Regina Célia Pereira Marques

***IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REPARO DE DNA EM
Caulobacter crescentus ATRAVÉS DA SELEÇÃO DE
CLONES SENSÍVEIS A AGENTES GENOTÓXICOS***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
como requisito para a obtenção de Título
de **Doutor em Ciências**.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador:

Dr. Carlos Frederico Martins Menck

São Paulo

-2008-

RESUMO

Marques RCP. Identificação de genes de reparo de DNA em *Caulobacter crescentus* através da seleção de clones sensíveis a agentes genotóxicos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2008.

Em estudos de proteção ao genoma contendo lesões de *C. crescentus*, foi feita uma varredura em uma biblioteca clones mutados pelo transposon Tn5 e sensíveis à luz UV-B e MMS. Dos 249 clones selecionados conseguimos identificar mutações em 102 genes, distribuídos em dez categorias funcionais, incluindo metabolismo de DNA. Além de genes já descritos como atuantes na defesa de genoma a lesões, os dados ainda adicionam funções potenciais para outros genes. Investigação mais detalhada indica que vários dos genes identificados podem afetar o estresse e ciclo celular, podendo estar relacionados a respostas do tipo pontos de checagem. Além disso, verificamos que mutantes para genes envolvidos em reparo excisão de nucleotídeos são mais sensíveis à H₂O₂, indicando que nessa bactéria, este sistema de reparo atua também em lesões oxidativas no DNA. Os dados obtidos são pioneiros no estabelecimento de funções para vários genes de *C. crescentus* e de outras alfa-proteobactérias.

Palavras-chave: Reparo de DNA, Agentes genotóxicos, Resposta a estresses, *Caulobacter crescentus*, Lesão no DNA, Genômica.funcional.

ABSTRACT

Marques RCP. Identification DNA repair related genes in *Caulobacter crescentus* through the identification of mutations affecting sensitivity to genotoxic agents [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2008.

This work aimed to identify genes related to DNA damage protection in *C. crescentus*, by means of screening a Tn5 –mutated library for clones sensitive to UV-B light and MMS. Out of 249 selected clones, we were able to identify mutations in 102 genes, classified in ten different functional categories, including DNA metabolism. In addition to genes already described as playing a role in genome defense to lesions, the results provide new potential functions to several other genes. More detailed investigation indicates also that the mutations in some of these genes may also affect cell stress and cell cycle, being potentially involved in check-point responses. Moreover, mutants for nucleotide excision repair genes were also found to be sensitive to H₂O₂, indicating that this DNA repair system also acts in DNA oxidative damage. These data are the first establishing a role in genome protection for several genes in *C. crescentus*, as well as other alpha-proteobacteria.

Key words: DNA repair, Genotoxics agents, stress response, *Caulobacter crescentus*, DNA damage, functional genomic

1 INTRODUÇÃO

*"From its very beginning, life has faced the
fundamental problem that the form in which
genetic information is stored is not chemically inert"*

Errol C. Friedberg

1.1 Uma breve história...

A observação de que mutações são imprescindíveis para descobertas biológicas tem seu início nos tempos mendelianos, onde os pesquisadores começaram a explorar os genes e as alterações espontâneas que ocorriam em seus ensaios biológicos. Estas alterações não eram eventos freqüentes o que tornava difícil seu estudo. Em 1927, temos a descoberta por Hermann J. Muller que os raios-X aumentavam significativamente a freqüência de mutações em *Drosophila* (Muller, 1941). O uso de raios ultravioleta (UV) como agente indutor de mutações não tardou a surgir. De fato, a irradiação UV nunca pode ser comparada ao enorme potencial mutagênico dos raios-X. A luz UV foi inicialmente caracterizada por J.W. Ritter em 1801 e, em 1877 temos o primeiro relato que a morte de bactérias por luz solar era devida aos comprimentos de onda mais curtos da luz UV (Koller, 1939). Vale ressaltar que neste período da história humana, a natureza do material genético ainda não era conhecida. A primeira relação entre os danos causados pela luz UV e os ácidos nucléicos surgiu em 1941 onde Hollaender e colaboradores associaram os comprimentos de onda causadores de lesões com o pico de absorbância dos ácidos nucléicos (Hollaender, 1986). Em 1944 temos o clássico trabalho de Avery, MacLeod e MacCarty demonstrando que o material genético era de fato o DNA (ácido desoxirribonucleico) (MacCarty, 1985).

Por outro lado, os mecanismos de reparo de DNA estavam longe de serem óbvios. O primeiro relato de que o material genético pudesse ser reparado após introdução das lesões aconteceu em 1948, com a descoberta

“acidental” da fotoreativação, ou reversão direta da lesão, concomitantemente e independentemente por Albert Kelner e Renato Dulbecco, 1949. Detalhes desta interessante novela, bem como a famosa troca de correspondência entre os dois grupos de pesquisa podem ser encontrados em Friedberg, 1997. Mesmo na resolução da estrutura da dupla-hélice do DNA, em 1953 por Watson e Crick, os mecanismos de reparo de DNA não ficaram evidentes (Crick, 1974). No clássico artigo de Watson e Crick, detalhes da replicação e de eventuais mutações pelo tautomerismo de bases foram descritos, mas nenhum comentário sobre o reparo de DNA. O avanço da biologia molecular levou à caracterização de sistemas de reparo e em 1994 temos as enzimas de reparo de DNA eleitas como as moléculas do ano pela revista *Science* (Koshland, 1994). Hoje fica claro que o material genético é extremamente valioso e que possui uma intrincada rede para sua manutenção estrutural. Também é praticamente impossível versar sobre mecanismos de mutagênese sem levar em consideração o reparo de DNA.

1.1.1 ...e surgiu o conhecimento do reparo

As alterações químicas e físicas a que a molécula de DNA está sujeita podem ser didaticamente divididas em duas categorias: espontânea, devido à instabilidade de ligações químicas dos nucleotídeos ou induzidas, isto é, através de interações químicas de nucleotídeos com outro composto químico ou agente físico presente no meio. Como alteração espontânea, podemos citar a ruptura das ligações N-glicosídicas entre bases purínicas e o açúcar desoxirribose que, originam em 2 horas a 37°C, cerca de 1000 sítios apurínicos (AP) no genoma humano (Lindahl e Nyberg, 1972).

Alguns dos compostos químicos que induzem lesões na molécula de DNA podem ser oriundos do próprio metabolismo celular, como espécies reativas de oxigênio, conhecidas por abstrair elétrons de resíduos de

moléculas orgânicas (Marnett, 2000; Bohr e Grigory, 1999 e, Cetti e Trump, 1991). Dentre os agentes físicos, os efeitos da interação da luz UV no DNA têm sido amplamente estudados. Isto acontece principalmente pela facilidade em reproduzir este sistema em laboratório e sua importância biológica, uma vez que os organismos vivos estão sujeitos aos efeitos genotóxicos da radiação solar, que inclui a luz UV, desde o início da evolução do planeta.

Este tipo de radiação produz principalmente dois tipos de lesões, os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e dímeros de (6-4) pirimidina-pirimidona ou 6-4 fotoprodutos (6-4 PPs), pela ligação covalente de duas pirimidinas adjacentes, (de Lima-Bessa et al., 2008). Os CPDs são mais abundantes, perfazendo cerca de 75-90% das lesões causadas por UV a 260 nm (UVC), enquanto que os fotoprodutos 6-4, de 10 a 25%. Estas duas lesões resultam em considerável distorção na estrutura da dupla-hélice de DNA. Apesar de menos abundantes, os fotoprodutos 6-4 distorcem mais drasticamente a hélice do DNA, tornando-se mais visíveis aos mecanismos de reparo de DNA e são, portanto, reparados cinco vezes mais rapidamente (Mitchell e Nairn, 1989).

Lesões no DNA podem resultar em efeitos bastante deletérios para as células, como o bloqueio dos processos de duplicação e transcrição do DNA (Tornaletti e Hanawalt, 1999), resultando em processos de morte celular como a apoptose (Chiganças *et al.*, 2000). Em outros casos, as lesões são fixadas no genoma como mutações, alterando o código genético inicial. Este fenômeno pode resultar em processos de tumorigênese.

A evolução se encarregou de selecionar diferentes estratégias para minimizar os efeitos deletérios das lesões induzidas no DNA. Didaticamente, podemos resumi-las em dois grupos: mecanismos de tolerância a lesões e mecanismos de reparo da lesão. Estas estratégias estão presentes nos três grandes domínios: Arqueia, Bactéria e Eucariontes (Eisen e Hanawalt, 1999).

1.2 Os mecanismos de tolerância à lesão

Os mecanismos de tolerância desempenham um importante papel ao permitirem que a célula seja capaz de lidar com lesões persistentes no genoma (Baynton e Fuchs, 2000). Basicamente, estes processos permitem a polimerização contínua do DNA mesmo na presença da lesão. A maquinaria envolvida é capaz de adicionar um nucleotídeo frente a uma lesão não codificante. Este sistema denominado síntese translesão (ou também “bypass”) é bastante susceptível a erros, aumentando a frequência de mutações. Este tipo de maquinário é encontrado tanto em procariontes como em eucariontes (Matsuda *et al.*, 2000 e Herr *et al.*, 2000).

Os mecanismos de tolerância à lesão se constituem basicamente de polimerases com baixa fidelidade, que através da inserção de qualquer nucleotídeo frente à lesão permitem que a replicação continue, ainda que com o risco de gerar mutações. A tolerância à lesão, na verdade, diminui a consequência de uma parada da replicação que seria drástica para o organismo, já que em última instância levaria à morte. Dependendo do nucleotídeo incorporado frente à lesão, dizemos que a polimerase é sujeita a erro (“error-prone”) ou livre de erros (“error-free”) (Goodman, 2002).

Nos últimos anos, foi descoberto um número considerável de polimerases especializadas em síntese translesão, e estão presentes desde bactéria até mamíferos. Estas polimerases fazem parte da família Y das polimerases, e sua participação na síntese através de lesões acaba promovendo mutagênese pela incorporação errônea de nucleotídeos frente à determinada lesão. No entanto, as polimerases integrantes desta família possuem características diversas como diferentes eficiências e especificidades, dependendo do tipo de dano presente, capacidade de iniciar a síntese em parceria com outras polimerases ou isoladamente (Fujii e Fuchs, 2004; McCulloch *et al.*, 2004; Lehmann, 2006).

Algumas vezes estas polimerases de síntese translesão não conseguem estender a partir do nucleotídeo inserido e neste caso são necessárias duas polimerases no processo. Um exemplo é a polimerase kappa (pol kappa) de eucariotos. Ela insere A frente à lesão 8-oxodG e é capaz de estender a fita a partir daí. No entanto, a síntese a partir desta lesão parece ter maior eficiência quando a polimerase delta (pol delta) também está presente. Neste caso, pol kappa insere o nucleotídeo frente à lesão e pol delta continua a polimerização deste ponto (Haracska *et al.*, 2000).

Em *E. coli*, as principais polimerases de baixa fidelidade são induzidas sob o controle do regulon SOS, e são elas: UmuC-UmuD (DNA polimerase V) e DinP (DNA polimerase IV). Apesar de pertencerem à mesma superfamília, elas têm mecanismos diferentes. Enquanto UmuC-UmuD se comporta como polimerase de síntese de translesão, DinP insere nucleotídeos sem necessidade de uma fita molde (Napolitano *et al.*, 2002). Além disto, DinP apresenta uma regulação independente do SOS em alguns organismos como na bactéria *C. crescentus* (Galhardo *et al.*, 2005).

Antes do conhecimento destas polimerases de baixa fidelidade envolvidas no mecanismo de tolerância à lesão, esta mutagênese espontânea sempre esteve associada à idéia de que as mutações são sempre acidentes de erros de replicação ou danos no DNA não reparados. Mas o que se verifica é que, em certas condições, as células permitem que erros sejam ignorados e propagados, ou até mesmo inseridos intencionalmente, para aumentar a adaptabilidade.

Mutação adaptativa, ou de fase estacionária, acontece quando as células são submetidas a diferentes condições de estresses não-letais, respondendo com um aumento de mutação (Hersh *et al.*, 2004). Estes mecanismos de mutação incluem inserções e deleções mediadas por transposon, mutações por substituição e mudança de fase de leitura (“frameshift”). Ocorrendo em diferentes espécies bacterianas e leveduras, a mutação adaptativa parece

dependem da existência de homólogos de polimerases da superfamília DinB/UmuC que são induzidas pela resposta SOS em bactérias. A amplificação gênica também é uma resposta de fase estacionária que confere vantagem, daí ser chamada de adaptativa, mas que não depende das polimerases sujeitas a erro, cuja indução está sob o controle do regulon SOS bacteriano (Hersh *et al.*, 2004; Foster, 2005).

Esta mutagênese aumentada tem sido verificada em resposta a diferentes estresses, como no mecanismo de resposta à pressão hidrostática em uma linhagem de *E. coli*, e que é dependente do gene *mrr*. Nestas condições, o regulon SOS é acionado independente de danos no DNA, indicando que a indução da resposta SOS não é apenas uma defesa contra danos no DNA que sofre alguma injúria externa, mas teria uma função fisiológica mais ampla (Aertsen e Michiels, 2005).

Este propósito da mutagênese fica mais claro quando ela é observada em bactérias patogênicas, já que elas têm que sobreviver em diferentes nichos. E evidências recentes demonstram que existe uma correlação entre resistência a drogas e taxa de mutação aumentada, e que esta é providenciada ativamente. As mutações são geradas no próprio genoma, através de erros de replicação que conferem esta resistência a antibióticos, e pode ser ilustrada pela resistência a β -lactamos. Quando a integridade da parede celular é comprometida pela exposição a alguns β -lactamos, o sistema de transdução de sinal de dois componentes, via DpiBA, é ativada. A proteína efetora deste sistema então se liga na região de origem de replicação no cromossomo de *E. coli*, e desta forma, impede a replicação do DNA. A parada de replicação induz a resposta SOS, e a consequência imediata é a inibição da divisão celular, o que temporariamente protege contra a letalidade de antibióticos da classe dos β -lactamos. Em longo prazo pode ocorrer o desenvolvimento de resistência a exposição sub-letais deste antibiótico, favorecida pela mutagênese mediada pelo SOS (Maiques *et al.*, 2006).

1.3 Sistema de Reparo de DNA

Ao contrário da tolerância, os mecanismos de reparo de DNA atuam através da remoção da lesão presente no DNA, em um sistema quase livre de erro. Cada tipo de lesão induzida requer um mecanismo de reparo específico, embora sobreposições de vias têm sido relatadas mais frequentemente. (Swanson *et al.*, 1999).

1.3.1 Reparo Direto – Fotorreativação

O primeiro tipo de reparo de DNA caracterizado foi a reversão direta da lesão. Neste caso, uma enzima específica é capaz de reconhecer a lesão e revertê-la ao seu estado normal em uma única reação, sem que seja necessária a sua remoção do DNA. As fotoliasas são enzimas envolvidas na fotoreativação. Elas são capazes de reconhecer especificamente as lesões induzidas pela luz UV (CPDs e 6-4 fotoprodutos) e ligar-se a elas formando um complexo. Após a absorção de um fóton de luz azul (300-500 nm), a fotoliase é capaz de quebrar a ligação covalente entre as pirimidinas adjacentes, revertendo à lesão. Esta via de reparo dependente de luz é bastante eficiente e homólogos das enzimas fotoliase CPD e 6-4 são encontrados em diversos organismos, Todo, 1999. Curiosamente, os homólogos encontrados em mamíferos placentários assumiram outra função, estando relacionados com o controle do ritmo circadiano (Thresher *et al.*, 1998 e van der Horst, 1999).

O mecanismo de fotorreativação utiliza a luz visível (comprimento de onda 300-500 nm) para retirar ou reverter danos causados por irradiação UV no DNA. A enzima fotoliase, encontrada de bactérias a mamíferos aplacentários, tem dois cromóforos, um deles capta um fóton e a transfere para um segundo cromóforo. A energia no segundo cromóforo é utilizada

para reverter o dímero, ou seja, quebrar a ligação covalente entre as pirimidinas (Figura 1).

1.3.1.2 Reparo Direto – Alquiltransferência

Grupos alquil são incorporados ao DNA algumas vezes em consequência de processos químicos e enzimáticos, e estes quando se constituem em danos no DNA podem ser retirados pelo processo de alquiltransferência. As proteínas que exercem esta atividade, produtos dos genes *ada* e *ogt* em *E. coli*, captam para si os grupos alquil em um mecanismo não enzimático suicida. É um mecanismo altamente específico, mas dispendioso, já que uma vez que uma molécula da proteína recebe um grupo alquil ela perderá sua atividade. O gene *ada* em *E. coli* possui dois domínios e integra o regulon Ada. Na região C-terminal de Ada está sua função de alquiltransferase que retira grupos metil de 0^6meG e 0^4meT , deixando as bases sem danos. Quando há um acúmulo de danos de alquilação, a região N-terminal da proteína Ada recebe grupo metil, modifica-se conformacionalmente, tornando-se um regulador transcricional do seu próprio promotor, e dos promotores dos genes *alkA* e *alkB*, para que iniciem o reparo de danos causados por alquilação do DNA por uma outra via de reparo, a excisão de bases. Desta forma, a função regulatória da proteína Ada é ativada em consequência da sua atividade de reparo, diferentemente de outras proteínas regulatórias que podem responder aos agentes danificadores ou ao próprio dano no DNA (Volkert e Landini, 2001).

Figura 1. Representação esquemática da via de reparo direto por fotorreativação.

Fonte: Adaptado de Friedberg *et al.*, 2006.

O produto do gene *alkB*, que até recentemente pensava-se atuar por um mecanismo semelhante ao gene *alkA*, também atua por um mecanismo próprio de reversão direta. A proteína AlkB processa a retirada de danos de metilação de bases de DNA através de uma reação dependente de oxigênio,

alfa-cetoglutarato e Fe (II). Esse mecanismo de desmetilação oxidativa constitui uma nova via de reparo de DNA (Trewick *et al.*, 2002; Falnes *et al.*, 2002). Estes trabalhos foram realizados com genes provenientes de *E. coli*, sendo que homólogos são encontrados em vários organismos, incluindo no homem. Um gene homólogo *alkB* foi descrito em *C. crescentus*, sendo que a disrupção desse gene resulta da alta sensibilidade ao agente alquilante MMS (Colombi e Gomes, 1997).

Outra via de reparo bem estudada é o reparo por excisão, também conhecida como “reparo escuro”, foi descrita pela primeira vez por (Setlow e Carrier, 1962, 1963 e 1964), com a observação de que haveria um mecanismo independente de luz, capaz de remover lesões no DNA. Neste processo, a base lesada é retirada e substituída por uma normal após sua remoção do genoma. O reparo por excisão pode ser dividido em reparo por excisão de bases (BER) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER).

1.3.2 Reparo por excisão de bases (BER)

O reparo por excisão de bases é caracterizado pela excisão única e exclusivamente da base lesada. Uma série de enzimas denominadas DNA-glicosilases reconhecem a lesão e promovem a hidrólise da ligação N-glicosil que liga a base ao esqueleto de fosfato-açúcar do DNA. Como consequência, temos um sítio abásico que é reconhecido por uma AP-endonuclease, capaz de produzir quebras na ligação fosfodiéster a 5' ou 3' do sítio abásico (Satoh e Lindahl, 1994). A lacuna formada é então preenchida pela polimerização e posterior ligação do novo nucleotídeo à sequência de DNA em questão (Cadet *et al.*, 2000).

As modificações em bases são muito frequentes no genoma celular. Podem ser resultados da própria instabilidade dos grupos amino das bases e

incluem conversão de citosina a uracil, adenina a hipoxantina, guanina a xantina e 5-metil-citosina a timina.

As bases também podem ser modificadas por agentes químicos resultantes do próprio metabolismo oxidativo da célula. Adiciona-se a isto os produtos químicos a que os organismos estão sujeitos no ambiente em que vivem. Todo este amplo conjunto de fatores gera inúmeros danos que exigem diferentes enzimas para reconhecer um tipo específico de lesão.

O mecanismo geral de reparo BER em *E. coli* é o seguinte: a base lesada ou inapropriada é reconhecida e retirada pelas diferentes glicosilases (codificadas pelos genes *alkA*, *ffg*, *mutY*, *nei*, *nth*, *tag* e *udg*), deixando o esqueleto desoxirribose fosfato. A excisão desta base gera então, um sítio apurínico ou apirimidínico (AP), que é retirado por endonucleases (produto dos genes *xthA* e *nfo*). Elas produzem incisões ou cortes em DNA duplex a 5' do sítio AP, gerando um resíduo desoxirribose terminal 5' fosfato. O resíduo restante de açúcar fosfato é excisado por uma exonuclease (dRpase) codificada por *recJ* ou *ffg*, gerando uma falha de um nucleotídeo. O sítio AP pode ainda ser clivado a 3' por uma atividade AP liase de algumas glicosilases (*ffg*, *mutY* e *nth*) que por β - eliminação gera terminais 5' fosfato e 3' com um aldeído 2-3 insaturado. As AP endonucleases codificadas pelos genes *nfo* e *xthA*, com atividade 3' fosfodiesterase, retiram então este aldeído gerando também uma falha de um nucleotídeo. Esta falha é preenchida por uma polimerase (*polA*) e o reparo é completado por uma DNA ligase. Representação esquemática da via mostrada na figura 2.

Figura 2. Representação esquemática do reparo por excisão de bases (BER).

Fonte: Adaptado de Friedberg *et al.*, 2006.

1.3.3 Sistema de Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

O BER não é um sistema muito flexível para o reconhecimento de lesões no DNA e seria inviável para a célula manter diferentes enzimas para os diferentes tipos de lesões encontradas no DNA. Neste contexto, o NER, mais geral e flexível, é capaz de reconhecer e reparar um grande número de lesões não necessariamente relacionadas estruturalmente. Neste caso, as lesões são reconhecidas não pela sua natureza química, mas pelo grau de distorção promovido na hélice de DNA. Lesões do tipo CPDs, 6-4 fotoprodutos, adutos químicos e certos tipos de ligações cruzadas entre as duas cadeias de DNA (“crosslinks”) são reparadas por este sistema. Dependendo do grau de distorção da hélice, as lesões são reparadas mais eficientemente ou não, conforme mencionado acima.

Além da flexibilidade, o NER possui uma outra característica que o distingue das demais vias de reparo de DNA. A remoção das lesões não ocorre de forma homogênea no genoma. Ensaio comparativos de detecção da remoção de lesões CPDs em regiões transcritas e não transcritas no genoma, demonstraram que estas eram removidas mais rapidamente nas seqüências transcritas (Bohr et al., 1985 e 1986). Com o estudo de sondas específicas para cada fita do gene transcrito, foi observada a existência de um reparo preferencial exclusivo da fita transcrita (Mellon et al., 1987). A diferença na taxa de remoção de CPDs é devida, provavelmente, ao baixo reparo desta lesão na fita não transcrita (as taxas de reparo no genoma global são refletidas como as taxas de reparo observadas nas fitas não transcritas), (Tornaletti e Hanawalt, 1999). Este reparo preferencial só foi observado para genes transcritos pela RNA polimerase II (Christians e Hanawalt, 1993 e Dammann e Pfeifer, 1997). Sabe-se hoje que esta característica não é exclusiva de células de mamíferos, sendo também encontrada em bactérias e leveduras, (Hoeijmakers, 1993; Petit e Sancar, 1999).

Figura 3. Representação esquemática da via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos.

Fonte: Adaptado de Petit e Sancar, 1999.

Em *E. coli* o mecanismo de atuação do NER (Figura 3) é bastante estudado e empregado como modelo de estudo em outros organismos principalmente em bactéria. O princípio básico em procariontes é a remoção

de um fragmento de DNA contendo a lesão (cerca de 12 nucleotídeos) através de dupla incisão na fita lesada (Pettijohn e Hanawalt, 1964). A lacuna resultante é preenchida tendo a fita intacta como molde. O modelo geral de atuação desta via de reparo é conservado na escala evolutiva desde bactérias até seres humanos (Rasmussen e Painter, 1964). Entretanto, as proteínas envolvidas não apresentam homologia de sequência e a quantidade destas difere consideravelmente, sugerindo que o NER em procariotos e eucariotos tenha divergido substancialmente (Eisen e Hanawalt, 1999). Entre os eucariotos, mesmo organismos distantes na escala evolutiva, como mamíferos, leveduras e plantas, apresentam grande similaridade de sequência nas proteínas componentes do sistema. A maioria dos genes envolvidos em NER já foi identificada, de (Laat *et al.*, 1999) e, a reação de NER em mamíferos foi reconstituída *in vitro* usando proteínas purificadas (Abousskhra *et al.*, 1995 e Mu *et al.*, 1996).

1.3.4 Reparo de bases mal emparelhadas (“Mismatch repair”)

O mal emparelhamento de bases é decorrente de uma ou mais bases erroneamente incorporadas durante a replicação ou durante o processo de recombinação. A maioria destes erros é imediatamente corrigida pela atividade exonuclease associada às polimerases. Quando estes erros não são reconhecidos e corrigidos pelo sistema de verificação das polimerase, entra em ação o sistema de reparo de bases mal emparelhadas.

Este sistema conhecido como “mismatch repair” (Figura 4) é altamente conservado entre quase todos os organismos conhecidos e parece utilizar a desestabilização do DNA dupla fita para reconhecimento do desemparelhamento de bases. Em *E. coli*, onde este sistema é bem descrito, a fita filha não metilada contendo a base incorreta é atacada por enzimas de correção e o trecho contendo a base incorreta é excisado. Os produtos dos

genes *mutH*, *mutL*, *mutS*, *ssb* e, a DNA helicase II (o produto de *uvrD*), DNA polimerase III, exonuclease I e exonuclease VII estão envolvidos neste processo nesta bactéria.

Em *E. coli* o reconhecimento da base desemparelhada é feito por um dímero de MutS que se liga no sítio contendo a lesão. Com a utilização de ATP, MutL se junta e estabiliza o complexo MutS-DNA. O complexo MutL-MutS-DNA desloca até o sinal de discriminação da fita a ser corrigida por mecanismos ainda não bem definidos, uma delas sendo através do deslizamento do complexo MutS/MutL pelo DNA até o MutH (Sixma, 2001). Este sinal de discriminação é um sítio GATC hemi-metilado mais próximo da lesão associado a MutH. A atividade endonuclease de MutH é acionada com a ligação do complexo MutS-MutL e esta incisão por MutH na fita recém sintetizada precede a excisão por exonuclease do trecho danificado na presença de helicases. O trecho excluído é ressintetizado pela DNA polimerase III, com auxílio da proteína de ligação ao DNA fita simples (SSB) e ligases (Sixma, 2001) figura 4.

A determinação da estrutura de MutS tem ajudado a definir como se dá a flexibilidade de MutS para se ajustar aos diversos tipos de lesões (Obmolova *et al.*, 2000), num mecanismo de liga e desliga na dependência de hidrólise de ATP mediado por MutL ou seja, MutL parece ser responsável pela modulação das atividade de ligação ao DNA de MutS (Hopner e Tainer, 2000).

Figura 4. Representação esquemática da via de reparo “mismatch”. As principais enzimas estão indicadas.

Fonte: Adaptado de Sixma, 2001.

1.3.5 Reparo Recombinacional

O reparo recombinacional em *E. coli* repara principalmente duplas quebra de DNA (DSB) e lacunas em fita simples, o chamado reparo de lacuna em fita filha (DSGR) esquematicamente representadas na figura 5. O primeiro

dano surge em decorrência direta de agentes externos, e o segundo, é consequência da interrupção da replicação e sua retomada em um ponto adiante, deixando uma lacuna na fita recém sintetizada. Neste caso a parada de replicação se deve à presença de um erro que impede a maquinaria de replicação inserir uma base neste ponto da fita. Um trecho de DNA homólogo não danificado é utilizado como molde para a replicação do trecho não replicado em DSGR. Depois que a recombinação é finalizada e a lacuna é preenchida a lesão original é corrigida por um mecanismo de reparo por excisão (Kowalczykowski, 2000).

Estas lesões precisam ser processadas para que a proteína RecA possa mediar a recombinação. Participam deste primeiro passo, chamado iniciação, as enzimas que vão gerar o substrato para a recombinação. Em *E. coli* as principais enzimas envolvidas neste processo formam o complexo RecBCD. Estas enzimas têm várias atividades enzimáticas como, exonucleases de fita simples e dupla, endonucleases de fita simples, ATPases e helicases (Kowalczykowski *et al.*, 1994). No entanto, existem vias alternativas para cada passo da recombinação e o início em *E. coli* pode ainda contar com as vias RecET (genes *recE* e *recT*), RecF (genes *recF*, *recJ*, *recN*, *recO*, *recQ*, *recR*) e a via SbcBCD (genes *sbcB*, *sbcC* e *sbcD*). E no passo seguinte quando o pareamento entre as fitas homólogas e a troca delas acontece, participam as proteínas RecA, SSB, RecF, RecO e RecR.

No terceiro passo se dá a extensão da heteroduplex com o auxílio do complexo RuvAB e da proteína helicase RecG. No quarto e último passo, a endonuclease RuvC cliva a junção “holliday” e resolve, ou desfaz, o cruzamento entre fitas homólogas deixando livres as fitas originais agora sem quebras ou lacunas, isto é, recombinadas. Ou seja, a movimentação e migração das fitas e, o passo de resolução pode ser realizado por pelo menos três vias: RuvABC, RecG e a via Rus.

A Proteína RecA que tem também atividade de coprotease quando está envolvida no processo de tolerância a lesão (Sistema SOS), é altamente conservada entre os procariotos, e em eucariotos têm sido encontradas proteínas relacionadas. No reparo recombinacional ela se associa à fita simples gerada por parada de replicação ou lesões formando um filamento protéico e invade uma molécula de DNA dupla fita dando início ao processo de recombinação (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática do reparo recombinacional de dupla quebra de DNA.

Fonte: Adaptado de Kowalczykowski, 2000.

1.3.6 Ligases

As ligases participam dos processos de reparo por excisão, replicação e recombinação, ligando sempre extremidades 5' fosfato e 3' hidroxil. No reparo direto elas ligam fitas, em quebra simples e quebra dupla. São divididas em duas famílias: a família I que agrupa as ligases NAD-dependentes, características de bactérias e, a família II com as ATP-dependentes encontradas em vírus, arqueia e eucariotos. Mas algumas bactérias também apresentam um membro da ligase de classe II (Eisen e Hanawalt, 1999).

1.3.7 Sistema SOS

Além destes sistemas de reparo, existe o regulon SOS, que é um conjunto de respostas fisiológicas a danos no DNA. Neste sistema, representado na figura 6 quando o DNA é lesado, vários genes são induzidos, incluindo genes das vias de reparo como o NER. Em *E. coli* é um sistema bem descrito onde os genes participantes têm seqüências promotoras reguladas pela proteína repressora Lexa (codificada pelo gene *lexA*).

Em condições normais o produto do gene *lexA* reprime a expressão dos genes SOS, por sua ligação aos promotores destes genes. O sinal para indução deste sistema parece ser a geração de DNA fita simples onde se liga a proteína RecA. RecA ligada ao DNA sofre mudança conformacional tornando-se uma enzima coproteolítica capaz de clivar o repressor LexA. Com a saída de LexA dos promotores os genes SOS são expressos.

Este sistema é ativado por uma variedade de agentes danificadores de DNA, e, ao contrário dos outros sistemas já citados, que agem sempre para retirar o dano no DNA, este pode ser altamente mutagênico. Esta capacidade mutagênica é um dos aspectos do sistema SOS e se deve à ativação de um mecanismo de tolerância a lesões necessárias em condições de estresse fisiológico ou ambiental.

Uma outra função de RecA é a ativação de UmuD (codificada pelo gene *umuD*) a UmuD' que na forma de dímero se complexa com UmuC (produto do gene *umuC*) formando a DNA polimerase V. O complexo UmuD'₂C (Pol V) é responsável pela maior parte da resposta mutagênica no sistema SOS. Funcionando como polimerase é capaz de incorporar um nucleotídeo em frente a uma lesão (“misincorporation”), permitindo assim a continuidade da replicação (“bypass”). Após a incorporação de um nucleotídeo em frente a uma lesão Pol V continua a replicação por alguns nucleotídeos, mas devido a sua baixa processividade e menor afinidade por subunidades da polimerase III, a replicação é retomada por pol III. UmuD'₂C interage com as subunidades alfa (catalítica) da Pol III e esta interação é crítica para que ocorra a síntese de translesão (Sutton *et al.*, 1999).

A grande participação de UmuD'₂C na resposta mutagênica não descarta a participação de outras proteínas nesta resposta, mesmo porque mutagênese também é verificada em cepas de *E. coli* deficientes para os genes *umuD* e *umuC*. Recentemente (Gerlach *et al.*, 1999) foi descoberta uma polimerase codificada pelo gene *dinB/dinP* que faria o papel de UmuD'₂C. A proteína codificada pelo gene *dinB/dinP* (DNA polimerase IV) é similar em seqüência a UmuC, mas parece participar de vias diferentes de mutagênese também induzida por SOS. Outro importante gene induzido na resposta SOS é o *dinA (polB)* que codifica a DNA polimerase II (Pol II). Apesar de, na ausência de Pol V, o início da replicação ser normal, a completa recuperação da síntese de DNA requer também a ação de DNA polimerase III junto com Pol II (Rangarajan *et al.*, 1999). Ao contrário da retomada de replicação feita por Pol V, com Pol II o início da replicação é feito por um reparo livre de erro, ou seja, sem incorporação de mutações.

A capacidade de reiniciar a replicação após a irradiação por UV é verificada mesmo na ausência de Pol II e Pol V, sugerindo pelo menos 3 vias para início de replicação e temporalmente separadas para evitar conseqüências

desastrosas para o organismo na ausência de correção. Com a descoberta da atividade polimerase da proteína DinB/DinP do gene *dinB/dinP* é possível que esta terceira via seja dependente dela (Kim *et al.*, 1997).

Figura 6. Representação esquemática do sistema SOS em *E. coli*. As principais enzimas envolvidas estão indicadas.

Fonte: Adaptado de Friedberg *et al.*, 2006.

1.4 A importância de conhecer os mecanismos de reparo

Os sistemas de reparo de DNA são bem conservados entre os organismos e bem descritos em *E. coli*. Porém, isto não esgota a busca por novos genes de reparo de DNA ou padrões novos de reparo, já que diferenças significativas são encontradas até mesmo em organismos próximos, como em

dois patógenos de plantas (Martins-Pinheiro *et al.*, 2004). Além disto, sistemas novos continuam sendo descobertos, como o mostrado por Rand *et al.*, (2003) em *Mycobacterium tuberculosis*. O mecanismo clássico de indução de genes funcionais em reparo de DNA nessa bactéria parece não depender totalmente de *recA*, ou seja, existem pelo menos duas vias de indução de genes de reparo de DNA em *M. tuberculosis*.

Em *D. radiodurans*, o mais conhecido organismo capaz de sobreviver a condições extremas de dissecação e radiação ionizante, a indução da via Embden-Meyerhof Parmas (EMP) esgota os precursores para o reparo de DNA e pode induzir o estresse oxidativo, levando à redução da radioresistência. Por outro lado, os metabólitos de glicose gerados a partir da via das pentoses aumentam a sobrevivência de *D. radiodurans* (Zhang *et al.*, 2003). Neste mesmo organismo, foi descrito recentemente um mecanismo até então desconhecido de reparo de DNA que prevê uma exaustiva montagem de pequenos fragmentos de DNA (Zahradka *et al.*, 2006). A ligação destes fragmentos é feita por estímulo de PprA, uma proteína induzida por radiação (Narumi *et al.*, 2004). Novas funções têm sido descritas também para proteínas clássicas, envolvidas em reparo, como é o caso do envolvimento de RecA com deslocamento de *E. coli* em meio semi-sólido (Gómez-Gomez *et al.*, 2007). Os genes envolvidos no mecanismo de fotorreativação são regulados por oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio em *Rhodobacter* (Hendrischk *et al.*, 2007), e estão organizados em um provável operon em *C. crescentus*, sugerindo a existência de processo similar nesta bactéria.

Além disto, é cada vez mais evidente que as atividades que mantêm a estabilidade genômica não agem isoladamente, e são, na verdade, um complexo e intricado conjunto de ações que se unem para proteger o DNA de agressões (Kobayashi *et al.*, 2005; Yang, 2006).

1.5 O Modelo *C. crescentus*

Os anos 60 e 70 marcam o interesse no estudo desta bactéria. Vários fatores contribuem para o interesse crescente: morfologia diferenciada, facilidade de cultivo, sua não patogenicidade.

As bactérias do grupo das *Caulobacters* são gram-negativas, não patogênicas, encontradas praticamente em todos os ambientes aquáticos e em muitos tipos de solos (Colombi e Gomes, 1997; Brun e Shapiro, 1992; Nierman *et al.*, 2001). O ambiente em que se encontram *Caulobacters* é pobre em nutrientes e com pH próximo a neutralidade. As *Caulobacters* são importantes na ciclagem do carbono, utilizando fontes deste elemento encontradas em baixas concentrações e liberando-o ao sistema como CO₂ (Nierman *et al.*, 2001).

C. crescentus vem sendo usado como modelo de estudo para diferenciação celular em bactérias (Jenal, 2000; Ostera e Jenal 2000). A principal característica do ciclo celular de *Caulobacter* é que células filhas diferem entre si em relação à estrutura, programa de desenvolvimento e iniciação da replicação do DNA. A divisão celular dá origem a uma célula móvel e uma célula talo. A célula móvel possui um flagelo localizado no pólo da célula oposto ao sítio de divisão celular. Diferentemente do período de duplicação, o período de motilidade (fase G1) é uma fração constante durante todo o ciclo celular da *C. crescentus* (Skerker e Shapiro, 2000). Após um terço do ciclo celular, o flagelo é liberado da célula, dá-se então a formação do talo no sítio previamente ocupado pelo flagelo, à replicação do DNA é iniciada (Dingwall e Shapiro, 1989) e a célula se alonga até dobrar o seu tamanho (fase S), neste estágio do ciclo celular, outro flagelo é montado no pólo oposto ao da célula talo (Grünenfelder *et al.*, 2001). Os dois novos cromossomos formados são divididos aos pólos da célula e subsequentemente há a formação do septo e em seguida a divisão celular (fase G2) (D'Ari, 2001), figura 7.

Figura 7. Ciclo celular de *C. crescentus*. A morfologia diferenciada é mostrada acima (uma célula móvel – que perde o flagelo para entrar em divisão) e uma célula talo que entra diretamente em novo ciclo. Os reguladores mestres estão destacados acima CtrA (vermelho), DnaA (verde) e GcrA (azul) é indicou. Uma divisão quanto às etapas do ciclo em relação ao tempo também é mostrado. Para uma divisão completa neste tempo é necessário que a mesma esteja em um meio rico.

Fonte: Adaptado de Holtzendorff *et al.*, 2006.

O ciclo celular de *C. crescentus* é uma obra de arte em riqueza de detalhes moleculares. Uma seqüência coordenada de acontecimentos que coloca esta bactéria no centro de estudos de diversos laboratórios espalhados pelo mundo.

Passos importantes foram dados nos últimos anos para a compreensão da progressão do ciclo celular do modelo *C. crescentus*. A progressão do ciclo celular é consequência de controladores sucessivos ao longo do ciclo. Estes reguladores mestres são CtrA, GcrA e DnaA (Holtzendorff *et al.*, 2006). O regulador de resposta CtrA é essencial, é ativado por fosforilação em um resíduo de aspartato (D51), possui domínios ligantes ao DNA (TTAAN7TTAA), quando fosforilada regula a transcrição de 95 genes e a sua proteólise por ClpXP libera a oriC e então o ciclo progride para a fase S. GcrA e CtrA: influenciam a transcrição de 30% dos genes expressos em horas específicas no ciclo celular, e altas taxas de GcrA afetam a transcrição de ~125

genes. A DnaA é o iniciador da replicação, sendo uma proteína autoregulatória e apresenta funções adicionais como regulador transcricional de outros genes. A DnaA liga-se a origem de replicação em uma região rica em AT em um organismo que apresenta uma porcentagem de 67% de GC (Hottes *et al.*, 2005, Holtzendorff *et al.*, 2006, Collier *et al.*, 2006) figura 8.

Figura 8. O gráfico exibi a coordenação dos reguladores mestres ao longo do ciclo celular. Os Algarismos abaixo indicam o tempo em minutos após o começo da sincronização.

Fonte: Adaptado de Holtzendorff *et al.*, 2006.

1.5.1 O reparo de DNA em *C. crescentus*

C. crescentus pertence ao grupo das proteobactérias alfa, gram-negativa, com um genoma que compreende um cromossomo circular de 4.016.942 pares de bases codificando 3.767 genes (Nierman *et al.*, 2001). Com características particulares que incluem a diferenciação celular a cada divisão, o desenvolvimento em *C. crescentus* requer uma coordenação dos processos de crescimento celular, replicação de DNA e divisão celular (Martin e Brun,

2000), como falado anteriormente. Utilizada como modelo de estudo para diferenciação celular em bactérias, *C. crescentus* é pouco exigente na obtenção de nutrientes e tem um ciclo de vida relativamente curto. Estas características, aliadas à facilidade de manuseio em laboratório, a torna um forte candidato para estudos complementares de reparo de DNA em bactérias. Além disto, pouco se conhece experimentalmente das vias de reparo de DNA em *C. crescentus*, o que abre um campo quase inesgotável de estudos. Bender (1984) descreveu a reativação de bacteriófagos em bactérias *C. crescentus* expostas a UV. Este resultado indica a existência de respostas SOS nesta bactéria, de acordo com a identificação dos genes *recA* e *lexA* (Martins-Pineiro *et al.*, 2007) que controlam estas respostas. Este mesmo trabalho ainda relata que bactérias irradiadas com UV apresentam fotorreparo quando submetidas a doses fortes de luz visível, o que correlaciona com a existência de pelo menos dois genes da família das fotolases nesta bactéria (Martins-Pineiro *et al.*, 2007), e que podem desempenhar essa função. Em um mutante para o gene *alkB* foi mostrada alta sensibilidade ao agente alquilante metil metanosulfonato (MMS) e expressão diferenciada nos dois tipos celulares 9células com flagelo e células com talo de *C. crescentus* (Colombi e Gomes, 1997). Posteriormente, este gene foi relacionado a uma nova via de reparo de DNA, a desmetilação oxidativa (Falnes *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstram, ainda, a importância das vias de reparo de DNA em estresse a metal pesado neste micro organismo (Hu *et al.*, 2005). Finalmente, a caracterização do operon *imuAB dnaE2*, indicando que ele está envolvido em mutagênese induzida por danos no DNA, e está sob o controle do regulon SOS. Todavia, no mesmo trabalho, não houve evidência que outra polimerase de síntese de translesão, DinP, era controlada pela resposta SOS nesta bactéria, o que sugere uma diferente via regulatória para este gene em *C. crescentus* (Galhardo *et al.*, 2005).

A inativação de genes conhecidos de reparo de DNA pode confirmar a função dos mesmos no genoma de *C. crescentus*, assim como podem ser revelados genes de função ainda desconhecida. A elucidação da expressão de genes de reparo de DNA nas duas formas celulares pode identificar diferenças de regulação destas vias ou até mesmo a presença de diferentes vias para os dois tipos celulares presentes em *C. crescentus* (Hallez *et al.*, 2004). Não podemos também deixar de salientar a importância da possível extrapolação do conhecimento de micro organismos para a compreensão de mecanismos de reparo de DNA em humanos. A semelhança entre sistemas de reparo de procariotos e humanos reforça a necessidade de entender ou buscar novos genes envolvidos em reparo de DNA, ou até mesmo, vias de reparo. O grande número de tipos de danos a que o DNA está sujeito reflete na variedade de mecanismos de reparo, e outras estratégias que evitam a incorporação de lesões no DNA. Portanto, o reparo de DNA é o sistema mais efetivo contra danos no DNA, e muito do que se conhece dos genes envolvidos em reparo de DNA se deve à identificação e caracterização de mutantes dos genes envolvidos nestas vias. A disponibilidade de uma biblioteca de mutantes de *C. crescentus* torna possível esta investigação e abre grandes perspectivas na área de mutagenese e reparo de DNA, através da utilização um novo modelo bacteriano, de fácil manipulação e de custo reduzido. É de grande importância também o fato de se tratar de um projeto em escala genômica, o que amplia as possibilidades na identificação de genes mutadores relacionados a novos fenômenos ainda não identificados, e presentes em outras bactérias e não identificados em *E. coli*. Neste trabalho, a partir de uma biblioteca genômica de *C. crescentus*, construída com inserção aleatória do transposon Tn5 (Italiani *et al.*, 2002), foi feita uma varredura à procura de clones com fenótipos sensíveis aos agentes genotóxicos. De nosso conhecimento, não houve até o

momento, estudos de reparo de DNA que empregaram esta metodologia para essa bactéria, o que torna original a proposta nesta área.

5 CONCLUSÕES

Foi efetuado um trabalho extensivo para sequenciamento das posições de inserção do transposon Tn5, o que resultou na identificação de 102 genes (a partir de 135 clones) mutados com fenótipos de sensibilidade a agentes genotóxicos. A premissa principal deste estudo é que a mutação provocada pela inserção única (confirmada neste trabalho) do Tn5 seja responsável pelo fenótipo de sensibilidade observado.

A identificação de mutantes para genes de reparo a partir de sensibilidade a agentes genotóxicos está na base dos estudos dos mecanismos de manutenção de reparo de DNA. Os primeiros mutantes de *E. coli* sensíveis à luz UV, por exemplo, foram isolados na década de 1960, sendo que o nome dos mutantes (uvr “UV resistance”) corresponde aos genes mutados, que foram identificados décadas depois (Friedberg, 1997). Logo, nosso trabalho apenas segue passos já trilhados, porém agora com a possibilidade de uso não só da ferramenta molecular do transposon, como todo o potencial comparativo da genômica microbiana.

A distribuição de categorias dos genes identificados como mutados é interessante, pois revelou a participação de várias vias metabólicas que podem ter participação nos processos de proteção do genoma.

Das vinte e uma mutações que afetam genes relacionados a metabolismo de DNA, encontramos vários cuja função está bem estabelecida em outras bactérias (na maior parte dos casos em *E. coli*, mas também em *B. subtilis*, como no caso dos genes AddA e AddB). Os dados para genes relacionados ao NER de *C. crescentus* revelaram que nesta bactéria (e diferente do que se conhece) há a participação de NER no reparo de lesões oxidativas (provocada por H₂O₂). Em vários casos, porém, os genes ainda não haviam

sido descritos como participantes de processamento de DNA lesado, e nossos dados abrem perspectivas interessantes de estudo.

Entre as outras categorias identificadas, encontramos duas com um elevado número de clones; metabolismo energético e proteínas de ligação e transporte. De certa forma esses dados foram inesperados, mas provavelmente isso se deve a eventos como efluxo do agente genotóxico (para agentes químicos), modificação do balanço de estresse celular (saturando as vias normais de proteção do genoma) e degradação de compostos eventualmente tóxicos no material genético (como compostos aromáticos, por exemplo).

Outra categoria que merece destaque é aquela relacionada à regulação gênica e transdução de sinais, onde foram classificados dez clones. Análise de vários fenótipos complementares (como fenótipo natante, filamentação e ciclo celular) revelou que esses clones (ou a maior parte deles) pode de fato estar afetado na sua motilidade e, conseqüentemente, no controle do ciclo celular. Esses dados são extremamente interessantes, pois podem ser pioneiros na identificação de vias de sinalização de ciclo celular em bactérias como mecanismo de proteção ao genoma.

Finalmente, em alguns genes afetados (que codificam proteínas hipotéticas) os dados apresentados constituem provavelmente os primeiros dados indicativos de função para essas proteínas.

Dessa forma a identificação dos genes, descritos aqui, é uma contribuição da genômica funcional ao estudo de mecanismos de resistência a agentes genotóxicos em um novo modelo bacteriano (*C. crescentus*) e pretende também ampliar os dados conhecidos para proteção do genoma de bactérias em geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protić M, Hübscher U, Egly JM, Wood RD. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*. 1995 Mar 24;80(6):859-68.

Adelman CA, Petrini JH. ZIP4H (TEX11) Deficiency in the Mouse Impairs Meiotic Double Strand Break Repair and the Regulation of Crossing Over. *PLoS Genet*. 2008 Mar 28;4(3):e1000042.

Aertsen A, Michiels CW. Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2005;58(5):1381-91.

Aravind L. An evolutionary classification of the metallo-beta-lactamase fold proteins. *In Silico Biol*. 1999;1(2):69-91.

Asahina H, Han Z, Kawanishi M, Kato T Jr, Ayaki H, Todo T, Yagi T, Takebe H, Ikenaga M, Kimura SH. Expression of a mammalian DNA photolyase confers light-dependent repair activity and reduces mutations of UV-irradiated shuttle vectors in xeroderma pigmentosum cells. *Mutat Res*. 1999 Dec 7;435(3):255-62.

Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26(1):153-81.

Au N, Kuester-Schoeck E, Mandava V, Bothwell LE, Canny SP, Chachu K, Colavito SA, Fuller SN, Groban ES, Hensley LA, O'Brien TC, Shah A, Tierney JT, Tomm LL, O'Gara TM, Goranov AI, Grossman AD, Lovett CM. Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J Bacteriol*. 2005;187(22):7655-66.

Ausubel LJ, Kwan CK, Sette A, Kuchroo V, Hafler DA. Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15317-22.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Azar Daryany MK, Massudi R, Hosseini M. Photoinactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* Suspended in Phosphate-Buffered Saline-A Using 266- and 355-nm Pulsed Ultraviolet Light. *Curr Microbiol*. 2008 May;56(5):423-8. Epub 2008 Feb 8.

Batty DP, Wood RD. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*. 2000 Jan 11;241(2):193-204. Review.

Baynton K, Fuchs RP. Lesions in DNA: hurdles for polymerases. *Trends Biochem Sci*. 2000;25: 74-79.

Bender RA. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Caulobacter crescentus*. *Mol Gen Genet*. 1984;197(3):399-402.

Bentchikou E, Servant P, Coste G, Sommer S. Additive effects of SbcCD and PolX deficiencies in the in vivo repair of DNA double-strand breaks in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*. 2007 Jul;189(13):4784-90.

Bernard MA, Ray NB, Olcott MC, Hendricks SP, Mathews CK. Metabolic functions of microbial nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr*. 2000 32(3):259-67.

Bhattacharyya MK, Matthews KM, Lustig AJ. Mre11 nuclease and C-terminal tail-mediated DDR functions are required for initiating yeast telomere healing. *Chromosoma*. 2008 Mar 12 [Epub ahead of print].

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(7):3290-5.

Bohr VA, Okumoto DS, Hanawalt P. Survival of UV-irradiated mammalian cells correlates with efficient DNA repair in an essential gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:3830-33.

Bohr VA, Smith CA, Okumoto, DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*. 1985;40:359-369.

Bohr VA, Grigory DL. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie*. 1999;81: 155-60.

Bootsma D, Hoeijmakers JHJ, Yasui A. Mammalian cry1 and cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 1999;398:627-30.

Bridges BA. Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis. II: The inducible SOS hypothesis. *DNA Repair*. 2005;4(6):725-6, 739.

Brun YV, Shapiro L. A temporally controlled sigma-factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter*. *Genes Dev*. 1992;6(12A):2395-408.

Burkovski A, Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002 Mar;58(3):265-74. Review.

Burton KA, Johnson BD, Hausken ZE, Westenbroek RE, Idzerda RL, Scheuer T, Scott JD, Catterall WA, McKnight GS. Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Sep 30;94(20):11067-72.

Cadet J, Bourdat AG, D'Ham C, Duarte V, Gasparuto D, Romieu A, Ravanat JL. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res*. 2000;462:121-28.

Certi PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells*. 1991;3:1-7.

Chédin F, Noirot P, Biaudet V, Ehrlich SD. A five-nucleotide sequence protects DNA from exonucleolytic degradation by AddAB, the RecBCD analogue of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 1998 Sep;29(6):1369-77.

Chiganças V, Miyaji EN, Muotri AR, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Yasui A, Menck CFM. Photorepair prevents ultraviolet-induced apoptosis in human cells expressing the marsupial gene. *Cancer Res*. 2000;60:2458-63.

Christians FC, Hanawalt PC. Lack of transcription-coupled repair in mammalian ribosomal RNA genes. *Biochemistry*. 1993;32:10512-18.

Collier J, Murray SR, Shapiro L. DnaA couples DNA replication and the expression of two cell cycle master regulators. *EMBO J*. 2006 Jan 25;25(2):346-56.

Colombi D, Gomes SL. An *alkB* gene homolog is differentially transcribed during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *J Bacteriol.* 1997;179(10):3139-45.

Crick FHC. The double helix: a personal view. *Nature.* 1974;248:766-69.

D'Ari R. Cycle-regulated genes and cell cycle regulation. *BioEssays.* 2001; 23:563-565.

Dajkovic A, Mukherjee A, Lutkenhaus J. Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J Bacteriol.* 2008 Apr;190(7):2513-26. Epub 2008 Feb 1.

Dammann R, Pfeifer GP. Lack of gene and strand-specific DNA repair in RNA polymerase II transcribed human tRNA genes. *Mol Cell Biol.* 1997;17: 219-29.

da Rocha RP, Paquola AC, Marques MV, Menck CF, Galhardo RS. Characterization of the SOS regulon of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 2008 Feb;190(4):1209-18. Epub 2007 Dec 14.

Dayhoff MO, Orcutt BC. Methods for identifying proteins by using partial sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979 May;76(5):2170-4.

De Laat W, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1999;13:768-85.

Dingwall A, Shapiro L. Rate, origin, and bidirectionality of *Caulobacter* chromosome replication as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 Jan;86(1):119-23.

Donaldson JR, Courcelle CT, Courcelle J. RuvABC is required to resolve holliday junctions that accumulate following replication on damaged templates in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2006;281(39):28811-21.

Dougan DA, Mogk A, Zeth K, Turgay K, Bukau B. AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett.* 2002;529(1):6-10.

Dulbecco R. Reactivation of ultraviolet-inactivated bacteriophage by visible light. *Nature.* 1949;163: 949-50.

Eastmond PJ, Graham IA. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds Trends Plant Sci. 2001;6(2):72-8.

Eisen JA. Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. Curr Opin Genet Dev. 2000 Dec;10(6):606-11. Review.

Eisen JA, Hanawalt PC. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins and processes. Mutat Res. 1999;435:171-213.

Evinger M, Agabian N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. J Bacteriol. 1977 Oct;132(1):294-301.

Falnes PO, Johansen RF, Seeberg E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. Nature. 2002;419(6903):178-82.

Falnes PO. Repair of 3-methylthymine and 1-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins. Nucleic Acids Res. 2004 Dec 1;32(21):6260-7.

Felzenszwalb I, Boiteux S, Laval J. Molecular cloning and DNA sequencing of the radC gene of *Escherichia coli* K-12. Mutat Res. 1992 May;273(3):263-9.

Felzenszwalb I, Boiteux S, Laval J. Cloning of the *Escherichia coli* radC gene: identification of the RadC protein. Braz J Med Biol Res. 1993 Dec;26(12):1261-8.

Ferreira H, Butler-Cole B, Burgin A, Baker R, Sherratt DJ, Arciszewska LK. Functional analysis of the C-terminal domains of the site-specific recombinases XerC and XerD. J Mol Biol. 2003 Jun 27;330(1):15-27.

Fischer B, Rummel G, Aldridge P, Jenal U. The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. Mol Microbiol. 2002;44(2):461-78.

Foster PL. Stress responses and genetic variation in bacteria. Mutat Res. 2005;569(1-2):3-11. Review.

Friedberg EC. Correcting the Blueprint of Life: an historical account of the discovery of DNA repair mechanism. Washington, D.C.: CSHL Press, 1997.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. DNA repair and mutagenesis. 2th ed. Washington, D.C.: Am. Soc. Microbiol; 2006.

Fujii S, Fuchs RP. Defining the position of the switches between replicative and bypass DNA polymerases. *EMBO J*. 2004 Oct 27;23(21):4342-52.

Galhardo RS, Rocha RP, Marques MV, Menck CF. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*. 2005 May 10;33(8):2603-14.

Gerlach VL, Aravind L, Gotway G, Schultz RA, Koonin EV, Friedberg EC. Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Oct 12;96(21):11922-7.

Goley ED, Iniesta AA, Shapiro L. Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location. *J Cell Sci*. 2007 Oct 15;120(Pt 20):3501-7. Review.

Gomez-Gomez JM, Manfredi C, Alonso JC, Blazquez J. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biol*. 2007;5:14.

Goodman MF. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:17-50. Review.

Grünenfelder J, Zünd G, Stucki V, Hoerstrup SP, Kadner A, Schoeberlein A, Turina M. Heat shock protein upregulation lowers cytokine levels after ischemia and reperfusion. *Eur Surg Res*. 2001 Sep-Dec;33(5-6):383-7.

Grünenfelder B, Rummel G, Vohradsky J, Röder D, Langen H, Jenal U. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *PNAS*. 2001;98:4681-86

Grzesiuk E, Gozdek A, Tudek B. Contribution of *E. coli* AlkA, TagA glycosylases and UvrABC-excinuclease in MMS mutagenesis. *Mutat Res*. 2001 Sep 1;480-481:77-84.

Hallez R, Bellefontaine AF, Letesson JJ, De Bolle X. Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol*. 2004;12(8):361-5.

Haracska L, Yu SL, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase ϵ . *Nat Genet.* 2000;25(4):458-61.

Helling RB, Janes BK, Kimball H, Tran T, Bundesmann M, Check P, Phelan D, Miller C. Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2002;184(13):3699-703.

Hendrischk AK, Braatsch S, Glaeser J, Klug G. The *phrA* gene of *Rhodobacter sphaeroides* encodes a photolyase and is regulated by singlet oxygen and peroxide in a $\sigma(E)$ -dependent manner. *Microbiology.* 2007;153(Pt 6):1842-51.

Herr AJ, Atkins JF, Gesteland R. Coupling of open reading frames by translational bypass. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:343-72.

Hersh MN, Ponder RG, Hastings PJ, Rosenberg SM. Adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*: two pathways of genome adaptation under stress. *Res Microbiol.* 2004 Jun;155(5):352-9. Review.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:67-113. Review.

Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol.* 2001;152(3-4):205-10. Review.

Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. *Trends Genet.* 1993;9:173-77.

Hoffmann JS, Cazaux C. DNA synthesis, mismatch repair and cancer. *Int J Oncol.* 1998;12(2):377-82.

Hollaender A. History of radiation biology from a personal point of view. In: Simic MG, Grossman L, Upton AC. editors. *Mechanisms of DNA damage and Repair*. New York: Plenum Press; 1986.

Holtzendorff J, Reinhardt J, Viollier PH. Cell cycle control by oscillating regulatory proteins in *Caulobacter crescentus*. *Bioessays.* 2006 Apr;28(4):355-61. Review.

Hopfner KP, Tainer JA. DNA mismatch repair: the hands of a genome guardian. *Structure.* 2000 Dec 15;8(12):R237-41. Review.

Hottes AK, Shapiro L, McAdams HH. DnaA coordinates replication initiation and cell cycle transcription in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2005 Dec;58(5):1340-53.

Hu P, Brodie EL, Susuki Y, McAdams HH, Andersen GL. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*. 2005 Dec;187(24):8437-49.

Hu Y, Walker S. Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem Biol*. 2002;9(12):1287-96. Review.

Huang KJ, Ku CC, Lehman IR. Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jun 13;103(24):8995-9000.

Huang M, Graves LM. De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(2):321-36.

Hurley PJ, Bunz F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle*. 2007 Feb 1;6(4):414-7. Review.

Italiani VC, Zuleta LF, Marques MV. The transcription termination factor Rho is required for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2002;44(1):181-94.

Italiani VC. Identificação de genes envolvidos na resposta a estresses ambientais em *Caulobacter crescentus* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2001.

Ivancic-Bace I, Vlastic I, Salaj-Smic E, Brcic-Kostic K. Genetic evidence for the requirement of RecA loading activity in SOS induction after UV irradiation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2006;188(14):5024-32.

Jenal U, Stephens C. The *Caulobacter* cell cycle: timing, spatial organization and checkpoints. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Dec;5(6):558-63.

Jenal U. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(2):177-91. Review.

Jin H, Retallack DM, Stelman SJ, Hershberger CD, Ramseier T. Characterization of the SOS response of *Pseudomonas fluorescens* strain DC206 using whole-genome transcript analysis. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Apr;269(2):256-64.

Keller KL, Overbeck-Carrick TL, Beck DJ. Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat Res*. 2001 Jun 5;486(1):21-9.

Kelner A. Action spectra for photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* and *Streptomyces griseus*. *J Gen Phys*. 1949;34:835-852.

Kim SR, Maenhaut-Michel G, Yamada M, Yamamoto Y, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T, Ohmori H. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. 1: *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Dec 9;94(25):13792-7.

Kobayashi K, Karran P, Oda S, Yanaga K Involvement of mismatch repair in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Hum Cell*. 2005;18(3):103-15. Review.

Koller LR. Bactericidal effects of ultraviolet radiation produced by low pressure mercury vapor lamps. *J Appl Phys*. 1939;10:624-30.

Kooistra J, Haijema BJ, Venema G. The *Bacillus subtilis* *addAB* genes are fully functional in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1993 Mar;7(6):915-23.

Koshland DE. Molecule of the Year: The DNA repair enzyme, *Science*. 1994;266:1925.

Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1994 Sep;58(3):401-65. Review.

Kowalczykowski SC. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci*. 2000;(4):156-65.

Kristich CJ, Ordal GW. *Bacillus subtilis* CheD is a chemoreceptor modification enzyme required for chemotaxis. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12;277(28):25356-62. Epub 2002 May 13.

Krwawicz J, Arczewska KD, Speina E, Maciejewska A, Grzesiuk E. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Pol.* 2007;54(3):413-34. Epub 2007 Sep 24.

Küpfer PA, Crey-Desbiolles C, Leumann CJ. Trans-lesion synthesis and RNaseH activity by reverse transcriptases on a true abasic RNA template. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(20):6846-53. Epub 2007 Oct 11.

Kurihara T, Esaki N. Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: Occurrences, reaction mechanisms, and applications. *Chem Rec.* 2008;8(2):67-74.

Kuzminov A. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Dec;63(4):751-813, table of contents. Review.

Lehmann AR. New functions for Y family polymerases. *Mol Cell.* 2006;24(4):493-5. Review.

Lima-Bessa KM, Armelini MG, Chiganças V, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, Menck CF. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair (Amst).* 2008 Feb 1;7(2):303-12.

Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 1972;11:3610-18.

Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, Stair J, Wu L, Thompson DK, Xu D, Rogozin IB, Gaidamakova EK, Zhai M, Makarova KS, Doonin EV, Daly MJ. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *PNAS USA.* 2003; 100(7):4191-96.

Lovett ST. Connecting replication and recombination. *Mol Cell.* 2003 Mar;11(3):554-6. Review.

MacCarty, M. The Transforming principle: discovering that genes are made of DNA. New York: W.W. Norton; 1985.

Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, Novick RP, Barbe J, Penades JR. Beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2006;188(7):2726-9.

Manson MD, Blank V, Brade G, Higgins CF. Peptide chemotaxis in *E. coli* involves the Tap signal transducer and the dipeptide permease. *Nature*. 1986 May 15-21;321(6067):253-6.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21:361-70.

Martin ME, Brun YV. Coordinating development with the cell cycle in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3(6):589-95.

Martin IV, MacNeill SA. ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol*. 2002;3(4):REVIEWS3005.

Martins-Pinheiro M, Galhardo RS, Lage C, Lima-Bessa KM, Aires KA, Menck CF. Different patterns of evolution for duplicated DNA repair genes in bacteria of the Xanthomonadales group. *BMC Evol Biol*. 2004;27;4:29.

Martins-Pinheiro M, Marques RC, Menck CF. Genome analysis of DNA repair genes in the alpha proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *BMC Microbiol*. 2007 Mar 12;7:17.

Mascarenhas J, Sanchez H, Tadesse S, Kidane D, Krisnamurthy M, Alonso JC, Graumann PL. *Bacillus subtilis* SbcC protein plays an important role in DNA inter-strand cross-link repair. *BMC Mol Biol*. 2006 Jun 16;7:20.

Mathews CK. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J*. 2006;20(9):1300-14. Review.

Matsuda, T, Bebenek, K, Masutani, C, Hanaoka, F, Kunkel, T. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polimerase- α . *Nature*, 404: 1011-1013. 2000.

McCulloch SD, Kokoska RJ, Chilkova O, Welch CM, Johansson E, Burgers PM, Kunkel TA. Enzymatic switching for efficient and accurate translesion DNA replication. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(15):4665-75.

McGrath PT, Iniesta AA, Ryan KR, Shapiro L, McAdams HH. A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. *Cell*. 2006;124(3):535-47.

Mellon I, Spivak G, Hanawalt P.C. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*. 1987;51:241-49.

Mitchell DL, Nairn RS. The biology of the 6-4 photoproduct. *Photochem Photobiol*. 1989;49:805-19.

Mu D, Wakasugi M, Hsu D, Sancar A. Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease. *J Biol Chem*. 1997;272:28971-79.

Muller HJ. Induced mutations in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1941;9:151-67.

Napolitano R, Janel-Bintz R, Wagner J, Fuchs RP. Pivotal role of the beta-clamp in translesion DNA synthesis and mutagenesis in *E. coli* cells. *DNA Repair (Amst)*. 2002 Sep 4;1(9):703-8.

Narumi I, Satoh K, Cui S, Funayama T, Kitayama S, Watanabe H. PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Mol Microbiol*. 2004;54(1):278-85.

Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT, Paulsen IT, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Alley MR, Ohta N, Maddock JR, Potocka I, Nelson WC, Newton A, Stephens C, Phadke ND, Ely B, DeBoy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Kolonay JF, Smit J, Craven MB, Khouri H, Shetty J, Berry K, Utterback T, Tran K, Wolf A, Vamathevan J, Ermolaeva M, White O, Salzberg SL, Venter JC, Shapiro L, Fraser CM, Eisen J. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(7):4136-41.

Nikel PI, Pettinari MJ, Ramírez MC, Galvagno MA, Méndez BS. *Escherichia coli* *arcA* mutants: metabolic profile characterization of microaerobic cultures using glycerol as a carbon source. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;15(1):48-54.

Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):703-10.

O'Reilly EK, Kreuzer KN. Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004;186(21):7149-60.

Osteras M, Jenal U. Regulatory circuits in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol*. 2000; 3(2):171-6.

Panmanee W, Gomez F, Witte D, Vijay P, Britigan BE, Hassett DJ. The Peptidoglycan-Associated Lipoprotein, OprL, Helps Protect a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant Devoid of the Transactivator, OxyR, From Hydrogen Peroxide-Mediated Killing During Planktonic and Biofilm Culture. *J Bacteriol*. 2008 Feb 29 [Epub ahead of print].

Petit C, Sancar A. Nucleotide excision repair: from *E.coli* to man. *Biochimie*. 1999;81: 15-25.

Pettersen HS, Sundheim O, Gilljam KM, Slupphaug G, Krokan HE, Kavli B. Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(12):3879-92.

Pettijohn DE, Hanawalt PC. Evidence for repair replication of ultraviolet damage DNA in bacteria. *J Mol Biol*. 1964;9:395-410.

Postle K, Kadner RJ. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol*. 2003 Aug;49(4):869-82.

Potocka I, Thein M, ØSterås M, Jenal U, Alley MR. Degradation of a *Caulobacter* soluble cytoplasmic chemoreceptor is ClpX dependent. *J Bacteriol*. 2002 Dec;184(23):6635-41.

Poulsen P, Jensen KF. Three genes preceding *pyrE* on the *Escherichia coli* chromosome are essential for survival and normal cell morphology in stationary culture and at high temperature. *Res Microbiol*. 1991;142(2-3):283-8.

Quillardet P, Hofnung M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat Res*. 1985 Jun;147(3):65-78.

Radhakrishnan SK, Thanbichler M, Viollier PH. The dynamic interplay between a cell fate determinant and a lysozyme homolog drives the asymmetric division cycle of *Caulobacter crescentus*. *Genes Dev*. 2008 Jan 15;22(2):212-25.

Ramírez-Ramírez N, Mendoza-Díaz G, Pedraza-Reyes M. Degradation of Single Stranded Nucleic Acids by the Chemical Nuclease Activity of the Metal Complex [Cu(phen)(nal)]. *Bioinorg Chem Appl*. 2003;25-34.

Rand L, Hinds J, Springer B, Sander P, Buxton RS, Davis EO. The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. *Mol Microbiol*. 2003; 50(3):1031-42.

Rangarajan S, Woodgate R, Goodman MF. A phenotype for enigmatic DNA polymerase II: a pivotal role for pol II in replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Aug 3;96(16):9224-9.

Rasmussen RE, Painter RB. Evidence for repair of ultraviolet damaged deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells. *Nature*. 1964;203:1360-62.

Reisinger SJ, Huntwork S, Viollier PH, Ryan KR. DivL performs critical cell cycle functions in *Caulobacter crescentus* independent of kinase activity. *J Bacteriol*. 2007 Nov;189(22):8308-20.

Roca AI, Cox MM. RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1997;56:129-223.

Rowell EH, Smith JM, Wolfe A, Taylor BL. CheA, CheW, and CheY are required for chemotaxis to oxygen and sugars of the phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1995 Oct;177(20):6011-4.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sandigursky M, Franklin WA. Thermostable uracil-DNA glycosylase from *Thermotoga maritima* a member of a novel class of DNA repair enzymes. *Curr Biol*. 1999;9(10):531-4.

Sanger F, Niklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1977; 74:5463-67.

Satoh MS, Lindahl T. Enzymatic repair of oxidative DNA damage. *Cancer Res*. 1994 Apr 1;54(7 Suppl):1899s-1901s. Review.

Saveson CJ, Lovett ST. Tandem repeat recombination induced by replication fork defects in *Escherichia coli* requires a novel factor, RadC. *Genetics*. 1999 May;152(1):5-13.

Setlow RB, Carrier WL. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proc. Nat Acad Sci USA*. 1964;51: 226-31.

Setlow RB, Carrier WL. Identification of ultraviolet induced thymine dimers in DNA by absorbance measurements. *Photochem. Photobiol*. 1963;2:49-57.

Setlow RB, Stlow JK. Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1962;48:1250-57.

Shen CH, Chiang YC, Hsu CH, Yang MK. Identification and characterization of two *uvrA* genes of *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. *Mol Genet Genomics*. 2007 Feb;277(2):149-60.

Sixma TK DNA mismatch repair: MutS structures bound to mismatches. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(1):47-52.

Skerker MJ, Shapiro L. Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J*. 2000;19:3223-34.

Sutton M, Warwick P, Hall A, Jones C. Carbonate induced dissolution of uranium containing precipitates under cement leachate conditions. *J Environ Monit*. 1999 Apr;1(2):177-82.

Swanson RL, Rorey NJ, Doetsch PW, Robertson SJ. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol*. 1999;19:2929-35.

Thornalley PJ. Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 6):1343-8. Review.

Thresher RJ, Vitaterna MH, Miyamoto Y, Kazantsev A, Hsu DH, Petit C, Selby CP, Dawut L, Smithies O, Takahashi JS, Sancar A. Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science*. 1998;282:1490-94.

Tomii K, Kanehisa M. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res.* 1998;8(10):1048-59.

Tornaletti, S, Hanawalt, P.C. Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie.* 1999;81:139-46.

Trewick SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature.* 2002;419(6903):174-8.

Umezu K, Kolodner RD. Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem.* 1994 Nov 25;269(47):30005-13.

Van Dyk TK, Templeton LJ, Cantera KA, Sharpe PL, Sariaslani FS. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J Bacteriol.* 2004;186(21):7196-204.

Verhoeven EE, Wyman C, Moolenaar GF, Hoeijmakers JH, Goosen N. Architecture of nucleotide excision repair complexes: DNA is wrapped by UvrB before and after damage recognition. *EMBO J.* 2001 Feb 1;20(3):601-11.

Vidal LS, Santos LB, Lage C, Leitão AC. Enhanced sensitivity of *Escherichia coli* uvrB mutants to mitomycin C points to a UV-C distinct repair for DNA adducts. *Chem Res Toxicol.* 2006 Oct;19(10):1351-6.

Volkert MR, Landini P. Transcriptional responses to DNA damage. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Apr;4(2):178-85. Review.

Wilkinson A, DAY J, Bowater R. Bacterial DNA ligases. *Mol. Microbiol* 2001;40(6):1241-1248.

Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977 Nov;74(11):5088-90.

Yang H, Wolff E, Kim M, Diep A, Miller JH. Identification of mutator genes and mutational pathways in *Escherichia coli* using a multicopy cloning approach. *Mol Microbiol.* 2004;53(1):283-95.

Yang W. Poor base stacking at DNA lesions may initiate recognition by many repair proteins. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(6):654-66. Review.

Yoon H, Hong J, Ryu S. Effects of Chaperones on mRNA Stability and Gene Expression in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*. 2008 Feb;18(2):228-33.

Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbeck D, Petranovic M, Lindner AB, Radman M. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature*. 2006;443(7111):569-73.

Zhang YM, Liu JK, Wong TY. The DNA excision repair system of the highly radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* is facilitated by the pentose phosphate pathway. *Mol Microbiol*. 2003;48(5):1317-23.

Zhu H, Shuman S. Bacterial Nonhomologous End Joining Ligases Preferentially Seal Breaks with a 3'-OH Monoribonucleotide. *J Biol Chem*. 2008 Mar 28;283(13):8331-9.

Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol*. 1965 Mar;8(2):357-66.