**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**SEQÜENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *alkB* DE
*Caulobacter crescentus***

DÉBORA COLOMBI

ORIENTADORA: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
Instituto de Química
Universidade de São Paulo**

**SÃO PAULO
1995**

“Sequenciamento e Caracterização do Gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*”

DÉBORA COLOMBI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. Suely Lopes Gomes
IQ-USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Roberto Vicente Santelli
IQ-USP

Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho
EPM

**SÃO PAULO
13 DE SETEMBRO DE 1995**

"E que a força do medo que tenho não me impeça de viver o que anseio
Que a morte de tudo em que acredito não me tape os ouvidos e a boca
Porque metade de mim é o que eu grito
mas a outra metade é silêncio
Que a música que eu ouço ao longe seja linda, ainda que tristeza
Que a mulher que eu amo seja para sempre amada, mesmo que distante
Porque metade de mim é partida
e a outra metade, saudade
Que as palavras que eu digo,
não sejam ouvidas como prece, nem repetidas com fervor,
apenas respeitadas
como a única coisa que resta a um homem inundado de sentimento
Porque metade de mim é o que ouço,
mas a outra metade é o que calo
Que essa minha vontade de ir embora
se transforme na calma e na paz que eu mereço
Que essa tensão que me corroee por dentro
seja um dia recompensada
Porque metade de mim é o que penso
e a outra metade é um vulcão
Que o medo da solidão se afaste
Que o convívio comigo mesmo se torne ao menos suportável
Que o espelho reflita em meu rosto o doce sorriso que me lembra a eterna da
infância
Porque metade de mim é a lembrança do que fui,
a outra metade eu não sei
Que não seja preciso mais do que uma simples alegria
para me fazer aquietar o espírito
e que o teu silêncio me fale cada vez mais
Porque metade de mim é abrigo,
mas a outra metade é cansaço
Que a arte nos aponte uma resposta
mesmo que ela não saiba
e que ninguém a tente complicar
porque é preciso simplicidade para fazê-la florescer
Porque metade de mim é platéia
e a outra metade é canção
e que a minha loucura seja perdoada
Porque metade de mim é amor
e a outra metade, também"

Osvaldo Montenegro

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Suely Lopes Gomes, pela orientação e apoio recebido durante o período em que estive em seu laboratório.

Ao Dr. José da Costa Maia (*in memoriam*), à Dra. Aline Maria da Silva, ao Dr. Antonio Gildo Bianchi, à Dra. Ohara Augusto, à Dra. Mari Armelin, à Dra. Virginia Berlanga, ao Dr. Rogério Meneghini e ao Dr. Fernando Reinach pelo empréstimos de materiais, agentes, enzimas de restrição e aparelhos essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega, por ter-nos cedido gentilmente os agentes alquilantes usados em vários experimentos deste trabalho.

Ao pessoal técnico, Alexandre, Marli e José Lino, pela amizade e auxílio técnico eficiente.

Aos amigos, Adriana, Aguinaldo, Ana Cláudia, Bilu, Catarina, Cátia, Cláudia, Cintia, Denis, Fabíola, Flávio, Gláucia, Julio, Kumiê, Lucia, Lucy, Márcia, Margareth, Mara, Mariazinha (Leo), Marcela, Marilis, Patrícia, Pio, Regina, Rosane, Rosângela, Samara, Zé, entre outros, pelas conversas, brincadeiras, por compartilharmos as alegrias e decepções e pelos momentos maravilhosos que passamos juntos no Instituto e nos bares da vida.

Ao meu querido "guru", Marcelo Avedissian, por ter-me auxiliado em várias dúvidas, experimentos e discussões, mas principalmente por ser o grande amigo que é, apesar de palmeirense.

Ao Paulo Eduardo Martins Ribolla, pelo carinho, amizade, paciência, conforto nos momentos difíceis e por ter me proporcionado tantos momentos inesquecíveis.

À minha família, Julio, Izabel, Mônica, Eduardo, Fernando, Marcio, Luiz Felipe e Guilherme, que apesar de pouco entenderem meu trabalho, sempre me apoiaram, incentivaram e principalmente respeitaram minha profissão.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Resumo	i
Summary	ii
Abreviaturas	iii
I - Introdução	1
II - Objetivos	10
III - Materiais e Métodos	11
1 - Células e condições de cultivo	11
2 - Enzimas e reagentes	11
3 - Vetores de clonagem	12
4 - Material radioativo	12
5 - Preparação de DNA genômico de <i>Caulobacter crescentus</i> em pequena escala	12
6 - Isolamento de DNA de plasmídeo	13
6.1 - Preparação de plasmídeo em pequena escala	13
6.2 - Preparação de plasmídeo em grande escala	13
7 - Purificação de fragmento de DNA em gel de agarose ou de poliacrilamida	14
8 - Eletroeluição	14
9 - Ligação	15
10 - Obtenção de células competentes	15
11 - Experimento de transformação	16
12 - Obtenção e análise das colônias recombinantes	16
13 - Transferência de DNA para filtro de nitrocelulose ("Southern Blot")	17
13.1 - Eletroforese em gel de agarose	17

13.2 - Transferência do DNA para filtro de nylon ou nitrocelulose	17
13.3 - Marcação da sonda do fragmento de DNA de interesse com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ e $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	18
13.4 - Hibridação com sonda marcada	18
13.5 - Lavagem dos filtros	18
14 - Seqüenciamento do DNA	19
14.1 - DNA simples fita	19
14.1.1 - Preparo de DNA simples fita para seqüenciamento	19
14.1.2 - Seqüenciamento do DNA simples fita	20
a) Sequenase	20
b) Klenow	20
14.2 - DNA dupla fita	21
14.2.1 - Preparação do DNA dupla fita para seqüenciamento	21
14.2.2 - Seqüenciamento do DNA dupla fita	22
15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-uréia para seqüenciamento	23
16 - Gel de poliacrilamida-uréia com gradiente para seqüenciamento	23
17 - Extração de RNA	23
18 - Eletroforese de RNA em gel de agarose	24
19 - Extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa para determinação do início de transcrição	24
20 - Ensaio de proteção a nuclease S1 para determinação do início de transcrição	26
21 - Transformação de <i>Caulobacter</i> por conjugação	27
22 - Transformação de <i>Caulobacter</i> por eletroporação	28
22.1 - Preparação das células	28
22.2 - Preparação da amostra	28
22.3 - Eletroporação	28
23 - Ensaio de "dot-blot"	28

24 - Ensaio de atividade de β -galactosidase	29
25 - Sincronização das células de <i>Caulobacter crescentus</i>	30
26 - Marcação de proteínas "in vivo" com pulsos de [^{35}S]-metionina	31
27 - Ensaio de imunoprecipitação	31
28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	32
29 - Experimento de dupla sincronia	32
30 - Preparação de extrato celular de <i>Caulobacter crescentus</i>	33
31 - "Western-blot"	33
IV - Resultados	35
1 - Isolamento do clone genômico contendo toda a região codificadora do gene <i>alkB</i> de <i>Caulobacter crescentus</i>	35
2 - Construção de um banco genômico parcial de <i>C. crescentus</i>	35
3 - Caracterização do clone 1	38
4 - Identificação do início de transcrição do gene <i>alkB</i> de <i>C. crescentus</i>	42
5 - Análise da região promotora do gene <i>alkB</i> de <i>C. crescentus</i>	46
6 - Uso do gene repórter de transcrição para estudar a expressão do gene <i>alkB</i> de <i>Caulobacter crescentus</i>	51
7 - Efeito de agentes alquilantes sobre a expressão de <i>alkB</i>	51
8 - Expressão do gene <i>alkB</i> durante o ciclo celular de <i>C. crescentus</i>	56
9 - Padrão de segregação da fusão de transcrição <i>alkB-placZ/290</i> de <i>Caulobacter crescentus</i>	56
10 - Interrupção do gene <i>alkB</i> de <i>C. crescentus</i>	58
11 - Estudo da resposta adaptativa ao MMS em <i>Caulobacter crescentus</i>	61
V - Discussão	67
VI - Referências Bibliográficas	76
VII - Curriculum Vitae	86

RESUMO

Caulobacter crescentus é uma bactéria gram-negativa que dá origem a duas células filhas a cada divisão celular, a célula móvel e a célula talo, que se distinguem por sua morfologia, programa de desenvolvimento e capacidade de replicação do DNA. O gene *alkB* de *C. crescentus* foi identificado num clone que contém os genes de choque térmico *dnaK* e *dnaJ* (Gomes et al, 1990). Em *E. coli*, o gene *alkB* mostrou estar envolvido, juntamente com os genes *alkA* e *ada*, no reparo de lesões do DNA causadas por agentes alquilantes (Teo et al, 1986). O gene *alkB* de *E. coli* forma um operon com o gene *ada*, sendo que o gene *ada* precede o gene *alkB*. A expressão de ambos os genes é induzida por doses não letais de agentes alquilantes, a nível de transcrição. A sequência de aminoácidos deduzida da sequência de nucleotídeos do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* mostrou uma identidade de 42,5 % com a proteína AlkB de *E.coli* (Kondo et al, 1986). Ao contrário do que ocorre em *E.coli*, este gene não faz parte de um operon com o gene *ada* e sua expressão não é induzida por agentes alquilantes. Através do ensaio de proteção à nuclease S1 foi demonstrada a existência de um único início de transcrição para este gene. Para medir o nível de expressão do gene *alkB* foi construída a fusão de transcrição *alkB-placZ/290*, onde o vetor repórter de transcrição (*placZ/290*) (Gober & Shapiro, 1992) contendo o gene da β -galactosidase sem o seu promotor foi ligado ao fragmento *Sall/StuI* (0,3 kb) que contém apenas a região promotora do gene *alkB*. Observou-se que a transcrição do gene *alkB* é regulada durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*, apresentando níveis máximos na célula talo. Verificou-se ainda, através do experimento de dupla sincronia, que a proteína AlkB de *C. crescentus* sintetizada na célula pré-divisional é segregada tanto para a célula móvel como para a célula talo, não apresentando um padrão polar de expressão. A resposta adaptativa a agentes alquilantes foi demonstrada em *C. crescentus* pela detecção de um aumento na sobrevivência aos efeitos letais dos agentes alquilantes em células pré-tratadas com baixas doses destes agentes e pela identificação de uma proteína induzida por agentes alquilantes utilizando anticorpos monoclonais anti-Ada de *E. coli*.

SUMMARY

Caulobacter crescentus is a gram-negative bacterium that yields two different progeny cells at each division cycle, the swarmer cell and the stalked cell, which differ in structure, developmental program and ability to replicate DNA.

The *alkB* gene in *Caulobacter crescentus* was identified in a clone which contains also the heat shock genes *dnaK* and *dnaJ* (Gomes et al, 1990). In *Escherichia coli* the *alkB* gene has been shown to be involved, with *alkA* and *ada*, in the pathway for repair of DNA alkylation damage (Teo et al, 1986). The *E. coli alkB* gene forms an operon with the *ada* gene, being downstream of it. The addition of the alkylating agent MMS to *E. coli* cultures induces the expression of both *ada* and *alkB*, at the level of transcription. The aminoacid sequence deduced from the nucleotide sequence of the *C. crescentus alkB* gene has shown 42,5 % identity with the AlkB protein of *E. coli* (Kondo et al, 1986). Contrary to what happens in *E. coli*, the *alkB* gene of *Caulobacter cescentus* does not form an operon with the *ada* gene and its expression is not induced by alkylating agents. S1 nuclease protection assays have shown the presence of a single start of transcription for the *alkB* gene. To investigate the expression of the *alkB* gene during the cell cycle of the bacterium, its regulatory region was fused to a promoterless *lacZ* gene present in the vector *placZ/290* (Gober & Shapiro, 1992), and β -galactosidase activity and synthesis, directed by the *alkB* gene promoter, were determined. It was observed that expression of the *alkB* gene is cell cycle controlled in *Caulobacter*. The *placZ/290* transcriptional fusion with *alkB*, expressed in predivisional cells did not display a polar pattern of segregation in *Caulobacter crescentus*. β -galactosidase synthesized in predivisional cell was partitioned in equal amounts to both cell types after cell division. An adaptive response to alkylation damage has been demonstrated in *C. crescentus*. The response was detected by the increased resistance to cell killing of pretreated cells with low doses of methylating agents, followed by exposure to higher doses of these agents, and by cross-reactivity of an inducible protein of 39 kDa with *E. coli* anti-Ada monoclonal antibodies.

ABREVIATURAS

AMP - adenosina monofosfato

ATP - adenosina trifosfato

BSA - soroalbumina bovina

cAMP - adenosina monofosfato cíclico

cpm - contagem por minuto

dATP, dCTP, dGTP e dTTP - 2'-desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfato de adenosina, citidina, guanidina e timidina, respectivamente.

ddNTP - 2'-didesoxirribonucleotídeo-5'-trifosfato

DMS - dimetil metanosulfonato

DNA - ácido desoxirribonucléico

D.O. - densidade óptica

dNTP's - 2'-desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfato

DEPC - dietilpirocarbonato

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

EMS - etil metanosulfonato

IPTG - isopropil β -D-galactopiranosídeo

kb - quilobases

KS - pBluescript II KS

MMS - metil metanosulfonato

MNNG - N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

MNU - N-metil-N-nitrosourea

MOPS - ácido 3-[N-morfolino]propanossulfônico

pb - pares de bases

PEG - polietilenoglicol

Pipes - piperazina-N,N'-bis 2-ácido etanossulfônico

ORF - quadro aberto de leitura

RF - forma replicativa do fago lambda

rpm - rotações por minuto

RNA - ácido ribonucléico

RNAse - nuclease de RNA

RNAsin - inibidor de nucleases de RNA

SDS - dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

ssDNA - DNA fita simples

SK - pBluescript II SK

TCA - ácido tricloroacético

Tris - Tris(hidroximetil)-amino-metano

UV - luz ultra violeta

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

INTRODUÇÃO

Diferenciação celular é a mudança ou especialização progressiva em estrutura e função de certos componentes celulares. As células que se diferenciam tem como aspecto essencial o surgimento de diferenças entre as células filhas e a célula mãe, isto é, a principal característica da diferenciação celular consiste no aparecimento de certas substâncias ou estruturas que não eram formadas anteriormente e o desaparecimento de outras na célula.

Diferenciação celular não é uma propriedade única dos organismos multicelulares, muito pelo contrário, é um processo trivial a praticamente todas as formas de vida, que vai desde a formação de estruturas subcelulares como o flagelo em bactérias até o desenvolvimento, em organismos multicelulares, de um ovo fecundado. Isto quer dizer que tais organismos possuem um programa genético, onde estão contidas as informações necessárias para a expressão dos genes de uma maneira ordenada no tempo e no espaço acarretando em mudanças morfológicas e funcionais.

Entre os sistemas biológicos utilizados para estudo de diferenciação celular os microorganismos são bastante empregados devido a algumas peculiaridades como a simplicidade estrutural, facilidade de cultivo e a possibilidade do uso de técnicas bioquímicas e de biologia molecular. Logo, a diferenciação celular tem sido estudada em vários microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Dictyostelium discoideum*, *Aspergillus nidulans*, entre outros.

Caulobacter crescentus, nosso sistema de estudo, é uma bactéria aquática gram-negativa, que por apresentar um dos mais simples programas de desenvolvimento, regulado tanto espacialmente como temporalmente, tem permitido o estudo de eventos como o aparecimento de assimetria, transcrição diferencial de genes e posicionamento direcionado dos produtos gênicos.

O ciclo celular de *Caulobacter* apresenta uma série de eventos morfogenéticos estágio-específicos, como mostra a Fig. 1, tendo como principal característica a formação de duas células filhas diferentes a cada divisão celular, a célula talo e a célula móvel, que se distinguem por sua morfologia, programa de desenvolvimento e capacidade de replicação do DNA.

FIGURA 1: Diagrama do ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.

A célula móvel possui flagelo, pili e é quimiotaticamente competente. A presença do flagelo lhe confere mobilidade enquanto que a presença do pili confere sensibilidade à infecção por fagos de DNA (Shapiro & Agabian-Keshishian, 1970). Entretanto, a célula móvel é incapaz de replicar seu DNA enquanto não se diferenciar numa célula talo.

A estrutura do flagelo é bastante conservada nas bactérias já estudadas (Macnab & DeRosier, 1988) e é diferente das estruturas dos flagelos de eucariotos. O flagelo de *Caulobacter crescentus* é composto de 3 partes, o corpo basal (rotor), o gancho e o filamento. O corpo basal serve para ancorar o flagelo ao envelope celular e proporciona rotação ao flagelo, enquanto que o gancho conecta o filamento ao corpo basal.

A formação do flagelo e da maquinária quimiotática requer a expressão de mais de 50 genes. Um grande número destes genes está ordenado numa hierarquia regulatória e seus produtos gênicos são posicionados em sítios específicos na célula. A identificação de proteínas flagelares e quimiotáticas específicas, assim como o mapeamento e isolamento dos genes que codificam estas proteínas, tem permitido uma análise de como a informação genética é traduzida em organização espacial durante o processo de diferenciação (Brun e colaboradores, 1994; Shapiro, 1985).

Os genes envolvidos na montagem e formação do flagelo estão divididos em quatro classes I, II, III e IV. Os genes de classe I são ainda hipotéticos e consistem nos genes necessários para a expressão dos genes de classe II (Van Way e colaboradores, 1993). Os genes de classe II, como por exemplo *fliQR*, *flhA*, *fliLM*, *fliP* e *fliF*, são expressos relativamente cedo no ciclo celular, logo após a transição da célula móvel para a célula talo, e conseqüentemente estes genes são necessários para a expressão dos genes de classe III e IV. Os genes de classe III codificam para as proteínas do corpo basal (genes: *flgI*, *flgH* e *flgFG*) e do gancho (genes: *flaNQ*, *flbG* e *flgE*), enquanto que os genes de classe IV (*fljK* e *fljL*) codificam para as proteínas do filamento (Gober & Marques, 1995).

A ordem de montagem dos componentes do flagelo segue a ordem de transcrição dos genes que codificam as suas proteínas componentes, ou seja, primeiro são sintetizadas as proteínas do corpo basal, seguindo-se as proteínas do gancho e por fim as proteínas do filamento do flagelo.

O tempo que a célula móvel permanece no ciclo celular não é influenciado por flutuações do meio ambiente, contato celular ou tempo de

geração (Poindexter, 1964; Newton, 1972; Shapiro, 1976), mas é fixado em aproximadamente 0,3 unidades do ciclo de divisão celular.

A célula móvel após um período equivalente a 1/4 do ciclo celular libera seu flagelo (Poindexter e colaboradores, 1967; Shapiro & Maizel, 1973) e os pilis são perdidos (Shapiro & Agabian-Keshishian, 1970; Smit & Agabian, 1982), em resposta a um fator interno não conhecido. Forma-se então um talo no pólo da célula previamente ocupado pelo flagelo, ocorrendo síntese da parede e da membrana celular que resulta numa pequena estrutura cilíndrica (Schmidt & Stanier, 1966). Logo, o talo é uma extensão cilíndrica da superfície celular que é sintetizada num pólo específico da célula, que foi anteriormente ocupado pelo flagelo. Sua estrutura é composta de material citoplasmático com a ausência de DNA e ribossomos (Poindexter, 1964) e possui anéis densos ("crossbands") compostos em parte por peptideoglicanos arranjados em camadas concêntricas formando anéis contínuos espaçados a intervalos variáveis por toda a extensão do talo, proporcionando rigidez ao mesmo e permitindo que este se suporte na membrana (Pate & Ordal, 1965).

Concomitantemente à biogênese do talo, a estrutura do cromossomo se modifica e é iniciada a replicação do DNA. Durante o processo de replicação, a célula talo em crescimento inicia uma cascata de eventos que culmina na biogênese de um novo flagelo (Shapiro, 1985) e da maquinaria quimiotática (Gomes & Shapiro, 1984). Os produtos gênicos componentes da maquinariaa quimiotática são sintetizados sob controle temporal e utilizados na montagem destas estruturas no pólo oposto ao talo na célula pré-divisional, na porção da célula que vai dar origem à célula móvel após divisão (Gomes & Shapiro, 1984). Logo, a célula prédivisional é formada pela distribuição localizada de proteínas estruturais originando uma célula com pólos marcados diferentemente. Essa assimetria gerada na célula prédivisional vai resultar na formação de duas células filhas distintas, após a divisão celular: a célula filha talo que é capaz de iniciar a replicação de DNA e imediatamente reentra no ciclo celular, e a célula filha móvel que contém o flagelo e a maquinaria quimiotática, sendo incapaz de replicar seu DNA, enquanto não perder seu flagelo e diferenciar-se numa célula talo.

Caulobacter crescentus contém um único cromossomo circular, uma única origem de replicação e ocorre somente um ciclo de replicação por ciclo celular (Dingwall & Shapiro, 1989). Segregação randômica das fitas de DNA ocorre durante a replicação, no entanto, os cromossomos recém replicados nos

dois pólos da célula prédivisional estão de alguma forma marcados, apresentando diferentes coeficientes de sedimentação (Evinger & Agabian, 1977). Um cromossomo condensado (FS - "fast sedimenting") que apresenta um coeficiente de sedimentação de aproximadamente 6,000 S é recebido pela célula móvel e um cromossomo que sedimenta mais lentamente (SS - "slow sedimenting"), isto é, apresenta um coeficiente de sedimentação em torno de 3,000 S é recebido pela célula talo; sendo que, como já foi mencionado, somente o cromossomo presente na célula talo é capaz de iniciar a replicação do DNA (Dingwall & Shapiro, 1989). Foi observado em culturas sincronizadas, que tanto o cromossomo SS como o FS estão presentes na célula pré-divisional e que a transição do cromossomo FS para o SS é abrupta e coincide com a transição da célula móvel para a célula talo (Evinger & Agabian, 1977 e 1979).

Vários genes envolvidos em replicação de DNA e recombinação, têm sido investigados em *C. crescentus*. Genes como, *dnaA*, *gyrB*, *dnaC*, *dnaK*, *ccrM*, *dnaJ* e *dnaN*, foram clonados, sequenciados e tiveram sua expressão investigada (Gober & Marques, 1995).

O gene *dnaC* é necessário para a elongação da cadeia de DNA e tem uma expressão baixa nos períodos do ciclo celular onde não ocorre a replicação do DNA, ou seja, nas células móveis e nas células pré-divisionais logo antes da divisão celular (Ohta e colaboradores, 1990). A proteína DnaA, no entanto, deve ter um papel essencial para o início da replicação do DNA, pois foi demonstrado em *C. crescentus* que a presença de uma *dnaA* "box" na origem de replicação é essencial para o início da mesma. Em *E. coli* já foi demonstrado que o gene *dnaA* é um fator indispensável para a ocorrência do início de replicação do DNA (Kornberg, 1988). Os genes *gyrB* e *dnaN* codificam a subunidade B da DNA girase e a subunidade β da haloenzima da DNA polimerase III, respectivamente e tem sua expressão regulada durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus* (Rizzo e colaboradores, 1993). No entanto, *dnaK* e *dnaJ* são genes cujos produtos são proteínas de choque térmico mas também possuem um papel na replicação do DNA (Sakakibara, 1988).

O gene *ccrM*, por sua vez, codifica uma DNA metiltransferase que metila a adenina do sítio reconhecido pela enzima de restrição *Hinfl*, GANTC. A enzima CcrM DNA metiltransferase deve ter um importante papel no ciclo celular de *C. crescentus*, pois possui expressão restrita à célula pré-divisional. Além disso, foi observado que quando o gene *ccrM* está sobre o controle de um promotor constitutivo, o DNA cromossomal se torna amplamente metilado

durante o ciclo celular da bactéria, diferindo do que ocorre na célula selvagem, onde os sítios GATC se tornam hemi-metilados durante a replicação do DNA na célula talo, persistindo assim até serem novamente metilados no último estágio da célula pré-divisional. Os mutantes também apresentam modificações morfológicas, entre elas, divisão irregular, redução no tamanho do talo e pólos achatados (Zweiger e colaboradores, 1994).

Um clone contendo os genes *dnaK* e *dnaJ* foi isolado e caracterizado em nosso laboratório (Gomes e colaboradores, 1990). Este clone de 3,5 kb contém todo o gene *dnaK* e parte do gene *dnaJ* de *Caulobacter*, compreendendo cerca de 2860 pares de base, incluindo dois promotores do operon *dnaKJ*. Seqüenciamento parcial do restante do clone foi realizado e o mesmo indicou a presença de um outro quadro aberto de leitura na direção oposta aos genes *dnaK* e *dnaJ*, codificando um polipeptídeo que possui homologia com a proteína AlkB de *E. coli* (Kondo e colaboradores, 1986).

Estudos realizados em *E. coli* (Kondo e colaboradores, 1986) demonstraram que a transcrição do gene *alkB* é controlado pelo gene *ada*, constituindo um operon com este gene, sendo que o gene *ada* precede o gene *alkB*. Foi observado também que a adenina do códon de terminação (TAA) do gene *ada* sobrepõe-se à adenina do códon de iniciação (ATG) do gene *alkB* e que apesar dos dois genes serem co-regulados, o nível de expressão dos mesmos é diferente, pois a quantidade da proteína Ada produzida é bem maior do que a quantidade da proteína AlkB produzida. Logo, deve haver uma regulação a nível de tradução ou transcrição. Tendo em vista que a transcrição do gene *ada* termina dentro do região codificadora do gene *alkB*, acredita-se que deve ocorrer a formação de uma estrutura secundária que possibilite a transcrição do gene *alkB*, embora a níveis menores do que a transcrição do gene *ada*.

Os genes *ada*, *alkB*, *alkA*, *aidB*, estão envolvidos em reparo de lesões no DNA causadas por agentes alquilantes (Teo e colaboradores, 1986) e estes genes são induzidos quando as células são expostas a doses não letais de agentes alquilantes como o N-metil-N'-nitron-N-nitrosoguanidina (MNNG), N-metil-N-nitrosourea (MNV) e metil metanosulfonato (MMS).

Agentes alquilantes são potentes mutagênicos e carcinogênicos, cujo mecanismo básico de ação é a transferência de grupos alquila, com pequeno número de átomos de carbono, formando adutos covalentes com ácidos nucléicos e proteínas. Ou seja, agem transferindo um grupo alquila a um átomo

de oxigênio ou nitrogênio suscetível de uma base, alterando desta forma as características formadoras de pontes de hidrogênio destas respectivas bases.

Exposição do DNA a agentes alquilantes resulta na produção de uma variedade de lesões, resultando em bases alteradas, alquilação dos átomos de oxigênio das pontes de fosfato internucleotídeos, assim como a produção de sítios apurínicos/pirimidínicos e quebras de cadeia (Singer, 1979; Pegg, 1983). Por exemplo, a alquilação na posição O⁶ da guanina, altera a especificidade das pontes de hidrogênio da guanina, fazendo com que esta base modificada pareie com a timina ao invés da citosina, produzindo uma frequência de mutação no DNA após a replicação (Snow e colaboradores, 1984), isto é, este tipo de alquilação promove a transição GC→AT (Richardson e colaboradores, 1987).

Convém ressaltar que apesar das lesões causadas pelos agentes alquilantes MNNG, MNU, MMS, DMS e EMS serem as mesmas, o mecanismo é diferente, pois estes produzem lesões em diferentes proporções (Lawley & Thatcher, 1970). Existem dois tipos de vias pelos quais atuam os agentes alquilantes, a via SN1 e a via SN2. A via SN2, mecanismo pelo qual atuam os agentes alquilantes MMS, DMS e EMS, alquila predominantemente o nitrogênio das bases do DNA, produzindo pouca alquilação nos oxigênios das bases e do fosfato. Enquanto que os agentes que atuam pela via SN1, como o MNNG e MNU, alquilam de modo eficaz tanto os nitrogênios quanto os oxigênios do DNA (Day e colaboradores, 1987 e Singer & Grunberger, 1983).

Exposição das células de *E. coli* a baixas concentrações de agentes alquilantes induz a resistência a efeitos mutagênicos e letais das exposições subsequentes a agentes metilantes e etilantes (Samson & Cairns, 1977). Esta resposta, denominada resposta adaptativa a agentes alquilantes, é regulada positivamente pelo produto do gene *ada* e induz a síntese de pelo menos quatro proteínas: a O⁶-metil-guanina-DNA metiltransferase e 3-metil-adenina-DNA glicosilase II, codificada respectivamente pelos genes *ada* e *alkA* e os produtos do gene *aidB* e *alkB* (Schendel & Robins, 1978; Karran e colaboradores, 1982).

A enzima 3-metil-adenina-DNA glicosilase II (AlkA) é ativa para reparar 3-metil-adenina, 3-metil-guanina, 7-metil-guanina, O²-metil-citosina e O²-metil-timidina (Lindahl e colaboradores, 1982 e 1984), enquanto a enzima O⁶-metil-guanina-DNA-metiltransferase (Ada) repara O⁶-metil-guanina, O⁴-metil-timidina e metilfosfotriéster (Ahmed & Laval, 1984). As proteínas AlkB e AidB ainda não tem sua função caracterizada.

O mecanismo de ativação da resposta adaptativa causada por agentes alquilantes é diferente do resposta SOS e da resposta ao choque térmico. Na resposta SOS a proteína RecA indiretamente induz a expressão de certos genes, promovendo a clivagem proteolítica de um repressor, enquanto que na resposta ao choque térmico é codificado um fator sigma que reconhece os promotores dos genes de choque térmico, induzindo a expressão dos mesmos (Teo e colaboradores, 1986).

A resposta adaptativa apresenta um efeito estimulatório direto na transcrição e não possui sequência homóloga aos fatores sigma (Landick e colaboradores, 1984). O mecanismo de ação da proteína Ada é parecido com o mecanismo de ação da proteína receptora de AMP cíclico, onde a proteína regulatória (CAP) interage com um efetor (cAMP), ocorrendo uma mudança conformacional que leva à ligação a uma sequência específica do DNA numa dada região do promotor. O sítio de ligação da proteína controle está localizado imediatamente a 5' do sítio de ligação da RNA polimerase, sugerindo um contato direto entre o ativador e a polimerase, facilitando deste modo, o início da transcrição.

No entanto, estas duas proteínas possuem diferenças, pois a proteína Ada é monomérica e não parece possuir um domínio "helix-turn-helix" que reconhece o DNA, sendo que a diferença mais importante é que a proteína receptora de cAMP (CAP) é ativada através de uma ligação não covalente com a molécula efetora, enquanto que a proteína Ada é ativada de forma irreversível devido a uma modificação covalente.

Teo e colaboradores (1986) demonstraram que o gene *ada* de *E. coli* codifica uma proteína de 39 kDa, que possui dois domínios ativos. O domínio amino-terminal possui atividade de DNA metiltransferase que repara metilfosfotriéster transferindo o grupo metila do esteioisômero para um resíduo de cisteína na própria enzima (Cys 69), enquanto que o domínio carboxi-terminal também possui atividade de metiltransferase só que repara outras lesões, O⁶-metilguanina e O⁴-metiltimina, transferindo o grupo metil para outro resíduo de cisteína na própria enzima (Cys 321) (Shevell & Walker, 1991).

A autometilação da proteína Ada, que ocorre por transferência de um grupo metila de um fosfotriéster para um resíduo de cisteína na proteína (Cys 69), converte Ada num potente ativador da transcrição de vários genes envolvidos na resposta adaptativa (Teo e colaboradores, 1986), e de seu próprio gene (Nakabeppu & Sekiguchi, 1986). Convém ressaltar, que a

autometilação é um fenômeno irreversível e faz com que a enzima perca sua atividade de metiltransferase.

Estudos recentes (Saget & Walker, 1994), demonstraram que alta concentração da proteína Ada não metilada é capaz de inibir a transcrição do gene *ada* tanto *in vitro* como *in vivo*. Este resultado sugere que este fenômeno deve possuir um papel importante na "down-regulation" da resposta adaptativa.

Estudos realizados em *Salmonella typhimurium* (Yamada e colaboradores, 1993) demonstraram que a proteína Ada de *Salmonella* (ADA_{ST}) apresenta uma similaridade de 75% com a proteína Ada de *E. coli* e que conserva os resíduos de cisteína (Cys-68 e Cys-320). Neste trabalho, os autores sugerem que a proteína ADA_{ST} também funciona como um ativador transcricional, só que de maneira diferente da enzima Ada de *E. coli*, pois a proteína ADA_{ST} metilada induz a expressão do gene *alkA* de *S. typhimurium* mas não do próprio gene *ada*. Foi observado neste trabalho que a proteína ADA_{ST} protege as células dos efeitos letais dos agentes alquilantes, mas não dos efeitos mutagênicos.

Apesar do gene *alkB* de *E. coli* já ter sido clonado e sua proteína identificada (Kataoka & Sekiguchi, 1985), o seu papel preciso no reparo de DNA ainda é obscuro. Devido à identidade de 40% encontrada entre os aminoácidos 189 a 217 da proteína AlkB e os aminoácidos 164 a 192 da enzima fumarato redutase de *E. coli*, há a possibilidade de que a proteína AlkB possa converter as bases alquiladas do DNA em outras formas através de uma reação de oxido-redução (Kondo e colaboradores, 1986).

Foi demonstrado em 1983 (Kataoka e colaboradores) que mutantes de *alkB* de *E. coli* são sensíveis ao MMS e que as células mutantes perdem a capacidade de reativar os fagos tratados com MMS. Estes resultados sugerem que o produto do gene *alkB* de *E. coli* está envolvido em algum passo do processo de reparo do DNA alquilado.

OBJETIVOS

Este projeto teve por objetivo seqüenciar e caracterizar o gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* e estudar sua expressão durante o ciclo celular da bactéria, assim como investigar sua possível indução por agentes alquilantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Células e condições de cultivo

A linhagem sincronizável da bactéria gram negativa *Caulobacter crescentus* NA100 é mantida em nosso laboratório em placas de meio sólido PYE-ágar, que é constituído de uma solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, extrato de levedo 1 g/l, bacto-peptona 0,2 g/l e ágar-bacteriológico 15 g/l. As placas, antes do preparo, são suplementadas com cloreto de cálcio 0,5 mM. As colônias recombinantes de *Caulobacter crescentus* foram mantidas em PYE-ágar contendo ampicilina (50 µg/ml) ou tetraciclina (2 µg/ml).

A cepa de *E. coli* assim como as colônias recombinantes obtidas de experimentos de transformação foram repicadas em nova placa de meio LB (bacto-triptona 10 g/l, extrato de levedo 5 g/l, cloreto de sódio 10 g/l e ágar bacteriológico 15 g/l) num pH igual a 7,5; sendo que as colônias recombinantes foram mantidas em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) ou tetraciclina (12,5 µg/ml) e crescidas a 37°C.

2. Enzimas e reagentes

- .Enzimas de restrição: USB, Boehringer Manhein, GIBCO-BRL e Biolabs.
- .Transcriptase reversa: Boehringer Manhein
- .RNAsin: Boehringer Manhein
- .T4 DNA ligase: Biolabs
- .S1 nuclease: Amersham
- .Taq polimerase: Promega
- .Kit Sequenase: USB
- .DEPC: Sigma
- .Formamida: BRL
- .Agentes alquilantes: MMS e EMS da Eastman e DMS da Aldrich, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega
- .MMH: Aldrich, gentilmente cedidos pelo Profa. Dra. Ohara Augusto

.Ferricianeto de Potássio: Merck, gentilmente cedidos pelo Profa. Dra. Ohara Augusto

Todos os demais reagentes utilizados foram em grau analítico.

3. Vetores de clonagem

Os vetores utilizados foram os seguintes:

.pBluescript KS e SK: Stratagene

.pBluescribe: Stratagene

.M13mp18 e 19: Yanish-Perron e colaboradores, 1985

.pUC: Yanish-Perron e colaboradores, 1985

.placZ/290: Guber & Shapiro, 1992

4. Material radioativo

Os compostos radioativos foram obtidos da Amersham: [α - ^{32}P]-dATP (3000 Ci/mmol); [α - ^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol); [γ - ^{32}P]ATP (1000Ci/mmol); [α - ^{35}S]-dATP (1000 Ci/mmol) e [^{35}S]-metionina (1000-1400 Ci/mmol).

5. Preparação de DNA genômico de *Caulobacter crescentus* em pequena escala

Esta preparação foi realizada segundo o método descrito por Chen e Kuo (1993).

Células de *Caulobacter crescentus* foram inoculados em meio PYE suplementado com cloreto de cálcio 0,5 mM e incubadas sob agitação a 30°C durante 16 horas. A seguir, 1,5 ml da cultura foram centrifugados por 3 minutos a 12000 rpm em minifuge e o precipitado foi ressuspensão em tampão de lise (Tris-acetato 40 mM pH 7,8; Acetato de Sódio 20 mM; EDTA 1 mM e SDS 1%). A seguir, foi adicionado à suspensão 66 μl de NaCl 5 M. Após centrifugação a 12000 rpm em minifuge por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf. Foi adicionado volume igual de clorofórmio e o tubo foi invertido cerca de 50 vezes. Após uma centrifugação à temperatura ambiente a

12000 rpm em minifuge por 5 minutos, o DNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto. Após centrifugação a 12000 rpm em Minifuge por 30 minutos a 4°C, o DNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 80 %, seco a vácuo e ressuspenso em 50 µl de TE contendo RNase (20 µg/ml).

6. Isolamento de DNA de plasmídeo

6.1) Preparação de plasmídeo em pequena escala

O método usado foi o de lise alcalina segundo Birnboim & Doly (1979). Com o auxílio de um palito estéril uma colônia branca isolada foi retirada da placa obtida do experimento de transformação e colocada em um tubo de vidro estéril contendo 1,5 ml LB ampicilina (100 µg/ml) ou tetraciclina (12,5 µg/ml). Após 8-12 horas de crescimento a 37°C, a cultura foi centrifugada por 5 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 100 µl de uma solução gelada de glicose 50 mM, EDTA 10mM e Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram então adicionados 200 µl de uma solução recém preparada de NaOH 0,2 N contendo SDS 1%. A amostra foi misturada por inversão do tubo e incubado no gelo por 5 minutos. A seguir 150 µl de acetato de potássio pH 4,5 (3M de potássio e 5M de acetato) foram adicionados e a suspensão foi agitada suavemente e incubada a 4°C por 5 minutos. Após uma centrifugação de 5 minutos a 12000 rpm a 4°C em Minifuge o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf. O sobrenadante foi extraído com o mesmo volume de fenol/clorofórmio (1:1). À fase aquosa foram adicionados 40 µl de acetato de sódio 3 M (1/10 do volume) e 880 µl de etanol absoluto (2 vezes o volume). Após incubação em banho de gelo seco/etanol por 30 minutos, a amostra foi centrifugada em Minifuge por 30 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi lavado com 0,5 ml de etanol 80 %, seco a vácuo e ressuspenso em 50 µl de TE contendo RNase (20 µg/ml).

6.2) Preparação de plasmídeos em grande escala

O método utilizado foi o de lise alcalina descrito por Birnboim & Doly (1979). Com o auxílio de um palito estéril uma colônia branca isolada da placa obtida da transformação foi retirada e colocada em um erlenmeyer de vidro estéril com 25 ml de LB contendo ampicilina 100 µg/ml ou tetraciclina 12,5 µg/ml. Após 8-12 horas de crescimento a 37°C, a cultura foi centrifugada por 5

minutos a 7000 rpm a 4°C no rotor SS34 (Sorvall) e o precipitado foi ressuspensão em 2 ml de uma solução a 4°C de glicose 50 mM, EDTA 10mM e Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir foi adicionado então 4 ml de uma solução recém preparada de NaOH 0,2 N contendo SDS 1%. A amostra foi misturada por inversão do tubo e incubado por 5 minutos no gelo. A seguir foi adicionado 2,4 ml de acetato de potássio pH 4,5 (3M de potássio e 5M de acetato). A suspensão foi agitada suavemente e incubada a 4°C por 5 minutos. Após centrifugação por 10 minutos a 4°C a 8000 rpm no rotor SS34 (Sorvall) o sobrenadante foi transferido para outro tubo e extraído com o mesmo volume de fenol/clorofórmio (1:1). À fase aquosa foram adicionados 2 vezes o volume de etanol absoluto . Após incubação em banho de gelo seco/etanol por 30 minutos, a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 4°C a 8000 rpm no rotor SS34 (Sorvall). O precipitado obtido foi lavado com 0,5 ml de etanol 80 %, seco a vácuo e ressuspensão em 700 µl de TE contendo RNase (20 µg/ml).

7. Purificação de fragmento de DNA em gel de agarose ou de poliacrilamida

Para se obter o inserto de interesse cerca de 10 µg de DNA do plasmídeo contendo o inserto foram digeridos com 100 unidades das enzimas de restrição, no tampão recomendado pelo fabricante, num volume final de 200 µl, por 4 horas a 37°C. Uma alíquota foi analisada em minigel de agarose 0,7% para verificar se a digestão foi completa. A seguir, os 200 µl da digestão foram submetidos a eletroforese em gel vertical de agarose 1% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), em sistema preparativo ou em gel de poliacrilamida 6%. Após a corrida, a banda correspondente ao inserto de interesse foi visualizada com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), cortada do gel e submetida a eletroeluição.

8. Eletroeluição

A fatia do gel contendo o inserto isolado foi colocado em um saco de diálise imersa em tampão TBE 0,5 X (tris-base 54 g/l, EDTA 0,5 M, cido brico

27,5 g/l), e submetida a uma voltagem de 100 V durante duas horas. Após a inversão da polaridade por 2,5 minutos, ao líquido contendo o DNA foi adicionado NaOAc 3 M (1/10 do volume), duas vezes o volume de etanol absoluto e 1 µl de tRNA de levedura (1 µg/ml). Após precipitação em gelo seco/etanol a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 12000 xg. O DNA precipitado foi seco a vácuo e então ressuspensão em 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; contendo EDTA 1 mM). O DNA foi extraído com fenol-clorofórmio e reprecipitado. O DNA precipitado final foi ressuspensão em 30 µl de TE contendo RNase (50 µg/ml).

9. Ligação

Os vetores de interesse foram digeridos com as enzimas de restrição adequadas nas mesmas condições descritas no item 7. Os vetores foram ligados ao inserto em tampão Tris-HCl 80 mM pH 7,6 contendo MgCl₂ 8mM, DTT 1mM, ATP 1mM, PEG 5% e 5 U de T4 DNA ligase em um volume final de 20 µl. A reação de ligação foi feita a 19°C durante a noite.

Convém ressaltar que em alguns casos, os vetores foram defosforilados para evitar que o vetor religue sem a presença do inserto. Para tanto, o vetor digerido foi tratado com fosfatase alcalina (1 U/µl) em tampão adequado por uma hora a 37°C. A seguir foi realizado extração com fenol/clorofórmio, e a seguir o DNA foi precipitado pela adição de NaOAc 3M (1/10 do volume) e duas vezes o volume de etanol absoluto. Após 30 minutos de incubação em banho de gelo seco/etanol, a amostra foi centrifugada a 12000 rpm em minifuge por 30 minutos 4°C. O precipitado foi lavado com 0,5 ml de etanol 80%, seco e ressuspensão em TE.

10. Obtenção de células competentes

Uma colônia isolada da cepa TG-1 de *E. coli* mantida em placas de meio mínimo M9, foi inoculada em meio líquido LB e incubada a 37°C sob agitação até atingirem uma densidade ótica de 0,5 a 600 nm. A cultura (20 ml) foi então mantida por 15 minutos no gelo e a seguir as células foram centrifugadas a 1000 xg por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. As células foram

ressuspensas em 10 ml de CaCl_2 100 mM (1/2 do volume inicial) e incubadas no gelo por mais 20 minutos. Procedeu-se então nova centrifugação a 1000 xg por 5 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 2 ml de CaCl_2 100 mM (1/10 do volume inicial). Após 20 minutos no gelo, as células estão prontas para uso.

11. Experimento de transformação

Para o experimento de transformação foram adicionados 200 μl de células competentes a 20 μl da ligação e a mistura foi incubada no gelo por uma hora. As células foram então submetidas a choque térmico a 37°C por 5 minutos e colocadas novamente no gelo por 5 minutos. A seguir, as células foram recuperadas por uma hora a 37°C após adição de 0,8 ml de LB líquido. As células foram centrifugadas em Minifuge por um minuto à temperatura ambiente, ressuspensas em 0,2 ml de LB líquido e plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) ou tetraciclina (12,5 $\mu\text{g/ml}$), 30 μl de IPTG 100 mM e 30 μl de X-Gal 2% em dimetilformamida. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

As colônias brancas obtidas são portadoras do inserto, já que este interrompe o gene da β -galactosidase do vetor em questão, e portanto não há hidrólise do indicador X-gal, enquanto que as colônias sem o inserto serão azuis, pois hidrolisam o X-gal através da β -galactosidase induzida pelo IPTG. Convém ressaltar que alguns vetores como o *placZ/290* não possuem o gene da β -galactosidase induzível por IPTG.

As colônias brancas obtidas foram repicadas em placas de meio LB contendo ampicilina ou tetraciclina e analisadas através de minipreparações de plasmídeo ou por hibridação com o inserto marcado radioativamente, como veremos no item 13.3.

12. Obtenção e análise das colônias recombinantes

Após o experimento de transformação descrito no item 11, as colônias brancas obtidas foram analisadas para encontrar os prováveis clones positivos.

Para este fim, colônias brancas isoladas foram plaqueadas em duplicatas em placa LB contendo ampicilina (LBA) ou tetraciclina (LBT) e em filtro de

nylon colocada em outra placa de LBA ou LBT. As placas foram então incubadas a 37°C durante a noite.

O tratamento do filtro de nitrocelulose com os recombinantes foi feito conforme Maniatis e colaboradores (1982), descrito a seguir:

Após o crescimento das colônias, o filtro de nitrocelulose foi colocado sobre papel 3 MM umidecido com uma solução de SDS 10% por 1 minuto. O filtro foi transferido sucessivamente para papel 3MM umidecido com solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 5 minutos; com uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M, pH 7.5; NaCl 1,5 M) por 5 minutos e com uma solução de SSC 2X por 2 minutos. A seguir o filtro foi seco por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido por incubação de 2 horas em forno a 80°C para fixar covalentemente o DNA ao filtro.

13. Transferência de DNA para filtro de nitrocelulose ("Southern Blot")

13.1. Eletroforese em gel de agarose

À amostra de DNA digerido com diferentes enzimas foi adicionado 0,1 vezes o volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%). A seguir as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 65°C e submetida a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. O gel foi submetido a voltagem constante de 100 V até o azul de bromofenol atingir a borda inferior do gel.

13.2. Transferência do DNA para filtro de nylon ou nitrocelulose

Após visualização do DNA com brometo de etídeo, o gel foi tratado com solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) por 45 minutos à temperatura ambiente sob agitação. A seguir, o filtro foi lavado brevemente com água destilada e incubado em solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M) por 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente. A transferência é feita segundo o método de Southern (1975), utilizando SSC 10X durante a noite.

Após a transferência, o filtro é seco por 30 minutos à temperatura ambiente seguido por incubação de 2 horas em forno a 80°C.

13.3. Marcação da sonda do fragmento de DNA de interesse com [α - ^{32}P]-dATP e [α - ^{32}P]-dCTP

O sistema usado para a marcação da sonda foi o de "random primed synthesis", que utiliza como "primer" o hexanucleotídeo pd(N)₆ (Pharmacia), segundo o método de Feinberg & Vogelstein (1983).

A marcação foi iniciada com 2 μl do fragmento de interesse e 1 μl (6 μg) do "primer", sendo a mistura fervida por 2 minutos e resfriada rapidamente no gelo. A seguir foi adicionado 3 μl de tampão RP 10X (Tris-HCl pH 7,2 0,5 M; MgCl₂ 100 mM e DTT 10 mM); 1,5 μl de dTTP (750 μM); 1,5 μl de dGTP (750 μM); 50 μCi [α - ^{32}P]-dCTP; 50 μCi [α - ^{32}P]-dATP; 1 μl de BSA acetilada (2,5 g/ml) e 1 μl da polimerase Klenow (5 unidades) num volume final de 30 μl .

A reação foi incubada à temperatura ambiente por 3hs, e após este período foram adicionados 2 μl de EDTA 0,2 M; 90 μl de STE (TE contendo NaCl 0,1 M); 2 μl de SDS 10% para parar a reação. Com a finalidade de remover os nucleotídeos livres e os fragmentos pequenos, a mistura foi submetida a separação em uma coluna de 0,9 ml de resina Sephadex G-50, equilibrada em 20 ml de STE (TE contendo NaCl 0,1 M). Para tanto, a coluna equilibrada em STE foi centrifugada a 2500 xg por 4 minutos para o empacotamento. A seguir, a mistura foi adicionada à coluna e procedeu-se nova centrifugação.

A radioatividade da amostra foi determinada após precipitação de uma alíquota da amostra com TCA 10% em papel 3MM e contagem em espectrômetro de cintilação.

13.4. Hibridação com sonda marcada

Os filtros de nitrocelulose ou nylon, com o DNA já fixado, foram incubados com 10 ml de tampão fosfato de potássio pH 6,2 60 mM, contendo SSC 5X concentrado; EDTA 10 mM; SDS 0,4%; formamida 30% e leite desnatado por 2 horas a 37°C. Após este período, a solução foi substituída por outros 10 ml da mesma solução contendo a sonda marcada (5 x 10⁶ cpm/ml) desnaturada por fervura. A hibridação foi realizada a 37°C sob fraca agitação por aproximadamente 15 horas.

13.5. Lavagem dos filtros

Após a hibridação, os filtros foram lavados três vezes a 37°C sob agitação por 45 minutos. As lavagens foram realizadas sucessivamente com

SSC 2 X contendo SDS 0,1 %; SSC 1,0 X contendo SDS 0,1 % e SSC 0,1 X contendo SDS 0,1 %. O filtro foi seco por 30 minutos a temperatura ambiente e exposto a filme de raio X a -70°C.

Estas condições de hibridação e lavagem são condições de alta exigência.

Os sinais positivos obtidos correspondem as colônias recombinantes que possui o gene de interesse. A seguir foi efetuada a mini preparação de DNA das prováveis colônias positivas, seguida de uma digestão com a enzima de restrição adequada para a retirada do inserto e análise em gel de agarose ou acrilamida para confirmar se os plasmídeos realmente contém o inserto de interesse.

14. Seqüenciamento do DNA

14.1) DNA simples fita

14.1.1) Preparo de DNA simples fita para seqüenciamento

Foram inoculados em 1,5 ml de LB contendo uma cultura de *E. coli* TG-1 em fase estacionária diluída 100 vezes, placas de lise isoladas do fago M13 contendo o inserto a ser seqüenciado. As culturas infectadas foram incubadas com agitação a 37°C durante aproximadamente 6 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em Minifuge à temperatura ambiente. Os precipitados foram estocados a -20°C e aos sobrenadantes contendo os fagos foram adicionados 150 µl de uma solução PEG 20% contendo NaCl 1,6 M. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos e a seguir centrifugadas em Minifuge a 4°C por 15 minutos. Os precipitados contendo os fagos foram ressuspensos em 200 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0) e 100 µl de fenol (equilibrado em Tris-HCl 0,1 M pH8,0). Os tubos foram vigorosamente agitados por 2 minutos e então foram acrescentados 100 µl de clorofórmio. Após nova agitação, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos. Às fases aquosas resultantes foram adicionados 15 µl de NaOAc 3 M pH 5,2 (1/10 do volume total) e 375 µl de etanol absoluto (2,5 vezes o volume total). O DNA foi precipitado por incubação a -20°C, durante a noite. Após centrifugação por 30 minutos a 4°C, os precipitados contendo o DNA foram lavados com 0,5 ml de etanol 80% e a seguir secos sob vácuo e ressuspensos em 30 µl de TE.

14.1.2) Seqüenciamento do DNA simples fita

a) Sequenase

As reações de seqüência foram realizadas utilizando a enzima Sequenase (USB Corporation). A enzima usada neste método é a T7 DNA polimerase modificada por mutagênese "in vitro", não possuindo atividade exonuclease 3'-5'.

As reações foram iniciadas com 7 µl de DNA simples fita purificado e 1 µl (0,5 pmol) do "primer" universal de M13 (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') ou oligonucleotídeos sintéticos apropriados em tampão (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM, NaCl 25 mM). Essa mistura foi aquecida a 65°C por 2 minutos deixando-se esfriar lentamente até uma temperatura inferior a 35°C. A seguir foi adicionado a cada reação 1 µl de DTT 100 mM, 2 µl de mistura de marcação contendo dGTP, dTTP e dCTP 7,5 µM previamente diluída 1:5, 0,5 µCi de [α ³⁵S]-dATP e 0,25 U de sequenase. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 2-5 minutos e posteriormente 3,5 µl dessa mistura foram transferidos para 4 tubos contendo mistura de terminação para T,C,G,A respectivamente que contém NaCl 50 mM, 80 µM de cada dNTP e 8 µM de cada ddNTP, seguindo-se de incubação a 37°C por 5 minutos. As reações foram terminadas com 4 µl de uma mistura contendo formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol FF 0,05%. Neste ponto as reações podem ser congeladas a -20°C ou então aquecidas a 75°C por 2 minutos para aplicação em gel de seqüenciamento poliacrilamida-uréia.

b) Klenow

O seqüenciamento com a enzima Klenow só foi utilizado para uma análise inicial dos DNA simples fita.

As reações foram feitas numa placa de ensaio de 96 poços. Em um dos lados de um poço foram colocados 2 µl do DNA simples fita purificado e do outro lado 2 µl de tampão Tris-HCl 12,5 mM pH 8,5 contendo MgCl₂ 6,25 mM e 25 nM do primer universal do M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') situado na posição -20 nucleotídeos do sítio múltiplo de clonagem. Através de uma rápida centrifugação as gotas foram misturadas e a placa foi incubada por 1 hora a 55°C a fim de permitir a hibridação do iniciador ao DNA simples fita do M13mp18 ou M13mp19. Após este período, foram colocados em um dos lados

do poço 2 μ l de uma mistura de nucleotídeos contendo um dos quatro dideoxinucleotídeos nas seguintes proporções:

- mistura de T: dTTP 6,25 μ M + dGTP 125 μ M + dCTP 125 μ M + ddTTP 250 μ M
- mistura de C: dCTP 6,25 μ M + dGTP 125 μ M + dTTP 125 μ M + ddCTP 250 μ M
- mistura de G: dGTP 6,25 μ M + dTTP 125 μ M + dCTP 125 μ M + ddGTP 250 μ M
- mistura de A: dTTP 6,25 μ M + dCTP 125 μ M + dGTP 125 μ M + ddATP 250 μ M

No outro lado do poço foram colocados 2 μ l de uma solução contendo 1/8 do volume de DTT, 0,5 μ Ci de [α - 35 S]-dATP e a DNA polimerase Klenow (0,125 U/ μ l). Após breve centrifugação, a placa foi deixada por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 2 μ l da mistura de dNTPS 0,25 mM; e foi deixado por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Neste momento pode-se congelar a placa a -20°C ou adicionar 2 μ l de uma mistura de corantes (azul de bromofenol 0,1%; xilenocianol 0,1% e EDTA 0,01 M em formamida deionizada). Após 20 minutos a 80°C as amostras podem ser aplicadas ao gel de poliacrilamida-uréia.

14.2) DNA dupla fita

14.2.1)Preparação do DNA dupla fita para seqüenciamento

Foi inoculada em 100 ml de LB contendo ampicilina (100 μ g/ml) ou tetraciclina (12,5 μ g/ml) a colônia carregando o plasmídeo contendo o fragmento a ser seqüenciado. A cultura foi mantida sob agitação a 37°C por 16 horas. A seguir, a cultura foi esfriada em banho de gelo por 5 minutos e as células foram centrifugadas a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C no rotor GSA (Sorvall). O precipitado obtido foi ressuspense em 6 ml de uma solução de glicose 50 mM, EDTA 10 mM e Tris-HCl 25 mM pH 8 contendo 30 mg de lisozima e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado então, o dobro do volume (12 ml) de uma solução recém preparada de NaOH 0,2 N contendo SDS 1%. A solução foi homogenizada por inversão do tubo, incubada por 10 minutos no gelo e 6 ml de uma solução de acetato de potássio pH 4,5 (potássio 3 M e acetato 5M) foram adicionados. Após incubação no gelo por 20 minutos, a amostra foi centrifugada a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C no rotor GSA (Sorvall). Ao sobrenadante obtido foram adicionados 15 ml de isopropanol, seguindo-se de incubação por uma hora à temperatura ambiente.

A amostra foi novamente centrifugada por 15 minutos a 6500 rpm a 4°C no rotor GSA (Sorvall). O precipitado contendo o DNA foi ressuspenso em 1 ml de TE. Foram adicionados 0,2 g de acetato de amônia para uma concentração final igual a 2,5 M, seguindo-se de incubação em gelo por 20 minutos e centrifugação por 15 minutos a 4°C no rotor SS34 (Sorvall) a 8000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto. Após 20 minutos em banho de gelo seco/etanol, foi realizada outra centrifugação a 8000 rpm a 4°C no rotor SS34 (Sorvall) por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de TE e foi adicionado RNase para uma concentração final de 10 µg/ml. Após 15 minutos a 37°C, foi adicionado PEG/NaCl (PEG 6000-8000 30% e NaCl 1,5 M) e incubou-se a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, foi efetuada uma centrifugação a 10000 rpm a 4°C no rotor SS34 (Sorvall) por 15 minutos e o precipitado obtido foi ressuspenso em 20 µl de H₂O. Foi adicionado um volume igual de tampão PK 2X (Tris pH 8,0 1 M; EDTA pH 8,0 0,25 M e SDS 10%) e proteinase K (5 mg/ml) para uma concentração final igual a 500 µg/ml. A amostra foi incubada por 30 minutos a 37°C e então foram efetuadas extração com fenol e clorofórmio. O DNA foi a seguir precipitado pela adição de 1/10 volume de KOAc 3 M pH 5,5 e dois volumes de etanol absoluto. Após incubação em banho de gelo seco/etanol por 30 minutos, a amostra foi centrifugada a 12000 rpm a 4°C em Minifuge por 30 minutos. O precipitado contendo o DNA foi lavado com 1 ml de etanol 80 %, seco a vácuo e ressuspenso em 40 µl de TE. Para verificar a quantidade de DNA obtida, 1 µl da amostra foi diluída em 1 ml de água e foi realizada a leitura da amostra em D.O.260 e D.O.280. A amostra será considerada boa quando a razão da D.O.260/D.O.280 for em torno de 1,8-2,0.

14.2.2)Seqüenciamento do DNA dupla fita

Inicialmente, foi realizada a desnaturação alcalina do DNA fita dupla. Para tanto, foi utilizado 5 µg do DNA preparado conforme descrito acima e ao qual foi adicionado 3 µl de uma solução recém preparada de NaOH 2 M e 3 µl EDTA 20 mM num volume final igual a 30 µl. Após uma incubação de 20 minutos a 37°C, o DNA desnaturado foi precipitado pela adição de 0,1 volume de NaOAc 3 M e 2 volumes de etanol absoluto, incubado em banho de gelo seco/etanol, centrifugado por 15 minutos a 4°C a 12000 rpm em Minifuge, seco a vácuo e ressuspenso em 3 µl de H₂O.

A seguir, foi adicionado ao DNA 2 μ l do oligonucleotídeo iniciador (0,5 pmol), 2 μ l do tampão de reação da Sequenase 10 X num volume final igual a 10 μ l, incubado a 72°C por 2 minutos e deixado esfriar lentamente até uma temperatura inferior a 35°C. Após este período foi realizada a reação de seqüenciamento com a polimerase Sequenase, conforme descrito no item 14.1.2.

15. Eletroforese em gel de poliacrilamida-uréia para seqüenciamento

O gel de poliacrilamida 7,5%, contendo uréia 7,5 M, foi montado em placas de 20 X 50 cm com um espaçador de 0,3 mm e o tampão de corrida foi TBE 1X. A solução de acrilamida foi aplicada entre as placas com uma seringa após adição de 120 μ l de PA 10% e 120 μ l de TEMED.

Após as amostras serem colocadas, aplicou-se uma potência constante de 37 W. Ao final da corrida, o gel foi seco durante 2 horas a 80°C e exposto a filme de raio X, à temperatura ambiente durante 24 horas.

16. Gel de poliacrilamida-uréia com gradiente para seqüenciamento

O gel de seqüenciamento foi montado com um gradiente de concentração de TBE. O gradiente foi feito em pipeta, colocando-se 6 ml de uma solução de acrilamida e uréia em 0,5 X TBE, seguido de 4 ml de uma solução de acrilamida em 5 X TBE. O gradiente foi formado, deixando-se subir algumas bolhas de ar pela pipeta. Esta mistura foi aplicada no espaço entre as placas de vidro e a seguir colocou-se o restante da solução contendo 0,5 X TBE; completando-se o espaço entre as placas.

17. Extração de RNA

Células de *Caulobacter* foram inoculadas em meio PYE suplementado com cloreto de cálcio 0,5 mM e incubadas sob agitação a 30°C até uma D.O.₆₀₀ igual a 1. Então as células foram centrifugadas a 12000 xg por 5 minutos a 4°C e os precipitados lavados com 5 ml de TEN (Tris 10 mM, EDTA

1mM e NaCl 10mM). O precipitado foi ressuspenso em tampão NaOAc 20 mM pH 4,0; EDTA 1 mM e 0,2 ml de SDS 10%, rapidamente foi adicionado um volume igual de fenol aquecido a 65°C (saturado com NaOAc 20 mM e EDTA 1 mM). A amostra foi incubada a 65°C por 15 minutos, agitando-se vigorosamente várias vezes durante este período, seguindo-se de centrifugação a 3000 xg por 10 minutos, à temperatura ambiente. Esta extração com fenol foi feita 3 vezes e posteriormente foram feitas uma extração com clorofórmio. À fração aquosa obtida acrescentou-se 1/10 do volume total de NaOAc 3 M pH 5,4 e 2,5 vezes do volume total de etanol absoluto. O RNA foi precipitado em um banho de gelo seco/etanol por 30 minutos. Após centrifugação a 12000 xg por 30 minutos a 4°C, o precipitado foi seco sob vácuo por 20 minutos. O RNA resultante foi ressuspenso em 400 µl de água tratada com DEPC (1 %) e armazenados a -70°C. A D.O. a 260 nm de uma alíquota foi lida e a concentração do RNA determinada. Considerar D.O.₂₆₀ = 1 como 40 µg/ml de RNA.

18. Eletroforese de RNA em gel de agarose

A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5 % em tampão MOPS (20 mM pH 7,0; NaOAc 5 mM; EDTA 0,1 mM contendo formaldeído 3,5 %). Foram usados 5 µg de RNA de cada amostra preparado em tampão MOPS, formaldeído 6 % e formamida 50 %. As amostras foram aquecidas a 65°C por 15 minutos e em seguida colocadas no gelo. Após adição de 2 µl de uma solução glicerol 50 %, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,25 % e 2 µl de brometo de etídeo (0,5 mg/ml), as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão MOPS com voltagem constante de 80 V. Após a corrida os RNAs foram visualizados sob luz UV e fotografado com máquina polaroid.

19. Extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa para determinação de início de transcrição

Aproximadamente 50 pmoles do oligonucleotídeo iniciador foram marcados com 40 µCi de [γ ³²P]-ATP em volume de 25 µl de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6; MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, cloreto de espermidina 0,1 mM; EDTA

0,1 mM e 10 U da enzima T4 polinucleotídeo quinase (Biolabs) por 30 minutos a 37°C. A seguir o DNA foi precipitado com 1 µg de tRNA de levedura, 3 µl de acetato de sódio 3M e 300 µl de etanol por 30 minutos em banho gelo seco/etanol. Após centrifugação a 4°C por 30 minutos a 12000 xg, o precipitado foi lavado com 500 µl de etanol absoluto, e o precipitado final foi seco e ressuspenso em 20 µl de TE. A incorporação do fosfato radioativo ao oligonucleotídeo foi monitorada através de contagem tipo CERENKOV em espectrômetro de cintilação (Beckman) após precipitação com TCA 10 % em papel 3MM.

Para a hibridação 1.10^6 cpm do oligonucleotídeo marcado foram inicialmente precipitados com 50 µg de RNA total de células crescidas a 30°C pela adição de 1/10 volume de NaOAC 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto. Após incubação de 30 minutos em banho gelo seco/etanol, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12000 rpm em minifuge, secas sob vácuo e ressuspenso em 25 µl de tampão de hibridação (PIPES 100 mM pH 7,0; contendo NaCl 1 M e EDTA 5 mM). A seguir, as amostras foram fervidas por 10 minutos e os tubos foram transferidos para 52°C, seguindo-se de uma incubação durante 16 horas. Após a hibridação, foi adicionado 40 µl de água tratada com DEPC (1 %) e 180 µl de etanol e os ácidos nucléicos foram precipitados em banho gelo seco/etanol por 30 minutos, seguindo-se centrifugação a 4°C por 30 minutos a 12000 rpm em Minifuge.

Os precipitados resultantes foram secos a vácuo e então ressuspenso em 30 µl de água tratadas com DEPC. A seguir foram adicionados 10 µl de tampão de transcriptase reversa (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; DTT 10 mM, MgCl₂ 25 mM e KCl 200 mM), 10 µl de dNTPs (2,5 µM de cada), 2 µl de RNAsin (20 U/ml) e 1 µl de transcriptase reversa (25 U).

A reação de extensão do oligonucleotídeo foi feita por 60 minutos a 37°C e interrompida pela adição de 2 µl de EDTA 0,25 M e 1 µl de RNase e incubação por 30 minutos a 37°C. A seguir foram adicionados 150 µl de STE (tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM e NaCl 100 mM) e foi feita uma extração com fenol-clorofórmio. A fase aquosa resultante foi precipitada com etanol e o precipitado ressuspenso em 2 µl de água e 4 µl de tampão de amostra para gel de seqüência. Após fervura por 5 minutos as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-uréia.

20. Ensaio de proteção a nuclease S1 para determinação do início de transcrição

O ensaio foi realizado segundo o método de Berck e Sharp (1977), com as modificações descritas por Amemyia e colaboradores (1986).

A marcação de sonda com ^{32}P na extremidade 5' do oligonucleotídeo foi realizada da seguinte maneira: Aproximadamente 10 pmoles do oligonucleotídeo de interesse foram marcados com 10 U da enzima T4 polinucleotídeo quinase em um volume final de 20 μl de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6; MgCl_2 10 mM; DTT 5mM contendo 50 μCi de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ por uma hora a 37°C. A seguir foram adicionados 70 μl de H_2O e 10 μl de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo EDTA 10 mM; NaCl 1M e foi realizada a extração com fenol/clorofórmio.

A seguir o oligonucleotídeo marcado foi hibridado com o clone M13mp19 B/S que contém grande parte da região codificadora do gene *alkB* e toda a região promotora. A hibridação foi feita a 65°C por 30 minutos e a seguir foram adicionados 1 μl de cada dNTP 0,5 mM (dATP, dCTP, dGTP, dATP); 6 μl de H_2O tratada com DEPC e 5 U da polimerase Klenow. A extensão do oligonucleotídeo foi feita à temperatura ambiente por 15 minutos. Para terminar a reação, esta foi incubada a 65°C por 5 minutos.

Para a hibridação, 10^6 cpm do oligonucleotídeo marcado foram precipitados 50 μg de RNA total de *Caulobacter* de células mantidas a 30°C com 1/10 volume de NaOAc 3M e duas vezes o volume de etanol absoluto, em banho de gelo seco/etanol por 10 minutos. Após a centrifugação o precipitado (DNA + RNA) foi seco e ressuspenso em 28 μl de formamida, aos quais foram adicionados 7 μl de tampão pipes 40 mM pH 6,4 contendo EDTA 1 mM e NaCl 400 mM. As amostras foram fervidas por 10 minutos e rapidamente transferidas para um banho a 52°C, onde permaneceram por 16 horas. Após a hibridação, foram adicionados 350 μl de uma solução contendo NaCl 250 mM, NaOAc 30 mM pH 4,6; ZnSO_4 1 mM e DNA de esperma de salmão 20 mg/ml. A seguir foram adicionados 100 U de nuclease S1 às amostras apropriadas e os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C. As amostras foram precipitadas pela adição de 2,5 μg de tRNA de levedura e 1 ml de etanol absoluto por 15 minutos em banho de gelo seco/etanol.

Após centrifugação, os precipitados foram secos e ressuspenso em 25 μl de tampão de amostra com formamida, fervidos por 5 minutos e aplicados em

gel de poliacrilamida 6%-uréia 8,3 M em TBE. Após a corrida, o gel foi seco e exposto a filme de raioX à temperatura de -70°C.

21. Transformação de *Caulobacter* por conjugação

Como não é possível transformar *Caulobacter* pelos métodos convencionais de transformação utilizados para *E. coli*, a transferência de plasmídeos é feita via conjugação com *E. coli*.

Para o ensaio de conjugação foi inoculado em 5 ml de LB contendo Kanamicina (50 µg/ml) a cepa de *E. coli* carregando o plasmídeo pRK 2013, que possui a capacidade de transferência (tra+) e em outro tubo contendo LB-tetraciclina (12,5 µg/ml) foi inoculada a cepa de *E. coli* que contém a construção em estudo (placZ/290 contendo o promotor em estudo). Em 5 ml de meio PYE suplementado com CaCl₂ 0,5 mM inoculou-se a cepa sincronizável selvagem NA1000 de *Caulobacter crescentus*.

Os tubos contendo as cepas de *E. coli* foram incubadas sob forte agitação durante a noite a 37°C, enquanto que o tubo contendo a cepa de *Caulobacter* foi incubado sob as mesmas condições, exceto que à temperatura foi de 30°C. A seguir foram adicionados sobre um filtro de nitrocelulose estéril 1,0 ml da cultura de *Caulobacter*, 0,5 ml da cultura da cepa de *E. coli* placZ/290 contendo o promotor em estudo e 0,5 ml da cultura da cepa pRK 2013 de *Escherichia coli*.

Após filtração sob vácuo, o filtro de nitrocelulose contendo as bactérias foi colocado numa placa de PYE-ágar suplementada com CaCl₂ 0,5 mM e a placa foi incubada a 30°C durante 16 horas. A seguir, o filtro de nitrocelulose foi colocado em 1 ml de meio líquido PYE suplementado com CaCl₂ e após forte agitação foram retirados 100 µl desta solução e colocadas em placa PYE suplementada com CaCl₂, contendo tetraciclina (2 µg/ml) e ácido nalidíxico (20 µg/ml) e procedeu-se incubação a 30°C por 3-4 dias. A seleção com tetraciclina e ácido nalidíxico permite somente o crescimento da cepa de *Caulobacter* que recebeu por conjugação o plasmídeo placZ/290-contendo o promotor em estudo, isto é, o vetor que contém o gene da β-galactosidase sob o controle do promotor de *alkB*.

22. Transformação de *Caulobacter* por eletroporação

22.1) Preparação das células

Foram inoculados em 25 ml de uma cultura em fase estacionária de *Caulobacter crescentus* LS176 (Δ bla, Δ rsa), sensível a ampicilina, em 500 ml de PYE e procedeu-se incubação com agitação a 30°C até D.O.₆₀₀ = 0,8.

A seguir, as células foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C no rotor GSA (Sorvall). O precipitado obtido foi ressuspenso em 250 ml de uma solução de glicerol 10 %. Esta etapa foi repetida 4 vezes, sendo que na última centrifugação o precipitado foi ressuspenso em 30 ml de glicerol 10 %. Estas células foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C no rotor SS-34 (Sorvall), o precipitado foi ressuspenso em 30 ml de glicerol 10 % e submetido a outra centrifugação. A seguir, o precipitado foi ressuspenso em 5 ml de glicerol 10 % e este volume foi aliquoteado e guardado a -70°C.

22.2) Preparação da amostra

O vetor contendo o fragmento de interesse foi precipitado com a adição de 1/10 volume de NaOAc 3M e 2 volumes de etanol absoluto. A amostra foi mantida em banho de gelo seco/etanol por 30 minutos. Após a centrifugação em Minifuge a 12000 rpm a 4°C por 30 minutos, o precipitado obtido foi lavado 3 vezes com 0,5 ml de etanol 80 %, seco a vácuo e ressuspenso em água.

22.3) Eletroporação

O plasmídeo foi introduzido em *C. crescentus* LS176 através da eletroporação utilizando 1 μ l do vetor contendo o fragmento de interesse e 40 μ l das células descritas no item 22.1, utilizando-se o eletroporador da Bio Rad nas seguintes condições: 25 μ F; 1800 V e 200 Ohms. Após a eletroporação foi adicionado 1 ml de PYE às células e foram então mantidas sob agitação a 30°C por uma hora. A seguir as células foram plaqueadas em PYE-água contendo o antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) para a seleção das células contendo o plasmídeo.

23. Ensaio de "Dot-blot"

Foram inoculadas em meio PYE suplementado com cloreto de cálcio 0,5 mM as colônias de *Caulobacter crescentus* que deveriam conter a fusão de transcrição, seguindo-se de incubação sob agitação a 30°C durante a noite. No dia seguinte, 1,5 ml de cada inóculo foi centrifugado por 2 minutos a 12000 rpm em minifuge à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em 100 µl de meio líquido PYE suplementado com cloreto de cálcio 0,5 mM. Cerca de 10 µl da solução foram colocadas num filtro de nylon e o filtro foi seco à temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir o filtro de nylon foi colocado sobre papel 3 MM umedecido com uma solução de SDS 10%; por 1 minuto, colocando-se então o filtro sucessivamente em solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 5 minutos; em uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M, pH 7.5; NaCl 1,5 M) por 5 minutos e em solução de SSC 2X por 2 minutos. A seguir foi seco por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido por incubação de 2 horas em forno a 80°C para fixação do DNA ao filtro.

Posteriormente a hibridação dos filtros contendo os recombinantes com a sonda do fragmento de interesse marcada, os filtros foram lavados conforme descrito no item 13.5, e expostos a filme de raio X, a -70°C.

24. Ensaio de atividade de β -galactosidase

Foram inoculadas as células de *Caulobacter* que continham o plasmídeo placZ/290 onde o gene da β -galactosidase estava sob controle do promotor do gene de interesse de *Caulobacter*, em meio líquido PYE suplementado com CaCl_2 0,5 mM, contendo Tetraciclina (2 µg/ml) e incubadas sob agitação a 30°C durante a noite.

Estas células foram utilizadas para dosagem da atividade de β -galactosidase. O ensaio foi feito segundo Miller (1972), utilizando-se o substrato cromogênico o-nitrofenil-B-D-galactopiranosídeo (ONPG). A 0,1 ml da cultura adicionou-se 0,8 ml de tampão Z (tampão fosfato de sódio 60 mM pH 7,0 contendo KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM e β -mercaptoetanol 50 mM) e 50 µl de clorofórmio. A suspensão foi agitada rapidamente e incubada por 5 minutos a 30°C. Após este período foram adicionados 200 µl do substrato ONPG, seguindo-se de incubação a 30°C 5 minutos. A reação foi parada com 0,4 ml de Na_2CO_3 1 M e centrifugação 5 minutos a 12000 $\times g$ à temperatura ambiente. A

atividade de β -galactosidase foi determinada por medida da D.O. a 420 nm de alíquotas do sobrenadante.

Concomitantemente a retirada das células para o ensaio acima descrito, foram também retirados 200 μ l de células e a elas acrescentou-se 0,8 ml de água miliQ, efetuando portanto uma diluição de 1:5 e foi feita a leitura da D.O. a 600 nm.

Para o cálculo da atividade de β -galactosidase foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{1000 \times \text{D.O. 420nm}}{\text{D.O. 600} \times \text{vol(ml)} \times \text{t(min)}} \quad \begin{matrix} \text{unidades} \\ \beta\text{-galactosidase} \end{matrix}$$

25. Sincronização das células de *Caulobacter crescentus*

Foi inoculada em meio líquido M2 (Na_2HPO_4 18 mM, KH_2PO_4 8 mM, NH_4Cl 9 mM, FeSO_4 10 mM, glicose 0,2 %, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 0,5 mM) uma cultura da cepa de *Caulobacter crescentus* que carrega o plasmídeo placZ/290 no qual se inseriu um fragmento de DNA contendo o promotor do gene *alk B* de *Caulobacter* (placZ/290-fragmento em estudo) na frente do gene da β -galactosidase. A cultura foi incubada a 30°C sob agitação durante aproximadamente 20 horas. Depois deste período 3 ml desta cultura foram colocados em 500 ml de meio M2 e mantidos sob agitação a 30°C até uma D.O.₆₀₀ igual a 0,9. As células foram então centrifugadas a 7800 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 70 ml de solução M2 sais (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4Cl). À suspensão foi adicionado 35 ml de Ludox LS (Dupont) filtrado. Após uma centrifugação por 30 minutos a 10000 xg a 4°C as células nos diferentes estágios do ciclo celular são separadas por diferença de densidade. As células móveis que são mais densas se concentram próximo ao fundo do tubo. As células prédivisionais e as células talo permanecem no topo do tubo. As células prédivisionais e as células talo são descartadas e as células móveis são coletadas. As células móveis assim obtidas são ressuspensas em solução de M2 sais e centrifugadas a 6000 xg por 5 minutos para a retirada do LUDOX LS. Este procedimento foi repetido 4 vezes, sendo que na última centrifugação os precipitados foram ressuspensos em 2,5 ml de meio líquido M2. As células foram então observadas ao microscópio para a certificação de que as células móveis estavam puras. Este

procedimento permite a obtenção de células móveis 90 % puras. Foi acrescentado mais meio líquido M2 para se obter uma D.O.₆₀₀ igual a 0,5. As células foram colocadas a 30°C sob agitação e deixadas prosseguirem no ciclo celular. Nos tempos determinados foram retiradas alíquotas para marcação de proteínas com pulsos de [³⁵S]-metionina.

26. Marcação de proteínas "in vivo" com pulsos de [³⁵S]-metionina

Alíquotas de 1 ml da cultura em estudo foram retiradas e nos tempos de interesse e foi adicionado 2,5 µCi/ml de [³⁵S]-metionina. As células foram incubadas por 10 minutos a 30°C e coletadas por centrifugação a 12000 xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e os precipitados contendo as células congelados.

27. Ensaio de imunoprecipitação

Os precipitados de células marcadas com [³⁵S]-metionina foram liquefeitos pela adição de 50 µl de uma solução de lisozima 10 mg/ml em TE pH 8,0. Foram então adicionados 0,5 ml de tampão de lavagem (0,05 M de Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,3 M de NaCl e 0,5% de Triton-X100). A suspensão foi incubada por 30 minutos a 4°C e a seguir centrifugada por 30 minutos a 12000 xg a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado 25 µl de "Staph A" (Células de *Staphylococcus aureus* fixadas com formol da BRL) e incubado por 30 minutos a 4°C. Este passo é feito para retirar as proteínas que se ligam inespecificamente à "Staph A". Após centrifugação por 15 minutos a 12000 xg a 4°C, alíquotas de 5 µl do sobrenadante foram contadas após precipitação com TCA 10 % em espectômetro de cintilação Beckman. Quantidades iguais de cpm de cada alíquota foram incubadas com 1 µl de anticorpo anti-β-galactosidase a 4°C, durante a noite.

Foram então adicionadas 25 µl de "Staph A", seguindo-se de incubação a 4°C por 30 minutos e centrifugação por 30 segundos a 12000 xg. O precipitado foi ressuspenso em tampão de lavagem e centrifugado em Minifuge por 30 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes e o precipitado final foi ressuspenso em 30 µl de SDS/PHAGE (40 µl). As amostras foram fervidas por

5 minutos e centrifugadas por 2 minutos em Minifuge. Ao sobrenadante foi adicionado 1 μ l de DTT 0,1 M e foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS.

28. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Esta eletroforese foi feita segundo o método de Laemmli (1970). O gel de corrida foi de 10 % de poliacrilamida e o de empilhamento 4,5 %, sendo que a espessura do gel é cerca de 1 mm. As amostras dissolvidas são fervidas por 3 minutos e a seguir foi adicionado DTT (ditiotreitól) numa concentração final de 100 mM. A amperagem utilizada para a corrida foi de 20 mA para o empilhamento e 25 mA para a separação. Após eletroforese o gel foi fixado com metanol 50% e ácido acético 10 %, e tratado Amplify (Amersham) por 30 minutos e seco sob vácuo a 80°C por 2 horas. O gel foi exposto a filme de raio X à temperatura de -70°C.

29. Experimento de dupla sincronia

Foi inoculado em meio líquido M2 uma cultura da cepa de *Caulobacter crescentus* que carrega o plasmídeo no qual se inseriu um fragmento de DNA contendo apenas o promotor do gene *alkB* de *Caulobacter* (placZ/290 Sal-StuI) na frente do gene da β -galactosidase. A cultura foi incubada a 30°C sob agitação até D.O.₆₀₀ = 0,9, e então as células móveis foram isoladas como descrito no item 23 e deixadas prosseguirem na ciclo celular.

As células prédivisionais foram marcadas com 2,5 μ Ci/ml de [³⁵S]-metionina por 10 minutos e depois foi realizado o "chase" com metionina fria 0,1 mM-peptona 0,2 %. Tais células prosseguiram no ciclo celular até a divisão celular. A seguir acrescentou-se às amostras 20 ml de LUDOX LS (Dupont) filtrado. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 10000 $\times$ g para que as células nos diferentes estágios do ciclo celular sejam separadas por diferença de densidade. As células móveis que são mais densas se concentram próximo ao fundo do tubo. As células pré-divisionais juntamente com as células talo são coletadas e as células móveis coletadas separadamente. As células foram então observadas ao microscópio para a certificação de que as células móveis estavam puras, assim como as células talo mais as células pré-

divisionais. As amostras assim obtidas são ressuspensas em solução de M2 sais e centrifugadas a 6000 xg por 5 minutos para a retirada do LUDOX LS. Este procedimento foi repetido 4 vezes, sendo que na última centrifugação os precipitados foram congelados a -70°C. A seguir foi realizado o ensaio de imunoprecipitação.

30. Preparação de extrato celular de *Caulobacter crescentus*

Foi realizada a diluição de culturas de *Caulobacter crescentus* para D.O.₆₀₀ = 0,2 e foi incubada por uma hora a 30°C sob agitação até D.O.₆₀₀ = 0,4. Após este período as células foram coletadas e foi adicionado volume igual de TCA 25% (ácido tricloroacético), que foi incubado por 30 minutos a 4°C, centrifugado por 10 minutos a 7000 rpm a 4°C e lavados com 1 ml de acetona fria. O precipitado obtido foi seco a vácuo e ressuspenso em 100 µl de tampão de amostra para eletroforese - solução O (Laemmli, 1970).

31. "Western-blot"

O procedimento usado é basicamente o descrito por Towbin e colaboradores (1979). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%, os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL), utilizando um aparato tipo sanduíche (Biorad) submerso em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 126 mM e metanol 20%) e submetido a uma voltagem de 80 V por 2 horas (Micro System Byolabs). Após a transferência, os filtros foram corados com Ponceau (Ponceau S 0,1% e ácido acético 10%) e descorados com água destilada a fim de visualizar a eficiência da transferência. A canaleta contendo os padrões de peso molecular são identificados e marcados com caneta a prova d'água (alguns marcadores de peso molecular já são pré-corados, não havendo a necessidade deste passo).

A seguir, o filtro foi colocado em solução de bloqueio TBS/leite (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM e leite desnatado 5%) por 30 minutos para bloquear as possíveis ligações inespecíficas. A seguir o filtro foi incubado com o anti-soro de interesse sob agitação a 4°C durante a noite. No dia seguinte, os

filtros foram lavados 4 vezes com TBST (TBS com detergente Tween 0,05%) e uma vez com TBS. O complexo antígeno-anticorpo foi incubado por uma hora com soro anti IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina. O filtro foi novamente lavado com TBST por 40 minutos (4 lavagens de 10 minutos) e uma vez com TBS por 10 minutos para remover os resíduos de Tween 20. A seguir, o filtro foi incubado no escuro com uma solução de BCIP/NBT (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; nitro-azul de tetrazolium 0,3 mg/ml e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato 0,15 mg/ml). Os precipitados residuais foram lavados com TBS e o filtro foi seco ao ar e guardado protegido da luz.

RESULTADOS

1. Isolamento do clone genômico contendo toda a região codificadora do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*

Durante o seqüenciamento do clone pGR24, que contém os genes de choque térmico *dnaK* e *dnaJ* de *Caulobacter crescentus* (Gomes e colaboradores, 1990), verificou-se a existência de um quadro aberto de leitura, na direção oposta aos genes *dnaK* e *dnaJ*, cuja seqüência deduzida de aminoácidos mostrou alta homologia com a proteína AlkB de *E. coli* (Kondo e colaboradores, 1986). No entanto, a extremidade 3' do gene *alkB* de *C. crescentus* não estava presente no clone pGR24. Assim decidimos isolar o restante do gene para obter a seqüência completa do gene *alkB* e verificar a existência de outros possíveis ORFs transcritos com o gene *alkB*.

A estratégia utilizada para o isolamento da extremidade 3' do gene *alkB* foi a seguinte: o fragmento BamHI/Sall de 0,9 kb (Fig. 02) que contém a região regulatória e grande parte da região codificadora do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*, foi marcado com [α -³²P]-dATP e [α -³²P]-dCTP e a sonda radioativa obtida foi hibridada em um "Southern blot", (cedido pelo aluno de doutorado Marcelo Avedissian), contendo amostras do DNA de *Caulobacter* digerido respectivamente com *Bam*HI; *Bam*HI e *Pst*II; *Pst*II e *Xba*I. Após a lavagem do filtro em condições de alta exigência, o filtro foi exposto a filme de raio X. A Fig. 03 mostra o auto-radiograma do filtro. Este experimento revelou que o fragmento que deveria conter todo o restante do gene *alkB* seria o fragmento obtido por digestão com a enzima *Pst*II de aproximadamente 7,0 kb.

2. Construção de um banco genômico parcial de *Caulobacter crescentus*

Para isolar o fragmento *Pst*II de 7,0 kb foi construída uma biblioteca genômica parcial de *C. crescentus*. DNA total de *C. crescentus* foi digerido com a enzima *Pst*II e analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. A região contendo os fragmentos entre 6 e 9 Kb, correspondente à região que

FIGURA 02: Mapa de restrição do fragmento BamHI do clone pGR24 que contém o gene *dnaK* e parte do gene *dnaJ*. Subclones deste fragmento foram utilizados como sonda (fragmento BamHI-SalI) e para seqüenciamento (fragmento BamHI-PstI). Enzimas de restrição: B, *BamHI*; C, *ClaI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; R, *RsaI*; S, *SalI*; e X, *XhoI*. As setas indicam a direção de transcrição dos genes.

FIGURA 03: Auto-radiograma do "Southern-blot" de DNA total de *Caulobacter crescentus* em condições de alta exigência. O DNA total foi digerido com as seguintes enzimas: *Bam*HI (1); *Bam*HI e *Pst*I (2); *Pst*I (3) e *Xba*I (4) e o filtro foi hibridado com o fragmento *Bam*HI-Sall (0,9 kb) marcado com [α - 32 P]-dATP e [α - 32 P]-dCTP. PM - DNA do fago lambda digerido com a enzima *Hind*III.

hibridou com o fragmento BamHI/Sall em "Southern-blot", foi isolada do gel de agarose 1% por eletroeluição e os fragmentos obtidos foram ligados ao vetor pBluescript II KS previamente digerido com a enzima *PstI* e a ligação foi utilizada para transformar a cepa TG-1 de *E. coli*.

As colônias brancas carregando plasmídeos contendo insertos, evidenciadas por seleção com X-gal foram plaqueadas em duplicatas diretamente numa placa de LBA e sobre filtro de nitrocelulose. Após o tratamento do filtro de nitrocelulose, conforme Materiais e Métodos (item 12), o mesmo foi hibridado com o fragmento BamHI/Sall (Fig. 02) marcado com ³²P, para a detecção do clone de interesse. Através da autoradiografia do filtro foi possível a identificação de quatro prováveis clones positivos (Fig. 04).

Após a preparação de plasmídeo em pequena escala dos 4 possíveis clones positivos, foi realizada a digestão do DNA obtido com a enzima *PstI* e a digestão foi analisada em gel de agarose 1%. Como mostra a Fig. 05A somente o clone 1 mostrou a presença do fragmento esperado de 7,0 kb. O DNA foi transferido para um filtro de nylon, segundo o método de Southern (1975), e hibridado com a sonda BamHI/Sall (Fig. 02). Através do auto-radiograma foi verificado que o clone 1 e 4 continham o fragmento de interesse (Fig. 05B). Na Fig. 05A não foi possível verificar a presença do fragmento Pst de 7,0 kb na canaleta 4, pois a quantidade de DNA do clone 4 não era suficiente para visualização com brometo de etídeo.

3. Caracterização do clone 1

Para caracterizar o clone 1, foi realizada preparação de DNA de plasmídeo em grande escala, que foi utilizada para obter o seu mapa de restrição parcial. Para isso, foram realizadas digestões simples ou duplas com várias enzimas de restrição. As enzimas utilizadas foram as seguintes: *BamHI*; *BamHI* e *PstI*; *PstI*; *KpnI*; *BamHI* e *KpnI*, *Clal*, *Clal* e *BamHI*, *XhoI*, *BamHI* e *XhoI* e *Sall*, e as digestões foram analisadas em gel de agarose 1 % (Fig. 06A). Após eletroforese, o DNA foi transferido para um filtro de nylon, segundo o método de Southern (1975) e hibridado com o fragmento BamHI/Sall (Fig. 02) marcado com [α -³²P]-dATP e [α -³²P]-dCTP. O filtro foi lavado em condições de alta exigência e exposto a filme de raio X a -70°C. Através do autoradiograma (Fig. 06B), foi

FIGURA 04: Auto-radiograma dos filtros de nitrocelulose contendo os clones considerados positivos no primeiro plaqueamento. Os filtros foram analisados utilizando como sonda o fragmento BamHI-Sall marcado com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ e $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ e lavados em condições de alta exigência conforme descrito em Materiais e Métodos. As setas indicam os quatro possíveis sinais positivos.

FIGURA 05: A) Eletroforese em gel de agarose TAE 1 % corado com Brometo de Etídeo dos quatro possíveis clones positivos. Após a preparação de plasmídeo em pequena escala dos quatro possíveis clones positivos, estes foram digeridos com a enzima *PstI* e analisados em gel de agarose. PM - DNA do fago lambda digerido com a enzima *HindIII*. **B) Autoradiograma do gel de agarose.** O gel de agarose contendo o DNA dos quatro possíveis clones positivos digeridos com a enzima *PstI* foi transferido para um filtro de nylon e hibridado com o fragmento Bam-Pst marcado com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ e $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$.

FIGURA 06: A) Análise dos sítios de enzimas de restrição do clone 1 em gel de agarose. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo do DNA do clone 1 submetido a digestão com várias enzimas de restrição: *Bam*HI (1); *Bam*HI e *Pst*I (2); *Pst*I (3); *Kpn*I (4); *Bam*HI e *Kpn*I (5); *Cl*aI (6); *Bam*HI e *Cl*aI (7); *Xho*I (8); *Bam*HI e *Xho*I (9) e *Sal*I (10). PM - DNA do fago lambda digerido com a enzima *Hind*III. **B) Auto-radiograma do "Southern-blot" do gel de agarose em condições de alta exigência.** O filtro de nylon foi hibridado com o fragmento Bam-Sal marcado com [α - 32 P]-dATP e [α - 32 P]-dCTP.

possível a identificação dos fragmentos que hibridavam com o fragmento BamHI/Sall. A partir deste experimento foi construído um esquema que representa o mapa de restrição parcial do clone 1 (Fig. 07). Após análise destes resultados, resolvemos escolher o fragmento de aproximadamente 4,5 kb correspondente a digestão dupla com as enzimas *BamHI* e *PstI* para seqüenciamento, pois o mesmo deveria conter a região 3' do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*. Para tanto, este fragmento foi clonado no vetor de seqüenciamento M13mp19 e seqüenciado a partir do sítio de *BamHI*, permitindo o seqüenciamento da extremidade 3' do gene *alkB*. A extremidade 5' do gene *alkB* foi determinada seqüenciando-se o fragmento BamHI-PstI (1,3 kb) do plasmídeo pGR24 utilizando-se clones deletados, segundo o método de Henikoff (1987) e os oligonucleotídeos sintéticos AB1 e D55.

Com esta abordagem, foi possível realizar o seqüenciamento total do gene *alkB* de *Caulobacter* (Fig. 08). Verificou-se também que diferentemente de *E. coli*, o gene *alkB* de *Caulobacter* não faz parte de um operon junto com o gene *ada*, sendo que em *E. coli* o gene *ada* precede o gene *alkB*. Através da comparação da seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de DNA do gene *alkB* de *C. crescentus* com a proteína AlkB de *E. coli* (Kondo e colaboradores, 1986), foi observada uma identidade de 42,5% (Fig. 09).

4. Identificação do início de transcrição do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*

Para determinar o início de transcrição do gene *alkB* de *C. crescentus* utilizamos tanto o ensaio de extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa quanto o ensaio de proteção à nuclease S1. Para o experimento de extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa utilizamos o oligonucleotídeo AB1 que contém 18 bases (5'-GGCTTCCCGTAGGCGGTC-3') complementares aos nucleotídeos +90 a +109 da região codificadora de *alkB*, que foi marcado com [γ -³²P]-ATP e hibridado com RNA isolado de células de *Caulobacter* crescidas até uma D.O.₆₆₀ = 1 a uma temperatura de 30°C. O híbrido foi estendido com a transcriptase reversa e o produto foi aplicado em um gel de poliácridamida-uréia e corrido junto com uma reação de seqüência usando o mesmo oligonucleotídeo como iniciador. A migração do fragmento

FIGURA 07: Mapa de restrição parcial do clone 1. Esquema do fragmento *PstI* (7,0 kb) que contém o gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*. Sítios de enzimas de restrição presentes no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pBluescribe II KS estão mostrados com letras menores. Enzimas de restrição: B, *BamHI*; C, *Clal*; K, *KpnI*; P, *PstI*; S, *Sall* e X, *XhoI*. A seta indica a direção de transcrição do gene *alkB*.

-289 -280 -270 -260 -250 -240
 GTCGACGAA AATCAAACGG GCGGAATGCG TTGTGCGAAG TTGACGAGCC CGTCAACCCC
SalI
 -230 -220 -210 -200 -190 -180
 GCTTCGGAGC CGGATATGGG GGATAGGGGC CGCCACGCAA GGCCATAACC CCTCCCACGA

 -170 -160 -150 -140 -130 -120
 CGGGGGAATC TGGATTCCGG GCCAAGAAAA ACGGCCGCGAG CCGATGCGCC GGGGGCAAAC

 -110 -100 -90 -80 -70 -60
 GATGCATGAG CGGCGGTTTT GTGGAAAATG GCTGTTGTTC GCCGGGCTGT GGCGGCGCGT

 -50 -40 -30 -20 -10
 GGGCTCCAGA TGATCGCCAA GCCTCTCACC GTTGTCCCCG GCTTTGACGT ATG GCC AGG
 -10 Met Ala Arg

 StuI 15 30 45 60
 CCT GCT GGA TAC TCG GCG CAG CGC GCC TTG GTC GAA GCG GTG CTA GCG GGC GCC
 Pro Ala Gly Tyr Ser Ala Gln Arg Ala Leu Val Glu Ala Val Leu Ala Gly Ala

 75 90 105
 GAA CAG GCG CCC TTT TCG AAC TAT AGG ACC GCC TAC GGG AAG CCG ATG AGC GTT
 Glu Gln Ala Pro Phe Ser Asn Tyr Arg Thr Ala Tyr Gly Lys Pro Met Ser Val

 AB1
 120 135 150 165
 GCG ATG ACG GCG CTT GGG TCG CTG GGC TGG ACC AGC GAC GCG CGT GGC TAT CGG
 Ala Met Thr Ala Leu Gly Ser Leu Gly Trp Thr Ser Asp Ala Arg Gly Tyr Arg

 180 195 210 225
 TAT GTC GAT CGT CAT CCC GAA ACG GGC CGA CCC TGG CCC GAC ATG CCG CCG GCC
 Tyr Val Asp Arg His Pro Glu Thr Gly Arg Pro Trp Pro Asp Met Pro Pro Ala
 PvuI
 240 255 270
 CTG CTC GAC CTC TGG ACG GTG CTC GGC GAC CCG GAA ACC CCG CCG GAT TCC GTT
 Leu Leu Asp Leu Trp Thr Val Leu Gly Asp Pro Glu Thr Pro Pro Asp Ser Val

 285 300 315 330
 CTG GTC AAC CTC TAC GCG ACG CGG ACG GGC GCG CGC ATG GGA CTG CAT CAG GAC
 Leu Val Asn Leu Tyr Ala Thr Arg Thr Gly Ala Arg Met Gly Leu His Gln Asp
 D55
 345 360 375
 CGT GAC GAG GCC GAT CCC CGA TTT CCG GTG ATG TCG ATC TCG CTG GGC GAC ACG
 Arg Asp Glu Ala Asp Pro Arg Phe Pro Val Met Ser Ile Ser Leu Gly Asp Thr

 390 405 420 435
 GCG GTG TTC CGG ATC GGC GGC GTC AAC CGC AAG GAC CCG ACA AGA AGC CTT CGC
 Ala Val Phe Arg Ile Gly Gly Val Asn Arg Lys Asp Pro Thr Arg Ser Leu Arg

 450 465 480 495
 TTG GCG TCG GGC GAC GTC TGT CGC CTC TTG GGC CCT GCG CGC CTG GCG TTC CAC
 Leu Ala Ser Gly Asp Val Cys Arg Leu Leu Gly Pro Ala Arg Leu Ala Phe His

 510 525 540
 GGC GTC GAC CGG ATT CTG CCC GGA TCC GCC TGG CCG GCG AAG GCG ACG CCG CGC
 Gly Val Asp Arg Ile Leu Pro Gly Ser Ala Trp Pro Ala Lys Ala Thr Pro Arg
 BamHI
 555 570 585 600
 GCG CGG CGG TCC GCG TGG GGA TCT CTA CAT CTT CCT GTC AGT GAC CCC GCA CGA
 Ala Arg Arg Ser Ala Trp Gly Ser Leu His Leu Pro Val Ser Asp Pro Ala Arg

 615
 GCT GTT CGA GCG TGA
 Ala Val Arg Ala *

FIGURA 08: Sequência de nucleotídeos do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*. As regiões sublinhadas correspondem as sequências complementares aos oligonucleotídeos sintéticos AB1 e D55 usados para o sequenciamento.

	10	20	30	40	50	60
AlkB C.c.	RPAGYSAQRALVEAVLAGAEQAPFSNYRTAYGKPM	SVAMTALGSLGWTSDARGYRYVDRH				
	:		..	:		:
AlkB E.c.	RRFAFNAAEQ	LIRDINDVASQSPFRQ	MTVPGGYTMSVAMTNC	GHLGWTTHRQGYLYSPID		
	30	40	50	60	70	80
	70	80	90	100	110	
AlkB C.c.	PETGRPWPDMPPALLDL----	WTVLGD	PETPPDSCLVNLYATGARMGLHQDRDEADPRFP			
	:		:	:	:	:
AlkB E.c.	PQTNKPWPAMPQSFHNL	CQRAATAAGYPDFQPDAC	LINRYAPGAKLSLHQDKDEPD	LRAP		
	90	100	110	120	130	140
	120	130	140	150	160	170
AlkB C.c.	VLSISLGDTAVERIGGVNRKDPT	RSRLASGDVCRL	LGPARLAFHGVDRILPG			
	:		:	:	:	:
AlkB E.c.	IVSVSLGLPAIFQFGGLKRNDPLKRL	LEHGDVVWGGESR	LFYHGIQPLKAG			
	150	160	170	180	190	

FIGURA 09: Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína AlkB de *C. crescentus* com a proteína AlkB de *E.coli*. O sinal (:) representa aminoácidos idênticos, (.) mudanças conservativas e (X) delimita a região de maior similaridade. As comparações foram feitas utilizando o programa ALIGN e FASTA (Pearson & Lipman, 1988).

indicou a existência de um único início de transcrição localizado nos resíduos de timina ou adenina nas posições -40 e -41, respectivamente (Fig. 10).

Para determinação do início de transcrição utilizando o ensaio de proteção à nuclease S1, o oligonucleotídeo AB1 foi marcado com [γ - ^{32}P]-ATP, estendido com a polimerase Klenow usando DNA fita simples do fago M13 contendo a extremidade 3' do gene *alkB*. A sonda de DNA obtida foi hibridada com RNA isolado de células de *Caulobacter* crescidas até uma D.O.₆₆₀ = 1 a uma temperatura de 30°C (nº 3) ou com tRNA de levedura como controle (nº 1 e 2). Após o tratamento com nuclease S1, as amostras foram precipitadas e ressuspensas em tampão de amostra com formamida e ressolvidas em gel de poliacrilamida-uréia, juntamente com uma reação de seqüência usando o mesmo oligonucleotídeo como iniciador. O experimento indicou a existência de um único sítio de iniciação de transcrição, na posição correspondente ao resíduo de citosina ou guanina nas posições -67 e -68 respectivamente (Fig. 11). Possíveis regiões -10 e -35 em relação aos inícios de transcrição obtidos pelos dois métodos estão mostradas na Fig. 12A.

5. Análise da região promotora do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*

A região promotora do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* está mostrada na Fig. 12A. Seqüências presentes a 5' dos inícios de transcrição determinados por S1 e PE foram comparadas com seqüências promotoras localizadas nas posições -10 e -35 do início de transcrição dos genes de *E. coli* e *C. crescentus* transcritos pelo fator sigma 70 e com os promotores de genes envolvidos no reparo de lesão de DNA causadas por agentes alquilantes (Tab. 01). Não se encontrou a -10 e -35 dos inícios de transcrição, seqüências que se aproximassem do consenso obtido para os promotores de *E. coli*, *C. crescentus*, *B. subtilis* ou *S. typhimurium*.

Para verificarmos a formação de estrutura secundária no mRNA da região promotora do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*, que poderia explicar a diferença na determinação do início de transcrição pelos dois métodos, foi utilizado o programa "FoldRNA" e "SQUIGGLES" do "GCG Package Program" da Universidade de Wisconsin (Zucker & Stiegler, 1981). Através da estrutura

FIGURA 10: Identificação do início de transcrição do gene *alkB* de *C. crescentus* através do ensaio de extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa. O oligonucleotídeo AB1 (complementar a sequência sublinhada na Fig. 08) foi marcado com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ e hibridado com 50 μg do RNA total de células de *Caulobacter* crescidas a 30°C. O híbrido foi estendido pela transcriptase reversa e o produto aplicado em gel de poliacrilamida-uréia. Para identificação do início de transcrição foi corrido junto uma reação de sequenase (T,C,G e A) utilizando o mesmo oligonucleotídeo como iniciador.

FIGURA 11: Identificação do início de transcrição do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* através do ensaio de proteção a nuclease S1. O oligonucleotídeo AB1 (complementar a sequência sublinhada na figura 08) foi marcado com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ e estendido com a polimerase Klenow. Canaletas: 1) sonda marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$; 2) sonda marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ e tratada com nuclease S1 e 3) sonda marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ e hibridada com 50 μg de RNA total de células crescidas a 30°C e tratada com nuclease S1. Para a identificação do início de transcrição foi corrida também uma reação de sequência (T, C, G e A) utilizando o mesmo oligonucleotídeo como iniciador. MW - DNA do fago ϕx digerido com a enzima *HaeIII*, defosforilado e marcado com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

A

```

-289
GTCGACGAAAATCAAACGGGCGGAATGCGTTGTGCGAAGTTGACGAGCCCGTCAACCCC
  SalI
-230
GCTTCGGAGCCGGATATGGGGGATAGGGGCCGCCACGCAAGGCCATAACCCCTCCCACGA

-170
CGGGGGAATCTGGATTCCGGGCCAAGAAAAACGGCCGCAGCCGATGCGCCGGGGGCAAAC

-110
GATGCATGAGCGGCGGTTTGTGGAAAATGGCTGTTGTTTCGCCGGGCTGTGGCGGCGCGT
      -35          -10          **          -10
-50
GGGCTCCAGATGATCGCCAAGCCTCTCACCGTTGTCCCGGCTTTGACGT  ATG GCC AGG
                  °°                                     Met Ala Arg

```

B

FIGURA 12: A) Seqüência da região promotora do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*. A seqüência foi numerada considerando a adenina do códon ATG como nucleotídeo +1. Estão indicados os inícios de transcrição determinados por extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa (•) e por proteção a nuclease S1 (*). **B) Suposta estrutura secundária do mRNA da região promotora do gene *alkB* de *C.crescentus*.** A possível estrutura secundária da região 5' do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* foi deduzida utilizando o programa "FOLDRNA" e "SQUIGGLES" do "GCG Package Program" da Universidade de Wisconsin (Zucker & Stiegler, 1981). S1 - início de transcrição determinado por ensaio de proteção a nuclease S1 e PE - início de transcrição determinado por ensaio com transcriptase reversa.

PROMOTOR	REGIÃO (- 35)	REGIÃO (- 10)	Ref.
<i>E. coli</i> σ^{70}	TTGACA	TATAAT	d
<i>C. crescentus</i> σ^{70}	TGGNN	CTANACAC	a
<i>E. coli</i> <i>ada</i>	TTGGTT	CAGCCT	b
<i>E. coli</i> <i>alkA</i>	GCGCAG	TATGCT	b
<i>S. typhimurium</i> <i>ada</i>	CGGGTT	CACACT	c
<i>B. subtilis</i> <i>ada</i>	TATTTT	TATAGT	e
<i>C. crescentus</i> <i>alkB</i> (PE)	GGCTGT	GCGCGT	este trabalho
<i>C. crescentus</i> <i>alkB</i> (S1)	TGAGCG	AATGGC	este trabalho

TABELA 01: Sequências promotoras de *E. coli*, *C. crescentus*, *B. subtilis* e *S. typhimurium*. Ref - Referências: a) Malakooti e colaboradores, 1992; b) Furuischi e colaboradores, 1992; c) Hakura e colaboradores, 1991; d) Hawley & McClure, 1983 e e) Moroshi e colaboradores, 1990.

secundária deduzida pelo programa (Fig. 12B), foi possível observar a formação de uma alça na região promotora, que poderia causar uma pausa inespecífica da transcriptase reversa.

6. Uso de gene repórter de transcrição para estudar a expressão do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*

Visto que "Northern-blots" normalmente não funcionam em *Caulobacter crescentus*, para analisar a expressão de *alkB* em resposta a agentes alquilantes, assim como durante o ciclo celular da bactéria, foi construída uma fusão de transcrição com o gene repórter que codifica a β -galactosidase, presente no vetor *placZ/290*, e o fragmento *Sall/Stul* de 0,3 kb que contém a região promotora do gene *alkB* (Fig. 13), colocando o gene *lacZ* sob o controle do promotor de *alkB*.

Este vetor foi transferido para *C. crescentus* via conjugação com *E. coli* conforme descrito em Materiais e Métodos. O transformante obtido (#11B) foi analisado quanto à atividade de β -galactosidase. Para realizar este experimento, as células de *Caulobacter* que contêm a fusão de transcrição foram inoculadas em meio líquido PYE suplementado com CaCl_2 0,5 mM e tetraciclina (resistência conferida pelo vetor *placZ/290*) e crescidas durante a noite sob agitação a 30°C. No dia seguinte foi realizado o ensaio de atividade de β -galactosidase conforme descrito por Miller (1972). O ensaio revelou que a fusão do promotor de *alkB* com o gene da β -galactosidase gera uma atividade em torno de 1300 unidades de β -galactosidase.

7. Efeito de agentes alquilantes sobre a expressão de *alkB*

Para investigar se o promotor do gene *alkB* é induzido por doses não letais de agentes alquilantes como o metil metanosulfonato (MMS), semelhante ao que ocorre com *E. coli*, as células de *Caulobacter* contendo a fusão de transcrição *alkB-placZ/290* foram inoculadas em meio líquido PYE suplementado com CaCl_2 0,5 mM contendo tetraciclina (2 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas durante a noite sob agitação a 30°C. No dia seguinte, a cultura foi diluída para

FIGURA 13: A) Vetor repórter de transcrição (*placZ/290*) contendo a região promotora do gene *alkB* de *Caulobacter* (fragmento *Sall-Stul*). A) O vetor repórter de transcrição que contém o gene da β -galactosidase sem o seu promotor foi ligado ao fragmento *Sall-Stul* do clone pGR24 que contém o promotor do gene *alkB*; colocando o gene da β -galactosidase sob o controle do promotor do gene *alkB*. B) Estratégia de clonagem do fragmento que contém o promotor do gene *alkB* no vetor repórter de transcrição *placZ/290*. Enzimas de restrição: A, *Apal*; B, *BamHI*; E, *EcoRV*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; P, *PstI*; R, *RsaI*; S, *Sall*; Sc, *SacI*; Sp, *SphI*; St, *Stul* e Xb, *XbaI*.

uma D.O.₆₀₀ = 0,1 e dividida em duas amostras. Estas foram incubadas com ou sem 0,01 % de MMS a 30°C

e a atividade de β -galactosidase foi determinada nos tempos de 0, 30, 60, 120 e 180 minutos após a adição da droga. Constatou-se que a transcrição do gene *alkB* de *Caulobacter* não é induzida pelo MMS (Fig. 14). Foram testadas outras concentrações de MMS (0,1 % e 0,05 %) e também não foi observada indução (resultado não mostrado).

A fim de verificar se o promotor do gene *alkB* de *C. crescentus* é sensível a outros agentes alquilantes, o mesmo ensaio foi realizado utilizando os agentes alquilantes etil metanosulfonato (EMS) e dimetil metanosulfonato (DMS). Com esta finalidade as células nas mesmas condições acima descritas foram tratadas com 0,01 %, 0,05 % e 0,1 % de EMS ou DMS. Como controle foi realizado um experimento em paralelo sem adição de agentes alquilantes. Através deste experimento não observamos nenhuma indução devido a adição destes agentes (resultados não mostrados).

Para verificar através do ensaio de imunoprecipitação, que é mais sensível do que a simples determinação da atividade de β -galactosidase se a transcrição do gene *alkB* de *C. crescentus* é induzida pelo agente alquilante MMS, as células de *Caulobacter* que contém a fusão de transcrição *alkB*-*placZ*/290, foram incubadas com MMS 0,01 % durante 0, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Caulobacter* que contém a fusão de transcrição *groESL*-*placZ*/290 (onde o vetor repórter de transcrição *placZ*/290 contendo o gene da β -galactosidase sem o seu promotor foi ligado a região promotora do operon *groESL* de *Caulobacter*), cedida pelo aluno de doutoramento Marcelo Avedissian. Tal construção, pode ser usada como controle positivo, pois algumas proteínas de choque térmico são induzidas por agentes alquilantes, entre elas GroES e GroEL (Lemotte & Walker, 1985). Alíquotas de células dos vários tempos de tratamento com MMS foram marcadas com pulsos de [³⁵S]-metionina por 10 minutos. Os extratos celulares obtidos foram imunoprecipitados com anticorpo anti- β -galactosidase e os imunoprecipitados foram resolvidos em gel de poliacrilamida-SDS. O autoradiograma mostrou que a transcrição do gene *alkB* de *C. crescentus* não é induzida por MMS, enquanto que a transcrição dirigida pelo promotor de *groESL* é induzida, conforme o esperado (Fig. 15).

FIGURA 14: Efeito da adição de MMS na atividade de β -galactosidase nas células de *Caulobacter* que carregam o plasmídeo *alkB-placZ/290*. As células foram crescidas em meio líquido PYE a 30°C até D.O.₆₆₀ = 0,5 e então a cultura foi dividida em duas amostras e diluídas até D.O.₆₆₀ = 0,1. As amostras foram tratadas na ausência e na presença de 0,01% de MMS. Alíquotas das culturas foram incubadas a 30°C e alíquotas foram removidas nos tempos indicados. A atividade de β -galactosidase foi determinada pelo método de Miller (1972).

FIGURA 15: Efeito da adição de MMS na síntese de β -galactosidase nas células de *Caulobacter* que carregam o plasmídeo *alkB-placZ/290*. **(A)** A região promotora do gene *groESL* foi ligada a um vetor repórter de transcrio (*placZ/290*) contendo o gene da β -galactosidase sem o seu promotor e o plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar *Caulobacter*. No transformante obtido foi determinado o efeito da adio de MMS 0,01 % na síntese da β -galactosidase através do ensaio de imunoprecipitao. **(B)** A região promotora do gene *alkB* foi ligada a um vetor repórter de transcrio (*placZ/290*) contendo o gene da β -galactosidase sem o seu promotor e o plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar *Caulobacter*. No transformante obtido foi determinado o efeito da adio de MMS 0,01 % na síntese da β -galactosidase através do ensaio de imunoprecipitao.

8. Expressão do gene *alkB* durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*

Com o transformante obtido (#11B) foi realizado o experimento de imunoprecipitação para averiguarmos a transcrição do gene *alkB* durante o ciclo celular de *Caulobacter*. Para tanto, foram isoladas por sincronização, células de *Caulobacter* do tipo móvel contendo o plasmídeo *alkB-placZ/290*. As células foram permitidas prosseguir no ciclo celular e nos vários tempos (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180) foram retiradas alíquotas para a marcação das proteínas com pulsos de [³⁵S]-metionina. Os extratos destas células foram imunoprecipitados com anticorpo anti- β -galactosidase e os imunoprecipitados resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. O autoradiograma deste experimento sugere que a transcrição do gene *alkB* é regulada durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*, apresentando níveis máximos na célula talo (Fig. 16). Os extratos também foram imunoprecipitados com anticorpo anti-flagelina de *Caulobacter* para controle da sincronia (Fig. 16).

9. Padrão de segregação da fusão de transcrição *alkB-placZ/290* de *Caulobacter crescentus*

A expressão da subunidade B da enzima DNA girase de *C. crescentus*, codificada pelo gene *gyrB* (Rizzo e colaboradores, 1993), apresenta o mesmo padrão de variação que o gene *alkB* aqui analisado, baixa expressão em célula móvel e alta expressão em célula talo, expressão esta determinada também como neste trabalho com uma fusão de transcrição *gyrB-placZ/290* (Rizzo e colaboradores, 1993). Foi também demonstrado que a transcrição de *gyrB* ocorre preferencialmente do cromossomo correspondente à porção da célula pré-divisional que vai dar origem à célula talo (Rizzo e colaboradores, 1993). Para verificar se o mesmo ocorria com a transcrição de *alkB*, um experimento para investigar a segregação da fusão de transcrição *alkB-placZ/290* foi realizado.

Para isto, as células que carregam o plasmídeo *alkB-placZ/290* foram crescidas em M2 contendo tetraciclina (2 μ g/ml) a 30°C até D.O.₆₀₀ = 0,9. As células móveis foram isoladas através da centrifugação em gradiente de densidade de LUDOX e deixadas prosseguirem no ciclo celular até células

FIGURA 16: Análise da expressão do gene *alkB* durante o ciclo celular de *C. crescentus* utilizando o gene repórter *placZ/290*. A) A região promotora do gene *alkB* foi ligada a um vetor de repórter de transcrição (*placZ/290*) contendo o gene da β-galactosidase sem o seu promotor e o plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar *Caulobacter*. No transformante obtido foi determinada a síntese da β-galactosidase durante o ciclo celular da bactéria, através do ensaio de imunoprecipitação de extratos de células de diferentes tempos do ciclo, marcadas com pulsos de [³⁵S]-metionina. B) Os extratos utilizados em A) foram imunoprecipitados com antisoro anti-flagelina de *C. crescentus* como controle da sincronização das células C) Quantidade relativa de síntese da β-galactosidase e das flagelinas obtida por densitometria das bandas correspondentes no auto-radiograma.

prédivisionais (± 2 horas). A seguir, estas células foram marcadas com [^{35}S]-metionina por 10 minutos e depois foi feita a caça com metionina fria 0,1 mM-peptona 0,2%. As células marcadas prosseguiram no ciclo até a divisão celular, e então as células móveis e as células talo foram isoladas por centrifugação em novo gradiente de densidade de LUDOX. Os extratos destas células foram imunoprecipitados com anticorpo anti- β -galactosidase e os imunoprecipitados resolvidos em gel de poliacrilamida-SDS. Os extratos também foram imunoprecipitados com anticorpo anti-flagelina de *Caulobacter* para controle da sincronização e da segregação.

Através do autoradiograma do experimento de dupla sincronia (Fig. 17), foi possível verificar que a β -galactosidase sintetizada na célula prédivisional é segregada tanto para célula móvel como para a célula talo, enquanto que as flagelinas são segregadas somente para a célula móvel.

10. Interrupção do gene *alkB* de *C. crescentus*

Com o intuito de analisar o fenótipo de mutantes nulos do gene *alkB* de *C. crescentus*, tentamos interromper este gene. Para tanto utilizamos um plasmídeo que confere resistência a ampicilina (KS) e a cepa LS176 de *Caulobacter crescentus* que é sensível a ampicilina e que possui um genótipo *bla*⁻, permitindo selecionar a integração do plasmídeo. Tal procedimento é viável pois a recombinação homóloga ocorre com alta frequência neste organismo.

Para realizar este experimento, o fragmento *Stu*I/*Bam*HI, de aproximadamente 350 pb, que contém parte da região codificadora do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* foi ligado no vetor pBluescript II KS (Fig 18A) previamente digerido com *Bam*HI e *Sma*I e a ligação utilizada para transformar *E. coli* da cepa TG-1. As colônias brancas obtidas por seleção com X-gal foram inoculadas em meio líquido LB contendo ampicilina e foi feita a preparação de plasmídeos em pequena escala. A seguir, foi realizada a digestão do DNA com as enzimas *Xba*I e *Cla*I e a digestão analisada em gel de agarose. Foi observado que apenas uma das preparações continha o fragmento *Stu*I/*Bam*HI. Esta preparação de DNA foi novamente precipitada com 1/10 volume de NaOAc 3 M e dois volumes de etanol, centrifugada e lavada 3 vezes com etanol 70 %, para retirar todo o sal da amostra. A transferência do plasmídeo contendo o

FIGURA 17: Padrão de segregação da β -galactosidase produzida pela fusão de transcrição alkB-placZ/290. As células carregando o plasmídeo alkB-placZ/290 foram crescidas em meio líquido M2 a 30°C até D.O.₆₀₀ = 0,9 e então as células móveis foram isoladas e deixadas prosseguir no ciclo celular. As células prédivisionais foram marcadas com [³⁵S]-metionina por 10 minutos e depois foi feito a caça com metionina fria 0,1mM-peptona 0,2%. Tais células prosseguiram no ciclo até a divisão celular e então foram isoladas as células móveis (M) e as células talo (T) através da centrifugação com LUDOX. **A.** Imunoprecipitação com antisoro anti- β -galactosidase. **B.** Imunoprecipitação com antisoro anti-flagelina (controle).

FIGURA 18: A) Vetor KS contendo o fragmento Stul/BamHI. O vetor KS foi ligado ao fragmento Stul/BamHI (350 pb) que contém apenas a região codificadora do gene *alkB*. **B) Esquema da recombinação homóloga.** As células de *C. crescentus* foram eletroporadas com o vetor contendo o fragmento Stul/BamHI, que deve se integrar por recombinação homóloga. **C) Esquema da digestão com a enzima BamHI das colônias obtidas por eletroporação.** Enzimas de restrição: B, *BamHI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; S, *SalI*; Sc, *SacI*; St, *StuI*; X, *XhoI* e Xb, *XbaI*.

inserto foi feita via eletroporação. As células foram plaqueadas em placas PYE-ágar contendo ampicilina (50 µg/ml).

As colônias capazes de crescer em meio PYE contendo ampicilina, provavelmente são colônias que integraram o vetor KS contendo o fragmento *Stul*/*Bam*HI através do processo de recombinação (Fig. 18B), pois a resistência a ampicilina é conferida pelo vetor KS. Para verificarmos se a integração ocorreu no local esperado e somente em um local foi realizada a preparação do DNA genômico das 8 colônias de *C. crescentus* obtidas da eletroporação com o plasmídeo.

Após a digestão do DNA com a enzima de restrição *Bam*HI (Fig. 18C) as amostras foram analisadas em duplicatas em gel de agarose 1% (Fig. 19A). A seguir, o DNA foi transferido para um filtro de nylon segundo o método de Southern (1975) e hibridado. Um dos filtros foi hibridado com o fragmento *Bam*HI-Sall (Fig. 02) e o outro com o vetor KS digerido com a enzima *Bam*HI, ambos marcados com [α -³²P]-dATP e [α -³²P]-dCTP. Após a lavagem dos filtros em condições de alta exigência, os filmes foram expostos a filme de raio X a -70°C. Através da Fig. 19C, o resultado esperado era que o fragmento *Stul*/*Bam*HI marcado com ³²P reconhecesse duas bandas, uma de 3,5 kb e outra de aproximadamente 3,35 kb. O vetor KS marcado ³²P, por outro lado, deve reconhecer apenas a banda de 3,35 kb. Através do autoradiograma (Fig. 19B) foi observado que não foi obtida nenhuma colônia que tivesse o gene de *alkB* de *Caulobacter crescentus* interrompido. Na única colônia que tinha o plasmídeo integrado (clone 7) este havia integrado em dois lugares, visto que o vetor KS marcado ³²P reconheceu duas bandas, sendo que nenhuma delas era do tamanho esperado.

11. Estudo da resposta adaptativa ao MMS em *Caulobacter crescentus*

Com o intuito de investigar se a bactéria *C. crescentus* apresenta resposta adaptativa foi realizado o seguinte experimento: a cepa selvagem NA100 foi inoculada em meio mínimo M2 suplementado com CaCl₂ 0,5 mM e incubada durante a noite sob agitação a 30°C. No dia seguinte, a cultura foi diluída para uma D.O.₆₀₀ = 0,1 e mantida sob agitação constante a 30°C até atingir D.O.₆₀₀ = 0,4. A seguir, a cultura foi incubada com 0,01 % de MMS e

FIGURA 19: A) Eletroforese em gel de agarose TAE 1 % corado com Brometo de Etídeo. Digestão com a enzima *Bam*HI do DNA genômico de *C. crescentus* das colônias obtidas após eletroporação com plasmídeo (3-10). (1) KS/fragmento *Stu*I/*Bam*HI linearizado com *Bam*HI, (2) pGR24 digerido com a enzima *Bam*HI, (PM) DNA do fago lambda digerido com a enzima *Hind*III e (Cc) DNA genômico de *C. crescentus* digerido com a enzima *Bam*HI. **B) Auto-radiograma do gel de agarose.** O gel de agarose foi transferido para um filtro de nylon e hibridado com o fragmento *Stu*I/*Bam*HI (B1) e com o vetor KS linearizado com *Bam*HI (B2), marcados com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ e $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ e lavados em condições de alta exigência.

nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos foi adicionado a 1 ml da cultura 1 % ou 0,5 % de MMS seguindo-se incubação por 5 minutos. Após a incubação, a cultura foi filtrada, diluída, plaqueada em placas PYE ágar e incubada por 3-4 dias a 30°C. Após este período, foi efetuada a contagem dos sobreviventes (Fig. 20). Verificou-se que após 180 minutos de pré-incubação com 0,01% de MMS houve um aumento no número de sobreviventes. Com estes resultados podemos supor a presença de uma resposta adaptativa fraca em *C. crescentus*, que começaria após 3 horas do tratamento. Convém ressaltar que no experimento onde foi utilizado 1 % de MMS, não foram obtidos sobreviventes.

Devido ao fato de termos observado uma resposta adaptativa em *C. crescentus* em torno de 180 minutos, resolvemos investigar se a expressão do gene *alkB* seria induzido por doses não letais de MMS (0,01 %) em tempos mais longos, onde foi observada uma resposta adaptativa em *C. crescentus* (180, 210 e 240 minutos). Com esta finalidade, as células de *Caulobacter* #11B, que contém a fusão de transcrição *alkB-placZ/290* foram incubadas com MMS 0,01% e nos tempos 0, 60, 120, 180, 210 e 240 minutos alíquotas das células foram marcadas com pulso de [³⁵S]-metionina por 10 minutos. A seguir os extratos foram imunoprecipitados com anticorpo anti-β-galactosidase e os imunoprecipitados foram resolvidos em gel de poliacrilamida-SDS. Através do auto-radiograma (resultado não mostrado) pudemos observar que a transcrição do gene *alkB* de *C. crescentus* não é induzida por doses não letais do MMS, mesmo após tempos mais longos de pré-incubação com doses não letais de MMS, onde foi observada uma resposta adaptativa.

Com o intuito de identificar a presença da proteína Ada em *Caulobacter crescentus*, e verificar se esta era induzida por doses não letais de MMS, e consequentemente confirmarmos a presença de uma resposta adaptativa em *C. crescentus*, fizemos o seguinte experimento: a cepa selvagem NA100 foi inoculada em meio PYE suplementado com CaCl₂ 0,5 mM e incubada durante a noite sob agitação a 30°C. No dia seguinte, a cultura foi diluída para uma D.O.₆₀₀ = 0,1 e mantida sob agitação constante a 30°C até atingir D.O.₆₀₀ = 0,4. A seguir, a cultura foi incubada com 0,01 % de MMS e nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos foram preparados extratos de *C. crescentus*. Cerca de 10 µg de cada extrato foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %-SDS (Fig. 21A) e as proteínas foram transferidas para filtro de nitrocelulose. O filtro foi incubado com os anticorpos monoclonais anti-

FIGURA 20: Efeito do pré-tratamento com baixas concentrações de MMS na morte celular causada por exposição a concentrações letais. As células de *C. crescentus* foram pré-incubadas com 0,01 % de MMS por diferentes tempos e a seguir tratadas com 0,5 % de MMS por 5 minutos. Após filtração das células para a retirada do agente alquilante, as células foram diluídas e plaqueadas em PYE-ágar. Após 3 dias foi realizada a contagem das colônias sobreviventes. C - células de *C. crescentus* não tratada com 0,5 % de MMS.

FIGURA 21: A) "Western-blot" utilizando soro anti-Ada de *E. coli*. Extratos de células de *C. crescentus* não tratadas (Cc) e tratadas com 0,01 % de MMS por 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos foram resolvidos em gel de poliacrilamida-SDS e as proteínas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose e incubadas com antisoro monoclonal anti-Ada de *E. coli* MC-A2 na diluição 1:200. **A)** Gel de poliacrilamida-SDS corado com azul de Comassie. **B)** "Western-blot" revelado com anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **C)** Quantidade relativa de proteína Ada. PM - peso molecular.

Ada de *E. coli* MC-A1 e MC-A2 (Vaughan e colaboradores, 1991) gentilmente cedidos pela Dra. Barbara Sedgwick do "Imperial Cancer Research Fundation" no Reino Unido, nas diluições 1:500 e 1:200, conseqüentemente. Através do "Western-blot" (Fig. 21B), pudemos observar que a proteína Ada de *C. crescentus* é fracamente induzida, cerca de 2,5 vezes, por doses não letais do agente alquilante MMS.

Discussão

Este projeto iniciou-se com a descoberta de um quadro aberto de leitura (ORF) na direção oposta ao operon *dnaKJ* presente no clone pGR24 (Gomes & colaboradores, 1990) (Fig. 02) que apresentava homologia com a proteína AlkB de *E. coli* (Kondo e colaboradores, 1986). Tínhamos grande interesse em caracterizar este gene e estudar sua expressão durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*, pois as características do gene *alkB* em *E. coli* são muito interessantes. Tal gene foi identificado em *E. coli*, quando foi isolado um mutante de *E. coli* que era sensível ao agente alquilante MMS mas não ao tratamento com luz UV (Kataoka e colaboradores, 1983). Estudos posteriores demonstraram que o gene *alkB* de *E. coli* codifica uma proteína de aproximadamente 27,000 Da (Kataoka & Sekiguchi, 1985), e forma um operon com o gene *ada*, localizando-se a 3' deste último (Kondo e colaboradores, 1986).

Outro aspecto importante destes genes é o fato de que o gene *ada* e *alkB* estão de alguma forma envolvidos no processo de reparo de lesões do DNA causadas por agentes alquilantes. Os agentes alquilantes são potentes agentes carcinogênicos e mutagênicos, pois alteram as características formadoras de pontes de hidrogênio das bases que possuem o grupo alquila. Estudar os processos que reparam a metilação do DNA também é bastante atraente pois é sabido que a metilação do DNA afeta vários processos bacterianos incluindo transcrição e replicação do DNA, e que a metilação diferencial afeta a progressão do ciclo celular (Marczynski & Shapiro, 1994).

A princípio foi realizado o seqüenciamento do fragmento Bam-Sal (0,9 kb) do clone pGR24, no entanto o clone pGR24 não possuía toda a região codificadora do gene *alkB*. Após a construção de um banco genômico parcial, foi possível a obtenção do fragmento Pst de 7,0 kb que continha toda a região codificadora de *alkB* e conseqüentemente foi possível realizar o seqüenciamento completo do gene *alkB* de *C. crescentus*.

Através do seqüenciamento total do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* (Fig. 08) foi observado que diferentemente de *E. coli* este gene não faz parte de um operon junto com o gene *ada* (Kondo e colaboradores, 1986). O gene *ada* já foi identificado em vários outros microorganismos como *Bacillus subtilis*

(Morohoshi e colaboradores, 1990), *Salmonella typhimurium* (Hakura e colaboradores, 1991) e *Saccharomyces cerevisiae* (Xiao e colaboradores, 1991 e 1992), enquanto que o gene *alkB* foi apenas caracterizado em *E. coli* (Kondo e colaboradores, 1986) e parcialmente em *S. typhimurium* (Hakura e colaboradores, 1991).

Em *S. typhimurium* o gene *alkB* também forma um operon junto com o gene *ada*, mas o códon de terminação do gene *ada* não se sobrepõe ao códon de iniciação do gene *alkB* como em *E. coli*, pois estes estão separados por 2 pb. Não se investigou, porém a quantidade de proteína sintetizada por cada um destes genes (Hakura e colaboradores, 1991). Em *B. subtilis*, no entanto, não foi encontrado a 3' do gene *ada* nenhuma seqüência que apresentasse homologia com o gene *alkB* (Morohoshi e colaboradores, 1990). Com esses dados podemos concluir que se existe o gene *alkB* neste microorganismo este não faz parte de um operon junto com o gene *ada*.

Através da comparação da seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de nucleotídeos do gene *alkB* de *C. crescentus* foi observado uma identidade de 42,5 % com a proteína AlkB de *E. coli* (Kondo e colaboradores, 1986). Essa porcentagem de identidade é bastante significativa, tendo em vista que a identidade encontrada entre proteínas envolvidas na resposta adaptativa em diferentes organismos é inferior a esta ou de igual porcentagem, com a ressalva de que neste último caso foram comparadas regiões da proteína e não a proteína inteira. A proteína AlkA de *B. subtilis*, por exemplo, apresenta uma identidade de 26 % com a proteína AlkA de *E. coli* (Morohoshi e colaboradores, 1993). Entretanto a proteína AdaB de *B. subtilis* apresenta uma identidade de 46 % com a porção amino terminal da proteína Ada de *E. coli* (Morohoshi e colaboradores, 1990) enquanto que a porção carboxi terminal da proteína MGT1 de *S. cerevisiae* apresenta uma identidade entre 42-43,6 % com as proteínas Ada de bactérias (Xiao e colaboradores, 1991).

Através dos ensaios de proteção à nuclease S1 e primer extension, foi determinado o início de transcrição do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus*. Seqüências presentes a 5' de ambos os inícios de transcrição foram comparadas com seqüências promotoras de *E. coli* e *C. crescentus* localizadas nas posições -10 e -35 (Tab. 01). Não se encontrou a -10 e -35 dos inícios de transcrição, seqüências que se aproximassem do consenso obtido para os promotores de *E. coli* ou *C. crescentus*. Vale ressaltar que poucos promotores de *C. crescentus* foram caracterizados até o momento, sendo a maioria deles de

genes envolvidos na biogênese do flagelo que apresenta uma regulação especial.

O início de transcrição determinado pelo ensaio de proteção a nuclease S1 não coincide com o início de transcrição determinado pela extensão de oligonucleotídeo com a transcriptase reversa (Fig. 12A). Acredita-se que o ensaio de proteção a nuclease S1 é mais confiável, pois em organismos com alto conteúdo de guanina e citosina fica favorecida a formação de ligações inespecíficas do oligonucleotídeo com os RNAs. Outro indício de que o início de transcrição correto seja o determinado pelo ensaio de proteção à nuclease S1, é a presença de uma provável alça na região promotora do gene *alkB* (Fig. 12B), o que poderia ter dificultado a ação da transcriptase reversa no ensaio de PE.

Para medir o nível de expressão do gene *alkB* foi construída uma fusão de transcrição *alkB-placZ/290*, onde o vetor repórter de transcrição (*placZ/290*) (Gober & Shapiro, 1992) contendo o gene da β -galactosidase sem o seu promotor foi ligado ao fragmento *Sall/Stul* (0,3 kb) que contém apenas a região promotora do gene *alkB* de *Caulobacter* (Fig. 13). Este vetor foi transferido para *C. crescentus* via conjugação e o transformante obtido foi analisado quanto à atividade de β -galactosidase, determinada pelo método de Miller (1972). Os ensaios mostraram que a fusão da região promotora de *alkB* com o gene da β -galactosidase gera uma atividade de 1300 unidades/D.O.₆₀₀.

O mesmo ensaio foi realizado para investigar se o promotor do gene *alkB* de *Caulobacter crescentus* é induzido por doses não letais de agentes alquilantes como o MMS, EMS e DMS. Observou-se que a transcrição do gene *alkB* de *C. crescentus* não é induzido por estes agentes. Também foi realizado ensaio para determinar se a síntese da β -galactosidase era induzida por MMS, experimento mais sensível do que o ensaio da atividade de β -galactosidase. No entanto, o mesmo resultado foi obtido, isto é, a transcrição do gene *alkB* não é induzida por doses não letais de agentes alquilantes.

Uma hipótese para explicar este fato, é a de que o promotor do gene *alkB* de *C. crescentus* já apresenta uma atividade elevada, e portanto não passível de indução. A atividade de β -galactosidase observada na construção em *E. coli* quando tratada com 0,01 % de MMS é em torno de 1000 unidades/D.O.₆₀₀ (Kondo e colaboradores, 1986), enquanto que o nível basal do gene *alkB* de *C. crescentus* é de 1300 unidades/D.O.₆₀₀.

Estudos realizados com *Salmonella typhimurium* (Yamada e colaboradores, 1993) demonstraram que a proteína Ada, que em *E. coli* precede

o gene *alkB* e é fortemente induzida por agentes alquilantes, protege as células apenas dos efeitos letais dos agentes alquilantes e não dos efeitos mutagênicos, não tendo sua expressão induzida por estes agentes. Estes autores não investigaram, porém, a expressão de AlkB.

Também foi investigada a expressão do gene *alkB* em células de *C. crescentus* submetidas a choque térmico ou tratadas com agentes oxidantes como o monometil hidrazina (MMH), através do ensaio de atividade de β -galactosidase e por imunoprecipitação, respectivamente (resultados não mostrados). Não foi observada indução em nenhum caso. Tais resultados já eram esperados, pois foi demonstrado em *E. coli* que o choque térmico não influencia a expressão dos genes envolvidos na resposta adaptativa, tendo em vista que a expressão destes genes a temperatura normal de crescimento e durante o choque térmico são aproximadamente as mesmas (Fabisiewicz & Janion, 1992). Também foi observado em *E. coli* que o mutante *alkB* BS87 não é sensível a mutagenicidade do agente oxidante MMH (Sedgwick, 1992).

A expressão do gene *alkB* durante o ciclo celular da bactéria foi investigada através do ensaio de imunoprecipitação (Fig 16), e foi observado que a transcrição do gene é regulada durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus* apresentando níveis máximos na célula talo. Genes envolvidos na replicação de DNA e recombinação também tiveram sua expressão investigada em *C. crescentus*. Rizzo e colaboradores (1993) observaram recentemente que a expressão do gene *gyrB*, que codifica a enzima girase, é regulada durante o ciclo celular de *Caulobacter*. A transcrição investigada utilizando o gene réporter β -Gal é baixa na célula móvel, ocorrendo um aumento abrupto durante a transição da célula móvel para a célula talo, coincidindo com o início de replicação do DNA, seguido de uma expressão contínua até a divisão celular. Este padrão de controle no ciclo celular também é exibido pelo gene *orf-1* a 5' do gene da girase (Rizzo e colaboradores, 1993) e *dnaC* (Ohta e colaboradores, 1990). Enquanto a expressão do gene *recF* é constitutiva durante o ciclo celular de *C. crescentus* (Rizzo e colaboradores, 1993).

Foi verificado através do experimento de dupla sincronia (Fig. 17), que a proteína AlkB de *C. crescentus* sintetizada na célula pré-divisional deve ser segregada tanto para a célula móvel como para a célula talo, em proporções equivalentes. Experimento semelhante também foi realizado por outros pesquisadores (Rizzo e colaboradores, 1993), e verificou-se que as proteínas correspondentes aos genes *gyrB* e *orf-1*, são segregadas apenas para a célula

talo, indicando que há uma expressão preferencial destes promotores na porção da célula que vai dar origem a célula talo. Entretanto, o gene *recF* não apresenta um padrão polar de expressão, visto que a proteína é segregada tanto para célula móvel como para a célula talo, semelhante ao que ocorre com a proteína AlkB.

Com o intuito de analisar o fenótipo de mutantes nulos do gene *alkB* de *C. crescentus* e verificar se esses mutantes são sensíveis ao tratamento com MMS, foi tentada a interrupção deste gene por recombinação homóloga. No entanto, não foi obtido nenhum transformante que tivesse o gene *alkB* interrompido (Fig. 19). Tal resultado sugere que o gene *alkB* de *C. crescentus* é um gene essencial, ou outros genes que sejam transcritos com ele sejam genes essenciais. Para verificarmos a existência de um gene essencial transcrito junto com o gene *alkB* cerca de 400 pb após o sinal de terminação do gene *alkB* foi seqüenciado. A seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de nucleotídeos nas 3 fases de leitura e nas duas orientações foi enviada para o GenBank. Entretanto não foi encontrado nenhum quadro aberto de leitura. Outra explicação é que foi utilizado um fragmento pequeno, cerca de 350 pb, o que dificultaria a recombinação homóloga.

Para investigar a presença de resposta adaptativa em *Caulobacter crescentus*, a cepa selvagem de *C. crescentus* foi incubada com doses não letais de MMS (0,01 %) e após vários tempos foi adicionado à cultura uma dose letal de MMS (0,5 %). Foi observado que o tratamento prévio com doses não letais de MMS, confere resistência aos efeitos letais do MMS (Fig. 20), tendo em vista o aumento considerável de bactérias sobreviventes após 180 minutos de pré-tratamento. Tal resultado sugere a presença de uma resposta adaptativa em *C. crescentus* ainda que fraca, já que não se atinge 100 % de sobrevivência, fato que ocorre em *E. coli*. No entanto, a presença da resposta adaptativa em *C. crescentus* não seria causada pela indução do gene *alkB*, pois não foi observado nenhum aumento na transcrição do gene *alkB* mesmo em tempos mais longos de tratamento com MMS 0,01 %.

Uma resposta adaptativa a agentes alquilantes já foi demonstrado em vários microorganismos como pode observar-se na Tabela 02. Nestes organismos, foi identificada uma proteína de 39 kDa, mesmo tamanho que a proteína Ada de *E. coli*, utilizando os anticorpos monoclonais anti-Ada de *E. coli* MC-A1 e MC-A2 (Vaughan e colaboradores, 1991). Tais proteínas tinham sua expressão aumentada quando as células eram tratadas com doses não letais de

Resposta Adaptativa

Detectável	Não detectável
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Chaetodipus intermedius</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Escherichia hermanii</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Gloetrichia ghosei</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus aureus</i>
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Streptomyces fradiae</i>	
<i>Shigella sonnei</i>	
<i>Shigella boydii</i>	
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	

TABELA 02: Ocorrência ou não da resposta adaptativa a agentes alquilantes em microorganismos. Referências: Ceccoli e colaboradores, 1988; Vaughan & Sedgwick, 1991 e Vaughan e colaboradores, 1991.

agentes alquilantes, e este aumento observado na concentração da proteína Ada corresponde a um aumento nas atividades de O⁶-metil-guanina DNA metiltransferase e metilfosfotriéster DNA metiltransferase (Vaughan & Sedgwick, 1991).

No entanto, em outros microorganismos (Tab. 2), os anticorpos monoclonais anti-Ada MC-A1 e MC-A2 não detectaram nenhuma proteína induzida durante o tratamento com agentes alquilantes, apesar de ter sido observado um aumento na atividade de O⁶-metil-guanina DNA metiltransferase e metilfosfotriéster DNA metiltransferase (Vaughan & Sedgwick, 1991).

Para identificar a presença de uma proteína Ada induzida por doses não letais de MMS e com isso confirmar a presença da resposta adaptativa em *C. crescentus*, foi realizado o experimento de "Western-blot" (Fig. 20), onde extratos de *Caulobacter crescentus* tratados com 0,01 % de MMS foram incubados com os anticorpos monoclonais MC-A1 e MC-A2 anti-Ada de *E. coli* (Vaughan e colaboradores, 1991). Com este experimento, pudemos observar a indução da proteína Ada de *C. crescentus* quando tratada com 0,01 % de MMS, e com isso confirmar a presença da resposta adaptativa em *Caulobacter crescentus*.

Convém ressaltar que os extratos de *C. crescentus* foram incubados separadamente com os anticorpos anti-Ada de *E. coli* MC-A1 e MC-A2, sendo que somente o anticorpo MC-A2 reconheceu a proteína de 39 kDa indutível por MMS. O epítipo do anticorpo MC-A2 está localizado no domínio carboxi-terminal da proteína Ada de *E. coli* enquanto que o epítipo do anticorpo MC-A1 está localizado no domínio amino-terminal (Vaughan & Sedgwick, 1991). Tal resultado sugere que a proteína de 39 kDa reconhecida pelo anticorpo MC-A2 em *C. crescentus* deve possuir o domínio carboxi-terminal, que corresponde à atividade de metiltransferase capaz de reparar as lesões O⁶-metilguanina e O⁴-metiltimina. Devido ao fato de que a proteína de *C. crescentus* não foi reconhecida pelo anticorpo MC-A1, esta proteína não deve possuir um domínio amino-terminal semelhante ao da proteína de *E. coli*. O domínio amino terminal da proteína Ada de *E. coli* repara metilfosfotriéster e converte Ada num potente ativador de transcrição.

Algumas especulações tem sido realizadas no sentido de associar uma baixa resposta adaptativa a agentes alquilantes a microorganismos que possuem um alto conteúdo de GC, pois acredita-se que devido ao alto conteúdo

de GC os organismos estariam mais sujeitos a mutações por agentes alquilantes e conseqüentemente teriam desenvolvido um mecanismo de reparo mais eficiente. Em *Streptomyces*, por exemplo, um microorganismo com alto conteúdo de GC (Wright & Bibb, 1992), foi demonstrado a presença de um outro sistema de reparo além da resposta adaptativa, que seria ativado após a saturação da resposta adaptativa ocorrendo a doses intermediárias (Baltz & Stonesifer, 1985a e 1985b).

Alguns autores preferem associar a presença da resposta adaptativa ao meio ambiente em que vivem os diferentes microorganismos. Foi observado uma resposta adaptativa mais forte em microorganismos cujo habitat é o solo, sugerindo uma exposição maior a agentes alquilantes, visto que neste meio ambiente a presença de agentes alquilantes é maior. *Caulobacter* sendo uma bactéria aquática estaria menos exposta a agentes alquilantes.

Como foi mencionado anteriormente, existem dois tipos de mecanismos de atuação dos agentes alquilantes, a via SN1 e a SN2. Devido ao fato de que os experimentos deste trabalho terem sido efetuados somente com os agentes alquilantes que atuam pela via SN2, poderia surgir a dúvida de que a expressão do gene *alkB* poderia ser induzida pelos agentes alquilantes que atuam pela via SN1. No entanto, isto não seria plausível, pois foi demonstrado que células de *E. coli* que carregam mutantes de *alkB* são extremamente sensíveis aos efeitos tóxicos do MMS e DMS (agente alquilante que atua pela via SN2) e apenas levemente sensíveis ao tratamento com MNNG e MNU (agente alquilante que atua pela via SN1) (Kataoka e colaboradores, 1983 e Chen e colaboradores, 1994).

Vários estudos tem sido realizados com o intuito de elucidar a função da proteína AlkB de *E. coli*. Alguns autores verificaram a hipótese de que a proteína AlkB poderia estar atuando como parte de um complexo multiprotéico ou regulando a transcrição de outros genes cujo produto repara as lesões no DNA causadas pelos agentes alquilantes. No entanto, foi verificado que a expressão da proteína AlkB de *E. coli* em células de mamíferos (HeLa) confere resistência a alquilação por agentes alquilantes que atuam pela via SN2 nestas células mesmo na ausência de outras proteínas e genes de *E. coli*. Ou seja, a resistência a alquilação a agentes alquilantes que atuam pela via SN2 é uma função intrínseca da proteína AlkB de *E. coli* (Chen e colaboradores, 1994).

A hipótese de que a proteína AlkB atuaria prevenindo a alquilação do DNA também foi verificada e descartada, pois foi verificado que a quantidade de

lesões causadas pelos agentes alquilantes no DNA é praticamente a mesma em células selvagens, células que carregam mutante de *alkB* e células que super expressam a proteína AlkB (Chen e colaboradores, 1994).

De acordo com estes resultados, a proteína AlkB deve possuir uma função intrínseca de reparo dos danos causados ao DNA pelos agentes alquilantes que atuam pela via SN2, embora o seu mecanismo de ação permaneça obscuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, Z. & Laval, J. (1984)** Enzymatic repair of O-alkylated thymidine residues in DNA: involvement of O⁴-methylthymine-DNA methyltransferase and O²-methylthymine-DNA glycosylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1-8.
- Avedissian, M. & Gomes, S. L. (1995)** Expression of the *groESL* operon is cell cycle controlled in *Caulobacter crescentus*. (submetido).
- Amemyia, k.; Bellofatto, V.; Shapiro, L. & Feingold, J. (1986)** *in vitro* and *in vivo* transcription initiation at a highly conserved promoter within a 16S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 187, 1-14.
- Baltz, R. H. & Stonesifer, J. (1985a)** Mutagenic and error-free DNA repair in *Streptomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 200, 351-355.
- Baltz, R. H. & Stonesifer, J. (1985b)** Adaptive response and enhancement of N-Metyl-N'-nitrosoguanidine mutagenesis by chloramphenicol in *Streptomyces fradie* *J. of Bacteriol.* 164, 944-946.
- Berk, A. J. & Sharp, P. A. (1977)** Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel eletrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* 12, 721-732.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid. Res.* 7, 1513.
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principlle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Brun, Y.V.; Marczynski, G. & Shapiro, L. (1994)** The expression of asymmetry during *Caulobacter* cell differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 419-50.

- Ceccoli, J.; Rosales, N.; Goldstein, M. & Yarosh, D. B.** (1988) Polyclonal antibodies against O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in adapted bacteria. *Mutation Res.* 194, 219-226.
- Chen, B. C.; Carroll, P. & Samson, L.** (1994) The *Escherichia coli* AlkB protein protects human cells against alkylation-induced toxicity. *J. of Bacteriol.* 176, 6255-6261.
- Chen, W. & Kuo, T.** (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid. Res.* 21, 9.
- Cozzarelli, N. R.** (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207, 953-960.
- Day, R. S.; Babich, M. A.; Yarosh, D. B. & Scudiero, D. A.** (1987) The role of O⁶-methylguanine in human cell killing sister chromatid exchange induction and mutagenesis: a review. *J. Cell Sci. Suppl.* 6, 333-353.
- Demple, B., Sedgwick, B., Robins, P., Totty, N., Waterfield, M.D. & Lindahl, T.** (1985) Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis. *Nucleic Acid. Res.* 82, 2688-2692.
- Dingwall, A. & Shapiro, L.** (1989) Rate, origin and bidirectional of *Caulobacter* chromosome replication as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 119-123.
- Ely, B.** (1991) Genetic of *Caulobacter crescentus*. *Methods in Enzymology* 204, 372-384.
- Evinger, M. & Agabian, N.** (1977) Envelope associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J. Bacteriol.* 132, 204-301.
- Evinger, M. & Agabian, N.** (1979) *Caulobacter crescentus* nucleoid: Analysis of sedimentation behavior and protein composition during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 175-178.

- Fabisiewicz, A. & Janion, C.** (1992) Effect of heat shock on expression of protein not involved in the heat shock regulon. *Eur. J. Biochem.* 209, 549-553.
- Fairweather, N. F.; Herrero, E. & Holland, I. B.** (1981) Inhibition of DNA gyrase in *Escherichia coli* K-12: Effects on the rates of synthesis of individual outer membrane protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 12, 11-14.
- Feinberg, A., Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Furuichi, M.; Yu, C. G.; Anai, M.; Sakumi, K. & Sekiguchi, M.** (1992) Regulatory elements for expression of the *alkA* gene in response to alkylating agents. *Mol. Gen. Genet.* 236, 25-32.
- Gober, J. W. & Marques, M. V.** (1995) Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol. Rev.* 59, 31-47.
- Gober, J. W. & Shapiro, L.** (1992) A developmentally regulated *Caulobacter* Flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. *Mol. Biol. Cell* 3, 913-926.
- Gomes, S. L., Gober, J. W. & Shapiro, L.** (1990) Expression of the *Caulobacter* heat-shock gene *dnaK* in *Caulobacter crescentus* *J. Bacteriol.* 172, 3051-3059.
- Gomes, S. L., Juliani, M. H., Maia, J. C. C. & Silva, A. M.** (1986) Heat shock protein synthesis during development controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.* 168, 923-930.
- Gomes, S. L. & Shapiro, L.** (1984) Differential expression and positioning of chemotaxis methylation proteins in *Caulobacter*. *J. Mol. Biol.* 178, 551-568.
- Hakura, A.; Morimoto, K. & Safuni, T. & Nohmi, T.** (1991) Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium* *ada* gene, which encodes O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. *J. Bacteriol.* 173, 3663-3672.

- Hawley, D. K. & McClure, W. R.** (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucleic Acid. Res. 11, 2237-2255.
- Henikoff, S.** (1987) Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. Meth. Enzymol. 155, 156-165.
- Karran, P.; Hjelmgren, T. & Lindahl, T.** (1982) Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents. Nature 296, 770-773.
- Kataoka, H. & Sekiguchi, M.** (1985) Molecular cloning and characterization of the *alkB* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 198, 263-269.
- Kataoka, H.; Yamamoto, Y. & Sekiguchi, M.** (1983) Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of adaptive response to alkylating agents. Nature 296, 770-773.
- Kondo, H., Nakabeppu, Y., Kataoka, H., Kutara, S., Kawabata, S. & Sekiguchi, M.** (1986) Structure and Expression of the *alkB* gene of *Escherichia coli* related to the repair of alkylated DNA. J. Biol. Chem. 261, 15772-15777.
- Korneberg, A.** (1988) DNA replication. J. Biol. Chem. 263, 1-4.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 226, 680-685.
- Landick, R.; Vaughn, V.; Lau, E.T.; VanBolegen, R.A.; Erickson, J.W. & Neidherdt, F.C.** (1984) Nucleotide sequence of the heat-shock regulatory gene of *E.coli* suggests its protein product may be a transcriptional factor. Cell 37, 175-182.
- Lawley, P. D. & Thatcher, C. J.** (1970) Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Biochem. J. 116, 693-707.

- Lemotte, P. K. & Walker, G. C.** (1985) Induction and autoregulation of *ada*, a positively acting element regulating the response of *Escherichia coli* K-12 to methylating agents. *J. Bacteriol.* 161, 888-895.
- Lindahl, T.; Demple, B. & Robins, P.** (1982) Suicide inactivation of the *E.coli* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Embo J.* 11, 1359-1363.
- Macnab, R. M. & DeRosier, D. J.** (1988) Bacterial flagellar structure and function *Can. J. of Microbiol.* 34, 442-451.
- Malakooti, J.; Wang, S. P. & Ely, B.** (1992) Characterization oh biosynthetic gene promoters in *Caulobacter crescentus*. abstrH-46, p. 190 Abstr 92nd Gen. Meet Am. Soc. Microbiol.
- McCarty, T. V.; Karran, P. & Lindahl, T.** (1984) Inducible repair of O-alkylated DNA pyrimidine in *Escherichia coli* EMBO J. 3, 545-550.
- Maniatis, T., Fritgch, E. F. & Sambrook, J.** (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marczynski, G. T. & Shapiro, L.** (1994) The control of asymmetric gene expression during *Caulobacter* cell differentiation. *Arch. Microbiol.* 986, 1-9.
- Miller, J. H.** (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Morohoshi, F.; Hayashi, K. & Munakata, N.** (1990) *Bacillus subtilis ada* operon encodes two DNA alkyltransferases. *Nucleic. Acids Res.* 18, 5473-5480.
- Morohoshi, F.; Hayashi, K. & Munakata, N.** (1993) *Bacillus subtilis alkA* gene encoding inducible 3-methyladenine DNA glycosylase is adjacent to the *ada* operon. *J. Bacteriol.* 175, 6010-6017.
- Neidhardt, F. C.; VanBogelen, R. A & Vaughn, V.** (1984) The genetics and regulation of heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 18, 295-329.

- Nakabeppu, Y. & Sekiguchi, M.** (1986) Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: Ada protein acts as a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 6297-6301.
- Nelles, L. P. & Bamberg, J. R.** (1976) Rapid visualization of protein-dodecyl sulfate complex in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 73, 522-531.
- Newton, A.** (1972) Poll of transcription in the temporal control of development in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 447-451.
- Ohta, N.; Masurekar, M. & Newton, A.** (1990) Cloning and Cell Cycle-dependent Expression of the DNA Replication Gene *dnaC* from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 172, 7027-7034.
- Pate, J.L. & Ordal, E. J.** (1965) The fine structure of two unusual stalked bacteria. *J. Cell Biol.* 27, 133-150.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J.** (1988) Improved tools for biological sequences analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2444-2448.
- Pegg, A. E.** (1983) In reviews in biochemical toxicology. Elsevier Biomedical Press. 5, 83-133.
- Poindexter, J. S.** (1964) Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol Rev.* 59, 31-47.
- Poindexter, J. S.; Hornack, P. R. & Armstrong, P. A.** (1967) Intracellular developmental of a large DNA bacteriophage. *Arch. Microbiol.* 59, 237.
- Richardson, K. K.; Richardson, F. C.; Crosby, R. M.; Swenberg, J. A. & Skopek, T. R.** (1987) DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of *Escherichia coli* to N-metyl-N- nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. natl. Acad. Sci.* 84, 344-348.

- Rizzo, M. F.; Shapiro, L. & Gober, J.** (1993) Asymmetric expression of the Gyrase B gene from the replication-competent chromosome in the *Caulobacter crescentus* predivisional cell. J. Bacteriol. 175, 6970-6981.
- Sakakibara, Y.** (1988) The *dnak* gene of *Escherichia coli* functions in initiation of chromosome replication. J. Bacteriol. 170, 972-979.
- Saget, B.M. & Walker, G.C.** (1994) The Ada protein acts as both a positive and negative modulator of *Escherichia coli*'s response to methylating agents. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 9730-9734.
- Samson, L. & Cairns, J.** (1977) A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. Nature 267, 281-283.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 5463-5467.
- Schendel & Robins** (1978) Repair of O⁶-methylguanine in adapted *Escherichia coli* Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 6017-6020.
- Schmidt, J. M. & Stanier, R. Y.** (1966) The development of cellular stalks in bacteria. J. Cell. Biol. 28, 423-436.
- Sedgwick, B.** (1992) Oxidation of methylhydrazines to mutagenic methylating derivatives and inducers of the adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage. Cancer Research 52, 3693-3697.
- Sekiguchi, M. & Nakabeppu, Y.** (1987) Adaptive response: Induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylation agents. TIG 3, 51-54.
- Shapiro, L.** (1976) Differentiation in the *Caulobacter* cell cycle. Annu. Rev. Microbiol. 30, 377-407.
- Shapiro, L.** (1985) Generation of polarity during *Caulobacter* cell differentiation. Annu. rev. Cell Biol. 1, 173-207.

- Shapiro, L.** (1994) The control of timing and spatial organization during *Caulobacter* cell differentiation. The Harvey Lectures 88, 23-48.
- Shapiro, L. & Agabian-Keshishian, N.** (1970) Specific assay for differentiation in the stalked bacterium *Caulobacter crescentus*. Proc. Natl. Acad. Sci. 67, 200-203.
- Shapiro, L. & Gober, J.W.** (1989) Position of gene products during *Caulobacter* cell differentiation. J. Cell. Sci. (Suppl) 11, 85-97.
- Shapiro, L. & Maizel, J. V.** (1973) Synthesis and structure of *Caulobacter crescentus* flagella. J. Bacteriol. 113, 478.
- Shevell, D.E. & Walker, G.C.** (1991) A region of the Ada DNA-repair protein required for the activation of *ada* transcriptional is not necessary for activation of *alkA*. Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 9001-9005.
- Singer, B.** (1979) N-nitroso alkylating agents: formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 62, 1329-1338.
- Singer, B. & Grunberger, D.** (1983) Molecular biology of mutagens and carcinogens. Plenum Press, New York 55-78.
- Smit, J. & Agabian, N.** (1982a) *Caulobacter crescentus* pili: Analysis of production during development. Dev. Biol. 89, 237-247.
- Smit, J. & Agabian, N.** (1982b) Surface patterning and morphogenesis: Biogenesis of a periodic surface array *Caulobacter* development. J. Cell. Biol. 95, 41-49.
- Snow, E.T.; Foote, R.S. & Mitra, S.** (1984) Base-pairing properties of O⁶-methylguanine in template DNA during *in vitro* DNA replication. J. Biol. Chem. 259, 8095-8100.
- Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

- Teo, I., Sedwick, B., Killpatrick, M.V., McCarthy, T. V.& Lindahl, T. (1986)** The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E.coli* Cell 45, 315-324.
- Towbin, H. ; Staehelin, T. & Gordon, J. (1979)** Eletrophoretic transfer of nitrocellulose sheets: Procedure and some aplications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354.
- VanWay, S. M.; Newton, A.; Mullin, A. H. & Mullin, D. A. (1993)** identification of the promoter and a negative regulatory element , *ftr4*, that is needed to cell cycle timing of *fliP* operon expression in *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. 175, 367-376.
- Vaughan, P. & Sedgwick, B. (1991)** A weak response to alkylation damage in *Salmonella typhimurium*. J. of Bacteriol. 173, 3656-3662.
- Vaughan, P. ; Sedgwick, B.; Hall, J.; Gannon, J. & Lindahl, T. (1991)** Environmental mutagens that induce the adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli*. Carcinogenesis 12, 263-268.
- Wright, F. & Bibb, M. J. (1992)** Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. Gene 113, 55-65.
- Xiao, W.; Derfler, B.; Chen, J. & Samson, L. (1991)** Primary sequence and biological functions of a *Saccharomyces cerevisiae* O⁶-methylguanine/O⁴-methylthymine DNA repairs methyltransferase gene. EMBO Journal 10, 2179-2186.
- Xiao, W. & Samson, L. (1992)** The *Saccharomyces cerevisiae* MGT1 DNA repair methyltransferase gene: its promoter and entire coding sequence, regulation and *in vivo* biological functions. Nucleic. Acids Res. 20, 3599-3606.
- Yamada, M.; Hakura, A.; Safuni, T. & Nohmi, T. (1993)** New method for gene disruption in *Salmonella typhimurium*: construction and characterization of an

ada-deletion derivative of *Salmonella typhimurium* TA1535. J. Bacteriol. 174, 5539-5547.

Yanish-Perron, C.; Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and puc19 vectors. Gene 33, 103-109.

Zucker, M. & Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. Nucleic Acids Res. 9, 133-148.

Zweiger, G.; Marczynski, G. & Shapiro, L. (1994) A *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisional cell. J. Mol. Biol. (1994) 235, 472-485.

Zweiger, G. & Shapiro, L. (1994) Expression of *Caulobacter dnaA* as a function of the cell cycle. J. Bacteriol. 176, 401-408.