreto de cézio, foram acrescentados  $262,5 \mu\text{l}$  de uma solução de brometo de etídio (10 mg/ml) e o índice de refração final da solução foi ajustado para 1,39. Esta preparação foi mantida em repouso por 12 horas e depois centrifugada em ultracentrífuga Beckman L65B (rotor Ti 60) a 45.000 rpm durante 48 horas e a  $20^\circ\text{C}$ . As bandas de DNA formadas no gradiente foram visualizadas sob luz ultravioleta e coletadas com o auxílio de agulha acoplada a seringa estéril. Ao volume total de frações coletadas ( $\approx 2 \text{ ml}$ ) foram adicionados 2 volumes de água bidestilada e 6 volumes de etanol absoluto. Esta solução foi centrifugada a  $705 \times g$  durante 20 minutos a  $15^\circ\text{C}$ . Após cuidadosa eliminação do sobrenadante, o precipitado foi secado sob fluxo de argônio e dissolvido em  $500 \mu\text{l}$  de água bidestilada estéril contendo  $50 \mu\text{g/ml}$  de RNase.

### 2.11.2 Minipreparação de plasmídeos

O isolamento de plasmídeos de *E. coli* em pequena escala baseou-se no método de lise alcalina (MANIATIS *et al.*, 1982), no qual foi omitido o uso de lisozima na solução de lise I e a solução de lise II foi substituída por uma solução de NaOH 0,2 N contendo 1% de SDS. Células de 1 mililitro de cultura recente de *E. coli* (D.O.<sub>550</sub>  $\approx 2,0$ ) foram coletadas em tubos plásticos de 1,5 ml por centrifugação em microcentrífuga Spin I (12.000 rpm), durante 2 minutos, a  $5^\circ\text{C}$ . O precipitado foi ressuspenso

em 100  $\mu$ l de solução de lise I (2.11.1) e mantido em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. As células foram lisadas pela adição de 200  $\mu$ l de NaOH 0,2 N contendo 1% de SDS e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. O DNA cromossomal desnaturado, proteínas, SDS e restos celulares foram precipitados pela adição de 158  $\mu$ l de solução de lise II (2.11.1) e incubação em banho de gelo por 15 minutos. Após este período, foi feita a desproteização através da adição de 450  $\mu$ l de fenol-clorofórmio (1:1), agitação e centrifugação (12.000 rpm, 5°C por 10 minutos). O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi coletado, transferido para novo tubo e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol. O DNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 80%, secado sob fluxo de argônio e ressuspensão em 20-30  $\mu$ l de água bidestilada estéril contendo 10  $\mu$ g/ml de RNase.

## 2.12 QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

A concentração de DNA de fita dupla foi determinada por método espectrofotométrico (BERGER, 1987). A absorvância da solução de DNA foi determinada em 260 nm e 280 nm e para o cálculo foi empregada a seguinte relação:  $D.O._{260} = 1,0$  corresponde a uma concentração de 50  $\mu$ g/ml de DNA de fita dupla. As preparações de DNA eram consideradas puras quando apresentavam uma relação  $D.O._{260}/D.O._{280}$  entre 1,8 e 2,0.

### 2.13 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

As eletroforeses de DNA em gel de agarose foram realizadas como descrito por MANIATIS *et al.*, 1982.

Os géis de agarose foram preparados fundindo agarose dissolvida em solução tampão Tris base 89 mM contendo ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0 (TBE) ou Tris base 40 mM contendo acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM pH 8,0 (TAE), a quente. O gel fundido foi transferido para placas suporte (40 cm<sup>2</sup> ou 143 cm<sup>2</sup>) contendo pentes para eletroforese analítica ou preparativa. A concentração de agarose variou de 0,3 a 1,0%, de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA a serem separados. O tampão de preparo do gel foi utilizado também na corrida eletroforética. Amostras contendo aproximadamente 10-200 ng de DNA, foram aplicadas com tampão GSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, glicerol 50% em T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>) ou FSUDS (azul de bromofenol 0,2%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>), na proporção de uma parte de tampão para quatro partes de amostra (MANIATIS *et al.*, 1982).

As eletroforeses foram desenvolvidas a 5 volts/cm por 3-4 horas ou 1,0-1,5 volts/cm durante 12-16 horas. Para a visualização das bandas de DNA o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) durante 30 minutos a 1 hora e o excesso de corante foi retirado com água destilada. A visualização das bandas DNA/brometo de etídio foi feita em transiluminador ultravioleta. Os géis foram fotografados com câmara fotográfica equipada com filtros ultravioleta e vermelho. Foram utilizados filmes preto e branco da marca Kodak ISO/ASA 100. A abertura focal foi de 1.8 e os tempos de

exposição variaram de 1/2 a 1/15 de segundo.

#### 2.14 CONDIÇÕES DE CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As condições utilizadas para a clivagem de DNA com enzimas de restrição foram aquelas especificadas pelo fabricante ou por MANIATIS *et al.*, 1982. Soluções tampão com diferentes concentrações de NaCl foram utilizadas de acordo com o tipo de enzima de restrição. As fórmulas destas soluções tampão são as seguintes (BOHERINGER MANNHEIM BIOCHIMICA, 1987):

Tampão de restrição A:

Tris-Acetato	33 mM	pH 7,9 a 37°C
Acetato de Mg	10 mM	
acetato de K	66 mM	
DTT	0,5 mM	

Tampão de restrição B:

Tris.HCl	10 mM	pH 8,0 a 37°C
NaCl	100 mM	
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	
2-Mercaptoetanol	1 mM	

Tampão de restrição H:

Tris.HCl	50 mM	pH 7,5 a 37°C
NaCl	100 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
DTE	1 mM	

Usualmente 1-5 unidades de enzima de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2-1  $\mu\text{g}$  de DNA em um volume de 20  $\mu\text{l}$  durante 1-4 horas na presença do tampão adequado e a 37°C.

#### 2.15 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE PARCIAL PARA O DNA DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

A nove tubos plásticos de 1,5 ml foram adicionados cerca de 2  $\mu\text{g}$  de DNA cromossomal de *H. seropedicae* Z78 dissolvido em 20  $\mu\text{l}$  de tampão de restrição A (2.14). Ao primeiro tubo foram adicionados 20  $\mu\text{l}$  de tampão A contendo 1 unidade de enzima *Sau3A*. Após breve homogeneização, 20  $\mu\text{l}$  desta solução foram transferidos para o segundo tubo. Este procedimento foi repetido até o último tubo do qual foram descartados 20  $\mu\text{l}$ . Após incubação de 1 hora a 37°C amostras das misturas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,4%. Os padrões de tamanho molecular foram: DNA do fago lambda intacto ( $\cong$  48,5 kb), DNA do fago lambda clivado com a enzima *SalI* (3 fragmentos: 32,7 kb; 15,2 kb e 0,5 kb) e DNA do fago lambda clivado com a enzima *HindIII* (8 fragmentos: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 0,56 kb e 0,12 kb) (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHIMICA, 1987). A diluição da enzima que produziu maior quantidade de fragmentos com tamanho molecular entre 15,2 kb a 32,7 kb foi determinada por comparação com os padrões de tamanho molecular.

## 2.16 CLIVAGEM DO DNA DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78 EM LARGA ESCALA

DNA total de *H. seropedicae* Z78 ( $\cong 100 \mu\text{g}$ ) foi clivado nas mesmas condições empregadas para a reação descrita no item 2.15, mas com a metade da concentração de enzima *Sau3A* necessária para produzir a maior quantidade de fragmentos na faixa de 15,2 kb a 32,7 kb (MANIATIS et al., 1982). Uma alíquota desta reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,6% para verificar a extensão da clivagem.

## 2.17 SELEÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78 APÓS CLIVAGEM EM LARGA ESCALA

Os fragmentos resultantes da hidrólise parcial do DNA de *H. seropedicae* Z78 (2.16) foram precipitados e ressuspensos em 100  $\mu\text{l}$  de água bidestilada. Fragmentos com tamanho molecular variando entre 15,2 kb e 32,7 kb foram purificados por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,7% (2.29). O DNA purificado foi dissolvido em 20  $\mu\text{l}$  de água bidestilada. A concentração de DNA foi estimada por método espectrofotométrico (2.12).

## 2.18 CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pLAFR3

A dois tubos plásticos de 1,5 ml foram adicionados cerca de 4  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pLAFR3 (STASKAWICZ et al., 1987)

purificado segundo o item 2.11.1. O DNA do primeiro tubo foi clivado com a enzima *HindIII* e o do segundo tubo com a enzima *EcoRI*, nas condições descritas no item 2.14, por 1 hora. A seguir, 1  $\mu$ l da enzima fosfatase alcalina (1 U/ $\mu$ l) foi adicionado a cada tubo e estes foram novamente incubados por 1 hora a 37°C. Após desfosfatização, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,7% e os plasmídeos linearizados foram purificados (2.29). Os plasmídeos clivados com *HindIII* e *EcoRI* e desfosfatizados foram então clivados separadamente com a enzima *BamHI* por 1 hora a 37°C, obtendo-se os braços *HindIII/BamHI* e *EcoRI/BamHI* que foram desproteinizados com fenol-clorofórmio, precipitados com etanol e dissolvidos em 20  $\mu$ l de água bidestilada estéril.

## 2.19 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

O banco de genes de *H. seropedicae* Z78 foi construído segundo o método descrito por STASKAWICZ *et al.*, 1987.

Fragmentos *Sau3A* de DNA de *H. seropedicae* Z78 ( $\cong$  4,0  $\mu$ g), com tamanho molecular entre 15,2 e 32,7 kb, foram misturados com os fragmentos *HindIII/BamHI* ( $\cong$  2,0  $\mu$ g) e *EcoRI/BamHI* ( $\cong$  2,0  $\mu$ g) (2.18) do vetor pLAFR3 em um tubo plástico de 1,5 ml. O tubo foi aquecido durante 5-10 minutos a 65°C e rapidamente resfriado em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 2  $\mu$ l da enzima T-4 DNA ligase ( $\cong$  2 unidades), 2  $\mu$ l de tampão de ligação 10 vezes concentrado (Tris.HCl 660 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTT 50 mM, ATP 10 mM; pH 7,5 - MANIATIS *et al.*, 1982) e água

bidestilada estéril suficiente para um volume final de 20  $\mu$ l. Esta mistura de ligação foi incubada a 16°C por 24 horas. A reação de ligação ocorre entre as pontas *Sau*3A e *Bam*HI dos fragmentos uma vez que as extremidades coesivas produzidas por *Sau*3A contém uma sequência de tetranucleotídeos igual aquela das extremidades coesivas produzidas por *Bam*HI (GATC). Dois microlitros da reação de ligação foram empacotados em partículas de fago lambda (2.19.1) e 20-40  $\mu$ l da mistura de empacotamento foram utilizados para infectar 100  $\mu$ l de suspensão de células de *E. coli* HB101 (2.19.2). As células infectadas foram plaqueadas em meio LA contendo 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina e 15  $\mu$ g/ml de tetraciclina. Colônias resistentes a estes dois antibióticos foram coletadas, estocadas em suspensões de glicerol 50% a -20°C e constituem o banco de genes de *H. seropedicae* Z78.

Os tópicos seguintes detalham a metodologia empregada nas diferentes etapas da construção do banco de genes.

#### 2.19.1 Empacotamento do DNA recombinante em partículas de fago lambda "in vitro"

Para o empacotamento do DNA recombinante foi utilizado o conjunto de empacotamento de DNA (DNA Packaging Kit), adquirido de Anglian Biotechnology Ltd, conforme instruções do fornecedor. Este sistema de empacotamento "in vitro" consiste de extrato sonicado (SE) e extrato lisado por congelamento/descongelamento (FTL) obtidos de duas estirpes lisogênicas de *E. coli*. Estas duas estirpes, BHB2690 e BHB2688, apresentam mutações distintas embora complementares, em genes envolvidos no processo de maturação do fago lambda (Hohn,

1979).

Os extratos de empacotamento mantidos a  $-70^{\circ}\text{C}$ , foram descongelados em banho de gelo. Em um tubo plástico de 1,5 ml foram misturados 2  $\mu\text{l}$  de mistura de ligação ( $\cong 0,8 \mu\text{g}$  de DNA recombinante), 10  $\mu\text{l}$  de extrato SE e 10  $\mu\text{l}$  de extrato FTL e homogeneizados levemente. Este sistema de empacotamento foi incubado a  $28^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu\text{l}$  de tampão SM e finalmente, as misturas de empacotamento foram estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.19.2 Infecção de *E. coli* HB101 com partículas de fago lambda contendo DNA recombinante

Uma colônia de *E. coli* HB101 foi inoculada em meio TB contendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina e incubada sob agitação de 130 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Duzentos microlitros desta cultura saturada foram utilizados como pré-inóculo para 20 ml de meio TB isento de antibióticos. Esta cultura foi incubada sob agitação de 180 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$  por 6 horas (D.O.<sub>550</sub>  $\cong 1,0$ ). Após incubação as células foram coletadas por centrifugação (1.960  $\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos) e ressuspensas em 6 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Aliquotas de 20-40  $\mu\text{l}$  de mistura de empacotamento (2.19.1) foram distribuídas em tubos plásticos de 1,5 ml, acrescidas de 100  $\mu\text{l}$  de suspensão de células tratadas com  $\text{MgSO}_4$  e levemente homogeneizadas. Estas misturas de foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos sem agitação, após o que foram completadas com 1 ml de meio LB e incubadas por mais 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após 2 minutos de centrifugação em microcentrífuga Spin I (12.000 rpm e  $5^{\circ}\text{C}$ ), 1 ml do sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas no meio residual foram espalhadas em placas de meio LA contendo os

antibióticos adequados. As culturas foram incubadas a 37°C por 24-36 horas e as colônias coletadas foram estocadas em suspensões de glicerol 50% a -20°C.

### 2.19.3 Avaliação da eficiência de ligação entre o DNA-inserto e o vetor

O plasmídeo pLAFR3 apresenta um fragmento *Hae*II com 454 pares de bases onde está contido o gene *lacZ* que codifica para a enzima  $\beta$ -galactosidase. Neste fragmento existem ainda, sítios únicos de restrição e clonagem para seis diferentes enzimas: *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI, *Sma*I e *Eco*RI (STASKAWICZ et al., 1987). Quando intacto, o plasmídeo pLAFR3 é capaz de complementar mutantes *lacZ* de *E. coli* ( $\alpha$  complementação) crescidos em meio contendo substâncias indutoras do gene *lacZ* como o isopropil- $\beta$ -D-tio-galactopiranosídeo (IPTG). A inserção de um fragmento de DNA em qualquer dos sítios de restrição acima causa inativação do gene da  $\beta$ -galactosidase, que perde a capacidade de promover  $\alpha$  complementação.

Durante a avaliação da eficiência das ligações entre fragmentos de DNA de *H. seropedicae* Z78 e o plasmídeo pLAFR3 clivado pelas enzimas *Hind*III, *Eco*RI e *Bam*HI (2.14), foi utilizada a bactéria *E. coli* 71.18 que é uma estirpe mutante para o gene *lacZ* capaz de ser  $\alpha$ -complementada pelo gene *lacZ'* (MESSING, 1977). Este teste foi feito pelo método descrito por MANIATIS et al., 1982. Uma alíquota de 2  $\mu$ l da mistura de empacotamento foi utilizada para infectar células de *E. coli* 71.18 como descrito no item 2.19.2. Colônias resistentes a tetraciclina foram isoladas e transferidas para uma placa contendo 25 ml de meio LA, 20  $\mu$ l de IPTG 10 mM e 25  $\mu$ l de

5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactosídeo (X-gal) 2%. As soluções de IPTG e X-gal foram preparadas imediatamente antes do uso. Após incubação a 37°C por 12-14 horas a placa foi analisada para o aparecimento de colônias azuis e/ou brancas. Colônias azuis indicam atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase sobre o substrato cromogênico X-gal e conseqüentemente a presença de um gene *lacZ* ativo isto é, isento de DNA-inserto. Colônias brancas indicam ausência de atividade  $\beta$ -galactosídica e portanto um gene *lacZ* inativado pela presença de um fragmento de DNA-inserto.

#### 2.19.4 Cálculo da representatividade do banco de genes

A representatividade do banco genômico foi calculada pela seguinte fórmula (CLARKE e CARBON, 1976):

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

calculando para P,

$$P = 1 - e^{-N \cdot \ln(1-f)}$$

onde P é a probabilidade, *f* é fração do genoma em um único recombinante e N é o número necessário de recombinantes.

#### 2.20 CONTAGEM DE CÉLULAS BACTERIANAS VIÁVEIS

O número de células viáveis presentes em uma cultura bacteriana foi determinado conforme método descrito por MILLER, 1974. Aliquotas de 100  $\mu$ l obtidas de diluições seriadas ( $10^{-2}$  a

$10^{-8}$ ) da cultura foram espalhadas sobre placas com meio sólido contendo antibióticos adequados e/ou suplementado com os nutrientes requeridos. Após incubação por 12-16 horas a 37°C, o número de colônias formadas foi registrado e considerado correspondente ao número de células viáveis existente, uma vez que cada célula viável origina uma colônia (Pelczar et al., 1980). Uma célula viável isolada foi então considerada uma "unidade formadora de colônia" (UFC). Para obtenção do número de células viáveis por mililitro de cultura, o número de colônias crescidas em cada placa foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente.

## 2.21 SELEÇÃO DE CLONES DO BANCO DE GENES RESISTENTES AO METANOSULFONATO DE METILA

A seleção de colônias resistentes ao agente alquilante metanosulfonato de metila (MMS), foi feita como descrito por BETTER e HELINSKI, 1983. Células de *E. coli* HB101 contendo plasmídeos recombinantes e representando o banco de genes de *H. seropedicae* Z78 foram inoculadas em 10 ml de meio LB e incubadas a 37°C por 16 horas. Uma amostra da cultura saturada (D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  2,5) foi diluída, em solução estéril de NaCl 0,85%, à concentração final de  $\cong 6 \times 10^5$  células por mililitro. Cada célula foi considerada como uma unidade formadora de colônia (UFC). Uma alíquota de 120  $\mu$ l contendo cerca  $6,5 \times 10^4$  células foi plaqueada em meio seletivo que consistiu de LA acrescido de metanosulfonato de metila 0,01%. Após 15 horas de incubação a 37°C, as colônias foram contadas. A frequência de aparecimento

de colônias resistentes ao MMS foi calculada pela relação entre o número de colônias que cresceram no meio seletivo e o número de UFC inicial. As colônias resistentes foram coletadas e estocadas em suspensão de glicerol 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.22 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM CLORETO DE CÁLCIO

A transformação de diferentes estirpes de *E. coli* com DNA plasmidial foi conduzida pelo método clássico descrito por MANIATIS *et al.* 1982, ou pelo método rápido descrito por SOUZA, 1990. Estes dois métodos diferem quanto ao tempo de cultivo das células e quanto ao volume de cultura empregado na obtenção das células competentes.

### 2.22.1 Transformação clássica

Vinte mililitros de meio LB pré-aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$  foram inoculados com  $80\ \mu\text{l}$  de uma cultura recente e saturada de *E. coli* (D.O.<sub>600</sub> inicial de 0,02) e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  sob forte agitação (200 rpm) por 2 a 3 horas (D.O.<sub>600</sub> final de 0,3-0,5). A cultura foi então resfriada em banho de gelo durante 10 minutos e as células coletadas por centrifugação ( $2.800 \times g$ ,  $5^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos). O precipitado foi ressuspensão em 10 ml de solução estéril Tris.HCl 10 mM pH 8,0 contendo  $\text{CaCl}_2$  50 mM (tampão de transformação), incubado em gelo durante 30-40 minutos e novamente centrifugado. No preparo de células competentes de *E. coli* estirpe MC1061 foi utilizada uma solução contendo apenas  $\text{CaCl}_2$  100 mM em substituição do tampão de

transformação descrito acima (SOUZA, 1990). Estas células, tornadas competentes por tratamento com  $\text{CaCl}_2$ , foram coletadas por centrifugação ( $2.800 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos) e ressuspensas em 1,2 ml de tampão de transformação. Aliquotas desta suspensão (0,2 ml) foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 ml previamente gelados.

Para a transformação, foram adicionados 1-5  $\mu\text{l}$  de solução de DNA plasmidial ou de uma mistura de ligação (2.30.3) a cada alíquota de 0,2 ml de suspensão de células de *E. coli* competentes. Esta preparação foi levemente homogeneizada e incubada em banho de gelo durante 30-40 minutos. Em seguida, a suspensão de células/DNA plasmidial foi submetida a um choque térmico em banho-maria a  $42^\circ\text{C}$  por 3 minutos e imediatamente resfriada em banho de gelo por 5-10 minutos. Oitocentos microlitros de meio LB foram então adicionados a cada tubo e os sistemas foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 3 horas sem agitação. Esta etapa permite a expressão dos genes de resistência aos antibióticos. Aliquotas de 100  $\mu\text{l}$  de cada tubo foram então plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos adequados e foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 16-22 horas. As colônias transformantes foram coletadas e estocadas em suspensão de glicerol 50% a  $-20^\circ\text{C}$ . Alternativamente, as colônias eram isoladas, repicadas em novas placas contendo LA e antibióticos específicos, reincubadas e finalmente estocadas em glicerol 50% a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 2.22.2 Transformação rápida

Um mililitro de cultura recente de *E. coli* (D.O.<sub>600</sub>  $\cong$  1,0-2,0) foi transferido para um tubo plástico de 1,5 ml e as

células foram coletadas por centrifugação ( $7.245 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos). Após descarte do sobrenadante as células foram ressuspensas em 0,2 ml de tampão de transformação (2.22.1) e incubadas em banho de gelo por 30-40 minutos. Uma alíquota da solução de DNA plasmidial (1-5  $\mu\text{l}$ ) foi adicionada e a suspensão novamente incubada em gelo por 30 minutos. O sistema foi então submetido a um choque térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos e reincubado em banho de gelo por mais 5 minutos. Após a adição de 800  $\mu\text{l}$  de meio LB, as células foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1-2 horas e plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados. As colônias resistentes ao antibiótico presente no meio seletivo foram coletadas e testadas para a presença de plasmídeos.

## 2.23 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

No método de preparo e na transformação de células de *E. coli* por eletroporação foram seguidas as instruções descritas no manual do Cell-Porator Electroporation System (BETHESDA RESEARCH TECH, INC.).

### 2.23.1 Preparo de células competentes

Uma colônia de células de *E. coli* HB101 foi utilizada para inocular 50 ml meio SOB (sem magnésio) contidos em um frasco de 500 ml. Este pré-inóculo foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação vigorosa (200 rpm), durante 14 horas. Quinhentos microlitros do pré-inóculo foram utilizados para inocular 500 ml de meio SOB contidos em um frasco de 2000 ml. Este inóculo foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob forte agitação (200 rpm) por 3 horas

(D.O.<sub>550</sub> = 0,8). A cultura foi então resfriada em banho de gelo durante 10 minutos e as células coletadas por centrifugação a  $2.800 \times g$ , a  $5^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. A seguir precipitado foi lavado duas vezes por ressuspensão em 500 ml de uma solução de glicerol 10% gelada. Após cada lavagem as células foram coletadas por centrifugação a  $2.800 \times g$ , a  $5^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após lavadas, as células foram em 2 ml de solução de glicerol 10% gelada e distribuídas em alíquotas de  $200 \mu\text{l}$  em tubos plásticos de 1,5 ml. As células alíquotadas foram mantidas congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

#### 2.23.2 Eletroporação

Uma alíquota de  $200 \mu\text{l}$  de células de *E. coli* HB101, preparadas conforme o item 2.23.1, foi descongelada lentamente em banho de gelo e utilizada durante o processo de eletroporação. Oitenta microlitros desta amostra foram distribuídos em alíquotas de  $20 \mu\text{l}$  entre quatro tubos plásticos de 1,5 ml e mantidos em gelo. A cada tubo foi acrescentado  $1 \mu\text{l}$  de solução de DNA plasmidial e o conjunto foi levemente homogeneizado. O volume célula/DNA de cada tubo foi então transferido para uma câmara de eletroporação devidamente identificada. As quatro câmaras foram ajustadas na câmara de segurança e as células submetidas a uma corrente elétrica de 2.400 Volts. A seguir, as células foram transferidas para frascos de 25 ml contendo 2 ml de meio SOC e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 130 rpm, por 1 hora. Após incubação, alíquotas de 50 ou  $100 \mu\text{l}$  de células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados para seleção das receptoras. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16-24 horas. As colônias obtidas foram

coletas e analisadas para a presença de plasmídeos (2.12.2).

## 2.24 EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE CÉLULAS BACTERIANAS

O efeito da radiação ultravioleta sobre células bacterianas foi determinado seguindo o método descrito por MILES *et al.*, 1986. Células de diferentes estirpes de *E coli* cultivadas em meio LB até densidade de  $1-3 \times 10^8$  células/ml (D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  0,5) foram coletadas por centrifugação ( $1.960 \times g$ , 4°C por 10 minutos) e ressuspensas em igual volume de solução estéril de NaCl 0,85%. Um mililitro desta suspensão foi espalhado no fundo de uma placa de Petri estéril e exposto à radiação ultravioleta emitida por uma lâmpada germicida General Electric modelo G15T8 15W. A distância entre a placa contendo a amostra e a lâmpada foi mantida em 60 cm. Os tempos de exposição variaram de zero a 30 segundos e entre cada tempo foi colhida uma alíquota de 100  $\mu$ l a qual foi diluída ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) com a solução de NaCl 0,85%. Em seguida 100  $\mu$ l de cada diluição foram plaqueados em meio LA e as placas foram incubadas a 37°C por 12-14 horas, no escuro para prevenir fotorreativação. Após incubação, o número de células sobreviventes foi determinado pela contagem do número de UFC por placa.

## 2.25 EFEITO DO METANOSULFONATO DE METILA SOBRE CÉLULAS BACTERIANAS

O efeito do MMS sobre o crescimento bacteriano foi determinado conforme o método descrito por RESNICK e NELSON, 1988. Células de diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $1-3 \times 10^8$  células/ml (D.O.<sub>550</sub>  $\cong 0,5$ ) e coletadas por centrifugação a  $1.960 \times g$ , 5°C por 10 minutos. A massa celular foi então ressuspensa em igual volume de solução estéril de NaCl 0,85%, diluídas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) e plaqueadas em meio LA contendo concentrações seriadas de MMS (zero a 5 mM). Após 16 horas de incubação a 37°C as colônias formadas foram contadas e a porcentagem de sobrevivência foi determinada.

## 2.26 TESTE DE ESTABILIDADE PARA ESTIRPES Hfr

O teste de estabilidade para o caráter Hfr foi feito conforme método descrito por MILLER, 1974. Estirpes bacterianas que contém o fator F integrado em seu cromossomo são ditas estirpes Hfr (high frequency recombination = alta frequência de recombinação) (MILLER, 1974). Entretanto, algumas estirpes são instáveis na preservação deste caráter e podem acumular uma proporção substancial de revertentes  $F^+$  após longos períodos de estocagem (MILLER, 1974). Portanto, quando se realizam ensaios que envolvem estirpes Hfr é necessário testá-las para a estabilidade deste caráter.

Colônias isoladas de *E. coli* HfrC foram obtidas por

plaqueamento de 100  $\mu$ l de cultura recente (D.O.<sub>550</sub>=1) e diluída ( $10^{-6}$ ), em meio LA após incubação por 14 horas a 37°C. Estas colônias foram repicadas em uma placa mestra e reincubadas a 37°C por 6-8 horas. A seguir, as colônias da placa mestra foram transferidas por "replica plating" (MANIATIS *et al.*, 1982) para placa seletiva contendo o meio MMA onde haviam sido previamente espalhados 200  $\mu$ l de uma cultura recente (D.O.<sub>550</sub>=1) de *E. coli* F<sup>-</sup>, auxotrófica para prolina, como recipiente. Após 14 horas de incubação a 37°C a placa seletiva foi comparada com a placa mestra. Colônias recombinantes Pro<sup>+</sup> cresceram somente nas áreas da placa seletiva onde as colônias doadoras eram HfrC pois estas transferem eficientemente o gene *pro* para as estirpes F<sup>-</sup>. Desta forma, após comparação das placas mestra e teste foi possível identificar e isolar da placa mestra as colônias que mantiveram o caráter HfrC.

## 2.27 TESTE DE PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO

*Escherichia coli* HfrC foi conjugada com *E. coli* RR1 e/ou *E. coli* HB101 de acordo com o método descrito por KOKJOHN e MILLER, 1985. Esta metodologia permitiu determinar a proficiência de recombinação das estirpes de *E. coli*. Uma colônia de *E. coli* HfrC foi inoculada em meio LB e incubada a 37°C e 130 rpm por 4-6 horas (D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  0,55 equivalente a  $2-3 \times 10^8$  células/ml). Cem microlitros desta cultura foram então misturados com 1 ml de uma cultura recente de *E. coli* RR1 ou HB101, esta última contendo ou não plasmídeo recombinante, (D.O.<sub>550</sub>  $\cong$  0,55-0,65 equivalente a  $2-3 \times 10^8$  células/ml). A

mistura de conjugação foi, em seguida, incubada durante 2 horas a 37°C sem agitação. A conjugação foi interrompida por forte agitação da mistura em agitador de tubos e as células foram coletadas por centrifugação em microcentrífuga Spin I a 12.000 rpm por 1 minuto. A seguir as células foram ressuspensas em 1,1 ml de meio MM contendo glucose 0,2% e diluídas em meio MM ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ). Cem microlitros de cada sistema de diluição foram plaqueados em meio MMA suplementado com os aminoácidos e antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 37°C durante 48-72 horas e as colônias foram finalmente contadas.

## 2.28 CONJUGAÇÃO

A transferência de plasmídeos por conjugação foi feita conforme descrição abaixo. As estirpes doadoras foram *E. coli* S17.1 que possui os genes *tra* do plasmídeo RK4 integrados no cromossomo (SIMON *et al.*, 1983), e *E. coli* 1230(R6845). O plasmídeo R6845 contém os genes *tra* sendo portanto um plasmídeo auto-transferível (HAAS e HOLLOWAY, 1978). A formação do "pillus" conjugativo e a transferência de plasmídeos de uma estirpe para outra depende da expressão coordenada dos genes *tra* (HARDY, 1981). Conjugações envolvendo *E. coli* S17.1 tinham por fim a transferência de plasmídeos recombinantes de uma estirpe para outra e conjugações envolvendo *E. coli* 1230(R6845) tinham por fim a eliminação do plasmídeo recombinante e presente na estirpe receptora, pelo plasmídeo R6845.

Células de *E. coli* estirpes doadora e receptora, ambas em fase exponencial de crescimento, foram lavadas com meio LB,

ressuspensas em 1 ml do mesmo meio e misturadas na proporção de 1:10 (100  $\mu$ l da estirpe doadora para 1000  $\mu$ l da estirpe receptora). A mistura foi incubada durante 2 horas a 37°C sem agitação. A conjugação foi interrompida por forte agitação da mistura em agitador de tubos. A seguir a mistura foi diluída em meio LB ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) e alíquotas de 100  $\mu$ l de cada volume de diluição foram plaqueados em meio LA contendo os antibióticos necessários à seleção das colônias transconjugantes. As placas foram incubadas por 15-20 horas a 37°C e os transconjugantes contados, coletados, analisados e estocados em suspensão de glicerol 50% a -20°C.

## 2.29 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO

A purificação de fragmentos de DNA plasmidial em gel de agarose de baixo ponto de fusão foi feita conforme descrito por BANKIER *et al.*, 1987. O plasmídeo fo purificado em larga escala por gradiente de cloreto de céσιο (2.11.1) ou como descrito para minipreparação (2.11.2). Neste último caso, os volumes dos reagentes foram ajustados proporcionalmente ao volume inicial da cultura. O DNA plasmidial foi, então, submetido à clivagem pela enzima de restrição adequada e os fragmentos foram separados em eletroforese preparativa em gel de agarose (0,6-1,0%) de baixo ponto de fusão, e utilizando tampão TAE. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador ultravioleta. Em seguida, a fração do gel contendo a banda de interesse foi cortada,

transferida para um tubo plástico de 1,5 ml e fundida a 65°C por 5 minutos. Após a fusão foram adicionadas soluções de Tris.HCl (1M pH 8,0), EDTA (0,5 M) e NaCl (5 M) até as concentrações finais de 10 mM, 1 mM e 0,25 mM respectivamente. Um volume de fenol tamponado foi acrescentado ao gel fundido, a mistura foi agitada vigorosamente, em agitador de tubos, durante 1 minuto e depois mantida em repouso por 10 minutos. O sistema foi então centrifugado em microcentrífuga Spin I (12.000 rpm, 5°C por 3 minutos), a fase aquosa foi coletada e a fase fenólica extraída com um volume de  $T_{10}E_1$ . As fases aquosas contendo o DNA foram reunidas ( $\cong 500 \mu\text{l}$ ), extraídas novamente com 1 volume de fenol e fenol-clorofórmio. A solução de DNA foi concentrada por extração com N-butanol ao volume final de 100  $\mu\text{l}$  e posteriormente, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol e 1,4 volumes de acetato de amônio 5 M. O DNA foi centrifugado, lavado com 500  $\mu\text{l}$  de etanol 80%, secado sob fluxo de argônio e finalmente dissolvido em 10-15  $\mu\text{l}$  de água bidestilada estéril.

## 2.30 SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA

Na subclonagem de fragmentos de DNA foram utilizados como vetores o plasmídeo pSUP202 (SIMON *et al.*, 1986) ou o plasmídeo pTZ18R (MEAD *et al.*, 1986). O plasmídeo pSUP202 apresenta sítios únicos de restrição para as enzimas *Hind*III, *Eco*RI e *Bam*HI, e confere resistência aos antibióticos tetraciclina, cloranfenicol e ampicilina. O plasmídeo pTZ18R contém o gene

*lacZ'* derivado do plasmídeo pUC18 com múltiplos sítios de restrição. Este plasmídeo confere resistência a ampicilina.

### 2.30.1 Preparo do vetor

Quatro microlitros ( $\cong$  200 ng) de uma solução do vetor de interesse foram submetidos a clivagem pelas enzimas *Hind*III, *Bgl*II ou *Bam*HI separadamente, nas condições de restrição citadas no item 2.14. Os fragmentos lineares de DNA obtidos foram defosfatizados pela enzima fosfatase alcalina para prevenir religações intra e/ou intermoleculares (0,5-1,0 unidade/ $\mu$ g de plasmídeo por 1-2 horas a 40°C). A reação foi interrompida pela adição de EGTA (concentração final de 50 mM) e o sistema foi incubado durante 30 minutos a 65-70°C para inativar a fosfatase alcalina. Em seguida o sistema foi desproteínizado com 1 volume de fenol tamponado e incubação a 65-70°C por 30 minutos. A solução aquosa foi coletada após centrifugação em microcentrífuga Spin I (12.000 rpm, 5°C por 5 minutos) e tratada com 1 volume de fenol-clorofórmio. O DNA foi então precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol por 1 hora a -20°C, centrifugado (12.000 rpm, 5°C por 15 minutos), lavado com 200  $\mu$ l de etanol 80% e secado sob fluxo de argônio. O DNA precipitado foi finalmente dissolvido em 5  $\mu$ l de água bidestilada.

### 2.30.2 Preparo do DNA-inserto

A obtenção de fragmentos de DNA-inserto para subclonagem foi feita através de clivagem enzimática do DNA plasmidial com posterior purificação dos fragmentos de interesse em gel de agarose de baixo ponto de fusão (2.29).

No preparo do DNA-inserto não foram empregados EGTA e a enzima fosfatase alcalina.

### 2.30.3 Ligaçãõ

As ligações para obtenção de subclones consistiram na reunião do fragmento de DNA-inserto purificado e do vetor linearizado, na proporção de 4:1 ( $\cong$  20 ng inserto: 5 ng vetor). O conjunto inserto/vetor foi incubado em banho-maria a 65°C por 5-10 minutos e imediatamente resfriado em banho de gelo. A seguir foram adicionados 2  $\mu$ l de enzima T4 DNA ligase (1U/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l de tampão ligase 5 vezes concentrado e água bidestilada estéril suficiente para um volume final de reação de 20  $\mu$ l. A mistura de ligação foi homogeneizada levemente e incubada por 16-20 horas a temperatura de 18-20°C. A eficiência da ligação foi monitorada por eletroforese em gel de agarose (2.13).

As misturas de ligação foram empregadas na transformação de diferentes estirpes de *E. coli*, por tratamento das células com cloreto de cálcio (2.22) ou por eletroporação (2.23).

## 2.31 MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR SÍNTESE E UTILIZANDO HEXADESOXINUCLEOTÍDEOS COMO "PRIMER"

O método de marcação de fragmentos de DNA com  $^{32}$ P empregado foi o descrito por FEINBERG e VOGELSTEIN (1983 e 1984). Os oligonucleotídeos e o tampão de reação compunham o sistema "Random Primed DNA Labeling Kit" (Boehringer Mannheim Biochimica).

O DNA ( $\cong$  25 ng) a ser marcado foi ressuspenso em água

bidestilada estéril (11,5  $\mu$ l), desnaturado em banho de água fervente (95-100°C) durante 8 minutos e imediatamente resfriado em banho de gelo (0°C). Ao tubo contendo o DNA desnaturado foram adicionados 3  $\mu$ l de uma mistura de desoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP, 1:1:1), 2  $\mu$ l de tampão de reação 10 vezes concentrado e contendo uma mistura de hexadesoxinucleotídeos, 3  $\mu$ l de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (30 $\mu$ Ci) e 2  $\mu$ l de enzima Klenow (1 U/ $\mu$ l). Estes componentes foram misturados suavemente, a mistura foi centrifugada momentaneamente e incubada a temperatura ambiente durante 16 horas.

## 2.32 DETERMINAÇÃO DA RADIOATIVIDADE INCORPORADA AO DNA-SONDA

A extensão da radioatividade incorporada ao DNA-sonda durante sua síntese foi determinada através do método descrito por MANIATIS *et al.*, 1982.

Uma amostra da mistura de reação para síntese do DNA-sonda foi utilizada na obtenção de sistemas de diluição a partir de 1:50 até 1:100. Aliquotas de 4  $\mu$ l de cada um destes sistemas foram depositadas sobre dois pedaços de papel de DEAE-celulose (4 cm<sup>2</sup>). Um dos pedaços (papel-controle) não foi submetido a nenhum tipo de tratamento. O outro pedaço (papel-teste) foi lavado em fosfato dibásico de sódio (0,5 M) por 5 minutos (6 vezes), em água bidestilada por 2 minutos (2 vezes) e em etanol (95%) por 2 minutos (2 vezes). Os dois pedaços de papel contendo DNA adsorvido foram secos a temperatura ambiente e a radioatividade de cada um foi determinada em contador de

cintilações líquidas empregando líquido de Bray (Bray, 1960) como líquido cintilador. A relação entre o número de cintilações por minuto detectadas no papel-teste (radioatividade incorporada) e no papel-controle (radioatividade total) forneceu um valor que multiplicado por 100 correspondeu à percentagem de incorporação de nucleotídeos marcados com  $^{32}\text{P}$  ao DNA-sonda.

### 2.33 TRANSFERÊNCIA DE FRAGMENTOS DE DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NYLON

A transferência de DNA do gel de agarose para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) foi feita como descrito por Maniatis *et al.*, 1982. O DNA plasmidial foi purificado (2.11.1), clivado (2.14), submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e fotografado (2.13). Uma régua milimetrada foi fotografada ao lado do gel servindo como referência para as distâncias de migração dos fragmentos. Os poços de aplicação foram removidos e o gel tratado por 10 minutos com uma solução de HCl 0,25 M. Após ligeira lavagem em água bidestilada, o gel foi tratado por 50 minutos com 20 ml de solução de NaOH 0,5 M contendo NaCl 1,5 M (solução desnaturante), lavado novamente em água bidestilada e tratado com 20 ml de solução tampão Tris.HCl 1,0 M pH 8,0 contendo NaCl 1,5 M (solução neutralizante) em dois períodos de 20 minutos. Após estes tratamentos, o gel foi cuidadosamente colocado sobre uma tira de papel 3MM (Whatman) com a face superior voltada para o lado do papel. Esta tira era da mesma

largura do gel (10 cm) e comprida o suficiente (26 cm) para formar uma ponte entre o gel e a solução tampão presente na cuba de transferência. O conjunto foi então montado na cuba de transferência equipada com uma plataforma central, em forma de T, dividindo-a em dois compartimentos. Cada um destes compartimentos foi preenchido com 300 ml de solução tampão citrato de sódio 0,3 M pH 7,0 contendo NaCl 3 M (SSC 20x). O nível da solução tampão ficou abaixo do nível da plataforma e as pontas do papel 3MM formaram a ponte entre a solução tampão e as bordas do gel. Sobre o gel foi colocada uma membrana de nylon seca, cortada do tamanho do gel e marcada com um sinal que permitiu identificar a face na qual fixou-se o DNA. As bolhas de ar existentes entre a ponte, o gel e a membrana foram cuidadosamente removidas. Sobre a membrana foram colocadas 3 folhas de papel 3MM cortadas exatamente do tamanho do gel, sobre estas foram colocadas 4 camadas de papel absorvente e finalmente um peso de 1,2 kg. As bordas do papel 3MM superior foram isoladas, no sentido da largura, com uma tira de plástico para evitar o contato entre as bordas do papel absorvente e a solução tampão. A transferência dos fragmentos de DNA do gel para a membrana de nylon ocorreu por capilaridade, num período de 19-21 horas. Durante o tempo de transferência, o nível da solução tampão SSC 20x foi mantido constante e as camadas de papel absorvente úmidas foram substituídas por outras secas. A membrana foi então removida, lavada com solução tampão citrato de sódio 0,75 M pH 7,0 contendo NaCl 75 mM (SSC 5x) por 5 minutos e secada a 37°C durante 6-8 minutos. O DNA transferido foi fixado a membrana por irradiação ultravioleta em transiluminador, durante 4 minutos.

## 2.34 HIBRIDIZAÇÃO

A hibridização utilizando como prova fragmentos de DNA marcados com  $^{32}\text{P}$  foi conduzida sob condições de baixa estringência e conforme técnica descrita em MANIATIS *et al.*, 1982.

A membrana de nylon com o DNA foi acondicionada em um saco plástico contendo 7 ml de uma solução composta de SSC 5X, solução de Denhardt 5X, SDS 0,5%, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA de esperma de salmão e 35% de formamida (solução de hibridização). O conjunto foi incubado sob agitação rotatória (0,5-1 rpm) em banho-maria a 42°C durante 15 horas. O DNA-marcado foi desnaturado por aquecimento (95°C por 10 minutos), imediatamente resfriado em banho de gelo e adicionado ao saco plástico contendo a membrana pré-hibridizada. A mistura de hibridização foi incubada durante 20 horas a 42°C, com agitação rotatória (0,5-1 rpm). A membrana foi então lavada duas vezes durante 15 minutos com solução tampão citrato de sódio 0,3 M pH 7,0 contendo NaCl 30 mM (SSC 2x) a 20°C e duas vezes durante 15 minutos com o mesmo tampão a 50°C. Em cada lavagem foram utilizados 200 ml de tampão.

## 2.35 DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA HIBRIDIZADOS

A detecção dos fragmentos de DNA hibridizados com a prova marcada com fósforo radioativo foi feita de através autoradiografia da membrana submetida à hibridização. A membrana contendo DNA hibridizado foi lavada segundo descrição no item 2.33, secada a temperatura ambiente e autoradiografada

com filme Kodak X-Omat XK-1 durante 7 dias a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O filme foi revelado com revelador a base de metol-hidroquinona (Hodgman *et al.*, 1960).

## 2.36 CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE RESTRIÇÃO DE PLASMÍDEOS

O plasmídeo a ser mapeado foi purificado em larga escala (2.11.1). O DNA foi submetido à clivagem com 4 enzimas de restrição empregadas separadamente ou combinadas duas a duas e os produtos das clivagens foram eletroforisados em gel de agarose 1% (2.13). A partir das fotografias obtidas foram determinadas as distâncias de migração dos fragmentos em relação a uma linha de base que unia os poços de aplicação no sentido da largura (origem). Como padrão de tamanho molecular foram utilizados o DNA do fago lambda clivado com *HindIII* e a mistura de DNA "1kb ladder". Os valores das distâncias de migração foram utilizados na construção de gráficos onde o logaritmo do peso molecular do padrão é expresso em função da distância de migração dos fragmentos de DNA. Estes gráficos permitiram determinar os tamanhos moleculares dos diversos fragmentos de DNA produzidos nas clivagens simples ou duplas. A análise comparativa dos resultados possibilitou a dedução do mapa de restrição do plasmídeo de interesse. Além deste procedimento foram analisados perfis de restrição de alguns fragmentos purificados em gel de agarose de baixo ponto de fusão (2.29).

## 2.37 PREPARO E TITULAÇÃO DE ESTOQUE DE FAGO LAMBDA: :Tn5

### 2.37.1 Preparo de células de *E. coli* para infecção por fago lambda

Uma colônia de *E. coli* C600 isolada de placa com meio LA foi inoculada em 10 ml meio TB suplementado com maltose 0,2% e incubada. A proteína bacteriana a qual o fago lambda: :Tn5 adsorve é codificada pelo operon *mal* que é induzido por maltose. Assim, células crescidas na presença de maltose adsorvem o fago mais facilmente (DAVIS *et al.*, 1980). Após 14 horas, as células foram coletadas (2.800 x g, 5°C por 10 minutos) e ressuspensas em 1/3 do volume inicial de solução de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

### 2.37.2 Infecção de *E. coli* com fago lambda: :Tn5

Aliquotas de células de *E. coli* C600 (100 µl) tratadas com MgSO<sub>4</sub> foram distribuídas em tubos plásticos de 1,5 ml. A estoque do fago lambda: :Tn5 foi diluído seriadamente até 10<sup>-9</sup> em tampão SM e alíquotas (100 µl) de cada diluição foram misturadas às suspensões celulares (volume final dos sistemas = 200 µl). Após breve homogeneização as células foram incubadas por 20-30 minutos a 37°C sem agitação para permitir a adsorção do fago. Em seguida, cada diluição foi misturado com 5 ml de meio TA semi-sólido (45°C), espalhado em placa com meio TA, incubado a 37°C por 12-14 horas e as partículas de fago liberadas durante a lise das células foram coletadas

### 2.37.3 Coleta e acondicionamento de partículas do fago lambda::Tn5

As partículas de fago lambda::Tn5 foram coletadas banhando-se as placas de lise com tampão SM (5-6 ml) por 3-4 horas com agitação manual intermitente, a 5°C. A seguir, a suspensão de partículas foi transferida para um frasco de vidro estéril. A coleta foi feita por duas vezes e ao volume final foram adicionadas duas gotas de clorofórmio. A suspensão de fago lambda::Tn5 foi então estocada a 5°C e titulada.

### 2.37.4 Titulação de estoque do fago lambda::Tn5

Células de *E. coli* C600 foram tratadas com MgSO<sub>4</sub> e infectadas com suspensões diluídas (100 µl) do fago lambda::Tn5 (itens 2.37.2 e 2.37.3). O título do estoque foi determinado pelo produto: número de placas de lise x fator diluição. Cada placa de lise formada foi considerada uma "unidade formadora de placa de lise" (UFP). O título do fago corresponde ao número de UFPs presentes em um mililitro de suspensão deste fago em estoque.

## 2.38 MUTAGÊNESE DE PLASMÍDEOS POR INSERÇÃO DO TRANSPOSON Tn5

A mutagênese de plasmídeos utilizando elementos transponíveis como o transposon Tn5, foi feita segundo método descrito por BRUIJN e LUPSKI, 1984. O plasmídeo a ser mutagenizado foi introduzido na estirpe *E. coli* S17.1 (Sm<sup>r</sup>) por transformação (2.22). Sua presença no fósforo no transformante foi confirmada por visualização em eletroforese em gel de

agarose (2.13). O tratamento e a infecção das células de *E. coli* S17.1 transformantes foram feitos como descrito nos itens 2.37.1 e 2.37.2. As células infectadas foram plaqueadas diretamente em meio LA contendo os antibióticos específicos para a estirpe hospedeira (Sm), o plasmídeo (Tc) e o transposon (Km) respectivamente. As colônias de células infectadas crescidas nas placas de meio seletivo (LA, Sm, Tc, Km) foram coletadas e reunidas. Esta suspensão de células constituiu um banco de células mutagenizadas por  $\lambda::Tn5$ .

## 2.39 TESTE PARA SELEÇÃO DE COLÔNIAS CONTENDO PLASMÍDEOS RECOMBINANTES $recA::Tn5$

*Escherichia coli* DH5 é uma bactéria mutante para o gene *recA* (HANAHAN, 1983) e portanto incapaz de reparar danos causados em seu DNA por determinados agentes físicos (radiação ultravioleta) ou químicos (MMS). Esta estirpe  $recA^-$  foi utilizada na seleção de plasmídeos recombinantes  $recA::Tn5$  por apresentar marca de resistência ao antibiótico ácido nalidíxico. Este caráter foi considerado importante porque permitiria a seleção dos transconjugantes *E. coli* DH5 (plasmídeo:: $Tn5$   $Nal^r$   $Tc^r$   $Km^r$ ) após conjugação de *E. coli* DH5 ( $Nal^r$ ) com *E. coli* 17.1 (plasmídeo:: $Tn5$   $Sm^r$ ) já que a estirpe *E. coli* HB101 não poderia ser empregada nesta fase por ser resistente a estreptomicina como *E. coli* S17.1.

Células de *E. coli* DH5 contendo plasmídeos recombinantes mutagenizados com o transposon  $Tn5$ , foram isoladas em meio LA contendo  $Nal$ ,  $Tc$  e  $Km$ . Aproximadamente cem colônias foram

transferidas para duas placas numeradas contendo meio LA. Estas placas também continham duas colônias de *E. coli* DH5 (controle negativo) e duas de *E. coli* DH5 contendo o plasmídeo recombinante (controle positivo). Em seguida uma das placas foi irradiada com luz ultravioleta, nas condições descritas no item 2.24, por 10-15 segundos. As duas placas foram incubadas no escuro a 37°C por 12-14 horas e finalmente comparadas. As colônias que não cresceram na placa irradiada foram identificadas e as colônias correspondentes foram coletadas da placa não irradiada. Estas colônias foram consideradas prováveis hospedeiras de plasmídeos contendo o transposon *Tn5* inserido na região do gene *recA*. Para confirmação destes dados, as colônias foram testadas para crescimento em meio LA contendo MMS 2 mM. Após 16 horas de incubação a 37°C, as colônias que não cresceram nas placas seletivas foram identificadas como *recA::Tn5* e coletadas da placa controle. A seguir, foram realizados novos testes de sensibilidade à radiação ultravioleta (2.24) e ao MMS (2.25). O ponto de inserção do transposon *Tn5* no fragmento clonado foi determinado pela análise dos perfis eletroforéticos dos plasmídeos isolados. Os tamanhos moleculares dos fragmentos foram determinados pelo método descrito no item 2.36.

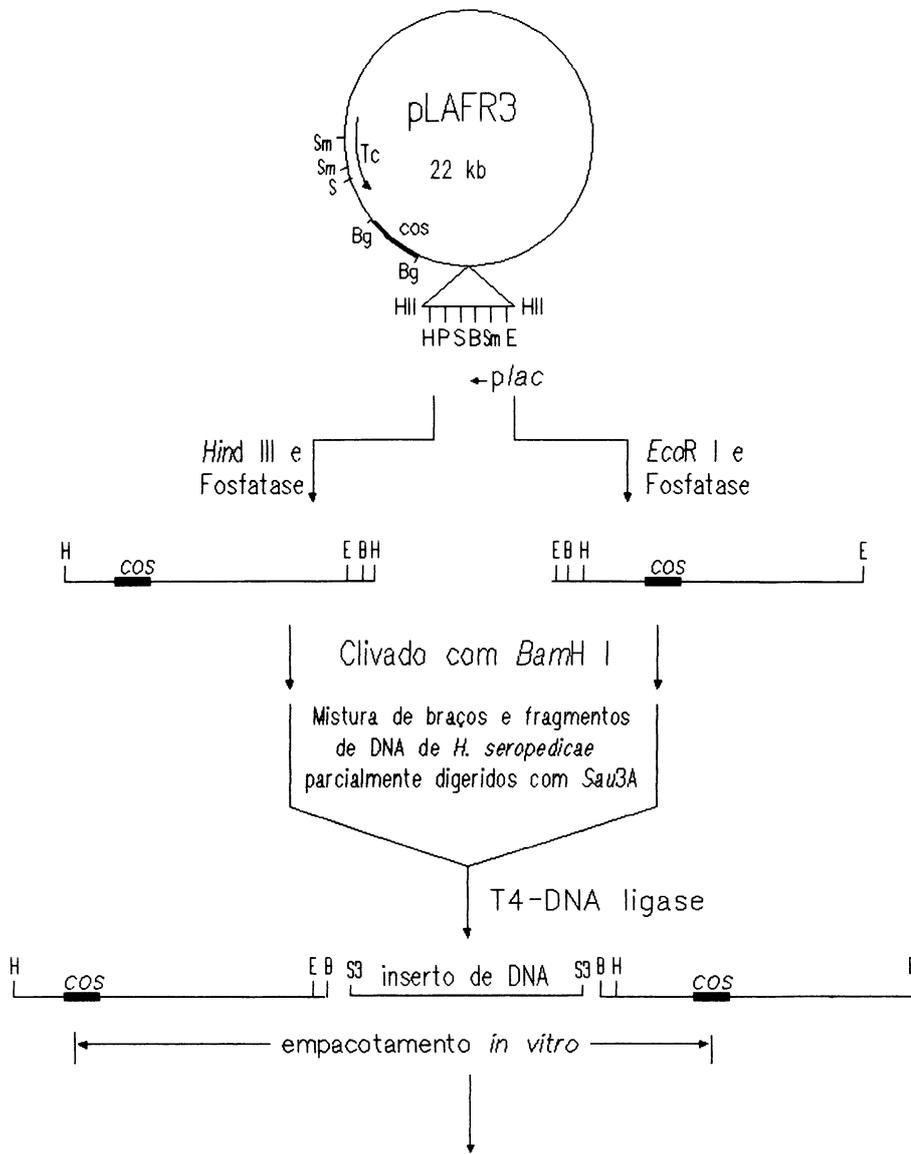
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Um banco de genes foi construído utilizando o plasmídeo vetor pLAFR3 (STASKAWICZ *et al.*, 1987) como descrito em Materiais e Métodos (2.19). O esquema de construção do banco de genes está representado na Figura 10. A eficiência da ligação entre os fragmentos de DNA-inserto e o vetor foi avaliada através da infecção de células de *E. coli* 71.18 com uma amostra do DNA empacotado em partículas do fago lambda (item 2.19.3). Quarenta colônias de *E. coli* 71.18 Tc<sup>r</sup> foram testadas para crescimento em meio LA contendo IPTG e X-gal. Todas as colônias formadas foram brancas indicando ausência de atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase sobre o substrato X-gal. Esta ausência pode ser creditada à inativação do gene *lacZ'* pela inserção de fragmentos de DNA no sítio *Bam*HI do cosmídeo vetor. Após infecção de células de *E. coli* HB101 com a mistura de empacotamento, cerca de cinco mil colônias independentes e duplo-resistentes a estreptomicina e tetraciclina, foram coletadas, agrupadas em sub-coleções com cerca de trezentas colônias cada e estocadas em glicerol 50% a temperatura de -20°C. O conjunto destas sub-coleções constitui o banco de genes de *H. seropedicae* estirpe Z78.

Plasmídeos recombinantes isolados de células de algumas colônias escolhidas ao acaso, foram clivados com a enzima *Sal*I e eletroforisados em gel de agarose. O perfil de restrição

FIGURA 10 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE  
*Herbaspirillum seropedicae* Z78



Transfectado em *E. coli* HB101 e selecionado para resistência à tetraciclina

Fragmentos de DNA cromossomal de *H. seropedicae* Z78 foram obtidos por digestão parcial com a enzima *Sau3A*. Braços *HindIII/BamHI* e *EcoRI/BamHI* do vetor pLAFR3 foram obtidos em digestões individuais seguidas de tratamento com fosfatase alcalina. Os fragmentos *Sau3A* defosfatizados foram ligados aos braços pela enzima T4 DNA ligase. Esta mistura de ligação foi empacotada em partículas de fago lambda, transfectada em *E. coli* HB101, e as colônias foram selecionadas em meio LA contendo tetraciclina.

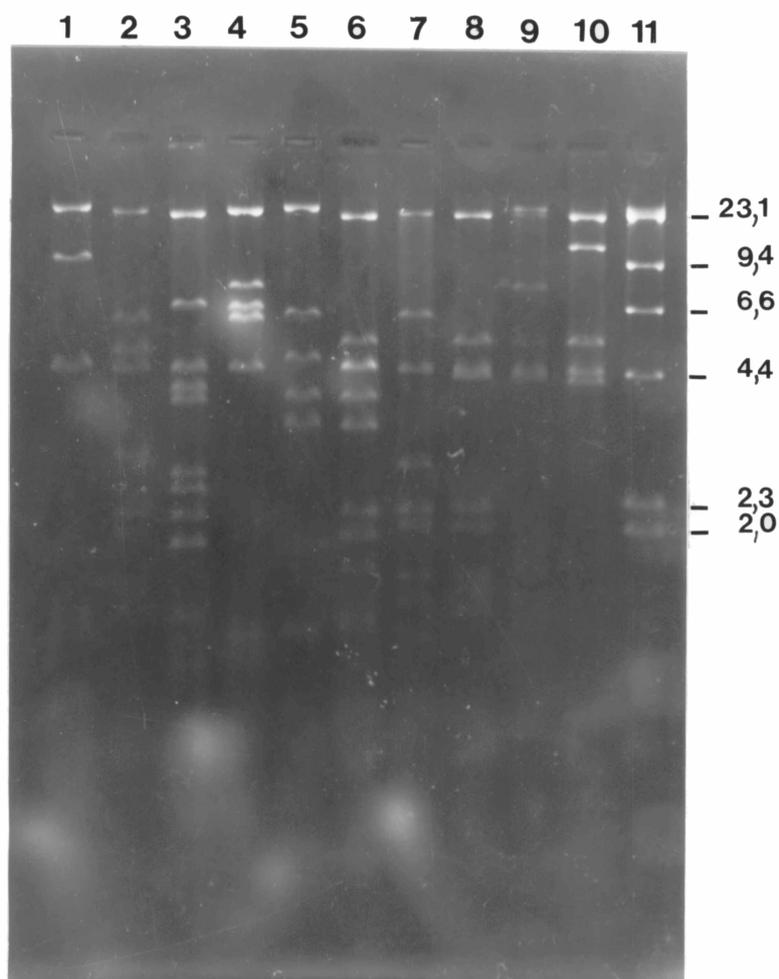
Simbolos: B, *BamHI*; B, *BglII*; E, *EcoRI*; HII, *HaeII*; H, *HindIII*; P, *PstI*; S, *SalI*; S3, *Sau3A*; Sm, *SmaI*; Tc, tetraciclina; cos, sítio cos do fago lambda.

mostrou que todos eles continham um fragmento do DNA de *H. seropedicae* Z78 ligado ao vetor pLAFR3 (Figura 11). A clivagem deste vetor pela enzima *Sal*I produz dois fragmentos, um com 17,6 kb e outro com 4,4 kb. O tamanho médio dos fragmentos de DNA-inserto dos plasmídeos recombinantes foi de 25 kb. Assumindo-se que o tamanho do genoma de *H. seropedicae* seja semelhante ao de *E. coli*, cerca de 4.750 pares de bases (BACKMAM, 1990), a aplicação da fórmula de Clark e Carbon (1976) indicou que esta coleção de plasmídeos recombinantes representa cerca de 100% do genoma de *H. seropedicae* Z78. O banco genômico está portanto, constituído por aproximadamente cinco mil colônias de *E. coli* HB101 contendo plasmídeos recombinantes derivados do cosmídeo pLAFR3 e contendo insertos de DNA de *H. seropedicae* Z78.

### 3.2 ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTENDO O GENE *recA* DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Estudos com espécies bacterianas apresentando mutações no gene *recA* demonstraram que elas são incapazes de reparar danos no DNA causados pelo metanosulfonato de metila (MMS) (MILES *et al.*, 1986; KOKJOHN e MILLER, 1985). A estirpe HB101 de *E. coli*, mutante para o gene *recA*, é incapaz de crescer na presença deste agente alquilante (BETTER e HELINSKI, 1983). Assim, para isolar clones contendo o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78, o banco genômico mantido nesta estirpe de *E. coli*, foi testado para crescimento em meio de cultura contendo MMS. A frequência de aparecimento de colônias resistentes ao

FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DO BANCO DE GENES DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78 CLIVADOS COM *SalI*



Os plasmídeos de alguns clones do banco de genes (1-10) foram isolados, clivados com *SalI* e eletroforisados em gel de agarose 0,7%. O padrão de tamanho molecular (11) foi o DNA do fago lambda digerido com a enzima *HindIII*.

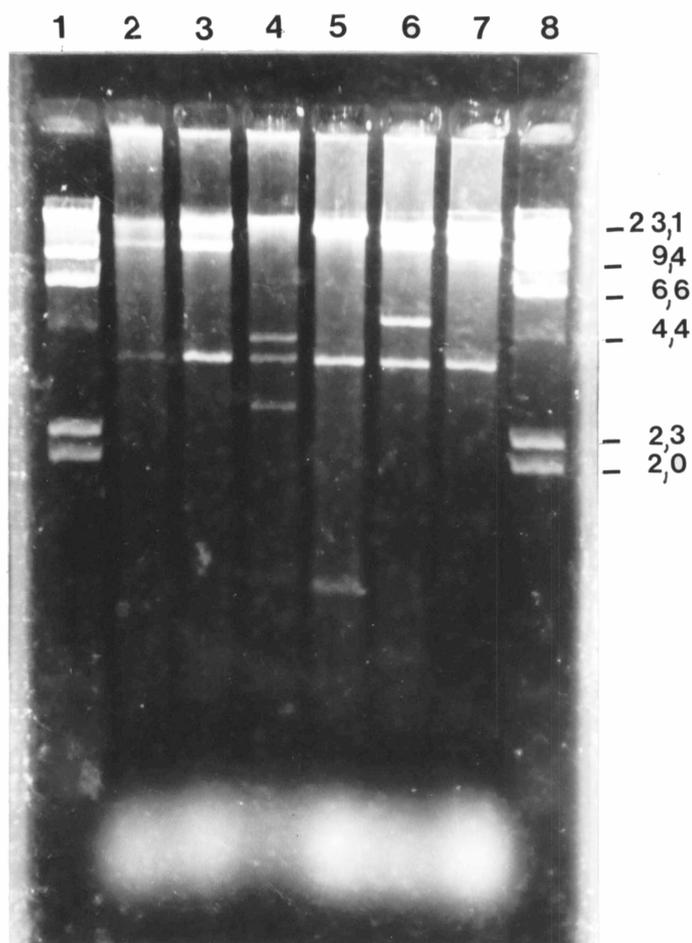
MMS foi de  $8,8 \times 10^{-4}$  (Tabela III). Células de *E. coli* HB101 que não continham plasmídeos foram incapazes de crescer nas mesmas condições (Tabela III). Seis colônias de *E. coli* HB101(pLAFR3::DNA *H. seropedicae* Z78)  $Sm^r$   $Tc^r$   $MMS^r$  entre as 226 obtidas, foram escolhidas ao acaso, seus plasmídeos foram isolados, clivados com a enzima de restrição *Hind*III e eletroforizados (Figura 12). Estes plasmídeos recombinantes foram designados pBMR1, pBMR2, pBMR3, pBMR4, pBMR5 e pBMR6 e considerados prováveis portadores de um gene semelhante ao gene *recA* de *E. coli*. A análise dos perfis eletroforéticos mostrou que o padrão de restrição do plasmídeo pBMR6 é igual ao do plasmídeo pBMR2, enquanto que os padrões de restrição dos demais plasmídeos diferem entre si, embora todos contenham um fragmento *Hind*III de 3.6 kb. Os plasmídeos pBMR1, pBMR2, pBMR3, pBMR4 e pBMR5 foram reintroduzidos, por transformação, na estirpe HB101 de *E. coli*. Uma colônia transformante derivada de cada plasmídeo foi isolada e testada para crescimento em meio contendo MMS. Todas as colônias testadas foram capazes de crescer em presença de MMS 0,01%. Estes resultados mostraram que os plasmídeos da série pBMR de fato complementavam o fenótipo  $RecA^-$  da estirpe HB101 indicando que todos continham um gene de *H. seropedicae* Z78 funcionalmente homólogo ao gene *recA* de *E. coli*. O plasmídeo pBMR5 foi escolhido para caracterização em detalhe.

TABELA III - FREQUÊNCIA DE APARECIMENTO DE COLÔNIAS DE  
*Escherichia coli* HB101 RESISTENTES AO MMS

ESTIRPE DE <i>E. coli</i>	COLÔNIAS RESISTENTES	FREQUÊNCIA
HB101	00	00
HB101(pLAFR3::H. s. DNA)	57	$8,8 \times 10^{-4}$

Células de *E. coli* HB101 e *E. coli* HB101(pLAFR3::DNA *H. seropedicae* Z78) ( $\cong 6,5 \times 10^4$  UFC<sub>s</sub>) foram espalhadas sobre meio LA contendo 0,01% de MMS. A frequência representa a razão entre o número de colônias resistentes e o número de UFC<sub>s</sub> inicial. Os resultados expressam a média entre quatro experimentos.

FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE SEIS CLONES DO BANCO DE GENES DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78 CLIVADOS COM *Hind*III



Os plasmídeos de seis clones do banco de genes foram isolados (2.11), clivados com *Hind*III (2.14) e eletroforisados em gel de agarose 1% (2.13).

1 e 8 - DNA do fago lambda digerido com *Hind*III

2 - 7 - plasmídeos pBMR1 a pBMR6 clivados com *Hind*III

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMPLEMENTAÇÃO DO FENÓTIPO $RecA^-$ DE *Escherichia coli* HB101 PELO PLASMÍDEO pBMR5

O plasmídeo pBMR5 foi utilizado nos estudos de complementação do fenótipo  $RecA^-$  de *E. coli* HB101 com a finalidade de avaliar a capacidade do produto do gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 em desempenhar funções análogas as da proteína *RecA* de *E. coli*, ou seja, conferir resistência à radiação ultravioleta e ao MMS e promover recombinação homóloga. Com este objetivo, células de *E. coli* HB101(pBMR5) foram expostas a doses crescentes de radiação ultravioleta e diferentes concentrações de MMS, testes indicativos da indução da resposta SOS (BETTER e HELINSKI, 1983). Além disso, esta estirpe foi testada quanto a sua capacidade de promover recombinação homóloga durante a conjugação com uma estirpe HfrC de *E. coli*.

Nestes experimentos foram empregadas como controles positivo e negativo as bactérias *E. coli* RR1 e *E. coli* HB101 respectivamente. Estas estirpes são isogênicas, diferindo apenas no que se refere ao gene *recA*, enquanto RR1 é *recA*,<sup>+</sup> HB101 é *recA13* (BOYER e ROULLAND-DUSSIOX, 1969; BOLIVAR *et al*, 1977).

#### 3.3.1 Efeito da Radiação Ultravioleta na Indução da Resposta SOS em *Escherichia coli* HB101(pBMR5)

O efeito da radiação ultravioleta sobre as diferentes estirpes de *E. coli*, RR1, HB101 e HB101(pBMR5), foi determinado

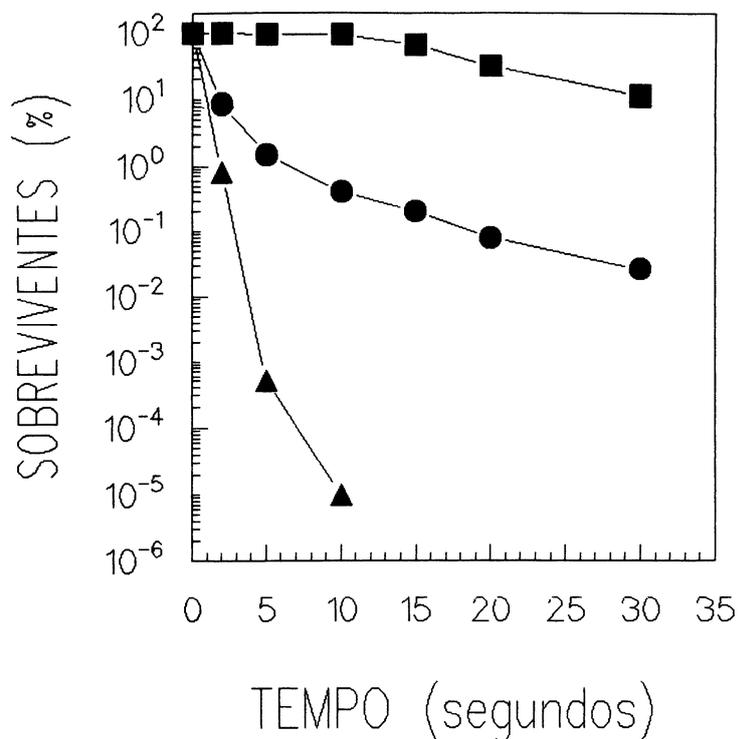
após exposição à radiação por períodos de tempo variáveis (Figura 13). Após 10 segundos de exposição, a porcentagem de sobreviventes da estirpe HB101(pBMR5) foi  $4,0 \times 10^4$  vezes maior que da estirpe HB101. Em tempos de exposição superiores a 10 segundos sobreviveram somente células de *E. coli* HB101(pBMR5) e *E. coli* RR1. Após 30 segundos de irradiação foram obtidos cerca de 0,03% de sobreviventes para *E. coli* HB101(pBMR5) e 11,3% para RR1.

Estes resultados indicaram que o plasmídeo pBMR5 foi capaz de complementar parcialmente o fenótipo  $\text{RecA}^-$  do mutante HB101, contribuindo significativamente para a redução do efeito da radiação ultravioleta sobre as células desta estirpe.

### 3.3.2 Efeito do Metanosulfonato de Metila na Indução da Resposta SOS em *Escherichia coli* HB101(pBMR5)

O efeito do MMS sobre as diferentes estirpes RR1, HB101 e HB101(pBMR5) de *E. coli*, foi determinado após exposição a concentrações crescentes do agente alquilante. Em virtude de ser altamente sensível ao MMS, a estirpe de *E. coli* HB101 teve seu aparecimento diminuído em  $1,5 \times 10^5$  vezes em presença de 1 mM de MMS (Figura 14). Entretanto, os transfectantes HB101(pBMR5) apresentaram 90% de sobrevivência nesta concentração de MMS (Figura 14). Quando a concentração de metanosulfonato de metila foi elevada de 1mM para 2 mM e posteriormente para 5 mM, o número de sobreviventes de *E. coli* HB101(pBMR5) reduziu de 90% para 33% e finalmente para  $\cong 18\%$ . Estes valores correspondem a aproximadamente 86,5%; 37% e 16%

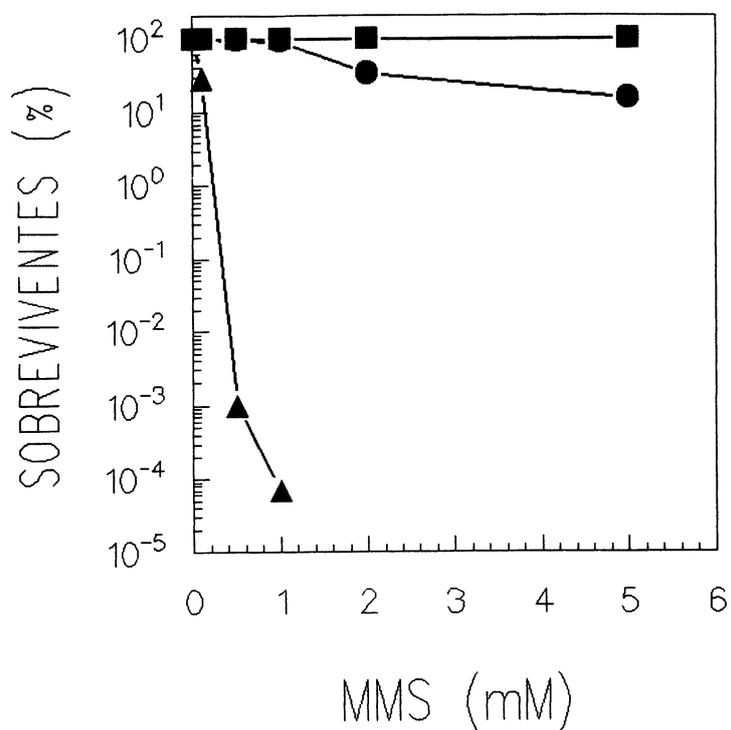
FIGURA 13 - EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA  
INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM *Escherichia coli*  
HB101(pBMR5)



Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0.85%, expostas a períodos crescentes de radiação ultravioleta, plaqueadas em meio LA e incubadas a 37°C por 12-14 horas no escuro.

Símbolos: ■ *E. coli* RR1, ▲ *E. coli* HB101, ● *E. coli* HB101(pBMR5)

FIGURA 14 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MMS NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM *Escherichia coli* HB101(pBMR5)



Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0,85%, diluídas e plaqueadas em meio LA contendo MMS nas concentrações indicadas.

Símbolos: ■ *E. coli* RR1, ▲ *E. coli* HB101, ● *E. coli* HB101(pBMR5)

de sobreviventes de *E. coli* HB101(pBMR5) em relação ao controle RR1, nas concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM, respectivamente.

Os resultados obtidos indicaram que o plasmídeo pBMR5 contém um gene capaz de complementar o fenótipo  $\text{RecA}^-$  do mutante HB101.

### 3.3.3 Proficiência de Recombinação de *Escherichia coli* HB101(pBMR5)

As estirpes HB101 e RR1 de *E. coli* são auxotróficas para prolina (*proA*) e incapazes de doarem marcas cromossomais durante a conjugação ( $\text{F}^-$ ). A eficiência do plasmídeo pBMR5 em complementar *E. coli* HB101 no sentido de promover recombinação homóloga foi verificada após conjugação desta estirpe com *E. coli* HfrC. Esta última é prototrófica para prolina e tem o fator sexual F integrado em seu cromossomo (MILLER, 1972). Durante a conjugação, o DNA cromossomal da estirpe doadora (HfrC) é transferido para a estirpe receptora sendo o gene *pro* o primeiro a ser transferido (MILLER, 1972). Se a estirpe receptora for capaz de promover recombinação homóloga, ela passa a crescer em ausência de prolina. Os resultados apresentados na Tabela IV, mostram que *E. coli* HB101 não foi capaz de promover recombinação. No entanto, a estirpe *E. coli* HB101(pBMR5) foi  $2,0 \times 10^3$  vezes mais eficiente em promover recombinação homóloga em relação a *E. coli* HB101 (Tabela IV). Este aumento correspondeu a 37% da eficiência verificada para *E. coli* RR1 nos cruzamentos com a mesma estirpe HfrC (Tabela IV).

TABELA IV - PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE *Escherichia coli*  
HB101 (pBMR5)

ESTIRPE DE <i>E. coli</i>	PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO (RECOMBINANTES <i>proA</i> <sup>+</sup> /100 DOADORES)
HB101 (pBMR5)	8,2350
RR1	21,7700
HB101	0,0042

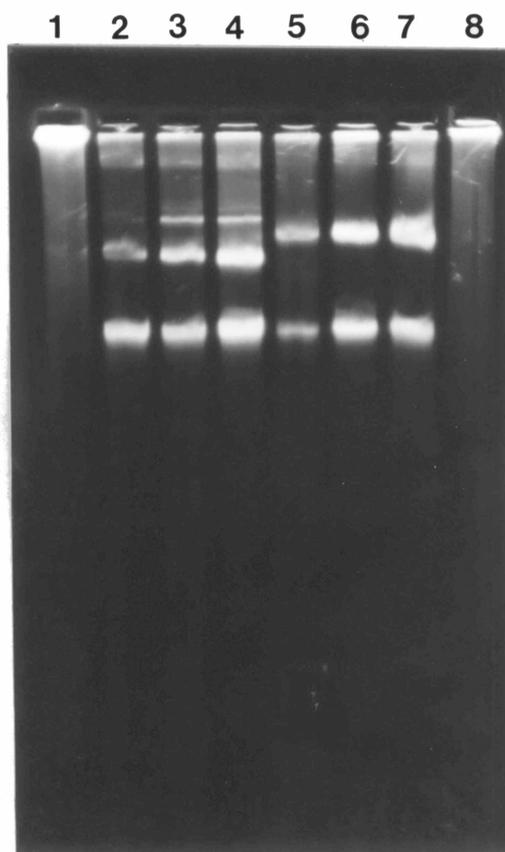
*E. coli* HfrC foi utilizada como estirpe doadora. A conjugação foi conduzida conforme descrito em Materiais e Métodos (2.28). Os resultados expressam a média entre dois experimentos.

Para confirmar que a capacidade de promover recombinação apresentada pela estirpe HB101(pBMR5) era devida ao gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 carregado pelo plasmídeo pBMR5 e não ao gene *recA* de HfrC eventualmente recebido durante a conjugação, foi promovida a cura de um transconjugante usando o plasmídeo R.68.45 que pertence ao mesmo grupo de incompatibilidade IncP1 do plasmídeo pLAFR3 (HASS e HOLLIDAY, 1978; STASKAWICZ *et al.*, 1987).

A colônia transconjugante *E. coli* HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7, obtida da conjugação HB101 $pro^-$ (pBMR5) x HfrC, foi selecionada ao acaso. Esta estirpe  $pro^+$  recombinante foi utilizada como receptora em um novo ensaio de conjugação onde a estirpe doadora foi *E. coli* 1230(R68.45). Dentre os novos transconjugantes foi escolhida ao acaso uma colônia denominada HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29. Paralelamente, foi realizada uma conjugação entre as estirpes HB101 $pro^-$ (pBMR5) e 1230(R68.45), visando neste caso, eliminar o plasmídeo pBMR5 da estirpe auxotrófica original. Um dos transconjugantes obtidos, HB101 $pro^-$ (R68.45)OR.T25, serviu como controle nos ensaios subsequentes. Os perfis eletroforéticos dos plasmídeos isolados das diferentes estirpes transconjugantes estão mostrados na Figura 15 e comprovam a cura do plasmídeo pBMR5.

Células das estirpes transconjugantes HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 e HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29, bem como das estirpes controles HB101 $pro^-$ , HB101 $pro^-$ (pBMR5)OR, HB101 $pro^-$ (R68.45)OR.T25 e HfrC foram testadas quanto a sua capacidade de crescer em meio mínimo (MM) suplementado ou não com prolina (Tabela V). Pode-se observar que as estirpes HB101 $pro^+$  recombinantes mantiveram a prototrofia para prolina, independente de hospedarem ou não o

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS ISOLADOS DOS  
 TRANSCONJUGANTES *E. coli* HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 E  
*E. coli* HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29



Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até saturação. Os plasmídeos foram isolados pelo método de lise alcalina (2.11.2) e eletroforisados em gel de agarose 0,7% (2.13).

- |   |  |
|---|--|
| 1- <i>E. coli</i> HB101 $pro^-$           | 5- <i>E. coli</i> 1230(R68.45)                 |
| 2- <i>E. coli</i> HB101 $pro^-$ (pBMR5)   | 6- <i>E. coli</i> HB101 $pro^-$ (R68.45)OR.T25 |
| 3- <i>E. coli</i> HB101 $pro^-$ (pBMR5)OR | 7- <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29  |
| 4- <i>E. coli</i> HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 | 8- <i>E. coli</i> HfrC                         |

TABELA V - CRESCIMENTO DOS TRANSCONJUGANTES *E. coli*  
 HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 E *E. coli* HB101 $pro^+$ (R68.45)T729  
 EM MEIO MÍNIMO

ESTIRPE DE <i>E. coli</i>	CRESCIMENTO EM MMA	
	+ PROLINA	- PROLINA
HB101 $pro^-$	+	-
HFRC $pro^+$	+	+
HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7	+	+
HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29	+	+
HB101 $pro^-$ (pBMR5)OR	+	-
HB101 $pro^-$ (R68.45)OR.T25	+	-

Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até  $1-2 \times 10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, lavadas em solução salina 0,85 %, diluídas e plaqueadas em meio mínimo suplementado ou não com prolina. Após incubação as placas foram analisadas para o crescimento (+) ou a ausência (-) de colônias.

plasmídeo pBMR5. Entretanto, quando testadas para resistência ao MMS (Tabela VI), a estirpe HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29 perdeu completamente a capacidade de crescer em presença deste agente, passando a apresentar comportamento igual ao da estirpe controle HB101 $pro^-$ (R68.45)OR.T25 (Tabela VI); indicando a ausência do gene *recA* da estirpe HfrC em seu genoma.

Os resultados obtidos para a estirpe *E. coli* HB101(pBMR5) durante os testes de indução da resposta SOS e após conjugação com a estirpe HfrC, indicaram que o plasmídeo pBMR5 contém um gene de *H. seropedicae* Z78 funcionalmente homólogo ao gene *recA* de *E. coli*.

#### 3.4 MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5

O mapa de restrição do plasmídeo pBMR5 foi construído a partir da análise dos perfis eletroforéticos resultantes da clivagem daquele plasmídeo com as enzimas *HindIII*, *BamHI*, *BglII* e *EcoRI* em sistemas de restrição simples e duplos (Figura 16). Nos sistemas duplos foram consideradas todas as combinações possíveis para as quatro enzimas. Os padrões de tamanhos moleculares utilizados foram "1 kb ladder" e DNA  $\lambda$  digerido com *HindIII*. Os valores dos tamanhos dos fragmentos produzidos nestas clivagens estão apresentados na Tabela VII e estão expressos em quilobase (kb) onde, 1 kb contém mil pares de bases. O fragmento de 22 kb produzido pela clivagem dupla *HindIII/EcoRI* (Tabela VII) corresponde ao vetor pLAFR3. Com o objetivo de facilitar a interpretação dos dados, os fragmentos de 28,60 kb; 8,35 kb e 7,0 kb produzidos pela clivagem com a

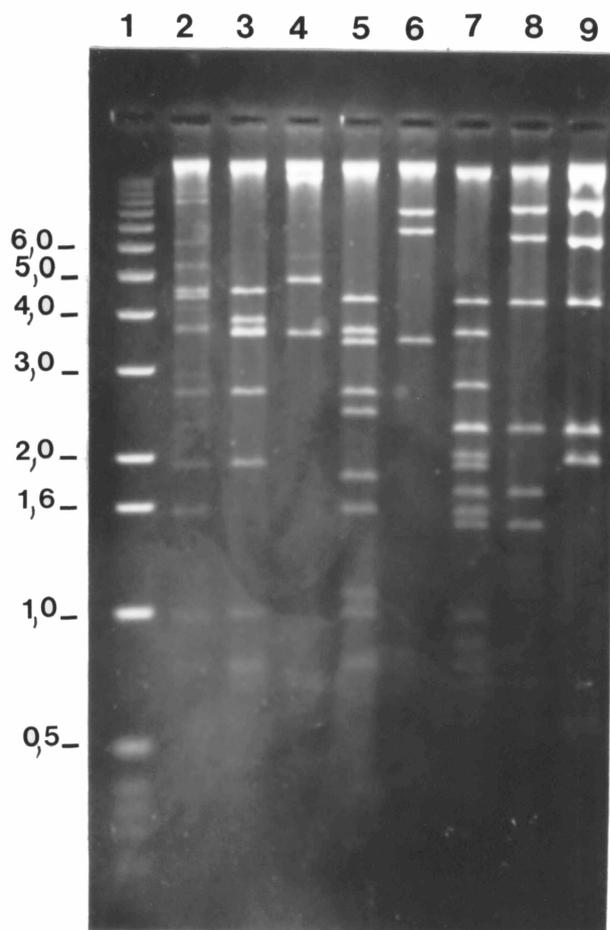
TABELA VI - SOBREVIVÊNCIA DOS TRANSCONJUGANTES *E. coli*HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7 E *E. coli* HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29

EM PRESENÇA DE MMS

ESTIRPE DE <i>E. coli</i>	CONCENTRAÇÃO DE MMS		
	SOBREVIVÊNCIA (%)		
	0 mM	0,5 mM	2,0 mM
RR1 $pro^-$	100	90	89
HB101 $pro^-$	100	0	0
HB101 $pro^-$ (pBMR5)OR	100	85	63
HB101 $pro^+$ (pBMR5)T7	100	94	68
HB101 $pro^+$ (R68.45)T7.29	100	0	0
HB101 $pro^-$ (R68.45)OR.T25	100	0	0

Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0,85%, diluídas e plaqueadas em meio LA contendo MMS nas concentrações 0,5 e 2 Mm.

FIGURA 16 - EXEMPLO DE ELETROFORESE ANALISADA DURANTE A ELABORAÇÃO DO MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5



O plasmídeo pBMR5 foi digerido com enzimas de restrição (2.14) e eletroforisado em gel de agarose 1% (2.13).

1- Padrão de tamanho molecular 1 kb ladder

2- pBMR5 digerido com *EcoRI*

3- pBMR5 digerido com *EcoRI/HindIII*

4- pBMR5 digerido com *HindIII*

5- pBMR5 digerido com *EcoRI/BamHI*

6- pBMR5 digerido com *BamHI*

7- pBMR5 digerido com *EcoRI/BglII*

8- pBMR5 digerido com *BglII*

9- Padrão de tamanho molecular  $\lambda$ /*HindIII*

TABELA VII - TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR5 COM DIFERENTES ENZIMAS E RESTRIÇÃO

Nº	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (kb)									
	H	H/B	H/Bg	H/E	B	B/Bg	B/E	E	Bg	E/Bg
1	23,45	23,45	20,35	22,00*	28,60	21,60	23,40	25,85	21,60	18,85
2	14,25	8,35	7,25	4,60	8,35	6,20	4,50	4,60	9,00	4,20
3	4,90	4,45	4,35	3,90	7,00	4,05	3,60	4,55	6,70	3,60
4	3,65	3,65	4,35	3,65	3,45	3,45	3,40	3,60	4,35	2,75
5	0,70	3,45	2,35	3,60		2,80	2,80	2,80	2,45	2,50
6	0,45	1,45	1,80	2,80		2,45	2,45	2,00	1,80	2,45
7		1,35	1,50	2,00		2,45	1,90	1,80	1,50	2,05
8		0,70	1,30	1,05		1,80	1,80	1,05		2,00
9		0,45	1,30	0,75		1,50	1,20	0,75		1,80
10		0,10	1,15	0,75		0,80	1,05	0,25		1,80
11			0,70	0,70		0,30	0,75	0,15		1,50
12			0,55	0,50			0,25			1,05
13			0,45	0,45			0,15			0,90
14				0,25			0,10			0,75
15				0,15			0,05			0,40
16				0,15						0,40
17				0,10						0,25
18										0,15

Aliquotas do plasmídeo pBMR5 foram submetidas a clivagem pelas enzimas *HindIII* (H), *BamHI* (B), *BglII* (Bg) e *EcoRI* (E). As enzimas de restrição foram empregadas separadamente ou combinadas duas a duas. Os fragmentos produzidos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1%.

\* - vetor pLAFR3

enzima *Bam*HI, foram purificados em gel de agarose de baixo ponto de fusão e clivados separadamente com as enzimas *Bgl*II, *Eco*RI ou *Hind*III. Os valores dos tamanhos destes fragmentos estão apresentados na Tabela VIII. A análise comparativa dos dados apresentados nas Tabelas VII e VIII possibilitou a construção do mapa de restrição do plasmídeo pBMR5 (Figura 17) e permitiu também a determinação do tamanho do DNA inserto que foi de 25,40 kb.

### 3.5 DETECÇÃO DE UM GENE ESTRUTURALMENTE HOMÓLOGO AO GENE *recA* DE *Escherichia coli* NO PLASMÍDEO pBMR5

A presença de um gene de *H. seropedicae* Z78 estruturalmente homólogo ao gene *recA* de *E. coli*, foi detectada por hibridização do plasmídeo pBMR5 com uma sonda específica para o gene *recA* de *E. coli* K12. O plasmídeo pBMR5 foi submetido à digestão com as enzimas *Hind*III, *Eco*RI, e *Bam*HI, *Eco*RI/*Hind*III, *Eco*RI/*Bam*HI e *Eco*RI/*Bgl*II; eletroforisado em gel de agarose, transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com o DNA-sonda. Como DNA-sonda foi utilizado um fragmento *Bam*HI de 3,3 kb do plasmídeo pJC859 que continha o gene *recA* de *E. coli* K12 (KOKJOHN e MILLER, 1985). Este fragmento foi purificado e marcado com [ $\alpha^{32}$ P]dCTP como descrito em Materiais e Métodos (2.31). A hibridização e as lavagens foram conduzidas em condições de baixa stringência e o DNA hibridizado foi detectado por autoradiografia.

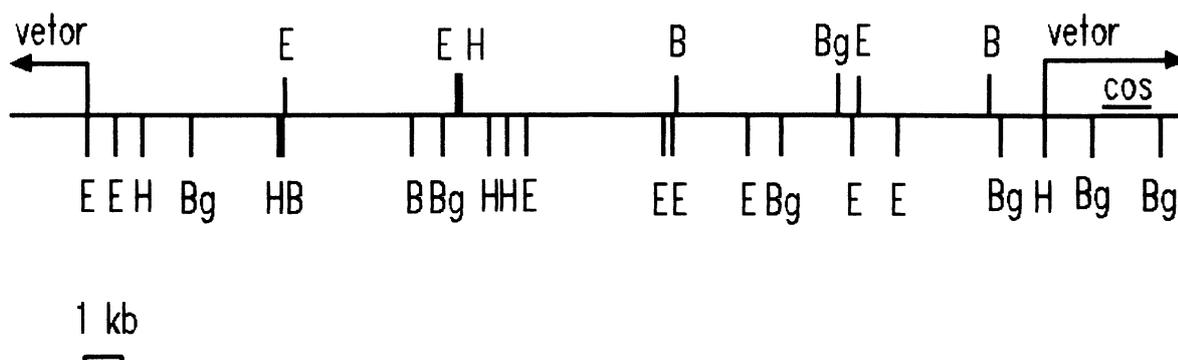
Na figura 18 estão mostrados os perfis de restrição do plasmídeo pBMR5, bem como os sinais de hibridização. O DNA

TABELA VIII - TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS PELA CLIVAGEM  
DOS FRAGMENTOS *Bam*HI COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Nº	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (kb)								
	I			II			III		
	Bg	E	H	Bg	E	H	Bg	E	H
1	21,60	23,40	23,45	4,05	2,80	8,35	6,20	3,60	5,00 <sup>p</sup>
2	2,45	4,50	3,65	2,80	2,45		0,80	1,80	4,45
3	2,45	0,75	1,40	1,50	1,90			1,20	2,05 <sup>p</sup>
4	1,80				1,05			0,25	1,35
5								0,10	0,70
6									0,45

Os fragmentos *Bam*HI/*Bam*HI de 28,60 kb (I), 8,35 kb (II) e 7,00 kb (III) foram purificados em gel de agarose de baixo ponto de fusão e clivados separadamente com as enzimas *Bgl*II (Bg), *Eco*RI (E) e *Hind*III (H). Os produtos destas clivagens foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%. O símbolo <sup>p</sup> indica fragmentos produzidos por clivagem parcial.

FIGURA 17 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5



O mapa de restrição do plasmídeo pBMR5 foi elaborado como descrito em Materiais e Métodos (2.36).

As enzimas de restrição indicadas são: E, *EcoRI*; B, *BamHI*; B, *BglIII*; H *HindIII*.

sonda hibridiza com os seguintes fragmentos: 4,55 kb *EcoRI*; 3,65 kb *HindIII*; 28,60 kb *BamHI*; 4,50 kb *EcoRI/BamHI*; 3,65 kb *EcoRI/HindIII* e 2,0 kb *EcoRI/BglIII*. Com exceção do sinal do fragmento *BamHI* de 28,60 kb que inclui o vetor, todos os demais sinais observados correspondem a fragmentos derivados exclusivamente do DNA inserto (Figura 18). O fragmento *HindIII* de 3,65 kb é o único fragmento comum a todos os plasmídeos da série pBMR isolados originalmente por conferir resistência ao MMS (Figura 12). Nas condições de experimentais empregadas, não foram observados sinais de hibridização cruzada entre o DNA-sonda e o vetor pLAFR3.

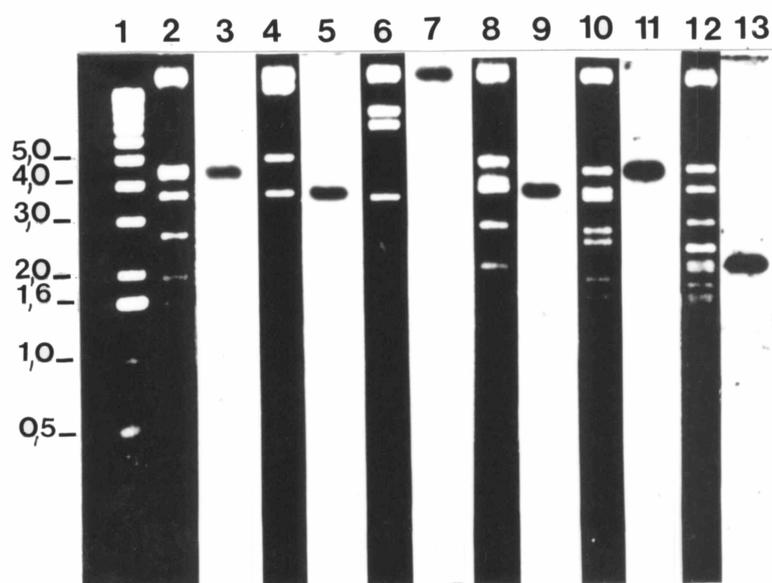
Estes resultados indicaram que *H. seropedicae* Z78 possui um gene estruturalmente homólogo ao gene *recA* de *E. coli* K12.

### 3.6 SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA DERIVADOS DO PLASMÍDEO pBMR5

Com objetivo de se isolar o menor fragmento de DNA capaz de complementar o fenótipo  $\text{RecA}^-$  de *E. coli* HB101, o plasmídeo pBMR5 foi clivado separadamente com as enzimas de restrição *HindIII* ou *BamHI*. Os fragmentos *BamHI* de 3,45 kb e *HindIII* de 4,90 kb foram isolados e subclonados no vetor pSUP202 enquanto que o *HindIII* de 3,65 kb no pTZ18R, produzindo os recombinantes denominados pBMR501 e pBMR502 e pBMR503 respectivamente.

O plasmídeo pBMR501 contém o fragmento *HindIII* de 4,90 kb (Tabela IX e Figura 19) e tem sítios de restrição para as enzimas *BglIII*, *BamHI* e *EcoRI*. Resultados de clivagem parcial permitiram determinar a orientação dos fragmentos de 1,45 kb e

FIGURA 18 - HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR5 COM O FRAGMENTO  
*Bam*HI ISOLADO DO PLASMÍDEO pJC859



O plasmídeo pBMR5 foi clivado com enzimas de restrição e eletroforizado em gel de agarose 1%. Os fragmentos foram transferidos para membrana de nylon (2.33) e hibridizados em condições de baixa estrigência com o fragmento *Bam*HI isolado do plasmídeo pJC859 e marcado com  $^{32}$ P (2.31, 2.34).

1 - marcador de tamanho molecular 1 kb ladder

2, 4, 6, 8, 10, 12 - perfis de restrição do pBMR5 digerido com *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RI/*Hind*III, *Eco*RI/*Bam*HI, *Eco*RI/*Bgl*III respectivamente.

3, 5, 7, 9, 11, e 13 - indicam o sinal de hibridização correspondente

3,45 kb produzidos pela clivagem com *Bam*HI (Tabela IX). O fragmento de 1,75 kb produzido por clivagem parcial indicou a ligação entre o fragmento de 0,30 kb do vetor e o fragmento de 1,45 kb derivado do fragmento subclonado.

O plasmídeo pBMR502 contém o fragmento *Bam*HI de 3,45 kb (Tabela X e Figura 20). Este fragmento apresentou um único sítio de restrição, próximo de uma das extremidades para a enzima *Eco*RI. A clivagem do plasmídeo pBMR502 por esta enzima produziu um fragmento *Eco*RI/*Bam*HI de 3,40 kb. A orientação deste fragmento foi determinada pela observação de uma banda de 7,50 kb resultante de clivagem parcial e correspondente a soma do fragmento *Eco*RI/*Bam*HI de 4,1 kb do pSUP202 com o fragmento *Eco*RI/*Bam*HI de 3,40 kb derivado do DNA inserto. O fragmento *Bam*HI do plasmídeo pBMR502 não possui sítios para as enzimas *Hind*III e *Bgl*III (Tabela X).

O plasmídeo pBMR503 contém o fragmento *Hind*III de 3,65 kb inserido no gene *lacZ* do vetor pTZ18R (Tabela XI e Figura 21). O fragmento suclonado apresenta um único sítio de restrição para a enzima *Bgl*III.

Os subclones pBMR501, pBMR502 e pBMR503 foram purificados, transformados em *E. coli* HB101 e os transconjugantes testados quanto a capacidade de complementar o fenótipo  $\text{RecA}^-$  em presença de MMS 0,5 e 1,0 mM (Tabela XII). Somente *E. coli* HB101(pBMR503) foi capaz de crescer em presença deste agente mutagênico. As porcentagens de sobreviventes observadas para esta estirpe foram muito próximas daquelas observadas para *E. coli* HB101(pBMR5) (Tabela XII).

TABELA IX - TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM  
DO PLASMÍDEO pBMR501 COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Nº	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (kb)			
	H	H/B	H/E	H/Bg
1	7,40 <sup>**</sup>	7,10 <sup>*</sup>	4,60	7,40 <sup>**</sup>
2	4,90	3,45	4,40 <sup>*</sup>	4,35
3		1,75 <sup>p</sup>	3,00 <sup>*</sup>	0,55
4		1,45	0,15	
5		0,30 <sup>*</sup>	0,15	

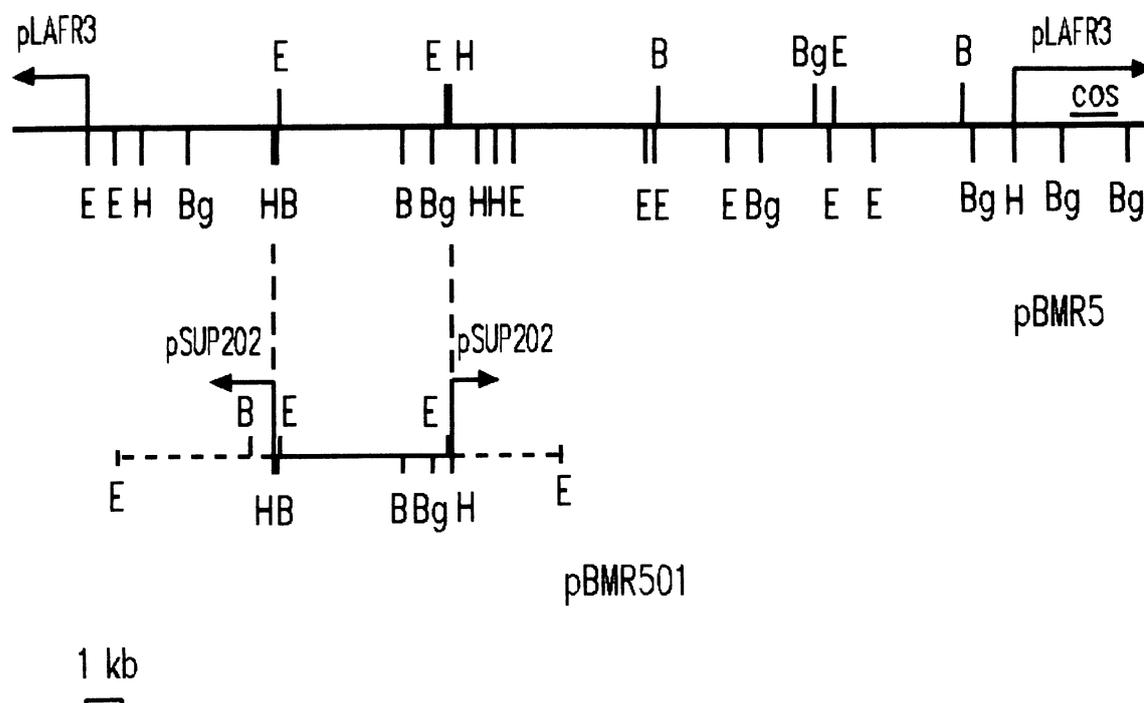
Aliquotas do plasmídeo pBMR501 foram clivadas pelas enzimas *Hind*III (H), *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) ou *Bgl*II (Bg). Um dos sistemas de restrição continha somente a enzima *Hind*III e os demais continham *Hind*III combinada com uma das outras três enzimas. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados conforme descrito no item 2.36 de Materiais e Métodos.

Símbolos: \*\* = vetor pSUP202 intacto

\* = fragmento produzido pela clivagem do vetor pSUP202

p = fragmento produzido por clivagem parcial

FIGURA 19 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR501



O fragmento *Hind*III de 4,90 kb do plasmídeo pBMR5 foi subclonado no plasmídeo vetor pSUP202 como descrito no item 2.31 de Materiais e Métodos. O mapa de restrição do subclone, designado pBMR501, foi elaborado conforme descrito no item 2.36. A orientação do fragmento foi deduzida a partir da análise do padrão de restrição do subclone após clivagem com as enzimas *Hind*III (H), *Bam*HI (B), *Bgl*II (Bg) e *Eco*RI (E).

TABELA X - TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS  
 CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR502 COM ENZIMAS DE  
 RESTRIÇÃO

Nº	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (kb)			
	H	H/B	H/E	H/B
1	7,40 <sup>**</sup>	7,50 <sup>p</sup>	7,10 <sup>*</sup>	7,40 <sup>**</sup>
2	3,45	4,10 <sup>*</sup>	3,45	3,45
3		3,40	0,30 <sup>*</sup>	
4		3,30 <sup>*</sup>		
5		0,05		

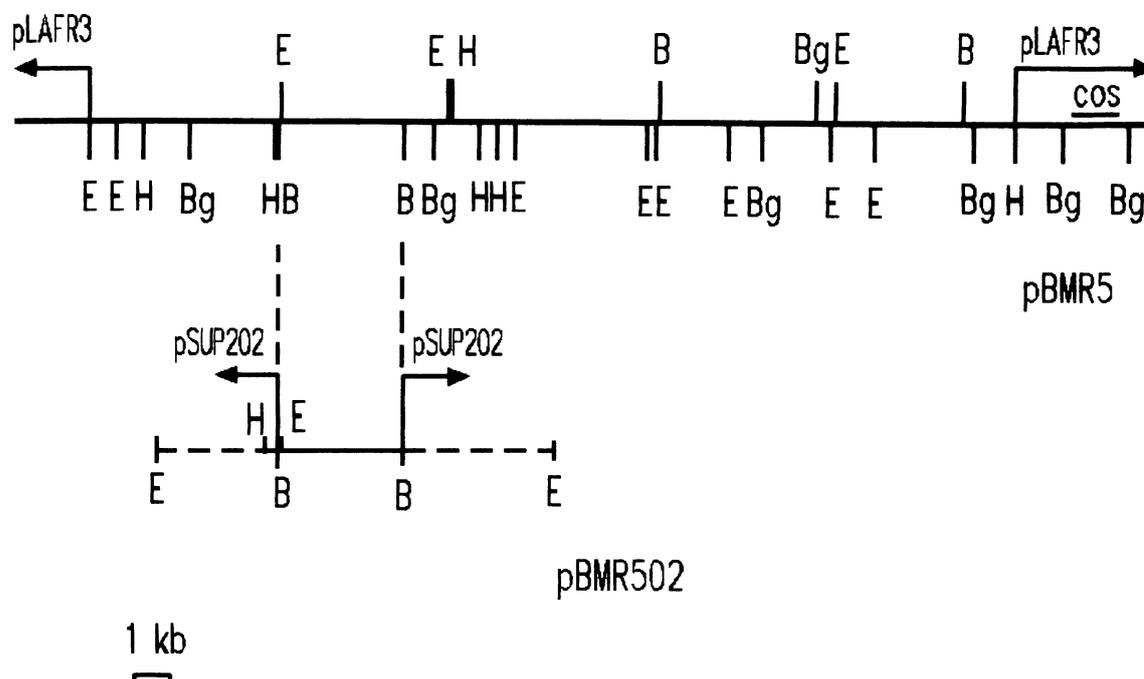
Aliquotas do plasmídeo pBMR502 foram clivadas pelas enzimas *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind*III (H) e *Bgl*II (Bg). Um dos sistemas de restrição continha somente a enzima *Bam*HI e os demais continham *Bam*HI combinada com uma das outras três enzimas. Os tamanhos moleculares dos fragmentos foram determinados conforme descrito no item 2.36 de Materiais e Métodos.

Símbolos: \*\* = vetor pSUP202 intacto

\* = fragmento produzido pela clivagem do vetor pSUP202

p = fragmento produzido por clivagem parcial

FIGURA 20 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR502



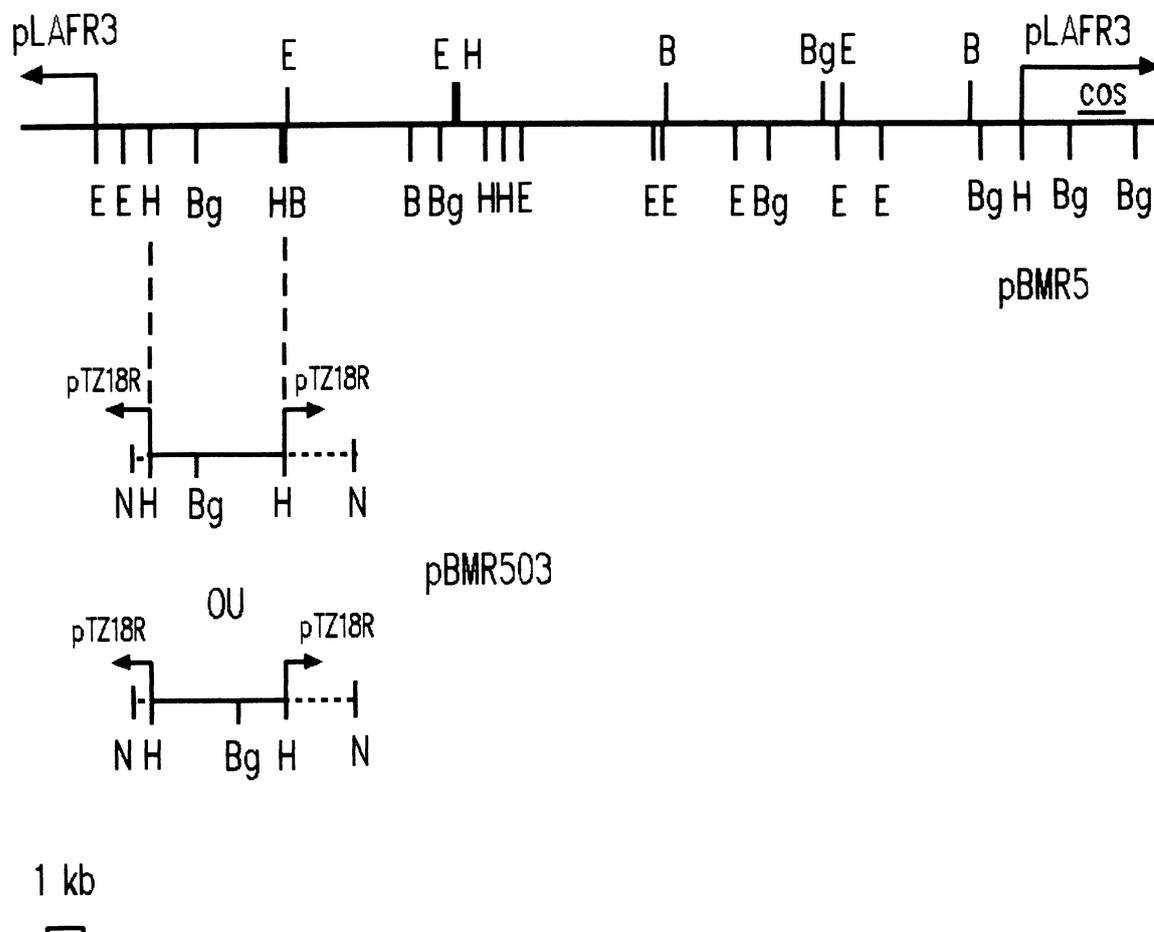
O fragmento *Bam*HI de 3,45 kb do plasmídeo pBMR5 foi subclonado no plasmídeo vetor pSUP202 como descrito no item 2.31 de Materiais e Métodos. O mapa de restrição do subclone, designado pBMR502, foi elaborado conforme descrito no item 2.36 de Materiais e Métodos. A orientação do fragmento foi deduzida a partir da análise do padrão de restrição do subclone após clivagem com as enzimas *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) e *Hind*III (H).

TABELA XI - TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS  
CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pBMR503 COM ENZIMAS DE  
RESTRIÇÃO

Nº	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (kb)	
	H	H/Bg
1	1,9	1,9
2	3,65	2,35
3		1,30

Alíquotas do plasmídeo pBMR503 foram clivadas pelas enzimas *Hind*III (H) e *Bgl*II (Bg). Os tamanhos moleculares dos fragmentos foram determinados conforme descrito no item 2.36 de Materiais e Métodos.

FIGURA 21 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pBMR503



O fragmento *Hind*III de 3,65 kb do plasmídeo pBMR5 foi subclonado no plasmídeo vetor pTZ18R (2.31). O mapa de restrição do subclone, designado pBMR503, foi elaborado conforme descrito no item 2.36 de Materiais e Métodos.

As enzimas de restrição indicadas são: E, *Eco*RI; B, *Bam*HI; *Bgl*III; *Hind*III; N, *Nae*I.

TABELA XII - COMPLEMENTAÇÃO DE *Escherichia coli* HB101 PELOS  
SUBCLONES DERIVADOS DO PLASMÍDEO pBMR5

ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	CONCENTRAÇÃO DE MMS		
	SOBREVIVÊNCIA (%)		
	0 mM	0,5 mM	1,0 mM
RR1	100	100	100
HB101	100	0	0
HB101(pBMR5)	100	90	86,5
HB101(pBMR501)	100	0	0
HB101(pBMR502)	100	0	0
HB101(pBMR503)	100	86	82

Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0,85%, diluídas e plaqueadas em meio LA contendo MMS nas concentrações 0,5 e 1 mM.

*E. coli* HB101(pBMR503) foi então testada quanto sua resistência à radiação ultravioleta (Figura 22) e sua proficiência em promover recombinação homóloga (Tabela XIII).

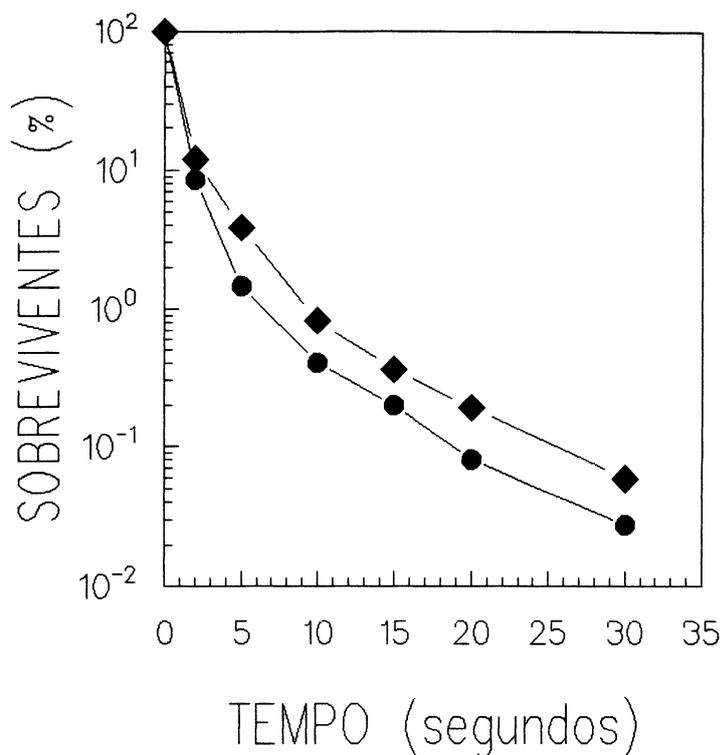
Quando exposta a níveis crescentes de radiação, *E. coli* HB101(pBMR503) apresentou perfil de resistência semelhante aquele obtido anteriormente para HB101(pBMR5) (Figura 22). Quando conjugada com a estirpe HfrC, o número de colônias de *E. coli* HB101(pBMR503) recombinantes foi muito próximo daquele observado para *E. coli* HB101(pBMR5) (Tabela XIII).

Os resultados obtidos indicaram que, dentre os fragmentos subclonados, o menor fragmento do plasmídeo pBMR5, capaz de complementar o fenótipo RecA<sup>-</sup> de *E. coli* HB101, foi o fragmento HindIII de 3,65 kb.

### 3.7 MUTAGÊNESE DO PLASMÍDEO pBMR5 POR INSERÇÃO DO TRANSPOSON *Tn5*

O plasmídeo pBMR5 foi mutagenizado por inserção do transposon *Tn5* carregado pelo fago lambda ( $\lambda::Tn5$ ). Cerca de oitocentas colônias de *E. coli* DH5 resistentes a Km e presumivelmente contendo inserção do *Tn5*, foram analisadas para o fenótipo RecA<sup>-</sup> através da exposição à radiação ultravioleta. Esta estratégia foi usada para selecionar aquelas colônias que poderiam conter o transposon inserido no plasmídeo pBMR5. Somente cinco colônias de *E. coli* DH5 NaI<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> apresentaram fenótipo presumivelmente RecA<sup>-</sup> e seus plasmídeos pBMR5::*Tn5* foram denominados pBMR13.3, pBMR26.2, pBMR38.5, pBMR56.4, pBMR107.5 (Tabela XIV). Esta denominação foi empregada apenas como critério de identificação dos plasmídeos e obedeceu a

FIGURA 22 - EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM *Escherichia coli* HB101(pBMR503)



Células de *E. coli* HB101(pBMR503) e *E. coli* HB101(pBMR5) foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0.85%, expostas a períodos crescentes de radiação ultravioleta, plaqueadas em meio LA e incubadas a 37°C por 12-14 horas no escuro.

Símbolos: ♦ *E. coli* HB101(pBMR503), ● *E. coli* HB101(pBMR5)

TABELA XIII - PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE *Escherichia coli* HB101(pBMR503)

ESTIRPE DE <i>E. coli</i>	PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO (RECOMBINANTES <i>proA</i> <sup>+</sup> /100 DOADORES)
HB101(pBMR503)	8,6800
HB101(pBMR5)	8,2350
HB101	0,0042

*E. coli* HfrC foi utilizada como estirpe doadora. A conjugação foi conduzida conforme descrito em Materiais e Métodos (2.28). Os resultados expressam a média entre dois experimentos. *E. coli* HB101(pBMR5) e *E. coli* HB101 estão representadas para fins de comparação.

TABELA XIV - ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS pBMR5: :Tn5

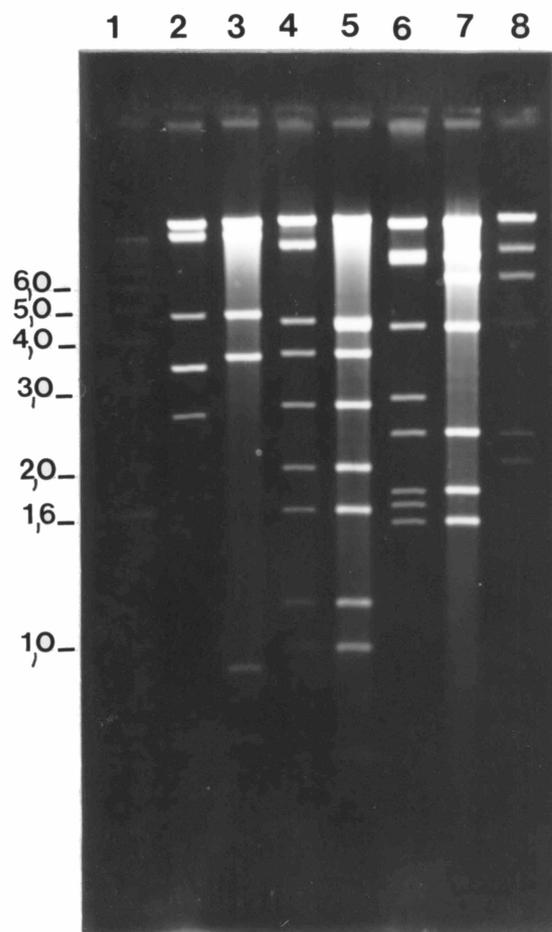
ESTIRPE DE <i>E. coli</i>	CRESCIMENTO EM LA	
	- MMS	+ MMS
DH5	+	-
DH5 (pBMR5)	+	+
DH5 (pBMR13.3)	+	+
DH5 (pBMR26.2)	+	-
DH5 (pBMR38.5)	+	+
DH5 (pBMR56.4)	+	-
DH5 (pBMR107.5)	+	+

Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0,85%, diluídas e plaqueadas em meio LA contendo MMS 2,5 mM. Após a incubação as placas foram analisadas para o crescimento (+) ou a ausência (-) de colônias resistentes ao MMS.

ordem de isolamento das colônias de *E. coli* DH5 hospedeiras. As cinco colônias consideradas prováveis hospedeiras de plasmídeos contendo o transposon *Tn5* inserido no gene *recA* de *H. seropedicae* Z78, foram testadas em meio LA contendo 2,5 mM de MMS. Como apresentado na Tabela XIV apenas *E. coli* DH5(pBMR26.2) e *E. coli* DH5(pBMR56.4) não cresceram em presença de MMS. Plasmídeos destas duas estirpes foram isolados e clivados com as enzimas *EcoRI*, *HindIII*. A análise do padrão de restrição dos plasmídeos pBMR26.2 e pBMR56.4 mostrou que ambos continham o transposon *Tn5* inserido na mesma região do gene *recA* de *H. seropedicae* Z78. O plasmídeo pBMR26.2 foi então selecionado para os ensaios subsequentes.

Os perfis eletroforéticos dos plasmídeos pBMR26.2 e pBMR56.4 estão apresentados na Figura 23. O transposon *Tn5* (5,7 kb) contém dois sítios de restrição para a enzima *HindIII* e para a enzima *BglIII*, localizados nas regiões de repetições invertidas (IR) (BRUIJN e LUPSKI, 1984). Os valores dos tamanhos dos fragmentos resultantes da clivagem do plasmídeo pBMR26.2 pelas enzimas *EcoRI*, *HindIII* e *BglIII* estão apresentados na Tabela XV. Quando digerido com *EcoRI* o plasmídeo pBMR26.2 apresenta um fragmento de 10,25 kb resultante da inserção do transposon no fragmento de 4,55 kb o qual formava uma banda dupla com o fragmento de 4,60 kb. Isto se deve ao fato de o transposon *Tn5* não conter sítios de restrição para *EcoRI*. Ao ser digerido com *HindIII*, o fragmento de 3,65 kb desaparece e três novos fragmentos são observados: 3,40 kb, 3,30 kb e 2,60 kb. Os fragmentos de 3,40 kb e 3,30 kb apresentam um perfil de migração muito próximo formando uma banda dupla e mais intensa que as bandas simples. O fragmento de 3,30 kb corresponde ao

FIGURA 23 - DETERMINAÇÃO DO PONTO DE INSERÇÃO DO TRANSPOSON *Tn5*  
NO PLASMÍDEO pBMR5



Os plasmídeos pBMR26.2 e pBMR5 foram isolados, clivados com enzimas de restrição e eletroforizados em gel de agarose 1% .

- 1 - padrão de tamanho molecular 1 kb ladder
- 2 - pBMR26.2 clivado com *HindIII*
- 3 - pBMR5 clivado com *HindIII*
- 4 - pBMR26.2 clivado com *EcoRI*
- 5 - pBMR5 clivado com *EcoRI*
- 6 - pBMR26.2 clivado com *BglII*
- 7 - pBMR5 clivado com *BglII*
- 8 - padrão de tamanho molecular  $\lambda$ /*HindIII*

TABELA XV - TAMANHOS DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS APÓS CLIVAGEM  
DO PLASMÍDEO pBMR26.2 COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

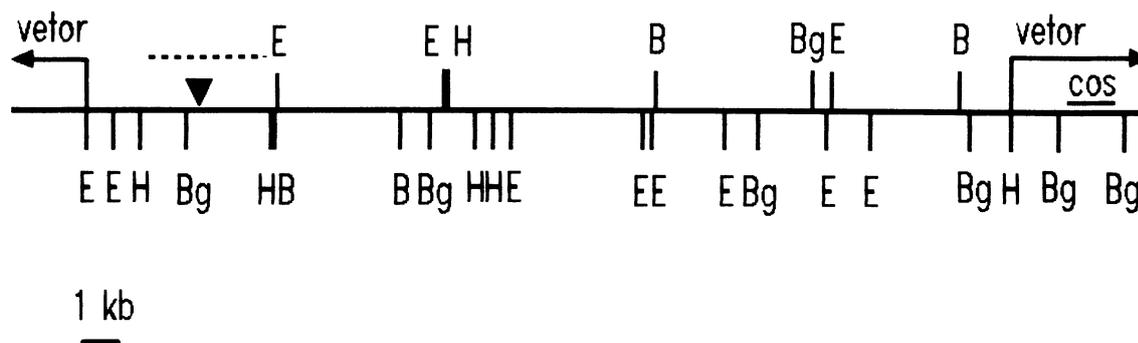
Nº	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (kb)					
	H		E		Bg	
	pBMR26.2	pBMR5	pBMR26.2	pBMR5	pBMR26.2	pBMR5
1	23,45	23,45	25,85	25,85	21,60	21,60
2	14,25	14,25	10,25 <sup>T</sup>	4,60	9,00	9,00
3	4,90	4,90	4,60	4,55	8,00 <sup>T</sup>	6,70
4	3,40 <sup>T</sup>	3,65	3,60	3,60	4,35	4,35
5	3,30 <sup>T</sup>	0,70	2,80	2,80	2,70 <sup>T</sup>	2,45
6	2,60 <sup>T</sup>	0,45	2,00	2,00	2,45	1,80
7	0,70		1,80	1,80	1,80	1,50
8	0,45		1,05	1,05	1,70 <sup>T</sup>	
9			0,75	0,75	1,50	
10			0,25	0,25		
11			0,15	0,15		

Aliquotas dos plasmídeos pBMR26.2 e pBMR5 foram clivadas separadamente com as enzimas *EcoRI* (E), *HindIII* (H) e *BglII* (Bg). Os produtos das clivagens foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os tamanhos moleculares dos fragmentos foram determinados conforme descrito no item 2.36 de Materiais e Métodos. O símbolo  $\tau$  indica os fragmentos produzidos após a inserção do transposon *Tn5*.

fragmento interno do transposon *Tn5* (Bruijn e Lupski, 1984). O fragmento de 3,40 kb compreende uma parte de 2,20 kb do fragmento de 3,65 kb e um segmento de 1,20 kb derivado de uma das extremidades do transposon *Tn5*. O fragmento de 2,65 kb contém o segmento de 1,45 kb, derivado do fragmento de 3,65 kb, e o de 1,20 kb derivado da outra extremidade do transposon *Tn5*. Quando clivado com *Bgl*III, desaparece o fragmento de 6,70 kb e aparecem os fragmentos de 8,00 kb, 2,70 kb e 1,70 kb. O fragmento de 2,70 kb corresponde ao fragmento interno do transposon *Tn5* (Bruijn e Lupski, 1984). O fragmento de 8,00 kb está formado por uma fração de 6,50 kb derivada do fragmento de 6,70 kb e por uma das extremidades do transposon que tem 1,50 kb. O fragmento de 1,70 kb contém a fração de 0,20 do fragmento de 6,70 kb ligada à outra extremidade de 1,50 kb do transposon *Tn5*. A localização do transposon *Tn5* no DNA-inserto de *H. seropedicae* Z78 no plasmídeo pBMR5 (fragmentos *Hind*III de 3,65 kb, *Eco*RI de 4,55 kb e *Bgl*III de 6,7 kb) está representada na Figura 24.

### 3.7 EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM *E. coli* DH5(pBMR26.2) e *E. coli* HB101(pBMR26.2)

O efeito da radiação ultravioleta sobre *E. coli* DH5 e *E. coli* HB101 contendo o plasmídeo pBMR5 mutagenizado com o transposon *Tn5* (plasmídeo pBMR26.2), foi determinado pela exposição de células destas estirpes à tempos variáveis de radiação (Figura 25). O gráfico A mostra que no tempo de exposição de 2 segundos o número de sobreviventes de *E. coli*

FIGURA 24 - LOCALIZAÇÃO DO TRANSPOSON *Tn5* NO PLASMÍDEO pBMR5

O ponto de inserção do transposon *Tn5* (▼) foi determinado a partir da análise do perfil de restrição do plasmídeo pBMR26.2 (Figura 23). A linha interrompida demarca o fragmento que contém o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78.

Os símbolos indicados são: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III.

DH5(pBMR5) foi de 50% e de *E. coli* DH5 foi de 17%. Assim, *E. coli* DH5(pBMR5) foi 30 vezes mais resistente à radiação ultravioleta que *E. coli* DH5. No tempo de 15 segundos de exposição somente  $1,50 \times 10^{-4}\%$  das células de *E. coli* DH5 sobreviveram enquanto que para *E. coli* DH5(pBMR5) sobreviveram 1,45% das células irradiadas. Um perfil de sobrevivência semelhante ao de *E. coli* DH5 foi observado para *E. coli* DH5(pBMR26.2). No tempo de exposição de 2 segundos sobreviveram 15 % das células e no tempo de 15 segundos apenas  $7,15 \times 10^{-5}\%$  das células de *E. coli* DH5(pBMR26.2) expostas à radiação. Em períodos de irradiação de 20 e 30 segundos sobreviveram somente células de *E. coli* DH5(pBMR5).

Com relação a *E. coli* HB101(pBMR26.2) (Figura 25B), pode-se observar que o perfil de sobrevivência acompanhou o perfil apresentado pela estirpe controle HB101, indicando reversão da característica de resistência à radiação ultravioleta.

### 3.8 EFEITO DO METASULFONATO DE METILA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM *E. coli* DH5(pBMR26.2) E *E. coli* HB101(pBMR26.6)

O efeito do MMS na indução da resposta SOS em *E. coli* DH5 e HB101 contendo o plasmídeo pBMR5 mutagenizado com transposon *Tn5* (plasmídeo pBMR26.2), foi determinado através da exposição de células destas estirpes à diferentes concentrações do agente mutagênico (Figura 26).

O gráfico A mostra que quando a estirpe DH5 foi exposta a uma concentração de 0,1 mM de MMS o número de células

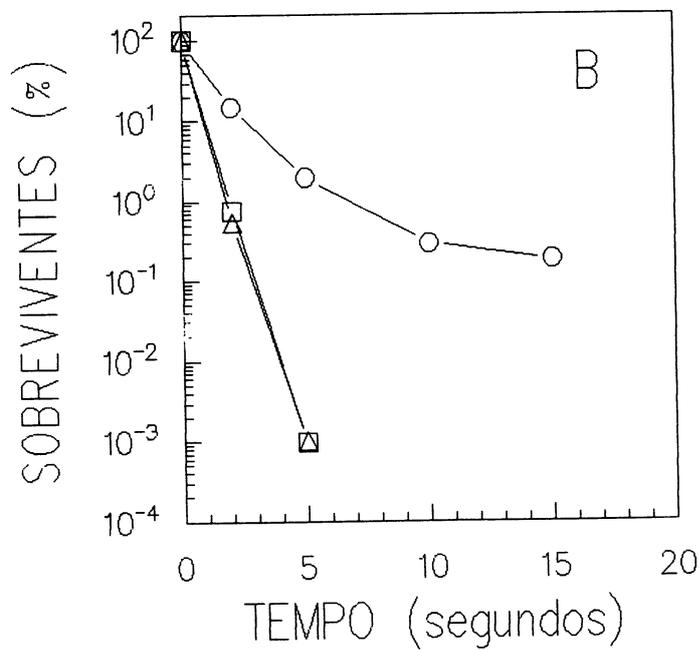
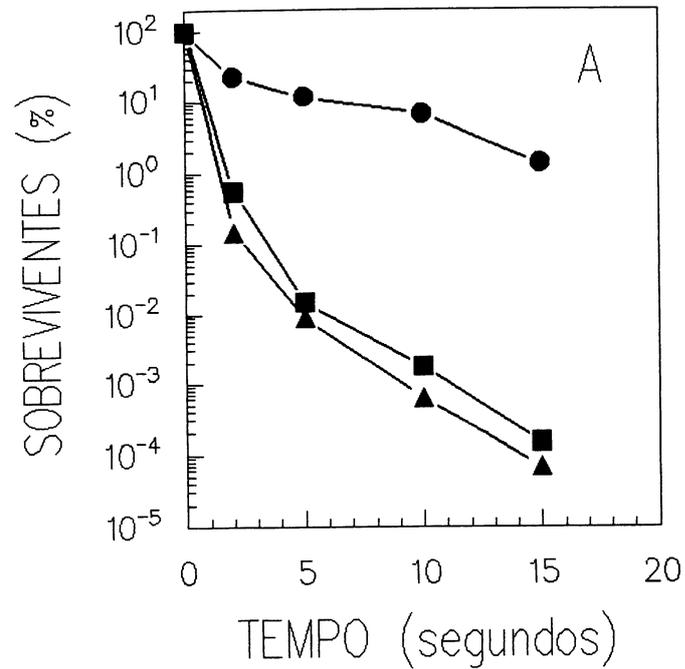
FIGURA 25 (legenda)

Células de diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0.85%, expostas a períodos crescentes de radiação ultravioleta, plaqueadas em meio LA e incubadas a 37°C por 12-14 horas no escuro.

Gráfico A: ■ *E. coli* DH5, ● *E. coli* DH5(pBMR5), ▲ *E. coli* DH5(pBMR26.2)

Gráfico B: □ *E. coli* HB101, ○ *E. coli* HB101(pBMR5), △ *E. coli* HB101(pBMR26.2)

FIGURA 25 - EFEITO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM *Escherichia coli* DH5(pBMR26.2) E *Escherichia coli* HB101(pBMR26.2)

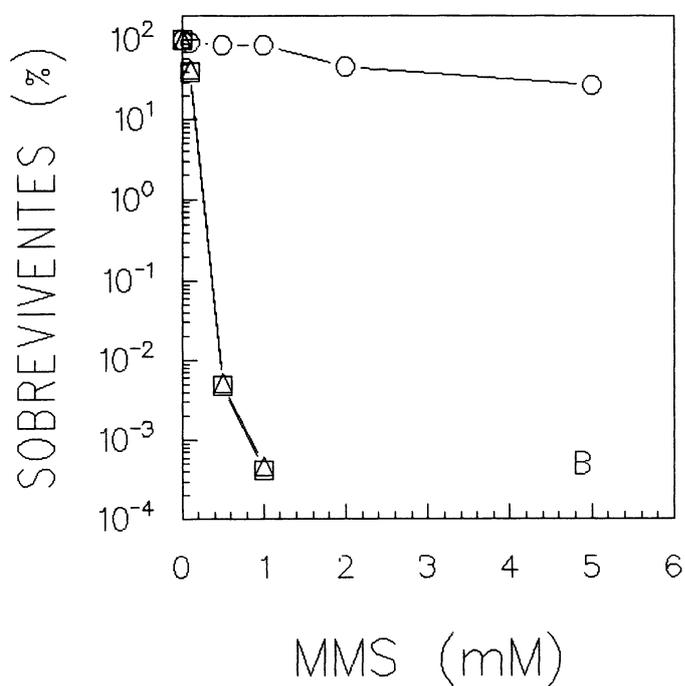
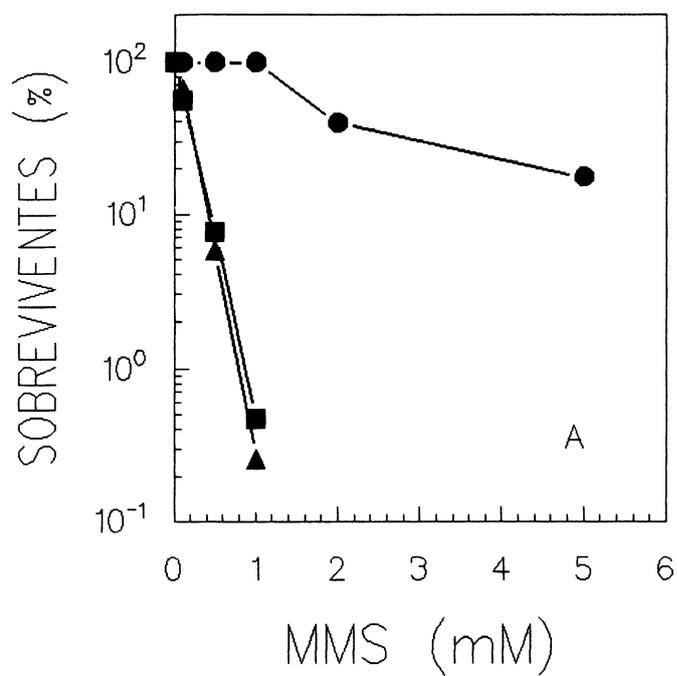


sobreviventes reduziu de 100% para cerca de 56%. Quando a concentração de MMS foi elevada em 10 vezes ou seja para 1,0 mM o número de sobreviventes de *E. coli* DH5 foi de 0,47%. Este valor foi 213 vezes menor que o controle (100%) e 118 vezes menor que o valor obtido para a concentração de 0,1 mM. Em concentrações superiores a 1,0 mM não houve crescimento de colônias de *E. coli* DH5. O perfil de sobrevivência da estirpe DH5 contendo o plasmídeo pBMR5 foi significativamente diferente. Nas concentrações de 0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM de MMS o número de sobreviventes permaneceu estável em 100%. Na concentração de 2,0 mM de MMS obteve-se aproximadamente 40% de células de *E. coli* DH5(pBMR5) sobreviventes. Quando a concentração de MMS foi elevada para 5 mM o número de sobreviventes foi de 18%. Resultados semelhantes aos de *E. coli* DH5 foram obtidos para *E. coli* DH5(pBMR26.2). Quando esta estirpe foi exposta as concentrações de 0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM de MMS os números de sobreviventes foram de 67%, 6% e 0,26% respectivamente. Assim como para *E. coli* DH5 não foi verificado crescimento de células de *E. coli* DH5(pBMR26.2) nas concentrações de 2,0 e 5,0 mM de MMS.

A figura 26B mostra que, assim como *E. coli* HB101, *E. coli* HB101(pBMR26.2) foi incapaz de sobreviver a concentrações de MMS superiores a 0,1 mM. Desta forma, os perfis gráficos observados para estas duas estirpes ficaram sobrepostos.

Os resultados apresentados nas Figuras 25 e 26 indicaram que o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 foi inativado pelo transposon *Tn5*, impedindo a indução da resposta SOS em *E. coli* DH5 e *E. coli* HB101.

FIGURA 26 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MMS NA INDUÇÃO DA RESPOSTA SOS EM *Escherichia coli* DH5(pBMR26.2) E *Escherichia coli* HB101(pBMR26.2)



### 3.9 PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE *Escherichia coli* HB101(pBMR26.2)

Células de *E. coli* HB101 contendo o plasmídeo pBMR26.2 foram testadas quanto a capacidade de promover recombinação homóloga (Tabela XVI). Os resultados obtidos após conjugação com a estirpe HfrC demonstraram que *E. coli* HB101(pBMR26.2) foi tão ineficiente quanto a estirpe controle HB101. Este resultado foi, mais uma vez, indicativo da inativação do gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 pelo transposon *Tn5*.

Não foram realizados experimentos de recombinação envolvendo *E. coli* DH5(pBMR26.2) devido a esta estirpe ser prototrófica para o aminoácido prolina.

TABELA XVI - PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO DE *Escherichia coli*  
HB101(pBMR26.2)

ESTIRPE DE <i>E. coli</i>	PROFICIÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO (RECOMBINANTES <i>proA</i> <sup>+</sup> /100 DOADORES)
HB101(pBMR26.2)	0,0037
HB101(pBMR5)	8,2350
HB101	0,0042

*E. coli* HfrC foi utilizada como estirpe doadora. A conjugação foi conduzida conforme descrito em Materiais e Métodos (2.28). Os resultados expressam a média entre dois experimentos. Os valores para *E. coli* HB101(pBMR5) e *E. coli* HB101 foram repetidos para fins de comparação.

FIGURA 26 (legenda)

Células das diferentes estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB até densidade de  $10^8$  células/ml (D.O. em 550 nm), coletadas por centrifugação, ressuspensas em solução salina 0,85%, diluídas e plaqueadas em meio LA contendo MMS nas concentrações indicadas.

Gráfico A: ■ *E. coli* DH5, ● *E. coli* DH5(pBMR5), ▲ *E. coli* DH5(pBMR26.2)

Gráfico B: □ *E. coli* HB101, ○ *E. coli* HB101(pBMR5), △ *E. coli* HB101(pBMR26.2)

#### 4 DISCUSSÃO

O produto do gene *recA* de *E. coli* está envolvido em aspectos fundamentais do metabolismo do DNA, sendo essencial para a recombinação homóloga e também para a expressão das funções de reparo SOS. Consequentemente, células *recA*<sup>-</sup> de *E. coli* são incapazes de promover recombinação e são extremamente sensíveis à agentes causadores de lesão no DNA como o metanosulfonato de metila e a radiação ultravioleta (Walker, 1984). Devido a estas características, tanto o gene *recA* como seu produto, a proteína RecA, têm despertado considerável interesse científico. Numerosas pesquisas direcionadas para a identificação e caracterização de genes e proteínas análogos em organismos procariotos (Tabela I) têm sido conduzidas, e o conhecimento acumulado já permitiu a extensão destas investigações para organismos mais complexos (Halbrook e McEntee, 1989; Moore e Fishel, 1990; Pang *et al.*, 1992).

O interesse em se pesquisar sistemas de recombinação nos diferentes microrganismos pode ser fundamentado em dois aspectos principais. Células bacterianas podem ser isoladas de ecossistemas diversos e estão em muitos casos, continuamente expostas à radiação ultravioleta do sol ou mesmo ao acúmulo de produtos metabólicos que podem lesar seu DNA. O papel da proteína RecA revela sua participação na tolerância dos organismos a estes tipos de lesão podendo até mesmo explicar sua capacidade de sobrevivência em ecossistemas considerados inadequados à vida. Em um segundo enfoque, as bactérias constituem ferramentas de trabalho essenciais na investigação

da expressão de genes e funcionalidade de seus produtos. Desde o isolamento dos primeiros mutantes Rec por Clark e Marguiles (1965) os mais diversos mutantes *recA* de *E. coli* vêm sendo utilizados em laboratórios de biologia molecular e microbiologia como células hospedeiras de bancos genômicos ou de plasmídeos portadores de genes de interesse específico. Entretanto a análise de alguns genes bacterianos mostrou-se em diversas ocasiões, facilitada pela disponibilidade de derivados *RecA*<sup>-</sup> da própria espécie em estudo (Zink *et al.*, 1985; Koomey e Falkow, 1987; Murphy *et al.*, 1987; Owttrim e Coleman, 1989).

Devido às perspectivas de aproveitamento do *H. seropedicae* na agricultura, diversos estudos sobre a genética e fisiologia deste microrganismo vêm sendo realizados "in vitro". As pesquisas genéticas envolvem a manipulação de seus genes, como a clonagem e a análise da expressão dos genes de fixação de nitrogênio da estirpe Z78 (Souza *et al.*, 1990; Teixeira, 1991, Machado *et al.*, 1994). Entretanto, até o presente, em todos os ensaios para avaliação da funcionalidade de seus produtos protéicos foram empregadas como recipientes, células de *E. coli* ou *A. brasilense* mutantes (Souza, 1990; Teixeira, 1992; Machado *et al.*, 1994). Por este motivo, foi desenvolvido este projeto de identificação, caracterização e mutagênese do gene *recA* de *H. seropedicae* Z78, visando a futura obtenção de estirpes *recA*<sup>-</sup> incapazes de recombinação homóloga e portanto, de integrar os genes clonados.

Um banco de genes de *H. seropedicae* Z78 foi construído no vetor pLAFR3 e propagado em *E. coli* HB101. Este banco contendo cinco mil clones e representando cerca de 100% do genoma de *H. seropedicae* Z78 foi utilizado para o isolamento de um gene

análogo ao gene *recA* de *E. coli*. O método de seleção empregado foi aquele descrito por Better e Helinski, 1983, durante a clonagem do gene *recA* de *Rhizobium meliloti* e baseou-se na complementação heteróloga de um mutante *recA* de *E. coli*. Segundo Better e Helinski, 1983, somente as células de *E. coli* onde a mutação *recA* é complementada, são capazes de crescer e formar colônias em presença do agente alquilante MMS. A escolha deste método fundamentou-se no fato do mesmo ter sido empregado eficientemente por outros pesquisadores durante a investigação de análogos do gene *recA* em outras espécies bacterianas Gram negativas (Miles *et al.*, 1986; Koomey e Falkow, 1987; Hickman *et al.*, 1987; Resnick e Nelson, 1988).

Considerando que o banco genômico de *H. seropedicae* Z78 havia sido transfetado em células *E. coli* HB101, uma estirpe onde o gene *recA* está inativado por uma mutação pontual (Boyer e Roulland-Dussiox, 1969), este foi empregado diretamente no isolamento de clones que possivelmente conteriam o gene *recA* *H. seropedicae* Z78. Um total de duzentas e vinte e seis colônias de *E. coli* HB101 ( $Sm^r Tc^r MMS^r$ ) foram isoladas em meio contendo MMS. A transformação de células de *E. coli* HB101 ( $MMS^S$ ) com os plasmídeos da série pBMR indicou que os plasmídeos recombinantes isolados de células de *E. coli* HB101 (pLAFR3::DNA *H. seropedicae* Z78) continham um gene capaz de complementar o fenótipo  $RecA^-$  daquela estirpe. Além disso, os resultados foram indicativos de que não houve reversão espontânea do genótipo *recA*<sup>-</sup> de *E. coli* HB101 durante o processo de isolamento dos clones resistentes ao MMS. O plasmídeo pBMR5 que continha um fragmento *HindIII* de 3,6 kb comum aos demais plasmídeos da série pBMR5 foi caracterizado. Durante este processo foi

avaliada a capacidade do produto do gene clonado em complementar o fenótipo  $\text{RecA}^-$  de *E. coli* HB101 em experimentos que envolviam duas das funções atribuídas à proteína RecA, isto é: a promoção da recombinação homóloga e a indução da resposta SOS via resistência à radiação ultravioleta e ao MMS.

A proteína RecA de *H. seropedicae* Z78 restaurou a capacidade de recombinação homóloga da estirpe *E. coli* HB101. Esta propriedade foi demonstrada através da recuperação da capacidade desta estirpe em crescer em meio de cultura isento de prolina após conjugação com *E. coli* HfrC. Sendo uma estirpe auxotrófica para prolina, a estirpe HB101(pBMR5) seria incapaz de crescer em sua ausência se não houvesse ocorrido a transferência e a integração do gene *pro* da estirpe HfrC, por conjugação e recombinação, respectivamente. O nível desta recuperação foi quantificado pelo aumento do número de recombinantes  $\text{pro}^+$  obtidos nos ensaios de conjugação. O fato da complementação do fenótipo RecA não ter sido suficiente para elevar a proficiência de recombinação da estirpe mutante ao nível verificado para sua estirpe isogênica *E. coli* RR1, pode ser atribuído à expressão diferencial de um produto heterólogo em uma estirpe hospedeira ou ainda, pode estar refletindo uma interferência na cooperação entre a proteína RecA de *H. seropedicae* Z78 e a enzima RecBCD de *E. coli*, o que não ocorre normalmente entre proteínas da mesma espécie. Esta recuperação parcial da proficiência de recombinação de *E. coli* HB101 em cruzamentos com *E. coli* HfrC foi também observada por Kokjohn e Miller (1985) e por Resnick e Nelson (1988) durante a caracterização dos genes *recA* análogos de *Aeromonas caviae* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

A sensibilidade à radiação ultravioleta e ao MMS, característica das estirpes *recA<sup>-</sup>*, também foi parcialmente suprimida em *E. coli* HB101 pela proteína RecA de *H. seropedicae* Z78. O aumento da resistência a estes agentes pode ser atribuído à recuperação da capacidade de reparo do DNA lesado, que permitiu às células recipientes sobreviverem a tempos maiores de exposição à radiação ultravioleta e à concentrações mais elevadas de MMS. Assim como no teste de proficiência de recombinação, as diferenças quantitativas observadas entre *E. coli* RR1 e *H. seropedicae* Z78 nos testes de indução da resposta SOS podem estar refletindo possíveis diferenças estruturais entre as proteínas RecA destas duas espécies. No caso da Resposta SOS estas diferenças poderiam dificultar a perfeita interação da proteína RecA de *H. seropedicae* com a proteína LexA de *E. coli*. Em decorrência desta interação deficiente a desrepressão do Sistema SOS e o conseqüente reparo do DNA seriam menos eficientes. Mesmo diante desta possibilidade os perfis de indução da resposta SOS em *E. coli* HB101 (pBMR5) mostraram que o gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 é transcrito nesta estirpe hospedeira, resultando em níveis de atividade da proteína RecA suficientes para conferir proteção. Perfis de sobrevivência semelhantes indicando proteção parcial à radiação ultravioleta e ao MMS são comuns e foram observados em estudos de complementação heteróloga de *E. coli* HB101 pela a proteína RecA de *Aeromonas caviae* (Resnick e Nelson, 1988), *Vibrio anguillarum* (Singer, 1989), *Aquaspirillum magnetotacticum* (Berson et al., 1989) e *Neisseria gonorrhoeae* (Fyfe e Daveis, 1990).

Novas evidências da complementação de *E. coli* HB101 pelo

gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 carregado no plasmídeo pBMR5 foram obtidas através da substituição deste plasmídeo pelo plasmídeo R68.45. Os vetores pLAFR3 e o R68.45 fazem parte do mesmo grupo de incompatibilidade IncP1 o que os impossibilita de coexistirem na mesma célula bacteriana (Hardy, 1981). Assim, a perda do plasmídeo pBMR5 em virtude de conjugação com a estirpe *E. coli* 1230(R68.45) restaurou o fenótipo  $RecA^-$  da estirpe *E. coli* HB101. Da conjugação da estirpe HB101(pBMR5)T7 com 1230(R68.45) obteve-se o transconjuante HB101(R68.45)T7.29 que manteve a prototrofia para prolina. Este resultado foi interpretado como um indício da reversão definitiva da mutação *proA* de *E. coli* HB101, pela integração do gene *pro*<sup>+</sup> de *E. coli* HFrC. Em contraposição, a mesma estirpe *E. coli* HB101(R68.45)T7.29 perdeu completamente a resistência ao MMS. Em vista destes resultados concluiu-se que não houve integração do gene *recA* de HfrC por recombinação e que a recuperação da resistência de HB101 ao MMS e à radiação ultravioleta foi realmente mediada pelo produto do gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 contido no plasmídeo recombinante pBMR5.

Estudos anteriores de complementação interespecífica são consistentes com a hipótese de que a proteína RecA foi funcionalmente conservada durante a evolução dos organismos procariotos (Miller e Kokjohn, 1990). Os resultados dos ensaios fisiológicos realizados neste trabalho indicam que estas observações se estendem a *Herbaspirillum seropedicae*.

A presença de um segmento de DNA estruturalmente homólogo ao gene *recA* no DNA-inserto de 25,40 kb de *H. seropedicae* Z78, foi estabelecida pela hibridização de fragmentos de restrição do plasmídeo pBMR5 com um DNA-sonda contendo o gene *recA* de *E.*

*coli* K12. Sob condições de baixa estringência foram detectados sinais de hibridização nos fragmentos *EcoRI* de 4,55 kb, *HindIII* de 3,65 kb e *BamHI* de 28,60 kb. De acordo com o mapa de restrição do plasmídeo pBMR5 o fragmento *BamHI* de 28,60 kb contém todo o segmento de DNA correspondente ao vetor pLAFR3, já que na construção do banco de genes o único sítio *BamHI* do vetor foi eliminado devido à ligação com os fragmentos *Sau3A* de *H. seropedicae* Z78. Também segundo o mapa os dois outros fragmentos derivam exclusivamente do DNA-inserto de *H. seropedicae* Z78. A análise dos sinais de hibridização correspondentes as digestões simples e duplas do plasmídeo pBMR5 permitiu ainda reconfirmar a região do mapa onde o fragmento *EcoRI* de 4,55 kb está ligado ao fragmento *BamHI* de 3,45 kb e contém o fragmento *HindIII* de 3,65 kb. A associação destes dados, além do fato de não haver sido detectado sinal de hibridização indicativo de reação cruzada entre o DNA sonda e o vetor, sugeriram que a sequência correspondente ao gene *recA* está localizada em uma das extremidades do fragmento clonado.

Estudos de clonagem e caracterização de genes tipo-*recA* de diferentes gêneros de bactérias apontaram para uma uniformidade no tamanho do segmento de DNA que codifica as regiões regulatória e estrutural destes genes. Assim como em *E. coli* K12 (SANCAR *et al.*, 1980), os genes *recA* de *A. brasilense* (CROES *et al.*, 1990) e de *R. phaseoli* (MARTÍNEZ-SALAZAR *et al.*, 1991) estão contidos em um fragmento de 1,2 kb. Em *A. tumefaciens* (FARRAND *et al.*, 1989) o tamanho do segmento é de 1,3 kb. Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm genes *recA* com tamanho médio de 1,4 kb (SANO e KAGEYAMA, 1987; HICKMAN *et al.*, 1987; DE MOT *et al.*, 1993). Em casos como o de *A.*

*magnetotacticum* (BERSON *et al.*, 1989) onde o tamanho do gene não foi precisamente definido, a hibridização DNA/DNA limitou o tamanho dos segmentos em 3-4 kb. Estas informações permitiram supor que todo a região correspondente ao gene *recA* poderia estar contida no fragmento *Hind*III de 3,65 kb de *H. seropedicae* Z78. Para confirmar esta hipótese procedeu-se a subclonagem de fragmentos do plasmídeo pBMR5. Inicialmente foi cogitada a subclonagem dos fragmentos *Hind*III (3,65 kb) e *Eco*RI (4,55 kb) que haviam hibridizado com o DNA sonda de *E. coli*. O fragmento *Bam*HI não foi considerado devido ao seu tamanho inadequado e também por conter todo o vetor pLAFR3. Entretanto a subclonagem do fragmento *Eco*RI (4,55 kb) foi inviabilizada tecnicamente pelo fato dele formar uma banda eletroforética dupla com o fragmento *Eco*RI de 4,60 kb que impediu sua purificação. Em vista disto, optou-se ainda pelo isolamento e subclonagem de dois outros fragmentos, o *Hind*III de 4,90 kb e o *Bam*HI de 3,45 kb uma vez que ambos estão situados imediatamente à direita do fragmento *Hind*III (3,65 kb). Desta forma, foram obtidos os suclones pBMR501, pBMR502 e pBMR503 que continham os fragmentos *Hind*III de 4,90 kb, *Bam*HI de 3,45 e *Hind*III de 3,65 kb respectivamente. Dentre estes três subclones somente o plasmídeo pBMR503 foi capaz de promover a complementação interespecífica de *E. coli* HB101. Os níveis de resistência a radiação ultravioleta e MMS assim como de proficiência de recombinação conferidos por este plasmídeo foram equivalentes àqueles observados para o plasmídeo pBMR5 nas mesmas condições experimentais. Estes resultados confirmaram o experimento de hibridização e a delimitação do gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 dentro do fragmento *Hind*III de 3,65 kb.

A mutagênese do plasmídeo pBMR5 através de inserção do transposon *Tn5* foi empregada como passo inicial para a futura obtenção de derivados *recA*<sup>-</sup> de *H. seropedicae* Z78. Pela digestão do plasmídeo pBMR26.2 com enzimas de restrição foi possível determinar o ponto de inserção do transposon. Sua localização apresentou concordância com a delimitação da região do gene *recA* estabelecida por hibridização e subclonagem.

Testes fisiológicos de proficiência de recombinação e de resistência à agentes mutagênicos demonstraram que a mutação no gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 inativou completamente seu produto protéico fazendo com que as células portadoras do plasmídeo pBMR26.2 apresentassem comportamento idêntico ao das estirpes empregadas como controles negativos.

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa permitiram comprovar a existência de um gene análogo ao *recA* em *H. seropedicae* estirpe Z78, bem como avaliar a funcionalidade de seu produto em difentes estirpes de *E. coli*.

## 5 CONCLUSÕES

- 1 *Herbaspirillum seropedicae* Z78 possui um gene semelhante ao *recA* de *E. coli*, cujo produto é capaz de complementar a estirpe mutante *E. coli* HB101 *recA*<sup>-</sup>.
- 2 O gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 é estruturalmente homólogo ao gene *recA* de *E. coli* K12.
- 3 O fragmento *Hind*III de 3,65 kb do DNA inserto contido no plasmídeo pBMR5, contém toda a região estrutural do *recA* de *H. seropedicae* Z78.
- 4 A proteína RecA de *H. seropedicae* Z78 restaurou a proficiência de recombinação homóloga de *E. coli* HB101 em eventos de conjugação.
- 5 A proteína RecA de *H. seropedicae* Z78 foi capaz de suprimir a sensibilidade das estirpes mutantes *E. coli* HB101 (*recA13*) e *E. coli* DH5 (*recA1*) ao metanosulfonato de metila e à radiação ultravioleta, restaurando a capacidade de indução da Resposta SOS em ambas estirpes.
- 6 A inativação do gene *recA* de *H. seropedicae* Z78 por inserção do transposon *Tn5*, resultou em um produto funcionalmente inativo isto é, incapaz de promover a desrepressão do Sistema SOS ou a recombinação homóloga do DNA em estirpes *recA*<sup>-</sup> de *E. coli*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANGULO, J.F.; MOREAU, P.L.; MAUNOURY, R.; LAPORTE, J.; HILL, A.M.; BERTOLOTTI, R.; DEVORET, R. KIN, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 217, p. 123-134, 1989.
- 2 AMREIN, M.; STASIAK, A.; GROSS, H.; STOLL, E.; TRAVAGLINI, G. Scanning tunneling microscopy of RecA-DNA complexes coated with a conducting film. *Science* (Washington DC), v. 240, p. 514-616, 1988.
- 3 AMUNDSEN, S.K.; TAYLOR, A.F.; CHAUDHURY, A.M.; SMITH, G.R. *recD*: The gene for an essential third subunit of exonuclease V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 83, p. 5558-5562, 1986.
- 4 BACHMANN, B.J. Linkage map of *Escherichia coli* K12, edition 8. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 54, p. 130-197, 1990.
- 5 BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *An. Acad. Bras. Cien.*, Rio de Janeiro, v. 56, p. 365, 1984.
- 6 BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- 7 BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.

- 8 BALL, T.K.; WASMUTH, C.R.; BRAUNAGEL, S.C.; BENEDIK, M.J.  
Expression of *Serratia marcescens* extracellular proteins requires *recA*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 172, p. 342-349, 1990.
- 9 BANKIER, A.T.; WESTON, A.T.; BARREL, B.G. Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method. *Meth. Enzymol.*, San Diego, v. 155, p. 51-93, 1987.
- 10 BARCAK, G.J.; TOMB, J.F.; LAUFER, C.S.; SMITH, H.O. Two *Haemophilus influenzae* *rd* genes that complement the *recA*-like mutation *recA1*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 2451-2457, 1989.
- 11 BASILE, G.; AKER, M.; MORTIMER, R.K. Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene *rad51*. *Mol. Cell. Biol.*, Washington, v. 12; p. 3235-3246, 1992.
- 12 BATTISTA, J.R.; OHTA, T.; NOHMI, T.; SUN, W.; WALKER, G.C. Dominant negative *umuD* mutations decreasing RecA-mediated cleavage suggest roles for intact UmuD in modulation of SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 87, p. 7190-7194, 1990.
- 13 BECKER, M.M.; WANG, Z. Origin of ultraviolet damage in DNA. *J. Mol. Biol.*, London, v. 210, p. 429-438, 1989.
- 14 BERGER, S.L. Quantifying <sup>32</sup>P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Meth. Enzymol.*, San Diego, v. 152, p. 49-54, 1987.
- 15 BERGER, I.; COHEN, A. Suppression of RecA deficiency in plasmid recombination by bacteriophage  $\lambda$   $\beta$  protein in RecBCD-ExoI-*Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.*, Washington, v.171, p. 3523-3529, 1989.

- 16 BERSON, A.E.; HUDSON, D.V.; WALEH, N.S. Cloning and characterization of the *recA* gene of *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Arch. Microbiol.*, Heidelberg, v. 152, p. 567-571, 1989.
- 17 BETHESDA RESEARCH TECHNOLOGIES, INC. *Cell-Porator Electroporation System*. Gaithersburg, 1987. 27p.
- 18 BETTER, M.; HELINSKI, D.R. Isolation and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.155, p. 311-316, 1983.
- 19 BI, X.; LIU, L.F. *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J. Mol. Biol.*, London, v. 235, p. 414-423, 1994.
- 20 BIEK, D.P.; COHEN, S.N. Identification and characterization of *recD*, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 167, p 594-603, 1986.
- 21 BISHOP, D.K; PARK, D.; XU, L.; KLECKNER, N. DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *Escherichia coli* RecA required for recombination, synaptonemal complex formation and cell cycle progression. *Cell*, Cambridge, v. 69, p. 439-456, 1992.
- 22 BLANAR, M.A.; SANDLER, S.J.; ARMENGOD, M.E.; REAM, L.W.; CLARK, A.J. Molecular analysis of the *recF* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 81, p. 4622-4626, 1984
- 23 BLANCO, M.; HERRERA, G.; COLLADO, P.; REBOLLO, J.E.; BOTELLA, L.M. Influence of RecA protein on induced mutagenesis. *Biochimie (Paris)*, v. 64, p. 633-636, 1982.

- 24 BOEHMER, P.E.; EMMERSON, P.T. The RecB subunit of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme couples ATP hydrolysis to DNA unwinding. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 4981-4987, 1992.
- 25 BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA. *Biochemicals for Molecular Biology*. Mannheim, 1987. 172p.
- 26 BOLIVAR, F.; RODRÍGUEZ, R.L.; GREENE, P.J.; BETLACH, M.J.; HEYNECKER, H.L.; BOYER, H.W.; CROSA, J.H.; FALKOW, S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II A multipurpose cloning system. *Gene* (Amst), v. 2, p. 95-103, 1977.
- 27 BOYER, W.H.; ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 41, p. 459-472, 1969.
- 28 BRAKIER, L.; VERLEY, W. G. The lethal action of ethyl methanesulfonate, nitrogen mustard and myleran on the T7 coliphage. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 213, p. 296-311, 1970.
- 29 BRAY, G.A. A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.*, San Diego, v. 1, p. 279-280, 1960.
- 30 BRENNER, S.L.; ZLOTNICK, A.; GRIFFITH, J.D. RecA protein self-assembly. Multiple discrete aggregation states. *J. Mol. Biol.*, London, v. 204, p. 959-972, 1988.
- 31 BRENT, R.; PTASHNE, M. The *lexA* gene product represses its own promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 77, p. 1932-1936, 1980a.
- 32 BRENT, R.; PTASHNE, M. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 78, p. 4204-4208, 1980b..

- 33 BRENT, R. Regulation and autoregulation by LexA protein. *Biochimie (Paris)*, v. 64, p. 565-569, 1982.
- 34 BRIDGES, B.A.; MOTTERSHEAD, R.P.; GREEN, M.H.L.; GRAY, W.J.H. Mutagenicity of dichlorvos and methyl methanesulfonate for *Escherichia coli* WP2 and some derivatives deficient in DNA repair. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 19, p. 295-303, 1973.
- 35 BRIDGES, B.A.; WOODGATE, R. Mutagenic repair in *Escherichia coli*: Products of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 82, p. 4193-4197, 1985.
- 36 BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. The use of transposon *Tn5* mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetics maps of DNA segments cloned in multi-copy plasmids: a review. *Gene (Amst)*, v. 27, p.131-149, 1984.
- 37 BRYANT, F.R.; LEHMAN, I.R. On the mechanism of renaturation of complementary DNA strands by the RecA protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 82, p. 297-301, 1985.
- 38 BRYANT, F.R.; TAYLOR, A.R.; LEHMAN, I.R. Interaction of the RecA protein of *Escherichia coli* with single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 260, p. 1196-1202, 1985.
- 39 BRYANT, F.R.; MENGE, K.L.; NGUYEN, T.T. Kinetic modeling of the RecA protein promoted renaturation of complementary DNA strands. *Biochemistry*, Washington, v. 28, p. 1062-1069, 1989.

- 40 BUCKHARDT, S.E.; WOODGATE, R.; SCHEUERMANN, R.H.; ECHOLS, H. UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: Overproduction, purification and cleavage by RecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, p. 1811-1815, 1988.
- 41 CAO, Y.; KOGOMA, T. Requirement for the polymerization and 5' → 3' exonuclease activities of DNA polymerase I in initiation of DNA replication at *oriK* sites in absence of RecA in *Escherichia coli* *rnhA* mutants. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 175, p. 7254-7259, 1993.
- 42 CAPALDO-KIMBAL, F.; BARBOUR, S.D. Involvement of recombination genes in growth and viability of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 106, p. 204-212, 1971.
- 43 CASADABAN, M.J.; COHEN, S.N. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 138, p. 179-207, 1980.
- 44 CERUTTI, H.; OSMAN, M.; GRANDONI, P.; JAGENDORF, A.T. A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 89, p. 8068-8072, 1992.
- 45 CHENG, K.C.; SMITH, G.R. Recombinational hotspot activity of chi-like sequences. *J. Mol. Biol.*, London, v. 180, p. 371-377, 1984.
- 46 CHENG, K.C.; SMITH, G.R. Cutting of chi-like sequences by the RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 194, p. 747-750, 1987.
- 47 CHEO, D.L.; BAYLES, K.W.; YASBIN, R.E. Elucidation of regulatory elements that control damage induction and competence induction of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 175, p. 5907-5915, 1993.

- 48 CHIU, S.K.; RAO, B.J.; STORY, R.M.; RADDING, C.M. Interactions of three strands in joints made by RecA protein. *Biochemistry*, Washington, v. 32, p. 13146-13155, 1993
- 49 CHOW, S.A.; HONIGBERG, S.M.; BAITON, R.J., RADDING, C. Patterns of nuclease protection during strand exchange. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 261, p. 6961-6971, 1986.
- 50 CHOW, S.A.; RAO, B.J.; RADDING, C.M. Reversibility of strand invasion promoted by RecA protein and its inhibition by *Escherichia coli* single-strand DNA binding protein or phage T4 gene 32 protein. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 263, p. 200-209, 1988.
- 51 CLARK, A.J.; MARGULIES, A.D. Isolation and characterization of recombination deficient mutants of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 53, p. 451-459, 1965.
- 52 CLARK, A.J. Toward a metabolic interpretation of genetic recombination of *E. coli* and its phages. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v. 25, p. 437-464, 1971.
- 53 CLARK, A.J. Recombination deficient mutants of *Escherichia coli* and other bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, Palo Alto, v. 7, p. 67-86, 1973.
- 54 CLARK, A.J. *rec* genes and homologous recombination proteins in *Escherichia coli*. *Biochimie (Paris)*, v. 73, p. 523-532, 1991.
- 55 CLARKE, L.; CARBON, J. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, Cambridge, v. 9, p. 91, 1976.
- 56 COHEN, S.; KNOLL, B.J.; LITTLE, J.W.; MOUNT, D.W. Preferential cleavage of phage  $\lambda$  repressor monomers by RecA protease. *Nature (Lond)*, v. 294, p. 182-186, 1981.

- 57 COHEN, A.; LABAN, A. Plasmidic recombination in *Escherichia coli* K-12: the role of *recF* gene function. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 198, p. 471-474, 1983.
- 58 COUTO, L.B.; CHAUDHURI, I.; DONAHUE, B.A.; DEMPLE, B.; ESSIGMANN, J.M. Separation of the SOS-dependent and SOS-independent components of alkylating-agent mutagenesis. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 4170-4177, 1989.
- 59 COX, M.M.; LEHMAN, I.R. RecA protein of *Escherichia coli* promotes branch migration a kinetically distinct phase of DNA strand exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 78, p. 3433-3437, 1981a.
- 60 COX, M.M.; LEHMAN, I.R. Directionality and polarity in RecA protein-promoted branch migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 78, p. 6018-6022, 1981b.
- 61 COX, M.M.; LEHMAN, I.R. Enzymes of general recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 56, p. 229-262, 1987.
- 62 CRAIG, N.L.; ROBERTS, J.W. *Escherichia coli* RecA protein-directed cleavage of phage  $\lambda$  repressor requires polynucleotide. *Nature (Lond)*, v. 283, p. 26-30, 1980.
- 63 CRAIG, N.L.; ROBERTS, J.W. Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli* RecA protein-directed cleavage of phage  $\lambda$  repressor. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 256, p. 8039-8044, 1981.
- 64 CROES, C.; VANDERLEYDEN, J.; MICHELS, K. Construction of an *Azospirillum brasilense* Sp7 *recA* mutant. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 223, p. 152-159, 1990.
- 65 CUNNINGHAM, R.P.; DAS GUPTA, C.; SHIBATA, T.; RADDING, C.M. Homologous pairing in genetic recombination: RecA protein makes joint molecules of gapped circular DNA and closed circular DNA. *Cell*, Cambridge, v. 20, p. 223-235, 1980.

- 66 DasGUPTA, C.; SHIBATA, T.; CUNNINGHAM, R.P.; RADDING, C.M. The topology of homologous pairing promoted by RecA protein. *Cell*, Cambridge, v. 22, p. 437-446, 1980.
- 67 DasGUPTA, C.; RADDING, C.M. Polar branch migration promoted by RecA protein: Effect of mismatched base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 79, p. 762-766, 1982.
- 68 DAVIS, R.W.; BOTSTEIN, D.; ROTH, J.R. Phage purification. In: *Advances Bacterial Genetics*. 1. ed. New York: Cold Spring Harbour Lab., 1980. p.70-73.
- 69 DAVIS, E.O.; SEDGWICH, S.G.; COLSTON, M.J. Novel structure of the *recA* locus of *Mycobacterium tuberculosis* implies processing of the gene product. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 173, p. 5653-5662, 1991.
- 70 DEFAIS, M.; CAILLET-FAUQUET, P.; RADMAN, M.; ERRERA, M. Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of  $\lambda$  in different genetic systems. *Virology*, San Diego, v.43, p. 495-503, 1971.
- 71 DE MOT, R.; LAEREMANS, T.; SCHOOF, G.; VANDERLEYDEN, J. Characterization of the *recA* gene from *Pseudomonas fluorescens* OE28.3 and construction of a *recA* mutant. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 139, p. 49-57, 1993.
- 72 DiCAPUA, E.; CUILLEL, M.; HEWAT, E.; SCHNARR, M.; TIMMINS, P.A.; RUIGROK, R.W.H. Activation of RecA protein. The open helix model for LexA cleavage. *J. Mol. Biol.*, London, v. 226, p. 707-719, 1992.
- 73 DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. *Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants*. Madison: Science Tech. Publishers, 1987. 155p.
- 74 DÖBEREINER, J.; Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic  $N_2$  fixing bacteria. *Cienc. Cult. (São Paulo)*, v. 44, p. 310-313, 1992a.

- 75 DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992b.
- 76 DRAKE, J.W.; BALTZ, R.H. The biochemistry of mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 45, p. 11-37, 1976.
- 77 DRESSLER, D.; POTTER, H. Molecular mechanisms in genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 51, p. 727-761, 1982.
- 78 DUNDERDALE, H.J.; BENSON, F.E.; PARSONS, C.A.; SHARPLES, G.J.; LLOYD, R.G.; WEST, S.C. Formation and resolution of recombination intermediates by *Escherichia coli* RecA RuvC proteins. *Nature (Lond)*, v. 354, p. 506-510, 1991.
- 79 DUTREIX, M.; MOREAU, P.L.; BAILONE, A.; GALIBERT, F.; BATTISTA, J.R.; WALKER, G.C.; DEVORET, R. New *recA* mutations that dissociates the various RecA protein activities in *Escherichia coli* provide evidence for an additional role for RecA protein in UV mutagenesis. *J. Bacteriol.*, Washington, v.171, p. 2415-2423, 1989.
- 80 DUWAT, P.; EHRLICH, S.D.; GRUSS, A. Use of degenerated primers for polymerase chain reaction cloning and sequence of the *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* *recA*. *Appl. Environm. Microbiol.*, Washington, v. 58, p. 2674-78, 1992.
- 81 DYBVIG, K.; HOLLINGSHEAD, S.K.; HEATH, D.G.; CLEWELL, F.S.; WOODARD, A. Degenerated oligonucleotide primers for enzymatic amplification of *recA* sequences from Gram-positive bacteria and mycoplasmas. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 174, p. 2729-2732, 1992.
- 82 ECHOLS, H.; GOODMAN, M.F. Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 60, p. 477-511, 1991.

- 83 ECKERT, K.A.; DRINKWATER, N.R. *recA*-dependent and *recA*-independent N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis at a plasmid-encoded *Herpes simplex* virus thymidine kinase gene in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 178, p. 1-10, 1987.
- 84 EGELMAN, E.H.; STASIAK, A. Structure of helical RecA-DNA complexes. Complexes formed in presence of ATP-Gamma-S or ATP. *J. Mol. Biol.*, London, v. 191, p. 677-697, 1986.
- 85 EGELMAN, E.H.; YU, X. The location of DNA in RecA-DNA helical filaments. *Science* (Washington DC), v. 245, p. 404-407, 1989.
- 86 EGGLESTON, A.K.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Biochemical characterization of a mutant RecBCD enzyme, the RecBCD<sup>2109</sup> enzyme, which lacks  $\chi$ -specific, but not non-specific, nuclease activity. *J. Mol. Biol.*, London, v. 231, p. 605-620, 1993.
- 87 EGUCHI, Y., OGAWA, T.; OGAWA, H. Cleavage of bacteriophage  $\phi$ 80 CI repressor by RecA protein. *J. Mol. Biol.*, London, v. 202, p. 565-573, 1988.
- 88 EITNER, G.; ADLER, B.; LANZOV, V.A.; HOFMEISTER, J. Interspecies RecA protein substitution in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 185, p. 481-486, 1982.
- 89 ELLEDGE, S.J.; WALKER, G.C. Proteins required for ultraviolet light and chemical mutagenesis. Identification of the products of *umuC* locus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 164, p. 175-192, 1983.
- 90 ENNIS, D.G.; OSSAMA, N.; MOUNT, D.W. Genetic separation of *Escherichia coli recA* functions for SOS mutagenesis and repressor cleavage. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 2533-2541, 1989.

- 91 EVENSEN, G.; SEEBERG, E. Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase. *Nature (Lond)*, v. 296, p. 773-775, 1982.
- 92 FAELEN, M.; SCHOONEJANS, E.; TOUSSAINT, A. Isolation and characterization of a *recA* mutant of *Erwinia chrysanthemi* B374. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 201, p. 126-128, 1985.
- 93 FALK, E.C.; JOHNSON, J.L.; BALDANI, V. D.; DOBEREINER, J. Deoxiribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 36, p. 80-85, 1986
- 94 FARRAND, S.K.; O'MORCHOE, S.P.; McCUTCHAN, J. Construction of an *Agrobacterium tumefaciens* C58 *rec A* mutant. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 5314-5321, 1989.
- 95 FAULDS, D.; DOWER, N.; STAHL, M.M.; STAHL, F.W. Orientation-dependent recombination hotspot activity in bacteriophage  $\lambda$ . *J. Mol. Biol.*, London, v. 131, p. 681-695, 1979.
- 96 FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, San Diego, v. 132, p. 6-13, 1983
- 97 FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (Addendum). *Anal. Biochem.*, San Diego, v. 137, p. 266-267, 1984
- 98 FERNANDEZ DE HENESTROSA, A.R.; CALERO, S.; BARBÉ, J. Expression of the *recA* gene of *Escherichia coli* in several species of gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 226, p. 503-506, 1991.

- 99 FERSHT, A.R.; KNILL-JONES, J.W. Contribution of 3' → 5' exonuclease activity of DNA polymerase III holoenzyme from *Escherichia coli* to specificity. *J. Mol. Biol.*, London, v. 165, p. 669-682, 1983.
- 100 FINCH, P.W.; BROUGH, C.L.; EMMERSON, P.T. Molecular cloning of a *recA*-like gene of *Methylophilus methylotrophus* and identification of its product. *Gene* (Amst), v. 44, p. 47-53, 1986.
- 101 FISHEL, R.A.; JAMES, A.A.; KOLODNER, R. *recA*-independent general genetic recombination of plasmids. *Nature* (Lond), v. 294, p. 184-186, 1981.
- 102 FLORY, J.; RADDING, C.M. Visualization of RecA protein and its association with DNA: A priming effect of single-strand-binding protein. *Cell*, Cambridge, v. 28, p. 747-756, 1982.
- 103 FLORY, J.; TSANG, S.S.; MUNIYAPPA, K. Isolation and visualization of active presynaptic filaments of RecA protein and single stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 81, p. 7026-7030, 1984.
- 104 FOSTER, P.L.; EISENSTADT, E. Induction of transversion mutations in *Escherichia coli* by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine is SOS dependent. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 163, p. 213-220, 1985.
- 105 FRANK, E.G.; HAUSER, J.; LEVINF, A.S.; WOODGATE, R. Targeting of the UmuD, UmuD', and MucA' mutagenesis proteins to DNA by RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 90, p. 8169-8173, 1993.
- 106 FREITAG, N.; McENTEE, K. "Activated"-RecA protein affinity chromatography of LexA repressor and other SOS-regulated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v 86, p. 8363-8367, 1989.

- 107 FU, H.; BURRIS, R. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 3168-3175, 1989.
- 108 FYFE, J.A.M.; DAVIES, J.K. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene (Amst)*, v. 93, p. 151-156, 1990.
- 109 GELLERT, M.; MIZUUCHI, K.; O'DEA, M.H.; TOMIZAWA, J. Nalidixic-acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 74, p. 4772-4776, 1977.
- 110 GILLEN, J.R.; WILLIS, D.K.; CLARK, A.J. Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 145, p. 521-532, 1981.
- 111 GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF GRUP 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M., ed. *Nitrogen Fixation*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publish., 1990. p. 293-294.
- 112 GIMBLE, F.S.; SAUER, R.T.  $\lambda$  repressor mutants that are better substrates for RecA-mediated cleavage. *J. Mol. Biol.*, London, v. 206, p. 29-39, 1989.
- 113 GOLDBERG, I.; MEKALANOS, J.J. Cloning of the *Vibrio cholerae* *recA* gene and construction of a *Vibrio cholerae* *recA* mutant. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 165, p. 715-722, 1986.

- 114 GORBALENYA, S.E.; KOONIN, E.V.; DONCHENKO, A.P.; BLINOV, V.M. A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination *FEBS Lett.*, Amsterdam, v. 235, p. 16-24, 1988.
- 115 GORDON, A.J.E.; BURNS, P.A.; GLICKMAN, B.W. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutation in a RecA strain of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 201, p. 219-228, 1988.
- 116 GUDAS, L.J.; PARDEE, A.B. Model for regulation of *Escherichia coli* DNA repair functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v. 72, p. 2330-2334, 1975.
- 117 GUDAS, L.J.; PARDEE, A.B. DNA synthesis inhibition and the induction of protein X in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 101, p. 459-477, 1976.
- 118 GUDAS, L.J.; MOUNT, D.W. Identification of the *recA* (*tif*) gene product of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v. 74, p. 5280-52-84, 1977.
- 119 HAAS, D.; HOLLOWAY, B.W. Chromosome mobilization by the R plasmid R68.45: A tool in *Pseudomonas* genetics. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 158, p. 229-237, 1978.
- 120 HAGENSEE, M.E.; TIMME, T.L.; BRYAN, S.K.; MOSES, R.E. DNA polymerase III of *Escherichia coli* is required for UV and ethyl methanesulfonate mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v. 84, p. 4195-4199, 1987.
- 121 HALBROOK, J.; McENTEE, K. Purification and characterization of a DNA-pairing and strand transfer activity from mitotic *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 264, p. 21403-21412, 1989.

- 122 HALL, S.D.; KANE, M.F.; KOLODNER, R.D. Identification and characterization of the *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the *recE* region that promotes renaturation of homologous single-strand DNA. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 175, p. 277-287, 1993.
- 123 HANAHAN, D. Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, London, v. 166, p. 557-580, 1983.
- 124 HARDY, K. *Bacterial Plasmids*. 1. ed. Nairobi: Thomas Nelson & Sons Ltda. 1981. 104p.
- 125 HEITMAN, J.; ZINDER, N.D.; MODEL, P. Repair of the *Escherichia coli* chromosome after "in vivo" scission by the *EcoRI* endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 86, p. 2281-2285, 1989.
- 126 HEVRONI, D.; LIVNEH, Z. Bypass and termination at apurinic sites during replication of single-strand DNA *in vitro*: A model for apurinic site mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, p. 5046-5050, 1988.
- 127 HEUSER, J.; GRIFFITH, J. Visualization of RecA protein and its complexes with DNA by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, London, v. 210, p. 473-484, 1989.
- 128 HICKMAN, M.J.; ORSER, C.S.; WILLIS, D.K.; LINDOW, S.E.; PANOPOULUS, N.J. Molecular cloning and biological characterization of the *recA* gene from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.169, p. 2906-2910, 1987.
- 129 HICKSON, I.D.; GORDON, R.L. TOMKINSON, A.E.; EMMERSON, P.T. A temperature sensitive RecA protein of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 184, p. 68-72, 1981.

- 130 HIGASHITANI, N.; HIGASHITANI, A.; ROTH, A.; HORIUCHI, K. SOS induction in *Escherichia coli* by infection with mutant filamentous phage that are defective in initiation of complementary-strand DNA synthesis. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 174, p. 1612-1618, 1992.
- 131 HODGMANN, C.D.; WEAST, R.C.; SELBY, M.S. *Handbook of Chemistry and Physics*. Cleavland: Chem. Rubber Publish., 1960.
- 132 HOHN, B. In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. *Meth. Enzimol.*, San Diego, v. 60, p. 299-309, 1979.
- 133 HOLLIDAY, R. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res. Camb.*, Cambridge, v. 5, p. 282-304, 1964.
- 134 HOLLIDAY, R. Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion *Genetics*, Baltimore, v. 78, p. 273-287, 1974
- 135 HONIGBERG, S.M.; RAO, B.J.; RADDING, C.M. Ability of RecA protein to promote a search for rare sequences in duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 83, p. 9586-9590, 1986.
- 136 HORII, Z.I.; CLARK, A.J. Genetic analysis of the RecF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. *J. Mol. Biol.*, London, v. 80, p. 327-344, 1973.
- 137 HORII, T.; OGAWA, T.; OGAWA, H. Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 77, p. 313-317, 1980.
- 138 HORSFALL, M.J.; GORDON, A.J.E.; BURNS, P.A.; ZIELENSKA, M.; van der VLIET, G.M.E.; GLICKMAN, B.W. Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ. Molec. Mutagen.*, New York, v. 15, p. 107-122, 1990.

- 139 HOWARD-FLANDERS, P.; THERIOT, L. Mutants of *E. coli* K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination. *Genetics*, Baltimore, v. 153, p. 1137-1150, 1966.
- 140 HOWARD-FLANDERS, P.; WEST, S.C.; STASIAK, A. Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature* (Lond), v. 309, p. 215-220, 1984.
- 141 HURSTEL, S.; GRANGER-SCHNARR, M.; SCHNARR, M. Contacts between the LexA repressor, or its DNA-binding domain, and backbone of the *recA* operator DNA. *EMBO J.*, Oxford, v. 7, p. 269-275, 1988.
- 142 JAMES, A.A.; MORRISON, P.T.; KOLODNER, R. Genetic recombination of bacterial plasmid DNA. Analysis of the effect of recombination-deficient mutations on plasmid recombination. *J. Mol. Biol.*, London, v. 160, p. 411-430, 1982.
- 143 JEGGO, P.; DEFAIS, M.; SAMSON, L.; SCHENDEL, P. An adaptive response of *Escherichia coli* to low levels of alkylating agent: Comparison with previously characterized DNA repair pathways. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 157, p. 1-9, 1977
- 144 JONCZYK, P. FIJALKOWSKA, I.; CIESLA, Z. Overproduction of the  $\epsilon$  subunit of DNA polimerase III counteracts the SOS mutagenic response of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, p. 9124-9127, 1988.
- 145 JOSEPH, J.W.; KOLODNER, R.D. Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. I. Purification and physical properties. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 258, p. 10411-10417, 1983a.
- 146 JOSEPH, J.W.; KOLODNER, R.D. Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. II. Mechanism of action. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 258, n. 17, p. 10418-10424, 1983b.

- 147 JULIN, D.A.; RIDDLES, P.W.; LEHMAN, I.R. On the mechanism of pairing of single- and double-stranded DNA molecules by the RecA and single-stranded DNA-binding proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 261, p. 1025-1030, 1986.
- 148 JULIN, D.A.; LEHMAN, I.R. Photoaffinity labeling of the RecBCD enzyme of *Escherichia coli* with 8-azidoadenosine 5'-triphosphate. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 262, p. 9044-9051, 1987.
- 149 KAHN, R.; RADDING, CM. Separation of the presynaptic and synaptic phases of homologous pairing promoted by RecA protein. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 259, p. 7495-7503, 1984.
- 150 KARRAN, P.; LINDAHL, T. *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J. Mol. Biol.*, London, v. 140, p. 101-127, 1980.
- 151 KARRAN, P.; HJELMGREN, T.; LINDAHL, T. Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptative response to alkylating agents. *Nature (Lond)*, v. 296, p. 770-773, 1982.
- 152 KATO, R.; KURAMITSU, S. RecA protein from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem. (Tokyo)*, v. 114, p. 926-929, 1993.
- 153 KAWASHIMA, H.; HORII, T.; OGAWA, T.; OGAWA, H. Functional domains of *Escherichia coli* RecA protein deduced from the mutational sites in the gene. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 193, p. 288-292, 1984.
- 154 KEENER, S.L.; McNAMEE, K.P.; McENTEE, K. Cloning and characterization of *recA* genes from *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* B/r. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 160, p. 153-160, 1984.

- 155 KHAMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P.  
*Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing  
bacterium associated with rice roots and rhizosphere  
soil. *Res. Microbiol.*, Paris, v. 140, p. 679-694, 1989.
- 156 KIM, B.; LITTLE, W.J. Dimerization of a specific DNA-  
binding protein on the DNA. *Science* (Washington DC),  
v. 255, p. 203-206, 1992.
- 157 KIM, B.; LITTLE, W.J. LexA and  $\lambda$  CI repressors as  
enzymes: Specific cleavage in an intramolecular  
reaction. *Cell*, Cambridge, v. 73, p. 1165-1173, 1993.
- 158 KITAGAWA, Y.; AKABOSHI, E.; SHINAGAWA, H.; HORII, T.;  
OGAWA, H.; KATO, T. Structural analysis of the *umu*  
operon required for inducible mutagenesis in *Escherichia*  
*coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 82,  
p. 4336-4340, 1985.
- 159 KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; FUNAYAMA, S; RIGO, L.U.  
Nitrogen fixation by *Herbaspirillum seropedicae* strains  
under different physiological conditions. In: XXIII  
REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR (1994: Caxambú). *Resumos ...*, 1994.  
p. 58
- 160 KNIGHT, K.L.; HESS, R.M.; McENTEE, K. Conservation of an  
ATP-binding domain among RecA protein from *Proteus*  
*vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Shigella flexneri* and  
*Escherichia coli* K12 and B/r. *J. Bacteriol.*,  
Washington, , v. 170, p. 2427-2432, 1988.
- 161 KOGOMA, T.; SKARSTAD, K.; BOYE, ERIK.; von MEYERBURG, K.;  
STEEN, H.B. RecA protein acts at the initiation of  
stable DNA replication in *rnh* mutants of *Escherichia*  
*coli* K-12. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 163, p. 439-  
444, 1985.

- 162 KOKJOHN, T.A.; MILLER, R.V. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 163, p. 568-572, 1985.
- 163 KOLODNER, R.; FISCHER, R.A.; HOWARD, M. Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of RecF pathway mutation on plasmid recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 163, p. 1060-1066, 1985.
- 164 KOLODNER, R.; EVANS, D.H.; MORRISON, P.T. Purification and characterization of an activity from *Saccharomyces cerevisiae* that catalyzes homologous pairing and strand exchange. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 84, p. 5560-5564, 1987.
- 165 KONDO, S.; ICHIKAWA, H.; IWO, K.; KATO, T. Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of *Escherichia coli* with different DNA repair capacities. *Genetics*, Baltimore, v. 66, p. 187-217, 1970.
- 166 KONFORTI, B.B.; DAVIS, R.W. 3' homologous free ends are required for stable joint molecule formation by the RecA and single-stranded binding proteins of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 84, p. 690-694, 1987.
- 167 KONFORTI, B.B.; DAVIS, R.W. The preference for 3' homologous end is intrinsic to RecA-promoted strand exchange. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 6916-6920, 1990.
- 168 KONFORTI, B.B.; DAVIS, R.W. DNA substrate requirements for stable joint molecule formation by the RecA and single-stranded DNA-binding proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 266, p. 10112-10121, 1991.

- 169 KOOMEY, J.M. ; FALKOW, S. Cloning of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and construction of gonococcal *recA* mutants. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 169, p. 790-795, 1987.
- 170 KORANGY, F.; JULIN, D.A. Alteration by site-directed mutagenesis of the conserved lysine residue in the ATP-binding consensus sequence of the RecD subunit of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 1727-1732, 1992a.
- 171 KORANGY, F.; JULIN, D.A. Enzymatic effects of a lysine-to-glutamine mutation in the ATP-binding consensus sequence in the RecD subunit of the RecBCD enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 1733-1740, 1992b.
- 172 KORANGY, F.; JULIN, D.A. Mutation in consensus ATP-binding sequence of the RecD subunit reduces the processivity of RecBCD enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 3088-3095, 1992c.
- 173 KORANGY, F.; JULIN, D.A. Kinetics and processivity of ATP hydrolysis and DNA by the RecBC enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, Washington, v. 32, p. 4873-4880, 1993.
- 174 KORNBERG, A.; BAKER, T.A. Repair, recombination, transformation, restriction and modification. In: *DNA replication*. 2. ed. New York: W. H. Freeman & Co. 1992. p. 771-832.
- 175 KOSSI AKOFF, A.A.; SPENCER, S.A. Direct determination of protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: neutron structure of trypsin. *Biochemistry*, Washington, v. 20, p. 6462-6474, 1981.

- 176 KOWALCZYKOWSKI, S. C.; CLOW, J.; SOMANI, R.; VARGHESE, A. Effects of the *Escherichia coli* SSB protein on the binding of *Escherichia coli* RecA protein to single strand DNA. Demonstration of competitive binding and the lack of a specific protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.*, London, v. 193, p. 81-95, 1987.
- 177 KOWALCZYKOWSKI, S. C.; KRUPP, R. A. Effects of *Escherichia coli* SSB protein on the single strand DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein. Evidence that SSB protein facilitates the binding of RecA protein to regions of secondary structure within single strand DNA. *J. Mol. Biol.*, London, v. 193, p. 97-113, 1987a.
- 178 KOWALCZYKOWSKI, S. C. Mechanistic aspects of the DNA strand exchange activity of *Escherichia coli* RecA protein. *TRENDS Biochem. Sci.*, Cambridge, v. 12, p. 141-145, 1987b.
- 179 KRAUT, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 46, p. 331-358, 1977.
- 180 KUAN, C. T.; LIU, S. K.; TESSMAN, I. Excision transposition of *Tn5* as an SOS activity in *Escherichia coli*. *Genetics*, Baltimore, v. 128, p. 45-57, 1991a.
- 181 KUAN, C. T.; TESSMAN, I. LexA protein of *Escherichia coli* represses expression of the *Tn5* transposase gene. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 173, p. 6406-6410, 1991b.
- 182 KUAN, C. T.; TESSMAN, I. Further evidence that transposition of *Tn5* in *Escherichia coli* is strongly enhanced by constitutively activated RecA protein. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 174, p. 6872-6877, 1992.
- 183 LABAN, A.; COHEN, A. Interplasmidic and intraplasmidic recombination in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 184, p. 200-207, 1981.

- 184 LARMINAT, F.; DEFAIS, M. Modulation of the SOS response by truncated RecA proteins. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 216, p. 106-112, 1989.
- 185 LAVERY, P.E.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Biochemical basis of the temperature-inducible constitutive protease activity of the RecA441 protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 203, p. 861-874, 1988.
- 186 LAVERY, P.E.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Biochemical basis of the constitutive repressor cleavage activity of RecA730 protein. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 20648-20658, 1992.
- 187 LIN, L.L.; LITTLE, J.W. Autodigestion and RecA-dependent cleavage of Ind<sup>-</sup> mutant LexA proteins. *J. Mol. Biol.*, London, v. 210, p. 439-452, 1989.
- 188 LITTLE, J.W.; KLEID, D.G. *Escherichia coli* protein X is the *recA* gene product. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 252, p. 6251-6252, 1977.
- 189 LITTLE, J.W.; HARPER, J.E. Identification of *lexA* gene product of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 76, p. 6147-6151, 1979.
- 190 LITTLE, J.W.; EDMISTON, S.H.; PACELLI, L.Z.; MOUNT, D.W. Cleavage of the *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 77, p. 3225-3229, 1980.
- 191 LITTLE, J.W.; MOUNT, D.W.; YANISCH-PERRON, C.R. Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.78, p. 4199-4203, 1981.
- 192 LITTLE, J.W.; MOUNT, D. W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, Cambridge, v. 29, p. 11-22, 1982.

- 193 LITTLE, J.W. The SOS regulatory system: control of its state by the level of RecA protease. *J. Mol. Biol.*, London, v. 167, p. 791-808, 1983.
- 194 LITTLE, J.W. Autodigestion of LexA and phage  $\lambda$  repressors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 81, p. 1375-1379, 1984.
- 195 LITTLE, J.W. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie (Paris)*, v. 73, p. 411-422, 1991.
- 196 LIVNEH, Z.; LEHMAN, I.R. Recombinational bypass of pyrimidine dimers promoted by the RecA protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 79, p. 3171-3175, 1982.
- 197 LLOYD, R.G.; BUCKMAN, C. Identification and genetic analysis of *sbcC* mutations in commonly used *recBC sbcB* strains of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 164, p. 836-844, 1985.
- 198 LLOYD, R.G.; BUCKMAN, C.; BENSON, F.E. Genetic analysis of conjugational recombination in *Escheria coli* K12 strains deficient in RecBCD enzyme. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 133, p. 2531-2538, 1987.
- 199 LOVETT, S.T.; CLARK, A.V. Genetic analysis of the *recJ* gene of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 157, p. 190-196, 1984.
- 200 LOVETT, S.T.; KOLODNER, R.D. Identification and purification of a single strand DNA specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 86, p. 2627-2631, 1989.

- 201 LOVETT Jr., C.M.; LOVE, P.E.; YASBIN, R.E. Competence-specific induction of the *Bacillus subtilis* RecA protein analog: Evidence for dual regulation of a recombination protein. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171 p. 2318- 2322, 1989a.
- 202 LOVETT Jr., C.M.; FIRTZGIBBON, T.; CHANG, R. Effects of UV irradiation on DNA as studied by its thermal denaturation. *J. Chem. Educ.*, Washington, v. 66, p. 526-528, 1989b.
- 203 LOVETT Jr., C.M.; CHO, K.C.; O'GARA, T.M. Purification of an SOS repressor from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 175, p. 6842-6849, 1993.
- 204 LU, C.; SCHEUERMANN, R.H.; ECHOLS, H. Capacity of RecA protein to bind preferentially to UV lesions and inhibit the editing subunit ( $\epsilon$ ) of DNA polymerase III: A possible mechanism for SOS-induced targeted mutagenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 83, p. 619-623, 1986
- 205 LU, C.; ECHOLS, H. RecA protein and SOS: Correlation of mutagenesis phenotype with binding of mutant RecA protein to duplex DNA and LexA cleavage. *J. Mol. Biol.*, London, v., 196, p. 497-504, 1987.
- 206 MACHADO, I.M. P.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of *nifHDK* genes from *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. In: XXIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1994: Caxambú). *Resumos ...*, 1994. p. 57
- 207 MacKAY, V.; LINN, S. The mechanism of degradation of duplex deoxyribonucleic acid by the RecBC enzyme of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 249, p. 4286-4294, 1974.

- 208 MacKAY, V.; LINN, S. Selective inhibition of the DNase activity of RecBC enzyme by the DNA binding protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 251, p. 3716-3719, 1976.
- 209 MADIRAJU, M.V.V.S.; CLARK, A.J. Evidence for ATP binding and double strand DNA binding by *Escherichia coli* RecF protein. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 174, p. 7705-7710, 1992.
- 210 MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDAL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Cienc.*, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.
- 211 MAGGE, T.R.; KOGOMA, T. Requirement of RecBC enzyme and an elevated level of activated RecA for induced stable DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 172, p. 1834-1839, 1990.
- 212 MALONE, R.E.; CHATTORAJ, D.K.; FAULDS, D.H.; STAHL, M.M.; STAHL, F.W. Hotspots for generalized recombination in the *Escherichia coli* chromosome. *J. Mol. Biol.*, London, v. 121, p. 473-491, 1978.
- 213 MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1. ed. New York: Cold Spring Harbour Lab., 1982. 545p.
- 214 MAPLES, V.F.; KUSHNER, S.R. DNA repair in *Escherichia coli*: identification of the *uvrD* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 79, p. 5616-5620, 1982.
- 215 MARGISON, G.P.; O'CONNOR, P.J. Biological implications of the instability of the N-glycosidic bond of 3-methyldeoxyadenosine in DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 331, p. 349-356, 197

- 216 MARSIC, N.; ROJE, S.; STOJILJKOVIC, I.; SALAJ-SMIC, E.; TRGOVCEVIC, Z. *In vivo* studies on the interaction of RecBCD enzyme and  $\lambda$  Gam protein. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 175, p. 4738-4743, 1993.
- 217 MARTÍNEZ-SALAZAR, J.M.; ROMERO, D.; GIRARD, M.L.; DÁVILLA, G. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 173, p. 3035-3040, 1991.
- 218 MASTERSON, C.; BOEHMER, P.E.; McDONALD, F.; CHAUDHURI, S.; HICKSON, I.D.; EMMERSON, P. Reconstitution of the activities of the RecBCD holoenzyme of *Escherichia coli* from the purified subunits. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 13564-13572, 1992.
- 219 McENTEE, K. Protein X is the product of *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 74, p. 5275-5279, 1977.
- 220 McPARTLAND, A.; GREEN, L.; ECHOLS, H. Control of *recA* gene RNA in *Escherichia coli*: Regulatory and signal genes. *Cell*, Cambridge, v. 20, p. 731-737, 1980.
- 221 MEAD, D. A.; SZCSESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Eng.*, Eynshan, v. 1, p. 67-74, 1986.
- 222 MENETSKI, J. P.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Enhancement of *Escherichia coli* RecA protein enzymatic function by dATP. *Biochemistry*, Washington, v. 28, p. 5871-5881, 1989
- 223 MESELSON, M.S.; RADDING, C.M. A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 72, p. 358-361, 1975.

- 224 MESSING, J.; GRONENBORN, B.; MÜLLER-HILL, B.; HOFSCHEIDER, P.H. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *Hind*II fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form "in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v. 74, p. 3642-3646, 1977.
- 225 MEYER, R.R.; LAINE, P.S. The single-stranded DNA binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, Washington, 54, p. 342-380, 1990.
- 226 MILES, A.C.; MOUNTAIN, A.; SASTRY, G.R.K. Cloning and characterization of the *recA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 204, p. 161-165, 1986.
- 227 MILLER, J.H. *Experiments in Molecular Biology*. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974. 466p.
- 228 MILLER, R.V.; KOKJOHN, T.A. Expression of *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO is inducible by DNA-damaging agents. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 170, p. 2385-2387, 1988.
- 229 MILLER, R.V.; KOKJOHN, T.A. General microbiology of RecA: Environmental and evolutionary significance. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 44, p. 365-394, 1990.
- 230 MOORE, S.P.; FISHEL, R. Purification and characterization of a protein from human cells which promotes homologous pairing of DNA. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 11108-11117, 1990.
- 231 MORRICAL, S.W.; COX, M.M. Light scattering of the RecA protein of *Escherichia coli*: Relationship between free RecA filaments and the RecA-ssDNA complex. *Biochemistry*, Washington, v. 24, p. 760-767, 1985.

- 232 MORRICAL, S.W.; LEE, J.; COX, M.M. Continuous association of *Escherichia coli* single strand DNA binding protein with stable complexes of RecA protein and single strand DNA. *Biochemistry*, Washington, v. 25, p.1483-1494, 1986.
- 233 MORRICAL, S.W.; COX, M.M. Stabilization of RecA protein-single stranded DNA complexes by the single-stranded DNA binding protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, Washington, v. 29, p. 837-843, 1990.
- 234 MÜLLER, B.; KOLLER, T.; STASIAKI, A. Characterization of the DNA binding activity of stable RecA-DNA complexes. *J. Mol. Biol.*, London, v. 212, p. 97-112, 1990.
- 235 MÜLLER, B.; BOEHMER, P.E.; EMMERSON, P.T.; WEST, S.C. Action of RecBCD enzyme on Holliday structures made by RecA. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 266, p. 19028-19033, 1991.
- 236 MUNIYAPPA, K.; SHANER, S.L.; TSANG, S.S.; RADDING, C.M. Mechanism of the concerted action of RecA protein and helix-destabilizing proteins in homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 81, p. 2757-2761, 1984.
- 237 MUNIYAPPA, K.; RADDING, C.M. The homologous recombination system of phage  $\lambda$ . *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 261, p. 7472-7478, 1986.
- 238 MURPHY, R.C.; BRYANT, D.A.; PORTER, R.D.; MARSAC, N.T. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7002. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 169, p. 2739-2747, 1987.
- 239 NAIR, S.; STEYN, M.L. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA* homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 137, p. 2409-2414, 1991.

- 240 NOHMI, T.; BATTISTA, J.R.; DODSON, L.A.; WALKER, G.C. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: Mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, p. 1816-1820, 1988.
- 241 OSSANNA, N.; MOUNT, D.W. Mutations in *uvrD* induce the SOS response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 303-307, 1989.
- 242 OWTTRIM, G.W.; COLEMAN, J.R. Molecular cloning of a *recA*-like gene from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 169, p. 1824-1829, 1987.
- 243 OWTTRIM, G.W.; COLEMAN, J.R. Regulation of expression and nucleotide sequence of the *Anabaena variabilis recA* gene. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 5713-5719, 1989.
- 244 PALAS, K.M.; KUSHNER, S.R. Biochemical and physical characterization of exonuclease V from *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 3447-34454, 1990.
- 245 PANG, Q.; HAYS, J.B.; RAJAGOPAL, I. A plant cDNA that partially complements *Escherichia coli* RecA mutations predicts a polypeptide not strongly homologous to RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 89, p. 8073-8077, 1992.
- 246 PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Reprodução e Crescimento. In: *Introducao a Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: McGraw Hill Ltda, 1980. v. 1; p. 129-147.
- 247 PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 23, p. 95-101, 1984.

- 248 PEREIRA, J.A.R.; CAVALCANTE, V.A.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. In: SKINNER, F. A.; BODDEY, R. M. & FENDRIK, I., eds. *Nitrogen Fixation with non-legumes*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 219-224.
- 249 PERRY, K.L.; ELLEDGE, S.J.; MITCHEL, B.B.; MARSH, L.; WALKER, G.C. *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light and chemical induced mutagenesis, UmuD, MucA and LexA proteins share homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 82, p. 4331-4335, 1985.
- 250 PETERSON, K.R. OSSANA, N.; THLIVERIS, A.T.; ENNIS, D.G.; MOUNT, D.W. Derepression of specific genes promotes DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 170, p. 1-4, 1988.
- 251 PHILLIPS, G.J.; KUSHNER, S.R. Determination of the nucleotide sequence for the exonuclease I structural gene (*sbcB*) of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 262, p. 455-459, 1987.
- 252 PHIZICKY, E.M.; ROBERTS, J.W. Kinetics of RecA protein-directed inactivation of repressors of phage  $\lambda$  and phage 22. *J. Mol. Biol.*, London, v. 139, p. 319-328, 1980.
- 253 PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant. Soil*, Dordrecht, v. 137, p. 61-65, 1991.
- 254 PINSINCE, J.M.; MUENCH, K.A.; BRYANT, F.R.; GRIFFITH, J.D. Two mutant RecA proteins possessing pH-dependent strand exchange activity exhibit pH-dependent presynaptic filament formation. *J. Mol. Biol.*, London, v. 233, p. 59-66 1993.

- 255 POVIRK, L.F.; HOULGRAVE, C.W. Mutagenesis of bleomycin - damaged lambda phage in SOS-deficient and repair endonuclease-deficient *Escherichia coli*. *Environ. Mol. Mutagen.*, New York, v. 11, p. 461-472, 1988.
- 256 PUGH, B.F.; COX, M.M. Stable binding of RecA protein to duplex DNA. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 262, p. 1326-1336, 1987a.
- 257 PUGH, B.F.; COX, M.M. RecA protein binding to the heteroduplex product of DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 262, p. 1337-1343, 1987b.
- 258 PUGH, B.F.; COX, M.M. General mechanism for RecA protein binding to duplex DNA. *J. Mol. Biol.*, London, v. 203, p. 479-493, 1988.
- 259 QUILLARDET, P.; MOREAU, P.L.; GINSBURG, H.; MOUNT, D.W.; DEVORET, R. Cell survival, UV-reactivation and induction of prophage  $\lambda$  in *E. coli* K12 overproducing RecA protein. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 188, p. 37-43, 1982.
- 260 RADDING, C.M. Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 47, p. 847-880, 1978.
- 261 RADDING, C.M. Helical RecA nucleoprotein filaments mediate homologous pairing and strand exchange. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1068, p. 131-145, 1989.
- 262 RAJAGOPALAN, M.; LU, C.; WOODGATE, R.; O'DONNELL, M.; GOODMAN, M. Activity of the purified mutagenesis proteins UmuC, UmuD' and RecA in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 89, p. 10777-10781, 1992.
- 263 RAMDAS, J.; MYTHILI, E; MUNIYAPPA, K. RecA protein promotes homologous pairing "in vitro". *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 264, p. 17395-17400, 1989.

- 264 RAO, B.J.; JWANG, B.; RADDIND, C.M. RecA protein reinitiates strand exchange on isolated protein-free DNA intermediates. An ADP-resistant process. *J. Mol. Biol.*, London, v. 213, p. 789-809, 1990.
- 265 RAO, B.J.; DUTREIX, M.; RADDING, C.M. Stable three-strand DNA made by RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 88, p. 2984-2988, 1991.
- 266 RAO, B.J.; RADDING, C.M. Homologous recognition promoted by RecA protein via non-Watson-crick bonds between identical DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 90, p. 6646-6650, 1993.
- 267 RAYMOND-DENISE, D.A.; GUILLEN, N. Expression of the *Bacillus subtilis* *dinR* and *recA* genes after DNA damage and during competence. *J. Bacteriol.*, Washington, v.174, p. 3171-3176, 1992.
- 268 REGISTER III, J.C.; GRIFFITH, J. The direction of RecA protein assembly onto single strand DNA is the same as the direction of strand assimilation during strand exchange. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 260, p. 12308-12312, 1985.
- 269 REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. *Azospirillum halopreferans* sp. nov., a diazotroph associated with roots of *Leptochloa fusca* (Linn.) Kunth. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J.; NEWTON, W. E., eds. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 427.
- 270 RESNICK, D.; NELSON, D.R. Cloning and characterization of *Aeromonas caviae* *recA* gene and construction of an *A. caviae* mutant. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 170, p. 48-55, 1988.

- 271 RIDDLES, P.W.; LEHMAN, I.R. The formation of paranemic and plectonemic joints between DNA molecules by RecA and single-stranded DNA-binding proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 260, p. 165-169, 1985a.
- 272 RIDDLES, P.W.; LEHMAN, I.R. The formation of plectonemic joints by RecA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 260, p. 170-173, 1985b.
- 273 ROBERTS, J.W.; ROBERTS, C.W. Two mutations that alter the regulatory activity of *Escherichia coli* RecA protein. *Nature (Lond)*, v. 290, p. 422-424, 1981.
- 274 ROCA, A.I.; COX, M.M. The RecA protein: Structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, Boca Raton, v. 25, p. 415-456, 1990.
- 275 ROLAND, K.L.; LITTLE, J.W. Reaction of LexA repressor with diisopropyl fluorophosphate. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 12828-12835, 1990.
- 276 ROMAN, L.J.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Relationship of the physical and enzymatic properties of *Escherichia coli* RecA protein to its strand exchange activity. *Biochemistry*, Washington, v. 25, p. 7375-7385, 1986.
- 277 ROMAN, L.J.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Characterization of the helicase activity of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme using a novel helicase assay. *Biochemistry*, Washington, v. 28, p. 2863-2873, 1989a.
- 278 ROMAN, L.J.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Characterization of the adenosinetriphosphatase activity of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme: Relationship of ATP hydrolysis to the unwinding of duplex DNA. *Biochemistry*, Washington, v. 28, p. 2873-2881, 1989b.

- 279 ROMAN, L.J.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Formation of hetero - duplex DNA promoted by the combined activities of *Escherichia coli* RecA and RecBCD proteins. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 264, p. 18340-18348, 1989c.
- 280 ROMAN, L.J.; DIXON, D.A.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. RecBCD dependent joint molecule formation promoted by the *Escherichia coli* RecA and SSB proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 88, p. 3367-3371, 1991.
- 281 ROSENBERG, M.; ECHOLS, H. Differential recognition of ultraviolet lesions by RecA protein. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 20641-20645, 1990.
- 282 SALLES, B.; PAOLETTI, C. Control of UV induction of RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 80, p. 65-69, 1983.
- 283 SANCAR, A.; RUPP, W.D. Physical map of the *recA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 76, p. 3144-3148, 1979.
- 284 SANCAR, A.; STACHELEK, C.; KONIGSBERG, W.; RUPP, W.D. Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 77, p. 2611-2615, 1980
- 285 SANCAR, A.; SANCAR, G.B. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 57, p. 29-67, 1988.
- 286 SANO, Y.; KAGEYAMA, M. The sequence and function of the *recA* gene and its protein in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 208, p. 412-419, 1987.
- 287 SASSANFAR, M.; ROBERTS, J.K. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*: The involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.*, London, v. 212, p. 79-96, 1990.

- 288 SASSANFAR, M.; ROBERTS, J. Constitutive and UV-mediated activation of RecA protein: Combined effects of *RecA441* and *RecF143* mutations and of addition of nucleosides and adenine. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 173, p. 5869-5875, 1991.
- 289 SCHENDEL, P.F.; DEFAIS, M.; JEGGO, P.; SAMSON, L.; CAIRNS, J. Pathways of mutagenesis and repair in *Escherichia coli* exposed to low levels of simple alkylating agents. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 135, p. 466-475, 1978.
- 290 SCHENDEL, P.F.; DEFAIS, M. The role of *umuC* gene product in mutagenesis by simple alkylating agents. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 177, p. 661-665, 1980.
- 291 SCHNARR, M.; POUYET, J.; GRANGER-SCHNARR, M.; DAUNE, M. Large-scale purification, oligomerization equilibria, and specific interaction of the LexA repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, Washington, v. 24, p. 2812-2818, 1985.
- 292 SEDGWICK, S.C. Inducible error-prone repair in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 72, p. 2753-2757, 1975.
- 293 SEDGWICK, S.C.; YARRANTON, G.T. Cloned truncated *recA* genes in *Escherichia coli*. II. Effects of truncated gene products on "in vivo" RecA<sup>+</sup> protein activity, *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, v. 185, p. 99-104, 1982.
- 294 SEDGWICK, S.G.; GOODWIN, P.A. Differences in mutagenic and recombinational DNA repair in enterobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 82, p. 4172-4176, 1985.
- 295 SHINAGAWA, H.; IWASAKI, H.; KATO, T.; NAKATA, A. RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, p. 1806-1810, 1988.

- 296 SHINE, J.; DALGERNO, L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* (Lond), v. 254, p. 34-38, 1975.
- 297 SHINOHARA, A.; OGAWA, H.; OGAWA, T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*, Cambridge, v. 69, p. 457-470, 1992.
- 298 SHINOURA, Y.; ISE, T.; KATO, T.; GLICKMAN, B. W. *umuC*-mediated misrepair mutagenesis in *Escherichia coli*: Extend and specificity of SOS mutagenesis. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 111, p. 51-59, 1983.
- 299 SKARSTAD, K.; BOYE, E. Perturbed chromosomal replication in *recA* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 170, p. 2549-2554, 1988.
- 300 SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for "in vivo" genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/technology*, New York, v. 1, p. 784-791, 1983.
- 301 SIMON, R.; O'CONNELL, M.; LABES, M.; PÜHLER, A. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other. *Meth. Enzimol.*, San Diego, v. 118, p. 641-659, 1986.
- 302 SINGER, B.; SPENGLER, S.J.; FRAENKEL-CONRAT, H.; KUSMIEREK, J.T. O<sup>4</sup>-methyl, -ethyl, or -isopropyl substituents on thymidine in poly(dA-dT) all lead to transitions upon replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 83, p. 28-32, 1986.
- 303 SINGER, J. T. Molecular cloning of the *recA* analog from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 6367-6371, 1989.

- 304 SLATER, S.C.; MAURER, R. Requirements for bypass of UV-induced lesions in single-stranded DNA of bacteriophage  $\phi$ X174 in *Salmonella thyphimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 88, p. 1251-1255, 1991.
- 305 SLILATY, S.N.; RUPLEY, J.A.; LITTLE, J.W. Intramolecular cleavage of LexA and Phage  $\lambda$  repressor dependence of kinetics on repressor concentration, pH, temperature and solvent. *Biochemistry*, Washington, v. 25, p. 6866-6875, 1986.
- 306 SLILATY, S.N.; LITTLE, J.W. Lysine-156 and serine-119 are required for Lex repressor cleavage: A possible mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 84, p. 3987-3991, 1987.
- 307 SMITH, C.L. Response of *recA*-dependent operons to different DNA damage signals. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 260, p. 10069-10074, 1985.
- 308 SMITH, G.R. Mechanism and control of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, Palo Alto, v. 21, p. 179-201, 1987.
- 309 SMITH, G.R. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 52, p. 1-28, 1988.
- 310 SMITH, G.R. Homologous recombination in *Escherichia coli*: multiple pathways for multiple reasons. *Cell*, Cambridge, v. 58, p. 807-809, 1989.
- 311 SMITH, G.R. Conjugalional recombination in *Escherichia coli*: myths and mechanisms. *Cell*, Cambridge, v. 64, p. 19-27, 1991.
- 312 SNYDER, M.; DRLICA, K. DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J. Mol. Biol.*, London, v. 131, p. 287-302, 1979.

- 313 SODERGREN, E.J.; FOX, M.S. Effects of DNA sequence non-homology on formation of bacteriophage lambda recombinants. *J. Mol. Biol.*, London, v. 130, p. 357-377, 1979.
- 314 SOUZA, Emanuel Maltempi. *Clonagem, caracterizacao e sequenciamento dos genes nifA e nifB de Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1990. 245p. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 315 SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 137, p. 1511-1522, 1991.
- 316 SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O. Effect of oxigen and ammonium on the expression of *nifA* and *nifB* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXIII REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1994: Caxambu). *Resumos ...*, 1994. p. 57
- 317 STAHL, F.W. Special sites in generalized recombination. *Annu. Rev. Genet.*, Palo Alto, v. 13, p. 7-24, 1979.
- 318 STAHL, M.M.; KOBAYASHI, I.; STAHL, F.W.; HUNTINGTON, S.K. Activation of CHI, a recombinator, by the action of an endonuclease at a distant site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 80, p. 2310-2313, 1983.
- 319 STAMM, L.V.; PARRISH, E.A.; GHERARDINI, F.C. Cloning of the *recA* gene from a free-living leptospire and distribution of RecA-like protein among Spirochetes. *Appl. Environm. Microbiol.*, Washington, v. 57, p. 183-189, 1991.

- 320 STASIAK, A.; CAPUA, E. The helicity of DNA in complexes with RecA protein. *Nature (Lond)*, v. 299, p. 185-186, 1982.
- 321 STASIAK, A.; EGELMAN, E.H.; HOWARD-FLANDERS, P. Structure of helical RecA-DNA complexes. III. The structural polarity of RecA filaments and functional polarity in the RecA-mediated strand exchange reaction. *J. Mol. Biol.*, London, v. 202, p. 659-662, 1988.
- 322 STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N.; NAPOLI, C. Molecular characterization of cloned avirulence gene from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 169, p. 5789-5794, 1987.
- 323 STORY, R.M.; WEBER, I.T.; STEITZ, T.A. The structure of the *Escherichia coli* RecA protein monomer and polymer. *Nature (Lond)*, v. 355, p. 318-325, 1992.
- 324 STORY, R.M.; BISHOP, D.K.; KLECKNER, N.; STEITZ, T.A. Structural relationship of bacterial RecA proteins to recombination proteins from bacteriophage T4 and yeast. *Science (Washington, DC)*, v. 259, p. 1892-1896, 1993.
- 325 SUGINO, A.; PEEBLES, G.L.; KREUZER, K.N.; COZZARELLI, N.R. Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 74, p. 4767-4771, 1977.
- 326 SUGINO, A.; NITISS, J.; RESNICK, M.A. ATP-independent DNA transfer catalysed by protein(s) from meiotic cells of the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, p. 3683-3687, 1988.
- 327 SWEASY, J.B.; WITKIN, E.M.; SINHA, N.; ROEGNER-MANISCALCO, V. RecA protein of *Escherichia coli* has a third essential role in SOS mutator activity. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 172, p. 3030-3036, 1990.

- 328 SYMINGTON, L.S.; MORRISON, P.; KOLODNER, R. Intramolecular recombination of linear DNA catalysed by the *Escherichia coli* RecE recombination system. *J. Mol. Biol.*, London, v. 186, p. 515-525, 1985.
- 329 TAKAHASHI, M.; DAUNE, M.; SCHNARR, M. Fluorescence study of the RecA-dependent proteolysis, of LexA, the repressor of the SOS system in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v. 196, p. 215-218, 1986.
- 330 TAKAHASHI, M.; SCHNARR, M. Investigation of RecA polynucleotide interactions from the measurement of LexA repressor cleavage kinetics. *Eur. J. Biochem.*, Heidelberg, v. 183, p. 617-622, 1989.
- 331 TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978.
- 332 TAYLOR, A.F.; SCHULTZ, D.W.; PONTICELLI, A.S.; SMITH, G.R. RecBC enzyme nicking at chi sites during DNA unwinding: Location and orientation-dependence of the cutting. *Cell*, Cambridge, v. 41, p. 153-163, 1985a.
- 333 TAYLOR, A.F.; SMITH, G.R. Substrate specificity of the DNA unwinding activity of the RecBC enzyme of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, London, v. 185, p. 431-443, 1985b.
- 334 TAYLOR, A.F.; SMITH, G.R. Action of RecBCD enzyme on cruciform DNA. *J. Mol. Biol.*, London, v. 211, p. 117-134, 1990.

- 335 TEIXEIRA, Katia Regina Santos. *Isolamento e caracterizacao do operon glnAntrBC de Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1992. 108p. Tese (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 336 TEO, I.; SEDGWICK, B.; KILPATRICK, M.W.; MCCARTHY, T.V.; LINDAHL, T. The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *Escherichia coli*. *Cell*, Cambridge, v. 45, p. 315-324, 1986.
- 337 TESSMAN, E.S.; PETERSON, P.K. Isolation of protease - proficient, recombinase-deficient *recA* mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 163, p. 688-695, 1985.
- 338 THLIVERIS, A.T.; MOUNT, D.W. Genetic identification of the DNA binding domain of *Escherichia coli* LexA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 89, p. 4500-4504, 1992.
- 339 UHLIN, B.E.; CLARK, A.J. Overproduction of the *Escherichia coli* RecA protein without stimulation of its proteolytic activity. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 148, p. 386-390, 1981.
- 340 UMEZU, K.; CHI, N.W.; NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, H. *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 87, p. 5363-5367, 1990.
- 341 UMEZU, K.; CHI, N.W.; KOLODNER, R.D. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 90, p. 3875-3879, 1993.
- 342 UMLAUF, S.W.; COX, M.M.; INMAN, R.B. Triple-helical DNA pairing intermediates formed by RecA protein. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 16898-16912, 1990.

- 343 VERICAT, J. A.; GUERRERO, R.; BARBÉ, J. Inhibition of the SOS response of *Escherichia coli* by the Ada protein. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 170, p. 1354-1359, 1988.
- 344 VICKERMAN, M. M.; HEATH, D. G.; CLEWELL, D. B. Construction of recombination-deficient strains of *Streptococcus gordonii* by disruption of the *recA* gene. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 175, p. 6354-6357, 1993.
- 345 VILLANI, G.; BOITEUX, S.; RADMAN, M. Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: Extend and fidelity of "in vitro" DNA synthesis on irradiated templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 75, p. 3037-3041, 1978.
- 346 VRIES, J.; WACKERNAGEL, W. Recombination and UV resistance of *Escherichia coli* with the cloned *recA* and *recBCD* genes of *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*. Evidence for an advantage of intraspecies combination of *P. mirabilis* RecA protein and RecBCD enzyme. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 138, p. 31-38, 1992.
- 347 WALKER, G. C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 48, p. 60-93, 1984.
- 348 WALKER, G. C. Inducible DNA repair systems. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 54, p. 425-457, 1985.
- 349 WERTMAN, K. F.; MOUNT, D. W. Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 163, p. 376-384, 1985.
- 350 WEST, S. C.; CASSUTO, E.; MURSALIM, J.; HOWARD-FLANDERS, P. Recognition of duplex DNA containing single-stranded regions by RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 77, p. 2569-2573, 1980.

- 351 WEST, S.C. Protein-DNA interactions in genetic recombination. *TRENDS Genet.*, Cambridge, p. 8-13, 1988.
- 352 WILLETS, N.S.; CLARK, A.J.; LOW, B. Genetic location of certain mutations conferring recombination deficiency in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 97, p. 244-249, 1969.
- 353 WILLIAMS, R.C.; SPLENGER, S.J. Fibers of RecA protein and complexes of RecA protein and single-stranded  $\phi$ X174 DNA as visualized by negative-stain electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, London, v. 187, p. 109-118, 1986,
- 354 WILSON, D.H.; BENIGHT, A.S. Kinetic analysis of the pre equilibrium steps in the self-assembly of RecA protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 7351-7359, 1990.
- 355 WITKIN, E.M. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.*, Washington, v. 40, p. 869-907, 1976.
- 356 WITKIN, E.M.; KOGAMA, T. Involvement of the activated form of RecA protein in SOS mutagenesis and stable DNA replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 81, p. 7539-7543, 1984.
- 357 WITKIN, E.M.; ROEGNER-MANISCALCO, V.; SWEASY, J.; McCALL, J.O.; Recovery from ultraviolet light-induced inhibition of DNA synthesis requires *umuDC* gene products in *recA718* mutant strains but not in *recA*<sup>+</sup> strains of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 84, p. 6805-6809, 1987.
- 358 WOODGATE, R.; RAJAGOPALAN, M.; LU, C.; ECHOLS, H. UmuC mutagenesis protein of *Escherichia coli*: Purification and interaction with UmUD and UmuD'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 86, p. 7301-7305, 1989.

- 359 WU, A.M.; KAHN, R.; DasGUPTA, C.; RADDING, C. M. Formation of nascent heteroduplex structures by RecA protein and DNA. *Cell*, Cambridge, v. 30, p. 37-44, 1982.
- 360 YU, X.; EGELMAN, E.H. The LexA repressor binds within the deep helical groove of the activated RecA filament. *J. Mol. Biol.*, London, v. 231, p. 29-40, 1993.
- 361 ZINK, R.T.; ENGWALL, J.K.; McEVOY, J.L.; CHATTERJEE, A.K. RecA is required in the induction of pectin lyase and carotovoricin in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 164, p. 390-396, 1985.
- 362 ZLOTNICK, A.; MITCHELL, R.S.; BRENNER, S.L. RecA protein filaments bind two molecules of single-stranded DNA with off rates regulated by nucleotide cofactor. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 265, p. 17050-17054, 1990.
- 363 ZULTY, J.J.; BARCAK, G.J. Structural organization, nucleotide sequence and regulation of the *Haemophilus influenzae* *rec-1*<sup>+</sup> gene. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 175, p. 7269-7281, 1993.