Marinalva Martins Pinheiro

Busca por genes relacionados a fenótipos mutadores em *Caulobacter crescentus*

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

-2007-

RESUMO

A comparação “in silico” das vias de reparo de DNA nos genomas de *C. crescentus* e *E. coli* mostra diferenças significativas entre estas duas bactérias, sugerindo diversidade biológica das respostas a danos no DNA entre as bactérias. Como muito pouco é conhecido de reparo de DNA em *C. crescentus*, este trabalho tem relevância desde que fornece uma estrutura útil para estudos experimentais neste organismo.

Em busca de genes que possam proteger o genoma de *Caulobacter crescentus* contra mutações, foi feita uma varredura em uma biblioteca de cerca de 5000 clones construída a partir de inserção aleatória do transposon TN5 no genoma de *C. crescentus*. Foram selecionados clones com altas taxas de mutação espontânea que conferiam resistência a rifampicina. A maioria destes genes, não tinha sido ainda relacionada a fenótipo mutador, e pertencem a diversas categorias funcionais. Estas categorias funcionais incluem: proteínas hipotéticas, proteínas envolvidas em transporte e processos de sinalização celular. Mas, como esperado, nós também identificamos genes já conhecidos como relacionados a fenótipos mutadores. A Inserção única pelo Tn5 foi confirmada pela técnica de Southern Blot, garantindo que esta inserção específica é a responsável pelo fenótipo mutador. A complementação de alguns mutantes reforça esta premissa. Como parte da caracterização funcional, alguns candidatos foram investigados quanto ao tipo de mutação envolvida, baseando-se na sequência do gene *rpoB*, com o objetivo de indicar o processo mutacional sob condições genéticas específicas. E, finalmente, análises baseadas na medida da atividade promotora em fusão de transcrição com *lacZ*, mostra que o sistema SOS está alterado em alguns clones, e pode justificar parte da mutagênese em alguns deles.

Os resultados obtidos demonstram que esta estratégia de seleção é um instrumento de grande valor. Além disto, estes são os primeiros estudos de contribuição genômica dos mecanismos de mutagênese em uma proteobactéria alfa.

ABSTRACT

The “in silico” comparison of the main DNA repair genes between *C. crescentus* and *E. coli* shows significant differences between these bacteria, suggesting biological diversity in bacterial responses to DNA damage. And, as very little is known about DNA repair in *C. crescentus*, the relevance of this work is to provide a useful framework for further experimental studies in this organism.

To identify additional genes that may protect the *C. crescentus* genome against mutations we have screened the *C. crescentus* library of 5,000 clones mutated by random insertion of the Tn5 transposon in the genome. We performed a large scale screening for mutators, searching for clones with high levels of spontaneous rifampicin resistance mutations. These candidate clones were reevaluated after a second screening and the mutation rate defined for individual clones (targeted to the *rpoB* gene) and finally, they have been identified by DNA sequencing. The most of the genes identified have not been previously reported as related to mutator phenotype, and belong to several functional categories. These functional categories encode hypothetical proteins, proteins involved in transport and processes of cellular signaling. But, as expected, we have also identified proteins already known as causing mutator phenotypes when mutated. The unique insertion by Tn5 was verified by Southern Blot, suggesting that specific gene disruption was responsible for the mutator phenotype. Therefore, the complementation of some mutants reinforces this idea. We further present, as part of the functional characterization, some candidate clones were characterized based on *rpoB* gene sequences aiming at indicating the mutational process under specific genetic background conditions. Finally, analysis of some candidate clones based on measurements of promoter activity with *lacZ* transcriptional fusions show that the system SOS is modified in some clones and can justify part of mutagenesis in some of them. The results obtained here demonstrate this strategy of selection as extremely valuable tool and therefore, this will be, to our knowledge, the first genomic contributions study of the mechanisms of mutagenesis protection in an alpha proteo-bacterium.

1 Introdução

1.1 A estabilidade da molécula de DNA

A molécula de DNA possui quase toda informação necessária ao funcionamento de qualquer organismo, e sua estabilidade é imprescindível para a manutenção da vida. Para garantir esta estabilidade genética, os organismos contam com um mecanismo preciso e eficiente de replicação. A fidelidade desta replicação é assegurada por pelo menos quatro níveis de controle: enzimas que protegem o DNA da ação de agentes que o lesionam, evitando que estes ataquem a molécula; manutenção de um conjunto equilibrado de nucleotídeos para a polimerização; DNA polimerases juntamente com sua atividade auto-corretora; e várias vias de reparo de DNA que vão corrigir eventuais danos que persistirem nesta molécula (Miller, 2005). Este conjunto de ações garante uma taxa de mutação espontânea baixa nos microorganismos, e que é característica de cada um deles. Em *E. coli*, por exemplo, é da ordem de 10^{-10} mutações por par de bases por geração (Garibyan *et al.*, 2003).

1.2 A interação da molécula de DNA com o meio celular

A maior fonte de danos na molécula de DNA em organismos aeróbicos provém do seu próprio metabolismo. O oxigênio possibilitou uma produção eficiente de energia nestes organismos, mas em contrapartida, exigiu a seleção de mecanismos protetores contra a toxicidade desta molécula. Esta toxicidade se dá no processo de redução do oxigênio, quando são produzidas espécies intermediárias conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO). Embora certos derivados de ERO sejam importantes mensageiros intracelulares (Turpaev, 2002), estas espécies induzem danos na molécula de DNA. Estes incluem uma variedade de lesões em bases, perda de bases gerando os sítios abásicos, e quebras na fita de DNA (Para uma revisão geral, Friedberg *et al.*, 2006).

Para minimizar a ação destas espécies reativas, os organismos contam com pelo menos dois mecanismos antioxidantes, ou seja, que previnem a formação de lesões oxidativas: mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Os mecanismos não enzimáticos são compostos de removedores de radicais livres, seqüestradores de íons metal, entre outros. Os mecanismos enzimáticos constituem-se em agentes que cataliticamente removem os radicais livres e outras espécies reativas. Estes agentes são enzimas como a superóxido dismutase (SOD), peroxidases, catalases e redutases (Friedberg *et al.*, 2006). No entanto, a quantidade de ERO pode superar a capacidade desta maquinaria de remover estes agentes, levando ao que se conhece por estresse oxidativo. É esta condição de desequilíbrio redox que é capaz de induzir danos em DNA, lipídeos e proteínas (Karihtala e Soini, 2007).

É preciso considerar que, além da oxidação direta por ERO, o DNA também pode ser danificado por produtos gerados em consequência desses ERO, como aqueles resultantes da peroxidação lipídica. Além disto, a contínua interação com a água, com metabólitos intracelulares, intermediários de várias vias metabólicas, assim como a própria instabilidade química da molécula de DNA, contribuem para danos no DNA, com a geração dos produtos de desaminação de citosina, adenina e guanina, perda de bases e alquilação (De Bont e Van Larebeke, 2004).

1.3 Nucleotídeos como precursores do metabolismo de DNA

A molécula de DNA é uma seqüência de nucleotídeos que diferem apenas pelas bases que os compõem, as quais são chamadas purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina e timina). O emparelhamento destas bases na molécula de DNA segue normalmente a regra de Watson-Crick, em que uma adenina se emparelha com uma timina, e citosina com uma guanina. Se a composição de bases no DNA do organismo reflete a composição do seu conjunto de nucleotídeos, então este deve ser precisamente regulado. Um desequilíbrio pode levar a consequências genotóxicas graves para a célula, que vão desde o aumento

da mutagênese e recombinação, a anormalidades cromossômicas, quebra do DNA e morte celular (Mathews, 2006).

Em um contexto com excesso ou deficiência de um determinado nucleotídeo, o erro de replicação causado pelo mau emparelhamento de bases é o efeito mais significativo e imediato, verificado “in vitro”. A atividade de edição associada à polimerase também é comprometida, porque é incapaz de exercer sua função, já que o nucleotídeo em excesso se incorpora imediatamente antes que o mal emparelhamento seja corrigido (Miller, 2005). Logo, algo que interfira no metabolismo destes nucleotídeos ou na modificação deles pode levar à incorporação errônea, alterando a sequência de DNA original. Por isto, as concentrações intracelulares adequadas destes quatro nucleotídeos são asseguradas por diversos mecanismos. A regulação passa pelo controle do metabolismo e do catabolismo de nucleotídeos; por proteínas que degradam nucleotídeos modificados, evitando assim a sua incorporação na molécula de DNA, ou ainda, por enzimas que retiram aqueles nucleotídeos já incorporados na molécula.

Os nucleotídeos podem ser sintetizados através da via de novo ou via de salvação. A primeira começa com seus precursores metabólicos: aminoácido, ribose-5-fosfato, CO_2 e NH_3 . A via de salvação recicla as bases livres e nucleosídeos originados da quebra dos ácidos nucléicos (Lehninger *et al.*, 1993).

A reserva celular de nucleotídeos, ou “pool” de nucleotídeos, deve disponibilizar, em condições e quantidades adequadas, estes nucleotídeos que serão utilizados na síntese e no reparo de DNA. Entretanto, antes mesmo de sua incorporação no DNA, os nucleotídeos também podem sofrer danos via oxidação por ERO. E esta condição, que parece ser a principal responsável pela mutagenese aumentada em condições oxidativas (David *et al.*, 2007), transforma estes nucleotídeos em lesões pré-mutagênicas. E para evitar a utilização destes nucleotídeos modificados na replicação do DNA, existem mecanismos capazes de eliminá-los antes mesmo que possam ser incorporados no genoma da célula.

A lesão 8-oxoguanina (8-oxo-dGTP), considerada uma das mais importantes lesões oxidativas, é uma modificação do nucleotídeo guanina, que então adquire a capacidade de se emparelhar também com adenina, o que pode levar assim, a produção de um evento de transversão, G:C $\rightarrow$ T:A (David *et al.*, 2007). A proteína bacteriana MutT e seus homólogos agem hidrolisando 8-oxo-dGTP de volta a sua forma mono fosfatada, que não pode ser utilizada na polimerização (Friedberg *et al.*, 2006). A função desta proteína seria então de saneamento do conjunto de nucleotídeos, retirando da célula nucleotídeos cuja incorporação pode ser mutagênica (Mathews, 2006).

Em *E. coli*, outros componentes do sistema de prevenção de erros, ou sistema “GO”, previnem os efeitos mutagênicos gerados pela lesão 8-oxo-dGTP. Neste caso, os produtos dos genes *mutY* e *mutM*, DNA glicosilases, agem facilitando a retirada (MutY) ou retirando (MutM) esta lesão na molécula de DNA. MutY retira preferencialmente a adenina quando esta se encontra emparelhada com 8-oxo-dGTP, ainda que também seja capaz de retirar adenina emparelhada com C ou G (Friedberg *et al.*, 2006). Retirando adenina quando esta se encontra emparelhada com 8-oxo-dGTP, MutY permite que o emparelhamento C $\rightarrow$ 8-oxoguanina se restabeleça. MutM é a proteína que reconhece 8-oxo-dGTP, sendo responsável por excisar 8-oxo-dGTP quando esta se encontra emparelhada com C (Hamm *et al.*, 2007). Ou seja, estas duas proteínas agem cooperativamente para minimizar os efeitos mutagênicos da lesão 8-oxo-dGTP.

1.4 Polimerases

Contando com um conjunto equilibrado de nucleotídeos, no momento da replicação do DNA, quando uma fita é utilizada como molde, o emparelhamento ocorre de forma normal, como previsto pela regra de Watson-Crick. Uma violação desta regra, ou uma base lesada pode ainda ser reconhecida pelo sistema de verificação das polimerases. Para isto, as lesões que levam à modificação na seqüência de bases do DNA devem ser corrigidas antes do final da replicação, que antecede a divisão celular. As polimerases replicativas só inserem um novo

nucleotídeo na fita que está sendo sintetizada quando o último está corretamente emparelhado. Caso isto não ocorra, a atividade exonuclease associada a estas polimerases remove o último nucleotídeo da extremidade 3'OH livre para que um novo nucleotídeo seja inserido.

Ainda assim, alguns danos podem escapar dos mecanismos que regulam o conjunto de nucleotídeos ou, em última instância, do controle de qualidade feito pelas polimerases. Além disto, como já discutido, a molécula de DNA está constantemente exposta a agentes que podem levar a alteração de sua estrutura ou composição química. Assim, os organismos contam também com o auxílio dos mecanismos de reparo de DNA. Estes se constituem em uma linha de defesa altamente especializada que protege o organismo contra danos no material genético, evitando a incorporação de lesões, ou eliminando danos que não foram reconhecidos e corrigidos pelo sistema de verificação das polimerases. Caso estas lesões não sejam eliminadas, podem resultar em mutações, que são modificações permanentes e que podem ser herdadas pelas gerações seguintes. Algumas poucas mutações podem aumentar a variabilidade de uma espécie, mas na sua grande maioria impossibilita o bom funcionamento do organismo.

A célula desenvolveu mecanismos de remoção de danos que são específicos para cada tipo de dano, apesar de diferentes vias de reparo serem capazes de reparar o mesmo tipo de lesão (figura 1, legenda no verso da página). Os sistemas de reparo de DNA são universais entre os organismos e bem descritos em *E. coli*. São classificados em mecanismos diretos, por reverterem a lesão sem modificação intermediária da molécula de DNA, ou mecanismos de excisão de lesões, sendo a escolha de um ou outro tipo de mecanismo definida pelo tipo de lesão.

1.5 Sistemas gerais de reparo de DNA

1.5.1 Reparo Direto

Entende-se por mecanismo direto de reparo aquele que corrige o erro sem produzir modificações intermediárias na molécula, ou seja, o reparo é feito em uma única etapa. A fotorreativação é um exemplo deste tipo de reparo, e um dos primeiros mecanismos de reparo descritos. Ela reverte ou retira os danos causados por irradiação UV (luz ultravioleta) utilizando a luz visível (comprimento de onda 300-500 nm) como fonte de energia. Estas alterações químicas nas bases do DNA causam distorção na estrutura da molécula de DNA impedindo mecanismos básicos para a sobrevivência como a duplicação e transcrição de RNA (Tornaletti e Hanawalt, 1999). As enzimas fotoliasas de classe I reparam dímeros de pirimidina e as enzimas de classe II atuam sobre 6-4 fotoprodutos (Weber, 2005). Algumas bactérias apresentam genes da família das fotoliasas, mas muito similares a genes fotorreceptores de luz azul de plantas, sugerindo que podem não estar envolvidos em reparo (Thompson e Sancar, 2002).

Outro mecanismo de reparo direto é o processo de alquiltransferência. Os grupos alquil, que algumas vezes são ligados às bases do DNA, podem ser retirados por proteínas alquiltransferases (codificadas pelos genes *ada* e *ogt* em *E. coli*), por um mecanismo não enzimático suicida. 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 O⁶meG e O⁴meT, deixando as bases sem danos. Em caso de acúmulo de danos de alquilação, a região N-terminal da proteína Ada recebe um grupo metil, modifica-se conformacionalmente, tornando-se agora um regulador transcrricional do seu próprio promotor e do promotor do gene *alkA*, também capaz de reparar os danos de alquilação, agora por mecanismo diferente de reparo, a excisão de bases.

Por um terceiro mecanismo de reversão direta, a desmetilação oxidativa, a proteína AlkB processa a retirada de grupos metil de 1-metil adenina e 3-metil citosina, numa reação dependente de oxigênio, alfa-cetoglutarato e Fe (II). A

proteína AlkB é bem conservada nos organismos, com homólogos inclusive em humanos (Trewic *et al.*, 2002; Falnes *et al.*, 2002). Utilizando este mesmo mecanismo, as proteínas AlkB de bactérias e humanos são capazes de reparar também moléculas de RNA (Aas *et al.*, 2003; Falnes *et al.*, 2007).

1.5.2 Reparo por excisão

O reparo por excisão compreende diferentes mecanismos, cada um deles envolvendo um conjunto específico de enzimas, mas todos possuem etapas em comum tais como: reconhecimento e retirada da parte danificada, deixando uma falha na fita de DNA; preenchimento desta falha por uma DNA polimerase, e a ligação desta sequência recentemente polimerizada por uma DNA ligase, terminando a restauração.

A - Reparo por excisão de bases - BER

Pequenas alterações de bases são preferencialmente reparadas pelo reparo BER que envolve um grande número de enzimas chamadas glicosilases (em *E. coli* codificadas pelos genes *alkA*, *fpg*, *mutY*, *nei*, *nth*, *tag* e *udg*). Estas enzimas são específicas para cada tipo de base alterada. Elas reconhecem e retiram a base lesada ou inapropriada deixando o esqueleto desoxirribose fosfato. Este sítio apirimidínico (AP) é retirado por endonucleases que ainda deixam um resíduo desoxirribose terminal 5'fosfato. Este resíduo restante de açúcar fosfato então é retirado por uma exonuclease gerando uma falha de um nucleotídeo. Outra possibilidade é que este sítio AP pode ainda ser clivado a 3'por uma atividade AP liase de algumas glicosilases que por β -eliminação geram 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 (Lindahl e Wood, 1999).

B - Reparo por excisão de nucleotídeos - NER

O reparo NER utiliza endonucleases mais genéricas que retiram as bases danificadas como nucleotídeos intactos, em vez de bases livres como no BER. As endonucleases envolvidas no reparo NER clivam as extremidades da região do DNA com lesão e estas incisões são localizadas em distâncias precisas da base danificada. Como em BER, leva a formação de uma falha no DNA dupla fita. A falha, de aproximadamente 15 nucleotídeos em bactérias, é preenchida por uma DNA polimerase que utiliza a fita não lesada como molde e este fragmento é ligado à fita por uma ligase (Lindahl e Wood, 1999).

Em *E. coli*, o reconhecimento da lesão é feito pelo complexo UvA₂B que libera UvrB na lesão. Após a saída de UvrA₂, UvrC se complexa com UvrB, e o DNA é clivado no quarto ou quinto nucleotídeo a 3' da lesão, e no sétimo nucleotídeo a 5' da lesão. Os sítios catalíticos para as incisões a 3' e 5' se encontram na endonuclease UvrC (Truglio *et al.*, 2006).

C - Reparo de bases mal emparelhadas ("Mismatch repair" - MMR)

O emparelhamento incorreto 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 polimerases, entra em ação o sistema MMR.

Presente em quase todos os organismos, ele reconhece o emparelhamento incorreto na forma de distorção da dupla hélice. Em *E. coli*, o sinal que permite a discriminação da fita recém-sintetizada é a metilação da adenina nos sítios GATC. Esta metilação ocorre somente um intervalo de tempo após a polimerização. Desta forma, as enzimas de correção reconhecem a fita não metilada temporariamente como a fita filha, dando início rapidamente à excisão da base incorreta. São 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 os envolvidos neste processo em *E. coli*.

O sítio contendo a lesão é reconhecido por um dímero de MutS que se estabiliza junto à fita de DNA com a aproximação de MutL. Quando o complexo MutL-MutS associado ao DNA se desloca até o sinal de discriminação, que é um sítio GATC hemi-metilado mais próximo da base mal-emparelhada associado a MutH, a atividade endonuclease de MutH é acionada. O trecho que contém a base mal emparelhada na fita recém sintetizada fica à frente da incisão feita por MutH, e é excluído por uma exonuclease na presença de helicases e ressintetizado pela polimerase III, com auxílio da proteína de ligação ao DNA fita simples (SSB) e ligases (Sixma, 2001).

O sistema de reparo de bases mal emparelhadas é um exemplo de via de reparo bem caracterizada em *E. coli*, mas que não se apresenta idêntico na maioria das bactérias. Os genes *mutH*, *mutL* e *mutS* são componentes essenciais para este tipo de reparo em *E. coli*, porém na maioria das bactérias onde este sistema está presente homólogos do gene *mutH* não são encontrados.

A proteína codificada por *mutH* em *E. coli* tem a função de endonuclease na região próxima do emparelhamento errôneo, e utiliza a metilação como sinalização. A ausência do gene *mutH*, na maioria das bactérias, correlaciona bem com a ausência do gene homólogo a *dam*, que normalmente realiza a metilação e sinalização para reparo de DNA mal emparelhado em *E. coli*. Isto pode implicar na existência de um sistema diferente para direcionar a ação deste tipo de reparo em bactérias e humanos onde se encontra ausente o gene *mutH*. Logo, podem existir outras enzimas ainda não descritas que realizam a função destas proteínas. Algumas vezes também encontramos *mutH* na ausência do gene *dam* (Sixma, 2001; Hsieh, 2001). A endonuclease Vsr é responsável por cortar 5' do nucleotídeo timidina quando este se encontra emparelhado erroneamente com guanina, e é estimulada por MutL em *E. coli* (Monastiriakos *et al.*, 2004).

1.5.3 Reparo recombinacional

Trata-se de um mecanismo complexo de reparo envolvendo várias vias alternativas para cada passo da recombinação. Em *E. coli* o reparo recombinacional corrige principalmente duplas quebras de DNA e lacunas em fitas simples. O primeiro dano surge em decorrência direta de agentes externos, e o segundo é consequência da interrupção da replicação e retomada em um ponto adiante, deixando uma lacuna na fita recém sintetizada.

O primeiro passo da recombinação, chamado de iniciação, processa estas lesões para que a proteína RecA possa mediar a recombinação. Este processamento inclui atividade de exonucleases de fita simples e dupla, endonucleases, ATPases e helicases. Existem pelo menos quatro vias para o início de recombinação em *E. coli*; são elas: via RecBCD, RecET, RecF e SbcBCD. Uma outra via, funcionalmente equivalente a RecBCD, tem sido verificada em algumas bactérias, e é chamada de AddAB (Rocha *et al.*, 2005).

No passo seguinte, ocorre o emparelhamento e troca entre as fitas homólogas com a participação de varias proteínas. A extensão da heteroduplex ocorre no terceiro passo, e no quarto, e último passo, chamado de resolução, tem a movimentação e migração das fitas, agora sem quebras ou lacunas, ou seja, a finalização da recombinação (Kowalczykowaski, 2000; Smith, 2004).

O reparo de dupla quebra tem fundamental importância para a sobrevivência do organismo. Uma segunda via que contribui para lidar com estas lesões utiliza um reparo recombinacional não homólogo, ou NHEJ de “non-homologous end-joining”. Produtos gênicos, similares às proteínas Ku que participa desta via em eucariotos, foram identificados recentemente em várias espécies bacterianas. No entanto, a contribuição de uma ou outra via varia entre as espécies (Bowater e Doherty, 2006; Sonoda, 2006).

1.5.4 Sistema SOS

O regulon SOS é um conjunto de respostas fisiológicas que é dada a uma variedade de agentes danificadores de DNA. Neste sistema, quando o DNA é lesado, pelo menos 30 genes são induzidos, incluindo genes das vias de reparo como o NER (Courcelle *et al.*, 2001). 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 inativar o repressor LexA. Com a saída de LexA dos promotores, os genes SOS são expressos.

Estas respostas que são normalmente induzidas em condições de estresse, com o objetivo de garantir a sobrevivência podem freqüentemente levar ao aumento da mutagênese. E este aumento de mutação decorre da expressão de polimerases de baixa fidelidade durante esta resposta (Nohmi, 2006).

1.6 Vias alternativas de mutagênese

1.6.1 Tolerância à lesão

Todo este conjunto de ações dedicado a impedir que danos sejam incorporados no genoma nem sempre evita que mutações decorrentes das lesões sejam persistentes no DNA durante a replicação, levando à formação de mutações. Estas mutações são chamadas espontâneas quando ocorrem na ausência de um agente exógeno que danifique o DNA, e induzidas, quando causadas por agentes físico-químicos denominados mutagênicos.

Normalmente, como descrito acima, os organismos têm mecanismos que garantem a duplicação de seu genoma com grande fidelidade, mesmo na presença de um grande número de danos nesta molécula. Contribuem para isto as polimerases, enzimas que estão envolvidas em reparo e replicação. Estas

polimerases têm alta precisão e são bloqueadas quando encontram uma lesão na fita molde, e esta parada da replicação compromete a sobrevivência da célula se não for retomada. No entanto, algumas vezes as células conseguem sobreviver a esta lesão e a replicação pode continuar, ou seja, aqui a lesão presente na fita molde é ignorada para garantir a sobrevivência da célula. Entre os mecanismos que lidam com as conseqüências deste dano incorporado no DNA estão os mecanismos de tolerância à lesão (Jarosz *et al.*, 2007).

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. Ou seja, enquanto o reparo pressupõe a restauração da seqüência de DNA normal, os sistemas de tolerância permitem o aumento da sobrevivência em detrimento de uma replicação eficiente. A tolerância à lesão, na verdade, diminui a conseqüência 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”) (para uma revisão, 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 a 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-oxodGTP 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 super-família, elas têm mecanismos diferentes. Enquanto UmuC-UmuD se comporta como polimerase de síntese de translesão, DinP insere mutações sem necessidade de uma fita molde com erro (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 depender 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 patógenos, já que eles 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, ou seja, intencionalmente. 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).

1.7 Reparo e mutação – um equilíbrio de forças

O fato dos organismos possuírem taxas tão baixas de mutação, leva a crer que a seleção natural favorece esta condição. Ou seja, a variação genética que a mutação insere é necessária para o aumento da adaptabilidade dos organismos em

Presente em ambientes aquáticos, e solos pobres em nutrientes, conta com um grande número de genes envolvidos na percepção e resposta aos substratos ambientais. Suas células também apresentam diferenças estruturais, sendo uma móvel por um flagelo onde não ocorre replicação de DNA, e uma sésil, chamada célula talo. Esta última se apresenta em contínuo brotamento no pólo oposto ao talo, dando origem a uma célula flagelar a cada divisão (Osteras e Jenal, 2000) (Figura 2).

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 possibilita a exploração de um grande número de dados. Bender (1984) descreve a reativação de bacteriófagos em bactérias *C. crescentus* expostas a 5 e 10 J/m² de UV. Este resultado indica a existência de respostas SOS nesta bactéria, de acordo com a identificação dos genes *recA* e *lexA* (Friedberg *et al.*, 2006) 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 fotoliasas nesta bactéria (Martins-Pinheiro *et al.*, 2007), e que podem desempenhar essa função. Em um mutante para o gene *alkB* foi mostrada alta sensibilidade ao agente alquilante metil metanosulfonado (MMS) e expressão diferenciada nos dois tipos celulares 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 microorganismo (Hu *et al.*, 2005). Finalmente, a caracterização do operon *imuAB dnaE2*, indicando seu envolvimento em mutagênese induzida por danos no DNA, e que está sob o controle do regulon SOS. Todavia, no mesmo trabalho, é verificada que outra polimerase de síntese de

certas condições, mas a mutação é mais deletéria que benéfica. As baixas taxas de mutações verificadas inclusive em organismos que vivem em condições extremas de sobrevivência (Sniegowski, 2001), e a existência de vários mecanismos de reparo de DNA nos organismos, sugerem fortemente que os danos no DNA precisam ser predominantemente evitados.

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 muito proximamente relacionados, como pode ser visto em três patógenos de plantas (*Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris* e *Xylella fastidiosa*) do mesmo grupo das Xanthomonadales (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 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 *Deinococcus radiodurans*, o mais conhecido organismo capaz de sobreviver a condições extremas de dissecação e radiação ionizante, a indução da via Embden-Meyerhof Parms (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). Além disso, 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). Recentemente, foi observado que, os genes envolvidos no mecanismo de fotorreativação são regulados por oxigênio

singlete e peróxido de hidrogênio em *Rhodobacter* (Hendrischk *et al.*, 2007). E, como homólogos do sigma, anti-sigma, e fotoliase, envolvidos neste processo em *Rhodobacter*, estão lado a lado no genoma de *C. crescentus*, sugerindo a constituição de operon, é provável que processo similar deve ocorrer 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 intrincado conjunto de ações que se unem para proteger o DNA de agressões (Kobayashi *et al.*, 2005; Yang, 2006).

1.8 O reparo de DNA em *Caulobacter crescentus*

A bactéria *Escherichia coli* continua sendo o microorganismo mais extensivamente estudado em todos os aspectos biológicos, e quando se fala de reparo de DNA, é ele também o modelo mais conhecido. No entanto, com a crescente disponibilidade de genomas completamente sequenciados, o que se verifica é que apesar da grande conservação e similaridade dos genes de reparo nos organismos, muitos dos genes de reparo de DNA de *E. coli* são compartilhados por poucas bactérias, levando ao questionamento da uniformidade funcional dessas vias de reparo. Alguns mecanismos de reparo não podem ser explicados da mesma maneira que em *E. coli*, necessitando, desta forma, a busca por novos modelos para compreensão destas diferenças entre os microorganismos. A determinação de seqüências completas de genomas tem facilitado e aberto novas perspectivas em várias áreas do conhecimento biológico, inclusive reparo de DNA.

C. crescentus trata-se de uma bactéria do 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).

Figura 2 - Representação esquemática do ciclo celular de *C. crescentus*. *C. crescentus* se divide assimetricamente, gerando células com programas de desenvolvimento e comportamentos diferentes. A orientação da progressão do ciclo está indicada por setas. A célula móvel não replica o seu DNA até se diferenciar em uma célula sésil, enquanto nesta a duplicação do DNA na célula é imediato e dá início a um novo ciclo de divisão celular. O ciclo celular de *C. crescentus* é dividido em três fases distintas: A fase **G1** que inclui o estágio móvel e o estágio de transição para a célula talo (sésil); A fase **S** define o período de replicação cromossômica; A fase **G2** inclui a citocinese e estágios de divisão celular (modificado de Jenal, 2000).

translesão, DinP, não é controlada pela resposta SOS nesta bactéria, o que sugere uma diferente via regulatória para este gene in *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).

A disponibilidade de uma biblioteca de mutantes de *C. crescentus*, com o transposon Tn5 inserido aleatoriamente (Italiani *et al.*, 2002), torna possível esta investigação e abre grandes perspectivas na área de mutagênese e reparo de DNA, através da utilização de um novo modelo bacteriano, de fácil manipulação e 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 em *E. coli*, mas presentes em outras bactérias. Neste trabalho pretendemos investigar melhor as vias de reparo de DNA no modelo de bactéria *C. crescentus*, e, empregando essa biblioteca de mutantes, identificar genes cuja perda de função resulte no fenótipo mutador.

A busca por genes de reparo de DNA e/ou envolvidos na proteção do DNA pode ajudar a entender processos básicos ou até mesmo elucidar passos dos diferentes sistemas de reparo de DNA ou das vias mutadoras. Tem sido demonstrado em pesquisas recentes que falhas no sistema MMR, que tem papel importante na estabilidade genômica, podem levar a um aumento da variabilidade genética, e esta estaria associada com patogenicidade e resistência a antibióticos em bactérias (Bjorkholm *et al.*, 2001; O'Neill e Chopra, 2002; Bethke *et al.*, 2007). Estes aspectos seriam favorecidos pela capacidade de uma determinada espécie escapar do sistema de defesa do organismo hospedeiro ou ainda ser capaz de ocupar um novo nicho. Isto se deveria tanto a capacidade deste mutador gerar mais mutações, como a inativação deste sistema de reparo aumentaria a

freqüência de recombinação entre seqüências não idênticas de DNA, o que por sua vez facilitaria a incorporação de elementos móveis através de eventos conhecidos como transferência genética lateral (Picard *et al.*, 2001). Nestes eventos, genes são transferidos entre grupos de organismos, não obrigatoriamente relacionados filogeneticamente (Chen *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2007), o que pode incluir as ilhas de patogenicidade.

Não podemos também deixar de salientar a importância da possível extrapolação do conhecimento de microorganismos 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. E como existe uma correlação direta entre mutagênese e carcinogênese, a descoberta de genes homólogos humanos a genes bacterianos que causam um fenótipo mutador pode contribuir para relação e compreensão de origem de certos tipos de câncer. Sabe-se, por exemplo, que falhas no sistema de reparo “mismatch”, que levam a formação de mutações, são relacionadas à presença de alguns cânceres em humanos (Harfe *et al.*, 2000, Okochi *et al.*, 2002; Miturski *et al.*, 2002).

1.9 Os mutadores, vias de reparo e mutagênese

O isolamento e caracterização de mutantes é uma estratégia que foi, e ainda é, imprescindível para estudos genéticos bacterianos, e muito do que conhecemos de reparo foi descrito através de estudos com mutadores. Os mutadores se definem como aquelas células que possuem alta incidência de mutação espontânea em relação à célula selvagem, e têm a vantagem de gerar fenótipos diversos mais rapidamente que as células normais, o que permite a sua pronta seleção. Os primeiros mutadores espontâneos foram reconhecidos em *Drosophila* no início dos anos 1940 (Plough, 1941), e só nos anos 1950 em bactérias (Treffers *et al.*, 1954).

Os mutadores têm ajudado a desvendar diversas vias de reparo e mutagênese em bactérias, e com a descoberta de homólogos bacterianos em

podem existir estratégias diferentes de reparo de DNA em *C. crescentus* e outras bactérias relacionadas.

Na segunda parte do 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 mutadores. A perspectiva foi de que esses clones possibilitariam a identificação de genes ainda não caracterizados, mas envolvidos em processos de mutagênese espontânea. O transposon Tn5 utilizado para a mutagênese carrega uma marca de resistência ao antibiótico canamicina, o que facilita a seleção dos mutantes. Além disto, ele preferencialmente se insere uma única vez no genoma (Berg e Berg, 1983). De fato, vários clones mutadores foram selecionados, e os genes mutados identificados por sequenciamento a partir do Tn5, o que possibilitou a identificação da posição exata da inserção do transposon. Entre os genes identificados, vários apresentam homólogos que participam em vias reconhecidamente envolvidas em processos de mutagênese, enquanto outros são descritos pela primeira vez com esse fenótipo mutador. Acreditamos que este trabalho, portanto, contribui para ampliar nosso conhecimento dos processos celulares envolvidos em mutagênese.

5 Conclusões

Os resultados obtidos até aqui, em escala genômica, trazem informações pioneiras sobre potenciais funções gênicas em *C. crescentus*, e contribuem para a compreensão dos mecanismos de manutenção da estabilidade genômica nesta bactéria, e em bactérias do grupo das proteobactérias alpha. Além disto, esses dados abrem perspectivas para trabalhos que possam caracterizar individualmente mutantes em genes de interesse. A tabela 18 abaixo resume os principais resultados de fenótipos dos clones selecionados. Nessa tabela apresentamos também, dados obtidos pela doutoranda Regina C. P. Marques (comunicação pessoal), relacionando sensibilidade de vários desses clones a agentes genotóxicos. Essas observações reforçam o envolvimento desses genes em processos de manutenção da estabilidade do genoma de *C. crescentus*. De um modo geral este trabalho permite concluir que:

- Mesmo que muito similares, a comparação das vias de reparo de DNA nos genomas de *C. crescentus* e *E. coli* mostra diferenças significativas entre as duas bactérias, reforçando a necessidade de investigação em novos modelos. E, embora a maioria das inferências “in silico” precisem ser confirmadas e testadas experimentalmente, este trabalho gera um perfil dos genes responsáveis pela manutenção da estabilidade genômica de *C. crescentus*.

- Os principais genes relacionados às vias BER e NER, incluindo o reparo acoplado a transcrição, são detectados em *C. crescentus*, bem como muitos dos genes do reparo recombinacional. Como em *E. coli*, um regulon SOS é encontrado em *C. crescentus*, desde que os principais genes (*recA* e o repressor *lexA*) são identificados, embora a mutagênese induzida esteja relacionada a mecanismo diferente daquele encontrado em *E. coli* (Galhardo *et al*, 2005). *C. crescentus* apresenta também algumas duplicações gênicas não idênticas que incluem ligases, a principal subunidade da polimerase III, exonuclease III e alquiltransferases.

humanos, e a relação deles com a incidência de certos tipos de câncer, tem aumentado o interesse por estes. Mutadores já revelaram a importância do gene *dnaQ* que codifica para a subunidade epsilon da polimerase III de *E. coli*; dos principais componentes da via de reparo de bases mal emparelhadas em *E. coli*; vias que previnem danos oxidativos no DNA, bem como vias ainda não bem compreendidas que levam a um aumento da frequência de mutação (Miller, 1996; Miller, 2005).

Inicialmente, os mutadores eram reconhecidos por reversão de marcas auxotróficas, ou uma aumentada resistência a antibióticos. Em seguida, o uso de corante facilitou o estudo com a técnica de identificação de micro-colônias conhecidas como papilas. Estas surgem, quando os nutrientes, necessários ao crescimento de uma determinada colônia se esgota, e estes mutantes (papilas) podem crescer neste meio que resta e que não é suficiente para a colônia principal (revisado em Miller, 1996).

Nos estudos pioneiros, nas décadas de 50 a 60, o estudo destes mutantes dependia do surgimento de mutantes espontâneos ou induzidos na população, mas posteriormente o direcionamento de mutagênese foi utilizado como ferramenta mais efetiva. De fato, a possibilidade de criar o mutante de interesse permitiu definir muito mais rapidamente o papel do gene mutado no metabolismo celular. Esta mutagênese, pode também ser feita por transposons (Hayes, 2003; Reznikoff, 2006). Mas, sem dúvida, todas estas técnicas sofreram um grande impulso com a era genômica, implicando na investigação de um grande número de genes ao mesmo tempo, e que permitem comparação direta com outros genomas.

Na primeira parte deste trabalho é feita uma busca “in silico” pela presença de genes envolvidos no reparo de DNA no genoma de *C. crescentus*. Como muito pouco é conhecido de reparo de DNA nesta bactéria, esta análise comparativa pode servir de base para investigação destes prováveis genes e vias de reparo em *C. crescentus*. Além disto, muitas das previsões geradas através desta análise, contribuíram para identificar duplicações e modificações gênicas, mostrando que

Estruturas gênicas interessantes foram identificadas para alquiltransferases, uma das quais é até então, exclusiva de *C. crescentus*;

- Identificação de 31 clones com fenótipo mutador. Destes, 11 têm mutações em genes cujas funções estão relacionadas diretamente com reparo de DNA ou síntese de nucleotídeos, duas categorias sabidamente mutagênicas. Porém, os dados apresentados são, até o presente momento, os primeiros obtidos para esses genes relacionados à proteção do material genético desta bactéria;

- A identificação de mutantes em genes envolvidos em sistemas de reparo de DNA já bem definidos em *E. coli*, como o reparo “mismatch” não só valida a nossa estratégia de seleção, como fornece a primeira evidência experimental de função desse sistema em *C. crescentus*;

- Entre os outros clones selecionados diversas categorias funcionais parecem estar envolvidas em processos de proteção à mutagênese. As principais categorias incluem proteínas envolvidas em transporte, degradação protéica, transdução de sinal e metabolismo energético. A maioria destes genes não tinha sido, ainda, relacionados a fenótipo mutador;

- Vários dos clones obtidos (14) apresentam alta mutagenicidade provavelmente resultado de uma condição do regulon SOS constitutiva provocada pela mutação.

Tabela 18 - Aspectos analisados nos mutadores selecionados. **A** - Em alguns casos (*), os genes são considerados ortólogos em humanos. **B** - Presença (+) de parálogos no genoma de *C. crescentus*. **C** - NR - experimentos não realizados; (-) SOS não aumentado; (-*) testes preliminares; (+) - SOS em uma condição induzida em níveis significativamente acima do controle. **D** - Sensibilidade aos agentes genotóxicos indicados, segundo caracterização pelo próprio grupo (Regina CP Marques, comunicação pessoal).

Gene mutado (Clone)	Similaridade ^A com genes humanos	Parálogo ^B	SOS constitutivo ^C	Caracterização funcional em <i>C. crescentus</i> ^D
CC0012 - <i>mutS</i> (47-2B)	+	.	-*	
CC0105 - <i>pyrF</i> (49-9C)	.	.	-	-
CC0204 - <i>kefC</i> (40-12F)	+	.	+	-
CC0254 - <i>rarD</i> (41-9E)	.	.	NR	
CC0377 - <i>mutY</i> (44-2A)	+	.	-*	MMS
CC0629 - histid.quinase(23-11G)	.	+	-	UV, MMS
CC0649 - peptidases (28-9G)	.	.	+	-
CC0695 - <i>mutL</i> (34-2B)	+	.	NR	-
CC1062 - histid.quinase(47-8H)	.	+	+	-
CC1222 - met. energético (P11-9D)	.	.	++	-
CC1278 - oxidoreductase (37-11G)	+	+	+	UV
CC1283 - <i>ruvB</i> -like (34-6C)	+	+	+	UV
CC1509 -2-keto-4-pentenoato hidratase (33-9H)	.	.	-*	UV
CC1528 - <i>uvrD</i>	-	-	NR	Mitomicina C, UV e H ₂ O ₂
CC1591 - <i>Kdpa</i> (18-7G)	.	.	NR	UV
CC1680 - <i>gmk</i> a jusante (P1-8C)	.	.	-	UV
CC1733 - Aas bifuncional(36-10F)	+	.	+	-
CC1765 - <i>aceB</i> (P1-10H)	.	.	-*	-
CC2084 - <i>udg</i> (CC2084)	+	+	+	UV, MMS
CC2278 - met. energético (22-5H)	.	.	-*	MMS
CC2444 - <i>pyrC</i> (P1-2E)	+	.	-	UV
CC2471 - met. nucleotídeos a jusante (39-9A)	+	.	+	-
CC2793 - amino oxidase (33-1D)	.	+	+	-
CC2812 - mand. racemase (43-7B)	.	.	NR	MMS
CC2916 - hipotética (13-10E)	.	.	+	-
CC3013 - TonB-depend.(25-7H)	.	.	-	-
CC3155 - <i>cheyIII</i> (11-9C)	.	+	+	UV
CC3337 - peptidase (10-11H)	+	+	+	-
CC3694 - ABC transp.(17-9H)	.	.	-*	UV
CC3729 - <i>ada</i> (46-11C)	.	+	+	MMS
CC3754 - <i>gidB</i> (28-8E)	.	.	+	-

6 Referências bibliográficas

Aas PA, Otterlei M, Falnes PO, Vagbo CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjoras M, Slupphaug G, Seeberg E, Krokan HE. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*. 2003;421(6925):859-63.

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

Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, Katyal S, Clements PM, McKinnon PJ, Caldecott KW, West SC. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*. 2006;443(7112):713-6.

Allen PN, Noller HF. A single base substitution in 16S ribosomal RNA suppresses streptomycin dependence and increases the frequency of translational errors. *Cell*. 1991;12;66(1):141-8.

Alley MR, Gomes SL, Alexander W, Shapiro L. Genetic analysis of a temporally transcribed chemotaxis gene cluster in *Caulobacter crescentus*. *Genetics*. 1991;129(2):333-41.

Altschul, S.F *et al*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*; 1997; 25, 3389-3402.

Aono S, Hartsch T, Schulze-Gahmen U: Crystallization of a member of the recFOR DNA repair pathway, RecO, with and without bound oligonucleotide. *Acta Crystallogr*. 2003, D 59: 576-57.

Aravind L, Walker DR, Koonin EV. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27:1223-1242

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.

Bacher JM, Schimmel P. An editing-defective aminoacyl-tRNA synthetase is mutagenic in aging bacteria via the SOS response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(6):1907-12.

Bakker EP. Cell K⁺ and K⁺ transport systems in prokaryotes. In: E. P. Bakker (ed.), *Alkali cation transport systems in prokaryotes*. Boca Raton, Fla :CRC Press; 1192.p. 205-224.

Balashov S, Humayun MZ. *Escherichia coli* cells bearing a ribosomal ambiguity mutation in rpsD have a mutator phenotype that correlates with increased mistranslation. *J Bacteriol.* 2003;185(16):5015-8.

Balashov S, Humayun MZ. Specificity of spontaneous mutations induced in mutA mutator cells. *Mutat Res.* 2004;548(1-2):9-18.

Beck BJ, Huelsmeyer M, Paul S, Downs DM. A mutation in the essential gene gmk (encoding guanlyate kinase) generates a requirement for adenine at low temperature in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 2003;185(22):6732-5.

Bell GD, Grogan DW. Loss of genetic accuracy in mutants of the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Archaea*. 2002;1(1):45-52.

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

Berg, DE and Berg, CM. The prokaryotic transposable element TN5. *Biotechnology* 1983;1, 417-435.

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.

Bethke L, Thomas S, Walker K, Lakhia R, Rangarajan R, Wirth D. The role of DNA mismatch repair in generating genetic diversity and drug resistance in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*. 2007.

Birren B, Green ED, Klapholz S, Myes RM, Roscanis J. *Genome Analysis-Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14607-12.

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 U S A*. 1997;94(7):3290-5.

Booth IR, Ferguson GP, Miller S, Li C, Gunasekera B, Kinghorn S. Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 6):1406-8. Review

Bowater R, Doherty AJ. Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet.* 2006;2(2):e8. Review.

Brégeon D, Colot V, Radman M, Taddei F. Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes Dev.* 2001;15(17):2295-306.

Brenner C. Hint, Fhit, and GalT: Function, Structure, Evolution, and Mechanism of Three Branches of the Histidine Triad Superfamily of Nucleotide Hydrolases and Transferases. *Biochemistry.* 2002; 41(29) pp 9003 – 9014.

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

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.

Caruthers JM, McKay DB. Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12(1):123-33.

Chaitidis P, Billett EE, O'Donnell VB, Fajardo AB, Fitzgerald J, Kuban RJ, Ungethuem U, Kuhn H. Th2 response of human peripheral monocytes involves isoform-specific induction of monoamine oxidase-A. *J Immunol.* 2004;173(8):4821-7.

Chao EC, Lipkin SM. Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(3):840-52.

Chatterjee DK, Bourquin AW. Metabolism of aromatic compounds by *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 1987;169(5):1993-6.

Chen I, Christie PJ, Dubnau D. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science.* 2005;310(5753):1456-60.

Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(9):2260.

Chopra I, O'Neill AJ, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat.* 2003;6(3):137-45.

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

Colussi C, Parlanti E, Degan P, Aquilina G, Barnes D, Macpherson P, Karran P, Crescenzi M, Dogliotti E, Bignami M. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol.* 2002;12(11):912-8.

Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics.* 2001;158(1):41-64.

Da Re S, Tolstykh T, Wolanin PM, Stock JB. Genetic analysis of response regulator activation in bacterial chemotaxis suggests an intermolecular mechanism. *Protein Sci.* 2002;(11):2644-54.

Dassler T, Maier T, Winterhalter C, Bock A. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol Microbiol.* 2000;36(5):1101-12.

David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.* 2007;447(7147):941-50.

Davidson T, Bjoras M, Seeberg EC, Tonjum T. Antimutator role of DNA glycosylase MutY in pathogenic *Neisseria* species. *J Bacteriol.* 2005;187(8):2801-9.

Davidson JN, Chen KC, Jamison RS, Musmanno LA, Kern CB. The evolutionary history of the first three enzymes in pyrimidine biosynthesis. *Bioessays.* 1993;15(3):157-64.

De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004;19(3):169-85. Review.

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.

Dorazi R, Lingutla JJ, Humayun MZ. Expression of mutant alanine tRNAs increases spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2002;44(1):131-41.

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.

Duncan BK, Weiss B. Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1982;151(2):750-5.

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

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

Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2003;75:293-320. Review.

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

Falnes PO, Klungland A, Alseth I Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience*. 2007;145(4):1222-32. Review.

Ferguson GP, Battista JR, Lee AT, Booth IR. Protection of the DNA during the exposure of *Escherichia coli* cells to a toxic metabolite: the role of the KefB and KefC potassium channels. *Mol Microbiol*. 2000;35(1):113-22.

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.

Fleck O, Nielsen O. DNA repair. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 4):515-7. Review.

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

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

Ganzle MG, Vermeulen N, Vogel RF. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* 2007;24(2):128-38.

Garcia-Rudaz C, Luna F, Tapia V, Kerr B, Colgin L, Galimi F, Dissen GA, Rawlings ND, Ojeda SR. Fxna, a novel gene differentially expressed in the rat ovary at the time of folliculogenesis, is required for normal ovarian histogenesis. *Development.* 2007;134(5):945-57.

Garibyan L, Huang T, Kim M, Wolff E, Nguyen A, Nguyen T, Diep A, Hu K, Iverson A, Yang H, Miller JH. Use of the rpoB gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair (Amst).* 2003;2(5):593-608.

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.

Gong C, Bongiorno P, Martins A, Stephanou NC, Zhu H, Shuman S, Glickman MS. Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(4):304-12.

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

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

Hamm ML, Gill TJ, Nicolson SC, Summers MR. Substrate Specificity of Fpg (MutM) and hOGG1, Two Repair Glycosylases. *J Am Chem Soc.* 2007;129(25):7724-5.

Hamma T, Ferré-D'Amaré AR. Pseudouridine synthases. *Chem Biol.* 2006;13(11):1125-35.

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.

Harfe BD, Jinks-Robertson S. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet.* 2000;34:359-399.

Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu Rev Genet.* 2003;37:3-29. Review.

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.

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.

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

Hsieh P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat Res.* 2001;486(2):71-87.

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

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

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 ;6(4):414-7. Epub 2007 Feb 19. Review.

Hutchison CA, Peterson SN, Gill SR, Cline RT, White O, Fraser CM, Smith HO, Venter JC, Hutchison CA, Peterson SN, Gill SR, Cline RT, White O, Fraser CM, Smith HO, Venter JC. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. Science. 1999;286(5447):2165-9.

Ishii H, Wang Y, Huebner K. A Fhit-ing role in the DNA damage checkpoint response. Cell Cycle. 2007;6(9):1044-8.

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.

Ivancic-Bace I, Vlasic 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.

Jarosz DF, Beuning PJ, Cohen SE, Walker GC. Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 2007;15(2):70-7. Review.

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

Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:247-81. Review.

Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS.* 2007;115(2):81-103. Review.

Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* vol.22 no12pp.1931-1937, 2001

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.

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

Kumar A, Seringhaus M, Biery MC, Sarnovsky RJ, Umansky L, Piccirillo S, Heidtman M, Cheung KH, Dobry CJ, Gerstein MB, Craig NL, Snyder M. Large-scale mutagenesis of the yeast genome using a Tn7-derived multipurpose transposon. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1975-86.

Lee K, Holland-Staley CA, Cunningham PR. Genetic approaches to studying protein synthesis: effects of mutations at Psi516 and A535 in Escherichia coli 16S rRNA. J Nutr. 2001;131(11):2994S-3004S. Review.

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

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers; 1993.

Lewinson O, Adler J, Sigal N, Bibi E. Promiscuity in multidrug recognition and transport: the bacterial MFS Mdr transporters. Mol Microbiol. 2006;61(2):277-84.

Li H, Zhang Y, Su T, Santella RM, Weinstein IB. Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice. Oncogene. 2006;25(5):713-21.

Lin J, Chen ZZ, Tian B, Hua YJ. Evolutionary pathways of an ancient gene *recX*. Gene. 2007, 387:15-20

Lindahl, T. And Wood, RD. Quality control by DNA repair. Science. 1999; 286:1897-1905.

Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporters. Curr Opin Struct Biol. 2004 ;14(4):426-31.

Lukianova OA, David SS. A role for iron-sulfur clusters in DNA repair. Curr Opin Chem Biol. 2005;9(2):145-51.

MacLean MJ, Ness LS, Ferguson GP, Booth IR. The role of glyoxalase I in the detoxification of methylglyoxal and in the activation of the KefB K⁺ efflux system in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1998;27(3):563-71.

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.

Marti TM, Fleck O. DNA repair nucleases. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(3):336-54.

Marti TM, Kunz C, Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol*. 2002;191(1):28-41.

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

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.

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

Matias PM, Gorynia S, Donner P, Carrondo MA. Crystal structure of the human AAA⁺ protein RuvBL1. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38918-29.

Matson SW, Robertson AB. The UvrD helicase and its modulation by mismatch repair protein MutL. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(15):4089-97.

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.

McLennan AG. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(2):123-43. Review.

Miller JH. A short course in Bacterial Genetics – A laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1992, 3 volumes.

Miller JH. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:625-43

Miller JH. Perspective on mutagenesis and repair: the standard model and alternate modes of mutagenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005;40(3):155-79. Review.

Miller S, Ness LS, Wood CM, Fox BC, Booth IR. Identification of an ancillary protein, YabF, required for activity of the KefC glutathione-gated potassium efflux system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2000;182(22):6536-40.

Miller JH. Mutators in *Escherichia coli*. *Mutat Res*. 1998;409(3):99-106. Review.

Miturski R, Bogusiewicz M, Ciotta C, Bignami M, Gogacz M, Burnouf D. Mismatch repair genes and microsatellite instability as molecular markers for gynecological cancer detection. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(8):579-86.

Mizrahi V, Andersen SJ. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol*. 1998;29(6):1331-9.

Mohl DA, Easter J Jr, Gober JW. The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2001;42(3):741-55.

Monastiriakos SK, Doiron KM, Siponen MI, Cupples CG. Functional interactions between the MutL and Vsr proteins of *Escherichia coli* are dependent on the N-terminus of Vsr. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(6):639-47.

Moolenaar GF, Hoglund L, Goosen N. Clue to damage recognition by UvrB: residues in the beta-hairpin structure prevent binding to non-damaged DNA. *EMBO J*. 2001;20(21):6140-9.

Morimatsu K, Kowalczykowski SC: RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell* 2003, 11:1337-47.

Mukherjee S, Palmer LJ, Kim JY, Aeschliman DB, Houk RS, Woodin MA, Christiani DC Smoking status and occupational exposure affects oxidative DNA injury in boilermakers exposed to metal fume and residual oil fly ash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(3):454-60

Murata-Kamiya N, Kamiya H, Kaji H, Kasai H. Methylglyoxal induces G:C to C:G and G:C to T:A transversions in the supF gene on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Mutat Res.* 2000;468(2):173-82.

Myers LC, Terranova MP, Nash HM, Markus MA, Verdine GL: Zinc binding by the methylation signaling domain of the *Escherichia coli* Ada protein. *Biochemistry* 1992, 31:4541-7.

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.

Neidhart DJ, Kenyon GL, Gerlt JA, Petsko GA. Mandelate racemase and muconate lactonizing enzyme are mechanistically distinct and structurally homologous. *Nature.* 1990; 347(6294):692-4.

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 U S A. 2001;98(7):4136-41.

Nohmi T. Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. Annu Rev Microbiol. 2006;60:231-53. Review.

Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y, Ochi K. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. Mol Microbiol. 2007;63(4):1096-106.

Okochi E, Watanabe N, Sugimura T, Ushijima T. Single nucleotide instability: a wide involvement in human and rat mammary carcinogenesis? Mutat Res. 2002, 506-507(C):101.

Olsen LC, Aasland R, Krokan HE, Helland DE. Human uracil-DNA glycosylase complements *E. coli* ung mutants. Nucleic Acids Res. 1991;19(16):4473-8.

O'Neill AJ, Chopra I. Insertional inactivation of mutS in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. J Antimicrob Chemother. 2002;50(2):161-9.

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.

Outten FW, Wood MJ, Munoz FM, Storz G. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 2003;278(46):45713-9.

Pages V, Koffel-Schwartz N, Fuchs RP. *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli*. DNA Repair .2003, 2:273-284

Parikh SS, Putnam CD, Tainer JA. Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase. Mutat Res. 2000;460(3-4):183-99.

Parker AR, Eshleman JR. Human MutY: gene structure, protein functions and interactions, and role in carcinogenesis. Cell Mol Life Sci. 2003;60(10):2064-83.

Pearl LH. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. Mutat Res. 2000; 460(3-4):165-81.

Pegg AE, Byers TL.: Repair of DNA containing O6-alkylguanine. FASEB J 1992, 6:2302-10. Review.

Petranovic M, Zahradka K, Zahradka D, Petranovic D, Nagy B, Salaj-Smic E, Petranovic D. Genetic evidence that the elevated levels of *Escherichia coli* helicase II antagonize recombinational DNA repair. Biochimie. 2001;83(11-12):1041-7.

Picard B, Duriez P, Gouriou S, Matic I, Denamur E, Taddei F. Mutator natural *Escherichia coli* isolates have an unusual virulence phenotype. Infect Immun. 2001; 69(1):9-14.

Pietrangeli P, Mondovi B. Amine oxidases and tumors. *Neurotoxicology*. 2004; 25(1-2):317-24. Review.

Plough HH. Spontaneous mutabilidade in *Drosophila*. Cold Spring Harbor.Symp. Quant. Biol. 1941; 9:127-137.

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

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.

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.

Reuven NB, Koonin EV, Rudd KE, Deutscher MP: The gene for the longest known *Escherichia coli* protein is a member of helicase superfamily II. *J Bacteriol* 1995, 177:5393-400. 33.

Reznikoff, WS. Tn5 transposition: a molecular tool for studying protein structure-function. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 2):320-3. Review.

Rhee S, Martin RG, Rosner JL, Davies DR: A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:10413-8.

Rocha EP, Cornet E, Michel B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. PLoS Genet. 2005;1(2):e15.

Rogers MB, Patron NJ, Keeling PJ. Horizontal transfer of a eukaryotic plastid-targeted protein gene to cyanobacteria. BMC Biol. 2007;5(1):26.

Romanowski MJ, Bonanno JB, Burley SK. Crystal structure of the Escherichia coli glucose-inhibited division protein B (GidB) reveals a methyltransferase fold. Proteins. 2002;47(4):563-7. No abstract available.

Rowsell 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; 177(20):6011-4.

Russo MT, De Luca G, Degan P, Bignami M. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. Mutat Res. 2007;614(1-2):69-76. Review

Sambrook J, Russel 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; 74:5463-5467.

Schaaper RM, Dunn RL. Escherichia coli mutT mutator effect during in vitro DNA synthesis. Enhanced A.G replicational errors. J Biol Chem. 1987;262(34):16267-70.

Schlösser A, Meldorf M, Stumpe S, Bakker EP, Epstein W. TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*. *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1995;177:1908-1910.

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

Slupska MM, Baikalov C, Lloyd R, Miller JH Mutator tRNAs are encoded by the *Escherichia coli* mutator genes *mutA* and *mutC*: a novel pathway for mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4380-5.

Smith KC. Recombinational DNA repair: the ignored repair systems. *Bioessays*. 2004;26(12):1322-6. Review.

Sniegowski P. Evolution: constantly avoiding mutation. *Curr Biol*. 20013;11(22):R929-31. Review.

Song S, Pursell ZF, Copeland WC, Longley MJ, Kunkel TA, Mathews CK. DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(14):4990-5.

Sonoda E, Hohegger H. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(9-10):1021-9. Review.

Springer B, Sander P, Sedlacek L, Hardt WD, Mizrahi V, Schar P, Bottger EC. Lack of mismatch correction facilitates genome evolution in mycobacteria. *Mol Microbiol*. 2004; 53(6):1601-9.

Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. Mismatch repair and DNA damage signalling. DNA Repair (Amst). 2004;3(8-9):1091-101. Review.

Stolworthy TS, Black ME. The mouse guanylate kinase double mutant E72Q/D103N is a functional adenylate kinase. Protein Eng. 2001;14(11):903-9.

Stryer L. Bioquímica. 3ed. Guanabara Koogan. 1992

Thompson CL, Sancar A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. Oncogene. 2002;21(58):9043-56. Review.

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.

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

Tornaletti S, Hanawalt PC. Effect of DNA lesions on transcription elongation. Biochimie;1999; 81(1-2):139-46.

Treffers HP, Spinelli V, Belser NO. A Factor (or Mutator Gene) Influencing Mutation Rates in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1954;40(11):1064-71.

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.

Truglio JJ, Croteau DL, Van Houten B, Kisker C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev.* 2006;106(2):233-52. Review.

Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67(3):281-92. Review

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.

Venkatesh J, Kumar P, Krishna PS, Manjunath R, Varshney U. Importance of uracil DNA glycosylase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium smegmatis*, G+C-rich bacteria, in mutation prevention, tolerance to acidified nitrite, and endurance in mouse macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(27):24350-8.

Voloshin ON, Vanevski F, Khil PP, Camerini-Otero RD. Characterization of the DNA damage-inducible helicase DinG from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2003;278:28284-28293

Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:611-47.

Wang G, Humayun MZ, Taylor DE. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* 1999;7(12):488-93. Review.

Wang L, Zhang Y, Li H, Xu Z, Santella RM, Weinstein IB. Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(10):4700-8.

Wang P, Seah SY. Determination of the metal ion dependence and substrate specificity of a hydratase involved in the degradation pathway of biphenyl/chlorobiphenyl. *FEBS J.* 2005;272(4):966-74.

Weber S Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1707(1):1-23. Review.

Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem.* 2006;281(37):27356-66.

Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(1):5-18. Review

Wu J, Zhu BB, Yu J, Zhu H, Qiu L, Kindy MS, Gu L, Seidel A, Li GM. In vitro and in vivo modulations of benzo[c]phenanthrene-DNA adducts by DNA mismatch repair system. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(22):6428-34.

Wyrzykowski J, Volkert MR. The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. *J Bacteriol.* 2003 Mar;185(5):1701-4.

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.

Yim L, Moukadiri I, Bjork GR, Armengod ME. Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(20):5892-905.

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

Zeibell K, Aguila S, Yan Shi V, Chan A, Yang H, Miller JH. Mutagenesis and repair in *Bacillus anthracis*: the effect of mutators. *J Bacteriol.* 2007 Mar;189(6):2331-8. Erratum in: *J Bacteriol.* 2007 May;189(10):3932.

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.

Zhao J, Leung HE, Winkler ME. The *miaA* mutator phenotype of *Escherichia coli* K-12 requires recombination functions. *J Bacteriol.* 2001;183(5):1796-800.

Zhou P, Bogan JA, Welch K, Pickett SR, Wang HJ, Zaritsky A, Helmstetter CE. Gene transcription and chromosome replication in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1997; 179(1):163-9.

Zuniga-Castillo J, Romero D, Martinez-Salazar JM. The recombination genes *addAB* are not restricted to gram-positive bacteria: genetic analysis of the recombination initiation enzymes *RecF* and *AddAB* in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol.* 2004;186(23):7905-13.