

Alexandre Rodrigues Guerzoni

Regulação da Expressão do Gene **AMP^R** Induzida por Osmólitos





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

Alexandre Rodrigues Guerzoni

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *AMP^R*
INDUZIDA POR OSMÓLITOS**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em
Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" - UNESP.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO RUGGIERO NETO



938/00

São José do Rio Preto - SP

1999

Aos Pais: GUERZONI

Ao Prof. Dr. João Rangelino Neto, pela orientação, confiança, oportunidade, compreensão, paciência e amizade que tornaram possível este trabalho.

Ao Fabiano Pereira de Souza e Lidner Trazzari Truzzi pelos conhecimentos compartilhados e auxílio durante toda a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo André Inzary, Departamento de Física, pela amizade e auxílio na resolução da disciplina de Física.

Ao Prof. Dr. Moisés Francisco de Castro, pela orientação, confiança, oportunidade, compreensão, paciência e amizade que tornaram possível este trabalho.

*Ao Prof. Dr. Roberto
USP, pelos conhecimentos
demonstrados.*

*Ao Prof. Dr. Elton
pelo exemplo.*

*Aos professores
Augustinho, Marcos,
Gustavo e outros.*

*Aos amigos
amizade com
deste trabalho.*

Aos funcionários da USP, Paulo E. Lima, Antônio A. Barbosa, Toninha e todos pelo bom ambiente de trabalho e ajuda na execução deste trabalho.

*Aos amigos
ocimar, Gláucia,
Flávio e outros.*

*Aos amigos
Alexandre e outros.*

Dedico este trabalho:

À meu pai Juarez Guerzoni que me ensinou a importância de valores morais, dedicou sua vida à formação dos filhos acima de qualquer interesse pessoal e cuja influência, alegria e satisfação sinto em todas as minhas realizações, mesmo após sua morte, e isso me torna mais forte e perseverante;

À minha mãe Ivone;

e à minha esposa Tânia que é meu apoio e minha companhia inseparável.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto, pela orientação, confiança, oportunidade, compreensão, paciência e amizade que tornaram possível este trabalho.

À Fátima Pereira de Souza e Uderlei Donizete Covissi pelos conhecimentos compartilhados e auxílio durante toda a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr Marcelo Andres Fossey, Departamento de Física, pela amizade e auxílio na execução da dissertação.

Ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo, Departamento de Física pelos conselhos sobre a execução do trabalho, utilização de equipamentos e exemplo de dedicação ao trabalho.

À Profª Drª Rita de Cássia Aleixo Tostes, Instituto de Biociências-USP, pelos conselhos, estímulo e, especialmente, amizade demonstrados desde muitos anos.

À Profª Drª Eloísa Helena Tajara, Departamento de Biologia, pelo exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos professores José Ruggiero, Elso D. Filho, Augusto Augustinho, Marinômio Cornélio, José Ramon, Eloi Feitosa, e Gustavo Botilha. Departamento de Física, pela gentileza e amizade com que sempre me trataram durante o transcorrer deste trabalho.

Aos funcionários Ilva, Paulo R. Salinas, Antônio A. Barbosa, Toninha e Eldes pela bom ambiente de trabalho e ajuda à execução deste trabalho.

Aos amigos: Adriana Rodrigues Alvez, Fernanda Canduri, Ocimar, Gláucia, Renato César Caetano, Osmar Caon Filho, Flavio Seixas, Dulcinéia Peres, Bernardete Colombo, Sandra, Alexandre "Macgaiver" Neves, Alexandre Teso.

RESUMO

O propósito do presente trabalho foi de estabelecer uma correlação entre alterações no nível de expressão do gene de resistência a ampicilina, *amp^R*, inserido no plasmídio pUC18 e alterações na sua topologia, quando bactérias (*E. coli*) com ele transformadas são cultivadas em diferentes concentrações de ampicilina e de choque osmótico, induzido pela presença de glicerol, trealose ou de NaCl. Níveis de expressão do gene *amp^R* foram estimados indiretamente através de dois procedimentos: a – determinação do número de bactérias viáveis através de variação de absorção ótica em 650 nm ou de contagem de colônias em plaqueamentos, b – medidas de alterações no pH do meio de cultura devido ao aumento da concentração de ácido penicilínico, resultado da digestão da ampicilina pela β -lactamase. As alterações no estado topológico de plasmídios extraídos de bactérias nos experimentos de cultivo na fase logarítmica foram analisados através de dois métodos: a- mobilidade eletroforética, comparando o deslocamento do centróide da distribuição de topoisômeros gerados em diferentes condições de crescimento e, b- alterações na fluorescência de brometo de etídio intercalado nestes plasmídios e submetidos a desnaturação térmica em pH12. O choque osmótico devido à adição de trealose e glicerol induz aumento no número de bactérias viáveis até uma osmolaridade de 900 mOsm, mesmo para altas concentrações de ampicilina. A



atividade da β -lactamase aumentou sob choque osmótico, consistente com o aumento do número de bactérias viáveis. Plasmídios extraídos de bactérias cultivadas nestas condições apresentam aumento de superhélice negativa sugerindo aumento de atividade gênica. Estes resultados sugerem que o aumento da osmolaridade induz aumento da expressão do gene de resistência a ampicilina. Este resultado pode ser de grande utilidade na formulação de terapêutica em infecções relacionadas a órgãos expostos a fluidos orgânicos de alta osmolaridade.



ABSTRACT

The aim of the present work was to establish a correlation between changes in the expression level of the resistance of the ampiciline gene (amp^R), inserted in pUC18 plasmid, and changes in its topology, when bacteria (*E. coli*) transformed with pUC18 was grown under different concentrations of ampiciline and under osmotic stress induced by addition of glycerol, trehalose or NaCl. amp^R expression level was estimated indirectly by two procedures: a- determination of number of viable bacteria through the changes of the optical absorption of the culture media at 650 nm or by counting number of colonies, b- changes in the culture media pH due to the increase in the penicilinoic acid resulting from the digestion of the ampiciline by β -lactamase. Changes in the topological state of the plasmids extracted from these culture batches, in the logarithmic phase, were analyzed with two methods: a- electrophoretic mobility comparing the displacement of the center of the distribution of topoisomers generated under different growth conditions and, b- comparing the changes in the fluorescence intensity of the ethidium bromide intercalated in these plasmids before and after thermal denaturation at pH12. The osmotic stress due to addition of trehalose and glycerol induced an increase in the number of viable bacteria up to an osmolarity of 900 mOsm,



even at high ampiciline concentration. The activity of the β -lactamase increased under osmotic stress which is consisten with the increase in the number of viable bacteria. Plasmids extracted from bacteria grown at these conditions presented an increase in the negative supercoil, suggesting increase in the gene activity. These results sugest that the increase in the osmotic stress induce an increase of the expression of the ampiciline resitence gene. These results could be of great utility in the terapeutical formulation on infections related to tissues exposed to high osmolarity organic fluids.



I. INTRODUÇÃO

Moléculas de DNA, na forma de círculos fechados, constituem o material genético de vírus ou plasmídios bacterianos, e, há algumas décadas, são utilizados em estudos da topologia da molécula de DNA.

Inicialmente, observou-se, através de experimentos de sedimentação, que moléculas de DNA viral apresentavam-se fracionadas em dois componentes, que foram denominados I e II. Com a utilização de microscopia eletrônica, identificou-se o componente I como moléculas torcidas e o componente II como círculos abertos (**Figura 1c-d e 1a-b, respectivamente**). Devido à maior compactação do componente I este apresentava maior migração em cloreto de cézio (Bates e Maxwell, 1994).

Posteriormente observou-se que a quebra de uma ligação fosfodiéster (“nick”) poderia resultar na transformação da molécula da forma I para a forma II (Bates e Maxwell, 1994).

O estado topológico da molécula circular de DNA é definido pelo número de voltas completas da molécula ao longo de seu eixo, e é comumente conhecido como “linking number” (Lk) representando o número de vínculos topológicos.



Apesar de ser uma invariante topológica o linking number (Lk) pode ser descrito como a soma de duas contribuições geométricas: Tw (“twist”) que representa a torção do eixo da hélice e Wr (“writhe”) que representa a curvatura do eixo da hélice no espaço (Figura 1b e 1c, respectivamente).

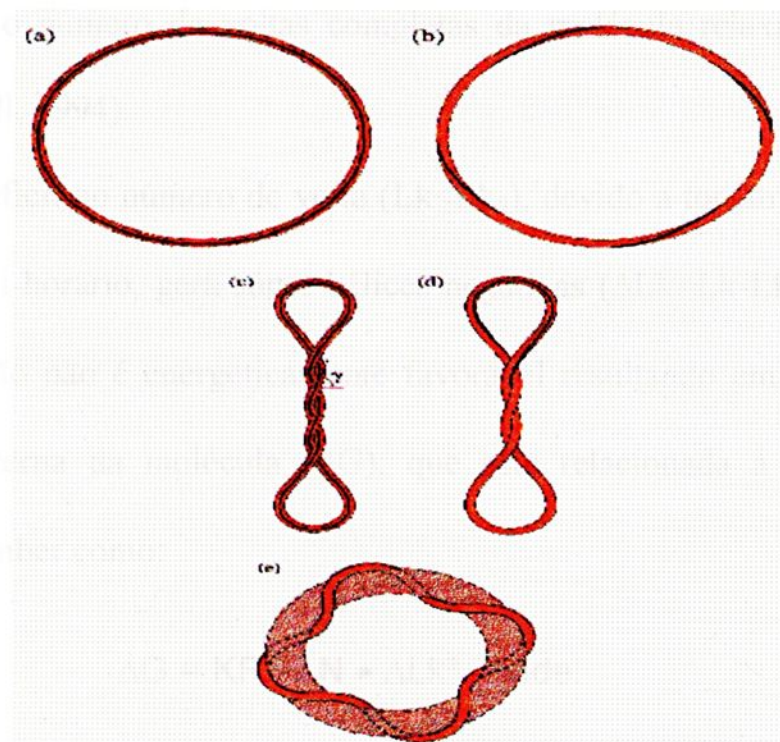


Figura 1 – Representação, em modelo da molécula de DNA na forma de tubo, do “twisting” e “writhing”. (a) Molécula relaxada, onde $Lk = Lk_0$; (b) molécula na forma de super hélice $\Delta Lk = -4$, $\Delta Tw = -4$, $Wr = 0$; (c) molécula na forma de super hélice $\Delta Lk = -4$, $\Delta Tw \approx 0$, $Wr \approx -4$; (d) DNA na forma de super hélice de menor energia, $\Delta Lk = -4$, $\Delta Tw \approx -1$, $Wr \approx -3$; (e) forma toroidal de hélice do DNA, onde o eixo da molécula circula outra molécula.

A molécula de DNA circular relaxada possui um número de vínculos topológicos (Lk) dados por:

$$Lk_0 = N/h, \text{ onde}$$

- N é o número de pares de bases da molécula circular;
- h é o passo da hélice, sendo que na forma relaxada $h=10,44$ pares de base/volta;
- Lk_0 é o número de voltas completas da molécula relaxada (Bates e Maxwell, 1994).

O deficit no número de volta ($Lk < Lk_0$), devido a torção da hélice no sentido anti-horário, gera súper-hélices negativas ($\Delta Lk = Lk - Lk_0 < 0$). Esta configuração não é energeticamente favorável resultando em aumento de energia interna da molécula (ΔG), que está relacionada à variação de linking number como:

$$\Delta G = KRT / N \bullet \Delta Lk^2, \text{ onde:}$$

- ΔG é a variação da energia entre os estados topológicos relaxado e super hélice;
- K é a constante de proporcionalidade obtida experimentalmente;
- R é a constante dos gases;
- T é a temperatura absoluta (Lilley et al, 1996).

A topologia da molécula é normalmente quantificada através de uma fração que representa a densidade de super hélice (σ):

$$\sigma = \frac{Lk - Lk_0}{Lk_0} .$$

I.1- Aspectos biológicos:

A estrutura super helicoidal do DNA é comum a todos os organismos e ocorre em plasmídeos, cromossomos bacterianos, DNA mitocondrial e de cloroplastos, além do DNA cromossomal de eucariotos, que, embora seja linear, apresenta-se associado a proteínas formando estruturas em alça fechada.

Esta estrutura armazena energia torcional, que pode catalisar a formação de estruturas não convencionais de DNA, tais como Z DNA (Vologodskii et al., 1992), cruciformes (Vologodskii et al., 1992; Lilley et al., 1996) e H DNA (Lilley et al., 1996), que podem estar envolvidas transitoriamente durante o curso de algum processo intracelular e em algumas regiões de regulação gênica.

Plasmídios são encontrados na forma de super hélice negativa na grande maioria dos organismos, exceto em arqueobactérias termofílicas, das quais foram extraídos plasmídios na forma de super hélice positiva. Aparentemente, nesta forma os plasmídios são mais resistentes às condições extremas à que estão expostos estes organismos (Bates e Maxwell, 1994).

As conseqüências principais da super hélice da molécula de DNA são:



- empacotamento da longa molécula em um volume relativamente pequeno. Por exemplo, *Escherichia coli*, possui um cromossomo de 1,5 mm de comprimento e diâmetro celular de 1µm, ou seja ≈ 1000 vezes menor,

-influência sobre alguns processos que envolvem ativação e repressão de determinados genes e interações de proteínas com o DNA.

Em processos biológicos como transcrição, replicação e recombinação, os aspectos topológicos da dupla hélice são de fundamental importância (Bates e Maxwel, 1994).

Durante a replicação a super hélice negativa facilita o processo de iniciação, aumentando a afinidade da DNA polimerase, proporcionando portanto uma união mais estável, do complexo protéico de iniciação (Lewin, 1997).

Durante o processo de transcrição, na ligação de ativadores ou da própria RNA polimerase surgem estruturas em forma de círculos ou dobras que podem reduzir barreiras energéticas, como também facilitar o contato entre proteínas e seus sítios de ligação formados por domínios distantes (Lewin, 1997; Lin, et al., 1997).

Na etapa de elongação dos processos de transcrição, como também de replicação, o DNA sofre um aumento de densidade de super hélice positiva na região anterior e negativa na região posterior à fôrca de replicação (Wang 1979). As torções em excesso podem impedir o processo



de replicação se não forem equilibradas por enzimas ou anuladas pela rotação da molécula ao longo de seu eixo, o que pode ocorrer em plasmídios que não apresentem nenhuma forma de ancoragem ou outro fator que impeça a difusão da topologia por toda a molécula. (Lewin , 1997)

Em procariotos, o estado topológico do DNA é regulado por várias enzimas sendo as mais conhecidas:

- DNA girase, composta de duas sub-unidades codificadas pelos genes *girA* e *girB*, que induz a formação de super hélice negativa com gasto energético. A atividade da girase é um excelente exemplo de transformação de energia em processo biológico. A molécula de ATP é hidrolisada nas subunidades B da girase (a girase é composta por um tetrâmero constituído por duas unidades A e duas unidades B) em cada processo duas moléculas de ATP são utilizadas, o que resulta em relaxamento da super hélice positiva da ordem de -2 (Lilley et al., 1996; Wang, 1979; Bates, et al, 1996).

- topoisomerase I codificada pelo gene *topA*, localizado próximo ao operon *trp* em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimuriun*, que induz o relaxamento da super hélice negativa, com espiralização no sentido positivo sem gasto energético (Bates e Maxwell, 1994; Wang, 1998).

No processo de transcrição, a formação do complexo de iniciação com interação da RNA polimerase e região promotora do gene, é



fortemente dependente da topologia da molécula de DNA. A super hélice negativa facilita a transição do complexo de iniciação fechado para o complexo de iniciação aberto, permitindo o início da elongação. Devido, principalmente, à influência sobre a iniciação da transcrição, muitos genes podem ser estimulados ou reprimidos por alteração na topologia da dupla hélice (Pruss e Drlica, 1986, Bates e Maxwell, 1994; Lewin, 1997).

Os organismos em geral possuem mecanismos para detecção de alterações em parâmetros físicos como temperatura e pressão osmótica, e químicos como ausência e presença de determinados compostos químicos.

Alguns mecanismos compõem-se da união de compostos ao DNA ou união de compostos a proteínas.

Para a sensibilização e resposta a alterações osmóticas é conhecido o sistema EnvZ (sensor de membrana)- OmpR (quinase) que envolve a transcrição dos genes *ompF*, *ompC* responsável pela transcrição de purinas; e o operon *proU* que regula um sistema de transporte de osmolitos para equilíbrio osmótico com o meio externo.

A alteração topológica do DNA é uma conhecida consequência de fatores ambientais como anaerobiose, diferentes temperaturas, meio pobre em nutrientes e osmolaridade.

Estudos *in vivo* (Higgins et al., 1988) mostraram que o nível de super hélice de plasmídios extraídos de bactérias (*E. coli* e *S. typhimurium*) foi influenciado pela osmolaridade do meio de crescimento destas bactérias



juntamente com o efeito de alterações da ação da girase e topoisomerase I, e, concluíram, assim, que a expressão de alguns promotores mostrou-se sensível à topologia, e que o aumento de super hélice negativa, observada em gel de agarose, variou diretamente com a concentração de NaCl, sacarose e NaCl-betaína.

Ramirez e Villarejo (1991), realizaram estudos *in vivo* utilizando condições anaeróbicas de crescimento e alta osmolaridade do meio. Segundo os autores a osmolaridade resultou em pequena alteração da topologia, mas foi responsável por sensível estimulação do promotor *proU*. Prince & Villarejo (1990) estudaram o efeito do glutamato de potássio, *in vitro*, sobre os genes *proU*, *lacZ*, β -*lac* e *pepN*, e observaram que os genes relacionados com resposta a choques osmóticos foram ativados, no entanto, todos sofreram influência do aumento de osmolaridade.

Cayley et al. (1991) e Record et al. (1998), observaram que o aumento de osmolaridade no meio de cultura provocou um decréscimo linear e acentuado na taxa de crescimento da cultura. Record et al. (1998), demonstraram que o aumento da osmolaridade do meio de crescimento é compensada internamente pelo aumento do transporte e síntese de osmoprotetores (osmólitos que não provocam alterações bioquímicas e moleculares prejudiciais), o que é resultante de alterações na expressão dos genes relacionados a estes processos.



Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram uma forte correlação entre alterações conformacionais da molécula de DNA, fatores externos, como a osmolaridade e a expressão de alguns genes (McClellan et al., 1990).

A influência do choque osmótico na expressão dos genes estudados nos trabalhos citados acima, foi em geral avaliado em duas situações: a) utilizando plasmídios nos quais o gene em estudo estava sob a regulação de promotor sensível ao choque osmótico, tal como o proU; b) utilizando cepas com deleções nos genes das topoisomerasas. Desta forma era de se esperar uma correlação entre a topologia do DNA e a expressão dos genes.

Neste trabalho, estudamos o gene de resistência a ampicilina (*amp^R*) situado no plasmídio pUC 18 com o qual fez-se a transformação da bactéria *E. coli* da linhagem HB 101. Este gene não apresenta influência direta de promotores sensíveis ao choque osmótico, e sua expressão pode ser estimulada através do aumento da concentração de ampicilina no meio de crescimento.



I.2- Objetivos deste trabalho:

- Analisar a expressão do gene através de curvas de crescimento em diferentes condições de choque osmótico e de concentração de antibiótico no meio de cultura, e da medida da atividade da β -lactamase (produto da expressão do gene *amp^R*);
- Observar o efeito das alterações no meio de cultura sobre a topologia do plasmídio;
- Estabelecer uma correlação entre alterações na topologia do plasmídio e a expressão do gene *amp^R*.



II- MATERIAIS E MÉTODOS

II.1.- Cultivo de Bactérias:

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* da linhagem HB101 transformada pela inserção do plasmídio pUC18 de 2.686 pares de base que contém o gene *amp^R*. O crescimento bacteriano se deu em meio LB composto de : 1% de cloreto de sódio, 1% de triptona e 0,5% de extrato de levedura, à 37°C, sob agitação de 200 rpm. A duração dos experimentos de cultura de bactérias foi de 18 horas.

O inócuo foi preparado pelo cultivo da bactéria até a absorbância de 1 nm obtida após cerca de 8 horas do início do crescimento, sendo adicionado 1 ml deste inócuo à 200 ml do meio de cultura utilizado no experimento.

II.1.1- Transformação

A técnica para transformação da bactéria pelo plasmídio pUC18 consistiu do crescimento da bactéria *Escherichia coli* da linhagem HB101 em meio LB-agar, de onde transferiu-se várias colônias para dispersão em 200 µl de tampão de transformação TFB, composto por KCl 100 mM, MnCl₄.4H₂O 45 mM, CaCl₂.2H₂O 10 mM, HAcOCl₃ 3 mM e K-MÊS 10 mM, por vigorosa agitação. O TFB tem a função de eliminar possíveis



interferências intermoleculares entre a membrana bacteriana e o DNA plasmidial.

A dispersão foi mantida a 0°C por 10 minutos e, posteriormente adicionou-se 20 µl de solução de DNA composta do plasmídio pUC18 na concentração de 1,4 µg/µl e incubou-se novamente a temperatura de 0°C durante 10 minutos.

Elevou-se rapidamente a temperatura da solução para 42°C (choque térmico) durante 90 segundos, o que resultou na expansão dos poros da membrana celular, permitindo, assim, a entrada do plasmídio no interior da bactéria. 800 µl de meio LB foi adicionado, sendo o recipiente mantido sob agitação a 200 rpm e 36 °C durante 1 hora, para recuperação da viabilidade celular.

A bactéria foi, então, semeada em meio LB-agar contendo 50 µl/ml de ampicilina para a seleção das bactérias resistentes (Sanbrook et al, 1989).

II.1.2- Curvas de Crescimento

Inicialmente foram feitas curvas de crescimento controle da bactéria *E. coli* da linhagem HB101 transformada com o plasmídio pUC18 sem alteração ou inclusão de nenhum osmólito ao meio LB e concentração de ampicilina constante em 20 µg/ml.



Posteriormente, foram feitas curvas de crescimento com concentrações diferentes dos osmólitos. Os osmólitos adicionados aos meios de cultura foram: 0,13M, 0,26M e 0,53M de trealose, que elevou a osmolaridade do meio LB de, aproximadamente, 350 mOsm para 550 mOsm, 680 mOsm e 960 mOsm respectivamente; 0,13M 0,26M e 0,52M de NaCl, que elevou a osmolaridade para 840 mOsm, 980 mOsm e 1440 mOsm; e 0,16M, 0,32M e 0,64M de glicerol, que resultou no aumento de osmolaridade para 450 mOsm, 650 mOsm e 900 mOsm.

O crescimento foi acompanhando durante 18 horas. As variações na absorção de luz no comprimento de onda de 660 nm foram monitoradas através de espectrofotômetro em intervalos de 1 hora. A linha de base para as medidas espectométricas foram feitas com o meio LB sem a adição de osmólitos e a adição dos osmólitos ao meio, anteriormente à inoculação das bactéria, não causou diferenças de absorção.

Nos tempos 0, 6 e 12 horas, 100 µl de cada meio foi submetido a diluições crescentes e semeado em meio LB-agar contendo 20 µg/ml para determinação do número de bactérias viáveis.



II.1.3- Cultivo na Presença de Osmólitos

Em cada experimento de cultivo foram analisados cinco meios diferentes, sendo que o controle era constituído pelo meio LB com 20 μ g/ml de ampicilina e os quatro meios restantes eram constituídos pela adição ao meio LB da mesma concentração do osmólito, diferindo apenas pelas concentrações de ampicilina crescentes em torno de 20 μ g/ml, 60 μ g/ml, 100 μ g/ml e 140 μ g/ml. Este experimento foi realizado utilizando-se todas as concentrações dos osmólitos anteriormente citados e foi repetido para avaliação da reproduzibilidade dos resultados.

O tempo de cultivo foi de 18 horas a temperatura de 36°C, em shaker a 200 rpm.

II.2- Extração dos Plasmídios:

A partir de uma colônia a bactéria *E. coli* da linhagem HB 101 transformada pelo plasmídio pUC18 foi pré-inoculada em 1,5ml de meio LB, contendo 50 μ g/ml do antibiótico ampicilina e submetido à agitação constante em Shaker Orbital Gallenkamp a 200 rpm por período de 12 horas, à 37°C. Esse cultivo foi utilizado para inocular em seguida



inoculadas em 200 ml de meio LB contendo o antibiótico e os osmólitos em várias concentrações. O cultivo ocorreu por 18 horas a 37°C, sob agitação a 200 rpm.

Após 6 horas do início do experimento, estas bactérias foram coletadas por centrifugação a 3400 g em centrífuga Sorvall RC5B Plus à 4°C por 10 minutos, seguido da remoção do sobrenadante. O precipitado de bactérias foi então submetido a lise alcalina. Nesta fase as bactérias foram inicialmente re-suspendidas em solução de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 10mM e adicionou-se 50 µl de RNase 10 µg/ml. Esta etapa é necessária para a inibição enzimática de DNases e quelamento de íons Mg^{+2} . Em seguida acrescentou-se a solução de NaOH 20 mM e triton 1%. Esta solução rompe a parede bacteriana a partir da dissolução da membrana lipoprotéica, solubilizando e desnaturando as proteínas devido ao rompimento das pontes dissulfeto. Em seguida foi adicionada solução de acetato de potássio 2,6 mM, pH 5,2, misturando-se suavemente e seguindo-se repouso por 5 minutos a temperatura ambiente (Sanbrook et al., 1989).

A adição dessa solução, com baixo pH e concentração salina elevada, induz a renaturação das macromoléculas, seguindo uma ordem na qual os plasmídios, por serem menores, e possuírem vínculos topológicos, se renaturam mais rapidamente que o DNA cromossomal e proteínas, que, deste modo, são precipitados durante a centrifugação a 2000 g por 10 minutos a 4°C, ficando o DNA plasmidial no sobrenadante, que é coletado.



O plasmídio presente no sobrenadante foi purificado através de uma solução de resina de afinidade, à qual liga-se o DNA. Finalmente acrescentou-se 5 ml de solução de Tris 100 mM e KCl 10 mM, pH8,5 centrifugando-se a 400 g por 2 minutos a 4°C, nestas condições rompem-se as ligações DNA-resina e o DNA é coletado. O DNA foi então precipitado com adição de isopropanol correspondente em volume a 0,75 da solução anterior. O DNA foi precipitado durante a centrifugação à 5800 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e resuspendido em tampão PBS composto de NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂HPO₄ 1,7 mM. Em seguida mediu-se a densidade ótica da amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280nm para a determinação da concentração da solução resultante.

II.3.- Análise da topologia dos plasmídios

II.3.1 - Análise da topologia dos plasmídios em gel de agarose

Para a análise da topologia da molécula de DNA utilizou-se gel de agarose 1,5%, contendo 8 µg/ml, 12 µg/ml e 16 µg/ml de cloroquina em tampão TAE composto de Tris-HCl 40 mM, pH8,0, acetato de sódio 5 mM



e EDTA 0,5 mM, com a concentração de 12 μ g/ml de cloroquina. A concentração das amostras dos plasmídios foi de 0,8 μ g/ml.

A cloroquina é um intercalante, e permite uma melhor resolução da família de topoisômeros pela indução do relaxamento do DNA super-hélice negativo, pois próximo ao linking number de -15 os topoisômeros migram muito próximos no gel de agarose, com o relaxamento para conformações menos compactas as amostras dividem-se nos vários topoisômeros, o que permite uma melhor visualização. (Bates e Maxwell, 1994).

O gel de agarose-cloroquina foi submetido a diferença de potencial elétrico de 0,8 V/cm, a temperatura ambiente, para os plasmídios extraídos das bactérias cultivadas sob choque osmótico e 1,2 V/cm e 4°C, para os plasmídios recircularizados nos experimentos *in vitro*.

A topologia do DNA permanece inalterada na ausência de quebra de uma ou das duas fitas simples do DNA, por isso analisando-se apenas as moléculas em super hélice podemos determinar suas diferenças no “linking number” mesmo após todo o processo de extração.



II.3.2 Análise da topologia dos plasmídios pUC18 através de fluorescência.

O estado topológico dos plasmídios crescidos em diferentes meios foi analisado também através de fluorescência de acordo com o protocolo proposto por Morgan et al. (1979).

A intensidade de fluorescência do brometo de etídio foi medida a partir do espectro de emissão em 600 nm com excitação em 525 nm, em tampão brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/ml}$, K_3PO_4 20 mM e EDTA 0,5 mM (pH 11,8). À 900 μl deste tampão foram adicionados 100 μl do plasmídeo pUC 18 (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

De acordo com este protocolo o número de voltas excedentes no plasmídeo (ΔLk) é proporcional à razão entre as fluorescências do plasmídeo desnaturado e nativo. O plasmídeo desnaturado foi obtido após aquecimento a 96°C por 2 minutos.



II.4- Análise da expressão do gene *amp^R*

A atividade do gene *amp^R* foi quantificada indiretamente através da dosagem de ácido penicilínico no meio de cultura pela medida do pH utilizando-se o indicador vermelho de metila.

O indicador apresenta a cor amarela em pH acima de 6,7 e a coloração vermelha abaixo do pH 4,3. Entre estes dois intervalos de pH a coloração é intermediária.

Após 10 horas de crescimento bacteriano nos meios com a adição dos vários osmólitos e concentrações de antibiótico citadas anteriormente, os meios foram centrifugados a 5800 g por 5 minutos para a separação das bactérias. O sobrenadante foi recolhido e colocado numa cubeta de quartzo ao qual foi adicionado 200µl do vermelho de metila. Após a homogenização da mistura foi realizada a medida de absorção ótica em 550 nm correspondente ao vermelho e 430 nm correspondente ao amarelo.

A atividade da β -lactamase foi medida através da razão entre a absorbância em 550 e 430 nm: A_{550}/A_{430} , sendo o resultado correspondente ao número médio obtidos de três experimentos.



II.4.1 – Análise do efeito direto dos osmólitos sobre a enzima β -lactamase.

Os experimentos para a observação do efeito dos osmólitos diretamente sobre a atividade da enzima β -lactamase foram realizados através da medida da acidificação do meio realizada após 10 horas de cultura da bactéria e centrifugação para remoção das células. Utilizou-se o meio LB; e LB com a adição de 60 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina; LB com a adição de 60 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina e de trealose (0,26 M); e LB com a adição de 60 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina e glicerol (0,32 M).

Neste experimento foi observado o número de bactérias viáveis através de plaqueamentos realizados a cada 2 horas, e a velocidade de crescimento pela medida de absorbância (660 nm) do meio.

À uma alíquota do meio LB com a adição de 60 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina aplicou-se, após o crescimento, concentrações de 0,32 M de glicerol e 0,26 M de trealose com incubação durante 10 minutos a 36°C e, posteriormente 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina com incubação durante 10 minutos e 36°C, avaliou-se, então, a acidificação produzida no meio, correlacionando com as medidas anteriores a estas adições.



Aos meios com adição de trealose e glicerol anterior à cultura, foi adicionado 100 µg/ml de ampicilina e procedeu-se como já descrito anteriormente.

Desta maneira foi possível avaliar a atividade da enzima durante o crescimento, sua atividade residual no meio após a centrifugação e separação das células, e os efeitos diretos dos osmólitos sobre a produção de ácido decorrente desta atividade residual.

II.5- Estudos *in vitro*

O plasmídio extraído a partir da bactéria crescida em meio LB foi tratado com a enzima de restrição BamH1 durante 1 hora à 37°C e posteriormente a solução de restrição teve sua temperatura elevada para 65°C durante 20 minutos para inativação da enzima. Os plasmídios foram, então, recircularizados através de reação com T₄ DNA ligase a 14°C durante 2 horas, na presença de diferentes concentrações de osmólitos: cloreto de sódio, trealose e glicerol.

Os topoisômeros gerados na reação da ligase foram analisados por eletroforese de maneira idêntica à utilizada para o estudo *in vivo*, ou seja, com a utilização de géis de agarose 1,5% acrescido de cloroquina.



Os géis destes experimentos foram mantidos à 4°C durante a eletroforese para diminuição da perda de nitidez das bandas devido à uma possível degradação do DNA.

II.6.– Densitometria Ótica

Os géis de agarose foram analisados através de densitometria, com a utilização de um programa de computador de domínio público (“bandlead”).

As alterações no “linking number” (ΔLk) foram estimadas através do deslocamento do centro de distribuição gaussiano dos topoisômeros.

Esta estimativa é feita em relação ao plasmídeo recircularizado em tampão de ligase, contendo $MgCl_2$ 6,6 μM , a 25°C, nesta condição o plasmídeo (pUC18) apresenta $\Delta Lk=1,8$ (Anderson & Bauer, 1978).



III- RESULTADOS

III.1- Estudos in vivo

Experimentos de cultivo da linhagem HB101 de *E. coli* transformada com o plasmídio pUC18 que possui o gene de resistência à ampicilina *amp^R* foram realizados por períodos de 18 horas em meio LB com a adição de osmólitos e de concentrações variadas de ampicilina.

Durante o tempo de observação, o crescimento bacteriano apresentou três fases distintas, como pode ser visto na **figura 2**:

-fase lag, ou de adaptação, onde são produzidos os elementos necessários às vias metabólicas essenciais para o início da divisão celular como enzimas, coenzimas ou elementos básicos necessários que não estavam presentes no meio anterior. Tem duração de 3 horas e o número de bactérias permanece praticamente constante. A duração desta fase não foi alterada pela adição dos co-solventes.

-fase log, ou exponencial, tem início quando as bactérias estão aptas à se dividirem em intervalos de tempo regulares, embora a taxa de crescimento varie no seu início e término. Segundo Brock et al., (1994), a velocidade de crescimento depende das características genéticas e das condições do meio.



-fase estacionária, onde o número de células é praticamente constante devido a um equilíbrio entre as taxas de mortes e de divisões celulares. A velocidade de crescimento é praticamente nula devido à falta de nutrientes ou acúmulo de produtos tóxicos.

O crescimento bacteriano, monitorado através da absorção ótica em 660 nm, foi apresentado em gráficos da absorbância em função do tempo em diferentes valores da osmolaridade dos meios na presença e ausência de antibiótico.

Os gráficos demonstram o comportamento bacteriano até 14 horas de crescimento, pois, devido as diferenças entre os números finais nas várias curvas de crescimento não terem sido relevantes para os meios utilizados, tornou-se de maior importância a visualização da fase de crescimento exponencial, durante a qual os plasmídios foram extraídos e os experimentos para quantificação da atividade da β -lactamase realizados.



III.1.1 Avaliação do efeito da variação da pressão osmótica dos meios de cultura sobre o crescimento bacteriano.

O aumento da osmolaridade resultou em grande alteração nas curvas de crescimento como podemos observar na **Figura2**.

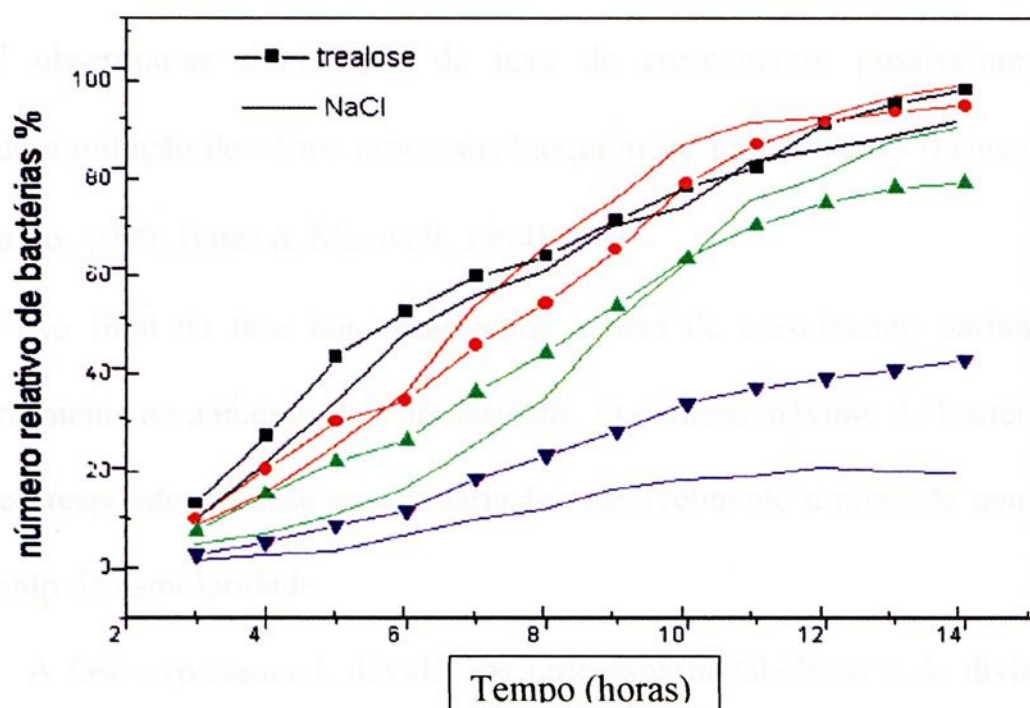


Figura -2 - Número relativo de bactérias (porcentagem entre medidas em espectrofotômetro da absorbância no comprimento de onda de 660 nm do meio em estudo a cada hora e a maior medida obtida das bactérias durante todo o cultivo em meio LB com 20 µg/ml de ampicilina realizado simultaneamente a este experimento) em função do tempo de cultivo a 37°C, sob 200 rpm de agitação, sendo: ■ — cultura em meio LB (controle); ● — meio LB com a adição de 0,13 M de trealose e de NaCl; ▲ — meio LB com a adição de 0,26 M de trealose e de NaCl; ▼ — meio LB com a adição 0,54 M de trealose e de NaCl, respectivamente. Em todos os experimentos foi utilizada ampicilina na concentração de 20 µg/ml.

As concentrações de 0,13 M de trealose (550mOsm) e de NaCl (800mOsm) mostraram-se levemente inibitórias no início da fase exponencial, sendo que ao final desta fase a taxa de crescimento foi maior, comparativamente, ao meio LB e as outras concentração de osmólitos.

Com o aumento da osmolaridade, 0,26 M (675 mOsm) e 0,53 M (940 mOsm) de trealose, e 0,26 M (960 mOsm) e 0,54 M (1426 mOsm) de NaCl observou-se diminuição da taxa de crescimento, possivelmente devido a inibição de vários processos bioquímicos intracelulares (Prince & Villarejo, 1990; Bates & Maxwell, 1994).

Ao final da fase lag observamos a taxa de crescimento variando inversamente ao aumento da osmolaridade. O número máximo de bactérias que correspondem a fase estacionária foi sensivelmente diminuído com o aumento da osmolaridade.

A fase exponencial, devido aos processos metabólicos e de divisão celular mais intensos, evidencia com maior nitidez os efeitos das alterações nos meios de crescimento sobre a velocidade do crescimento e número de bactérias viáveis.

Os gráficos da **figura 2** são representativos dos experimentos de cultivo da bactéria. Foram construídos utilizando a porcentagem obtida através da razão entre a absorbância em 660 nm medida em determinado



tempo de cultivo e a medida referente ao maior número de bactérias no meio LB, sem a adição de osmólitos, durante todo o experimento.

O objetivo desta apresentação em porcentagem é a redução de variações apresentadas nos experimentos de cultivos não realizados simultaneamente.

III.1.2- Avaliação do efeito da variação das concentrações de ampicilina no meio de cultura sobre o crescimento bacteriano.

O efeito da concentração de ampicilina nas curvas de crescimento bacteriano da linhagem HB 101 são mostradas na **figura 3**.

As curvas de crescimento indicam diminuição na velocidade de crescimento em função do aumento da concentração de ampicilina. Este efeito foi observado, também, através da contagem de colônias obtidas através dos plaqueamentos realizados durante a fase exponencial, apresentados na **Tabela 1**. Nos plaqueamentos foram feitas diluições para que o número de colônias em cada placa variasse entre 50 e 60 colônias e insemou-se três placas para cada meio, sendo os números obtidos a média entre estes resultados.



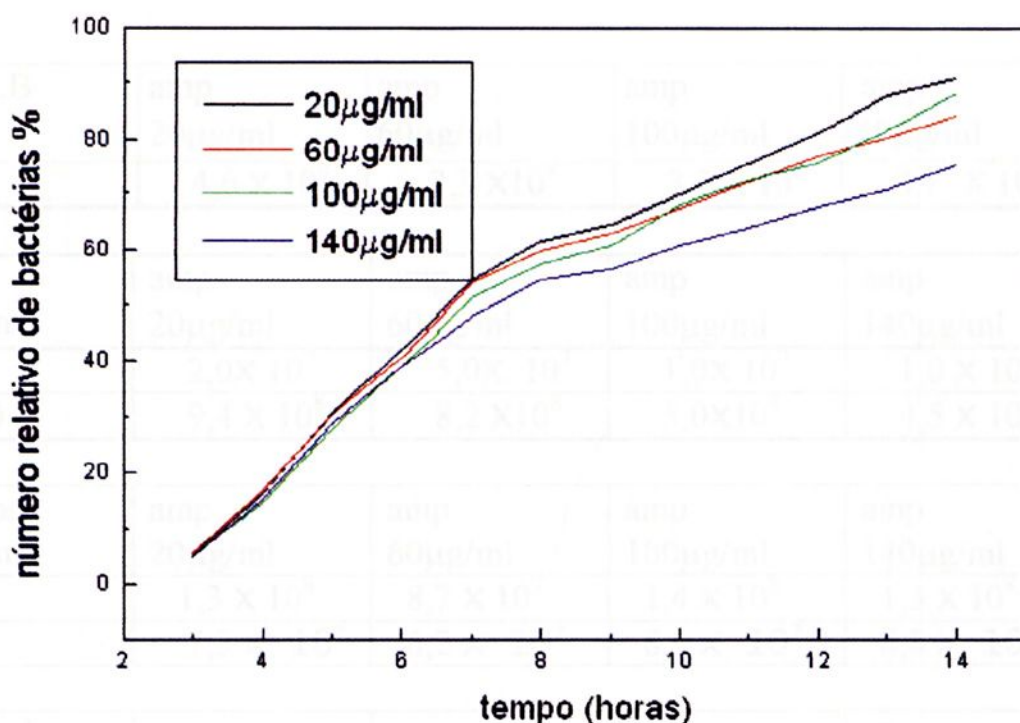


Figura -3 Número relativo de bactérias (porcentagem entre medidas em espectrofotômetro da absorbância no comprimento de onda de 660 nm do meio em estudo a cada hora e a maior medida obtida das bactérias durante todo o cultivo em meio LB com 20 µg/ml de ampicilina realizado simultaneamente a este experimento) em função do tempo de cultivo a 37°C, sob 200 rpm de agitação, sendo: ● — cultura em meio LB com adição 20 µg/ml de ampicilina (controle); ● — meio LB com a adição de 60 µg/ml de ampicilina; ▲ — meio LB com a adição de 100 µg/ml de ampicilina; ▼ — meio LB com a adição de 140 µg/ml de ampicilina.

Tabela 1 – Número de colônias observadas nos plaqueamentos realizados as 6 horas nos experimentos de cultivo de bactérias indicando o número de bactérias viáveis.

LB	amp 20µg/ml	amp 60µg/ml	amp 100µg/ml	amp 140µg/ml
0	4,6 X 10 ⁸	3,3 X10 ⁸	3,2 X 10 ⁸	8.7 X 10 ⁷

NaCl (mOsm)	amp 20µg/ml	amp 60µg/ml	amp 100µg/ml	amp 140µg/ml
980	2,0X 10 ⁷	5,0X. 10 ⁷	1,0X 10 ⁷	1,0 X 10 ⁷
1440	9,4 X 10 ⁸	8,2 X10 ⁸	5,0X10 ⁸	4,5 X 10 ⁸

Trealose (mOsm)	amp 20µg/ml	amp 60µg/ml	amp 100µg/ml	amp 140µg/ml
550	1,3 X 10 ⁸	8,7 X 10 ⁷	1,4 X 10 ⁸	1,3 X 10 ⁸
680	7,3 X 10 ⁷	6,2 X 10 ⁷	8,9 X 10 ⁷	8,8 X 10 ⁷

Glicerol (mOsm)	amp 20µg/ml	amp 60µg/ml	amp 100µg/ml	amp 140µg/ml
450	1,1 X 10 ⁹	1,4 X 10 ⁹	1,6 X 10 ⁹	1,2 X 10 ⁹
650	8,4 X 10 ⁸	5,3 X 10 ⁸	5,6 X 10 ⁸	4,0 X 10 ⁸
900	7,5 X 10 ⁷	3,0 X 10 ⁷	4,0 X 10 ⁷	4,5 X 10 ⁷

O efeito do choque osmótico no crescimento bacteriano em diferentes concentrações de ampicilina é mostrado na **figura 4**. Observamos que com a adição de 0,13 M (550 mOsm) de trealose e 0,16 M de glicerol (cerca de 450 mOsm), as curvas de crescimento não apresentam o mesmo padrão do controle. Os resultados são, no entanto, muito próximos para o mesmo osmólito. Entre os osmólitos notamos maior taxa de crescimento para os meios de crescimento com adição de glicerol. O gráfico de atividade absoluta da β-lactamase (independente do número de bactérias) apresentou grande diferença entre os osmólitos, sendo que a atividade enzimática é maior para o meio com glicerol.



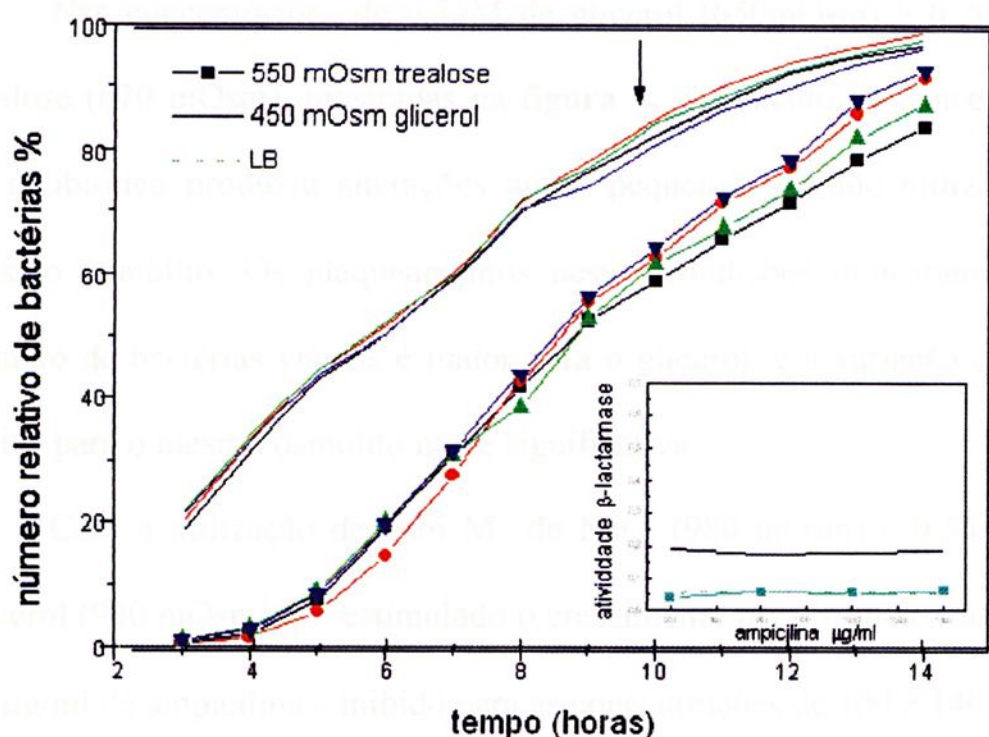


Figura 4 - Número relativo de bactérias (porcentagem entre medidas em espectrofotômetro da absorbância no comprimento de onda de 660 nm do meio em estudo a cada hora e a maior medida obtida das bactérias durante todo o cultivo em meio LB com 20 µg/ml de ampicilina realizado simultaneamente a este experimento) em função do tempo de cultivo a 37°C, sob 200 rpm de agitação, variando-se a concentração de ampicilina em meio LB com adição dos osmólitos trealose (550 mOsm) e glicerol (450 mOsm) durante 18 horas: ■ — dados obtidos do meio de cultura com 20 µg/ml de ampicilina; • — dados do meio com 60 µg/ml de ampicilina; ▲ — dados do meio com 100 µg/ml de ampicilina; ▼ — dados do meio de cultura com 140 µg/ml de ampicilina. O inserto corresponde a medida da atividade da enzima β-lactamase produzida pelas bactérias crescidas sob estas condições, após 10 horas de cultura. O inserto no canto inferior direito representa os resultados dos experimentos para a medida da atividade da enzima β-lactamase referente aos meios apresentados nesta figura e ao meio LB sem a adição de osmólitos e concentração de ampicilina de 20 µg/ml.

Nas concentrações de 0,32M de glicerol (650mOsm) e 0,26 M de trealose (670 mOsm), mostradas na **figura 5**, o aumento da concentração de antibiótico produziu alterações muito pequenas, quando utilizou-se o mesmo osmólito. Os plaqueamentos nestas condições indicaram que o número de bactérias viáveis é maior para o glicerol, e a variação entre os meios para o mesmo osmólito não é significativa.

Com a utilização de 0,26 M de NaCl (980 mOsm) e 0,54 M de glicerol (900 mOsm) foi estimulado o crescimento para os meios com 20 e 60 µg/ml de ampicilina e inibido para as concentrações de 100 e 140 µg/ml, embora estas diferenças não sejam muito significativas. Nas concentrações de 0,54M de NaCl (1440mOsm) a disposição das curvas de crescimento retornam à observada no meio LB sem adição de osmólitos, sendo inibido o crescimento com o aumento da concentração de antibiótico (dados não mostrados).



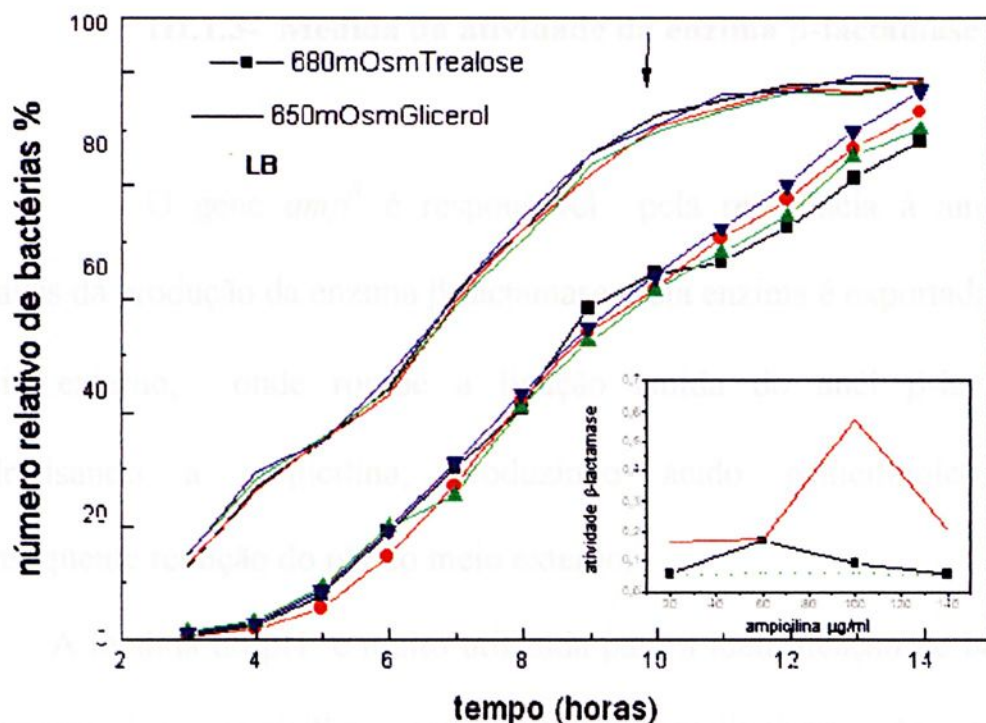


Figura -5 - Número relativo de bactérias (porcentagem entre medidas em espectrofotômetro da absorvância no comprimento de onda de 660 nm do meio em estudo a cada hora e a maior medida obtida das bactérias durante todo o cultivo em meio LB com 20 µg/ml de ampicilina realizado simultaneamente a este experimento) em função do tempo de cultivo a 37°C, sob 200 rpm de agitação, variando-se a concentração de ampicilina em meio LB com adição dos osmólitos trealose (680 mOsm) e glicerol (650 mOsm) durante 18 horas: ■ — dados obtidos do meio de cultura com 20 µg/ml de ampicilina; • — dados do meio com 60 µg/ml de ampicilina; ▲ — dados do meio com 100 µg/ml de ampicilina; ▼ — dados do meio de cultura com 140 µg/ml de ampicilina. O inserto corresponde a medida da atividade da enzima β-lactamase produzida pelas bactérias crescidas sob estas condições, após 10 horas de cultura. O inserto no canto inferior direito representa os resultados dos experimentos para a medida da atividade da enzima β-lactamase referente aos meios apresentados nesta figura e ao meio LB sem a adição de osmólitos e concentração de ampicilina de 20 µg/ml.

III.1.3- Medida da atividade da enzima β -lactamase

O gene *amp^R* é responsável pela resistência à ampicilina através da produção da enzima β -lactamase. Esta enzima é exportada para o meio externo, onde rompe a ligação amida do anel β -lactâmico, hidrólizando a ampicilina, produzindo ácido penicilínico, com conseqüente redução do pH do meio externo.

A medida do pH é muito utilizada para a identificação de bactérias resistentes a ampicilina em métodos qualitativos. As medidas espectométricas das alterações ocorridas no indicador de pH (vermelho de metila) nos vários meios utilizados neste trabalho demonstraram, quantitativamente, a produção de β -lactamase e sua atividade na produção de ácido penicilínico. (Murray et al, 1995)

Os espectros de absorção do vermelho de metila no meio de cultura apresentam dois picos de absorção em 430 nm e 550 nm (mostrados na **figura 6**) indicando a atividade da β -lactamase que foi expressa pela fração 430 nm/550 nm



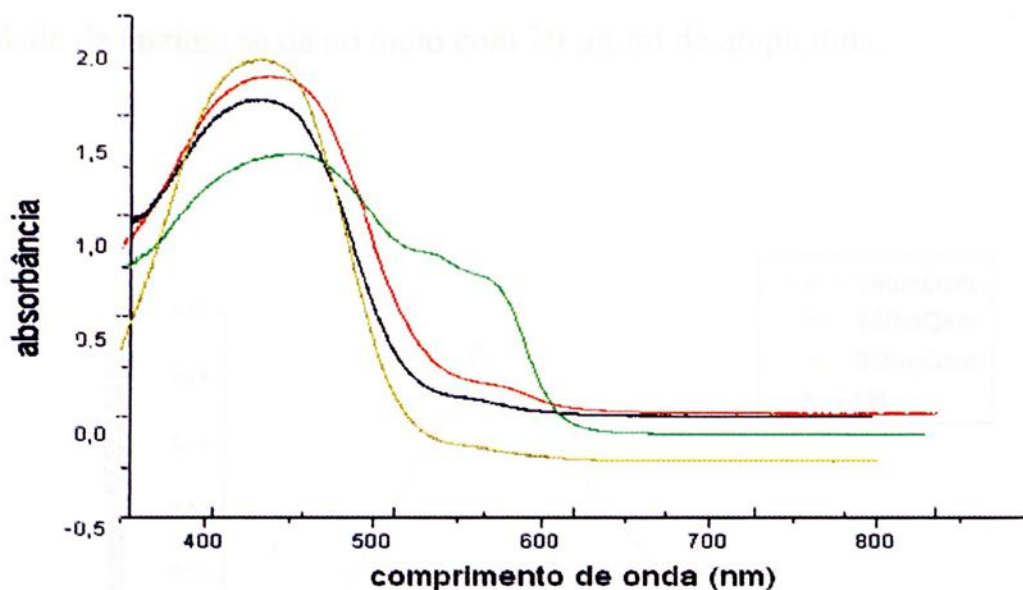


Figura - 6- Espectros de absorção dos meios LB contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina na presença de — 640mOsm de NaCl, — 650mOsm de glicerol, — 680mOsm de trealose e — meio LB sem adição de osmólitos, às 10 horas de crescimento, após separação por centrifugação das bactérias e adição de 200 μl do indicador de pH vermelho de metila.

Os gráficos de atividade da β -lactamase observada em função da concentração de ampicilina nos meios de cultura com a adição dos vários osmólitos utilizados são mostrados nas **figuras 7, 8 e 9**, sendo que os resultados correspondem a média aritmética de três medidas realizadas.

Na **figura 7** observamos que a adição de trealose induziu pouca variação na curva de absorção do indicador em relação ao meio LB à 550

mOsm, no entanto a 960 mOsm a atividade da enzima apresentou um pico máximo no meio com 60 µg/ml de ampicilina; à 980 mOsm a maior atividade da enzima se dá no meio com 20 µg/ml de ampicilina.

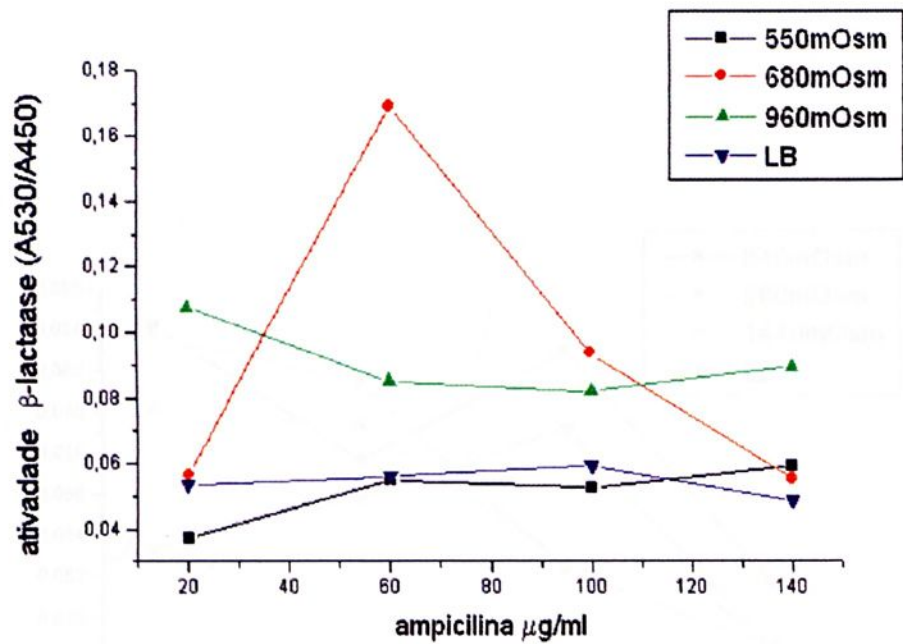


Figura 7- Atividade da enzima β-lactamase em função da concentração de antibiótico no meio LB sem a adição de osmólitos e nos meios LB com a adição das concentrações de trealose utilizadas nos experimentos de cultivo, as 10 horas de cultura, após separação por centrifugação das bactérias e adição de 200 µl do indicador de pH vermelho de metila.

O aumento da concentração de NaCl no meio de cultura mostrou-se inibitório com o aumento da concentração do antibiótico, com exceção do pico à 20µg/ml de ampicilina e 680mOsm, o que pode ser resultado da



estimulação do gene pelo aumento do antibiótico no meio em concentrações baixas de NaCl que seriam, ainda, pouco inibitórias (Figura 8).

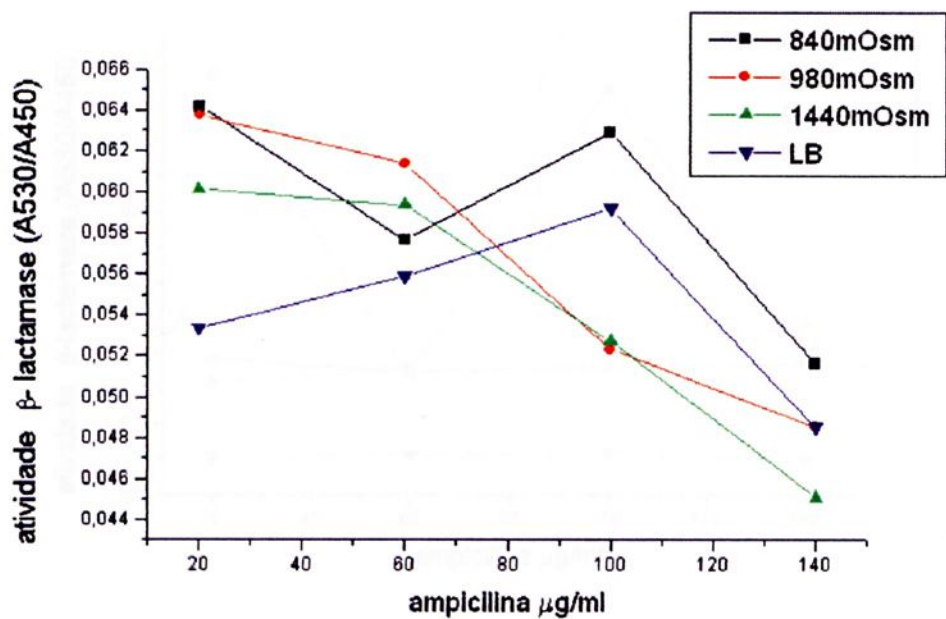


Figura 8- - Atividade da enzima β -lactamase em função da concentração de antibiótico no meio LB sem a adição de osmólitos e nos meios LB com a adição das concentrações de NaCl utilizadas nos experimentos de cultivo, as 10 horas de cultura, após separação por centrifugação das bactérias e adição de 200 μl do indicador de pH vermelho de metila.



A adição de glicerol resultou em maior atividade da enzima em relação ao NaCl e trealose ; à 450 mOsm não demonstrou nenhum pico, no entanto a atividade enzimática foi sempre maior que em meio LB; à 650 mOsm ocorre um pico de atividade no meio com 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina; e com 20 $\mu\text{g/ml}$ à 900 mOsm. (Figura 9)

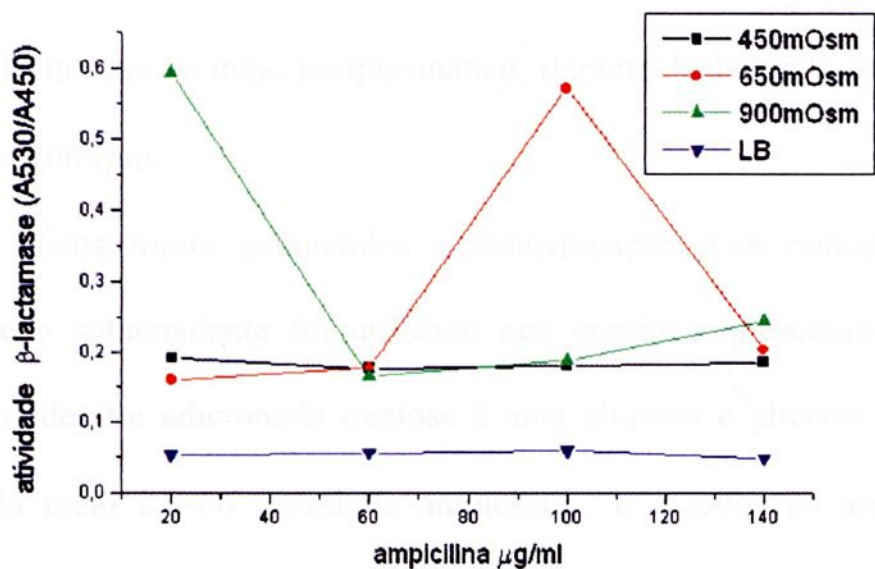


Figura 9 - Atividade da enzima β -lactamase em função da concentração de antibiótico no meio LB sem a adição de osmólitos e nos meios LB com a adição das concentrações de glicerol utilizadas nos experimentos de cultivo, as 10 horas de cultura, após separação por centrifugação das bactérias e adição de 200 μl do indicador de pH vermelho de metila.



III.1.3.1 – Análise do efeito direto dos osmólitos sobre as enzima no espaço periplasmático.

Foram realizadas culturas da bactéria *E. coli* da linhagem HB 101 que possui o plasmídio pUC 18 em meio LB; LB com a adição de 60 µg/ml de ampicilina; LB com adição de 0,36 M de glicerol (650 mOsm) e 60 µg/ml de ampicilina; LB com adição de 0,26 M de trealose (680 mOsm) e 60 µg/ml de ampicilina e, para o controle do efeito dos osmólitos sobre a enzima β -lactamase no meio periplasmático, durante 14 horas, a 37°C sob agitação de 200 rpm.

Os meios foram submetidos a centrifugação para remoção das bactérias e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios representados pela **tabela 2**, onde foi adicionado trealose à uma alíquota e glicerol à outra alíquota do meio LB-60 µg/ml de ampicilina e a todos os meios foi adicionado 100 µg/ml de ampicilina, avaliou-se, então, variações na acidificação dos meios em decorrência da adição do substrato da enzima (ampicilina) em relação à acidificação dos meios aos quais além do substrato foram adicionados os osmólitos.



Tabela 2 – Atividade da enzima β -lactamase e número de bactérias viáveis
(10 horas de cultura de bactérias)

Meio inicial	Adições para reação	Atividade β -lactam. 550/430	bactérias viá-veis(10 horas)	Atividade espe- cífica β -lactam. (ativ./célula)	Atividade residual β - lac. no meio (ativ./celula)
LB		0,0533	$1,0 \times 10^{12}$	$5,3 \times 10^{-14}$	
LB	Amp. (100 $\mu\text{g/ml}$)	0,0957	$1,0 \times 10^{12}$		$42,4 \times 10^{-15}$
LB+ amp.(60 $\mu\text{g/ml}$)		0,0480	$4,0 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{-14}$	
LB+ amp.(60 $\mu\text{g/ml}$)	Amp. (100 $\mu\text{g/ml}$)	0,0559	$4,0 \times 10^{12}$		$1,97 \times 10^{-15}$
LB+ amp.(60 $\mu\text{g/ml}$)	Trealose + amp. (100 $\mu\text{g/ml}$)	0,0794	$4,0 \times 10^{12}$		$7,85 \times 10^{-15}$
LB+ amp.(60 $\mu\text{g/ml}$)	Glicerol + amp. (100 $\mu\text{g/ml}$)	0,0568	$4,0 \times 10^{12}$		$2,2 \times 10^{-15}$
LB+amp (60 $\mu\text{g/ml}$) Trealose (0,26M)		0,0562	$2,0 \times 10^{10}$	$280,0 \times 10^{-14}$	
LB+amp (60 $\mu\text{g/ml}$) Trealose (0,26 M)	Amp. (100 $\mu\text{g/ml}$)	0,0745	$2,0 \times 10^{10}$		$915,0 \times 10^{-15}$
LB+amp (60 $\mu\text{g/ml}$) Glicerol (0,32 M)		0,1374	$1,7 \times 10^{12}$	$8,1 \times 10^{-14}$	
LB+amp (60 $\mu\text{g/ml}$) Glicerol (0,32 M)	Amp. (100 $\mu\text{g/ml}$)	0,1671	$1,7 \times 10^{12}$		$17,4 \times 10^{-15}$



Os cultivos de bactérias realizados neste experimento foram dispostos em gráficos do número de bactérias viáveis obtidas por plaqueamentos realizados a cada 2 horas e velocidade de crescimento obtido pela absorbância a 660 nm em função do tempo, apresentados nas figuras 10 e 11.

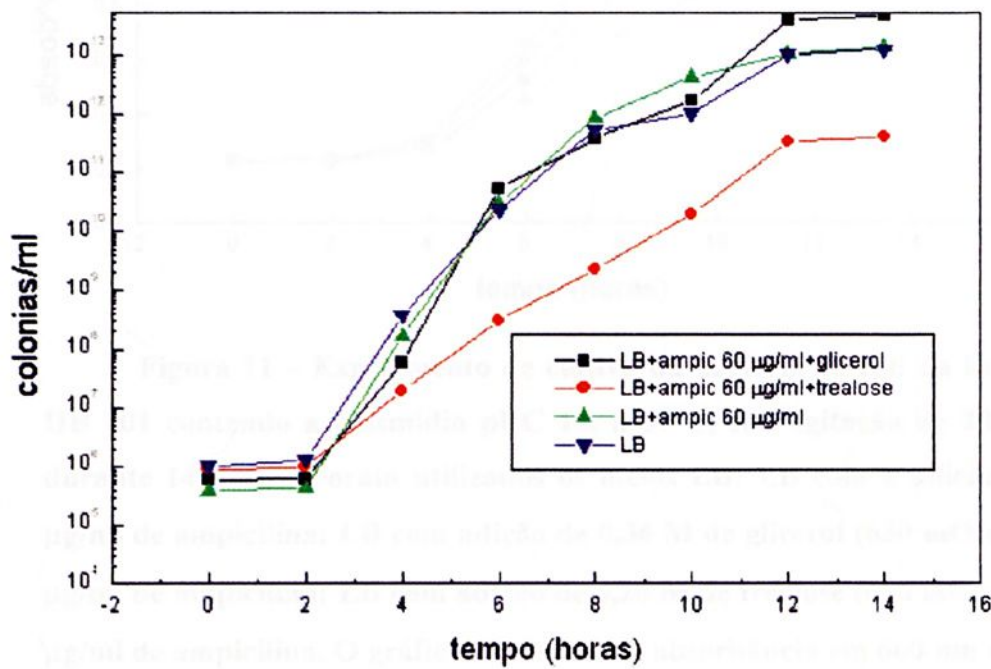


Figura 10 – Experimento de cultivo da bactéria *E. coli* da linhagem HB 101 contendo a plasmídeo pUC 18, a 37°C, sob agitação de 200 rpm, durante 14 horas. Foram utilizados os meios LB; LB com a adição de 60 µg/ml de ampicilina; LB com adição de 0,36 M de glicerol (650 mOsm) e 60 µg/ml de ampicilina; LB com adição de 0,26 M de trealose (680 mOsm) e 60 µg/ml de ampicilina. O gráfico representa o número médio de colônias observadas em três placas de meio LB-agar com 50µg/ml utilizadas nas medida a cada 2 horas com diluições crescentes para obtenção do número de colônias entre 50 e 300 por placa em função do tempo.

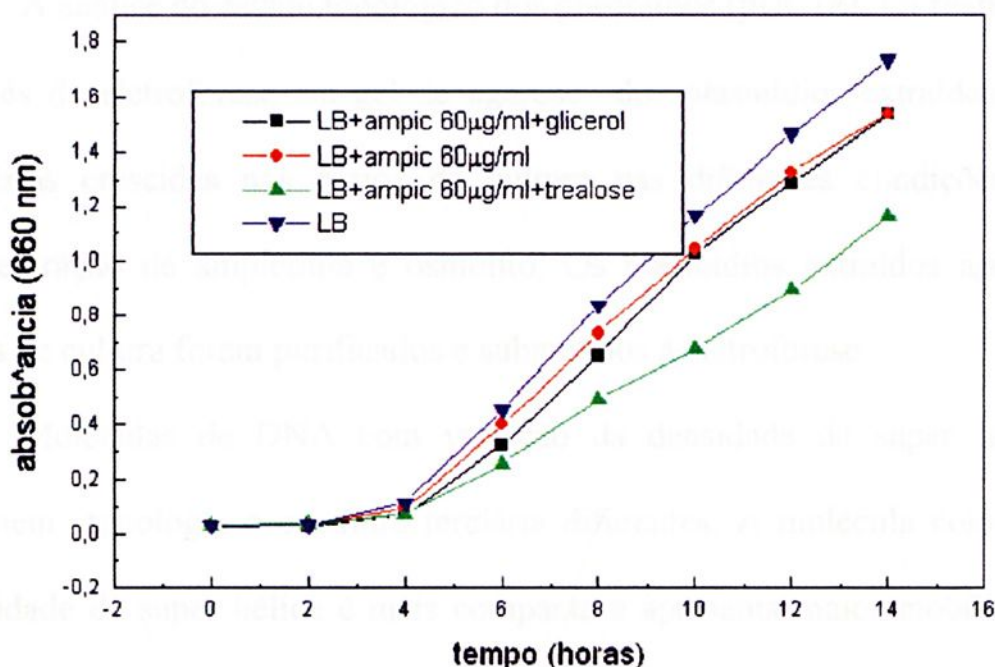


Figura 11 – Experimento de cultivo da bactéria *E. coli* da linhagem HB 101 contendo a plasmídeo pUC 18, a 37°C, sob agitação de 200 rpm, durante 14 horas. Foram utilizados os meios LB; LB com a adição de 60 µg/ml de ampicilina; LB com adição de 0,36 M de glicerol (650 mOsm) e 60 µg/ml de ampicilina; LB com adição de 0,26 M de trealose (680 mOsm) e 60 µg/ml de ampicilina. O gráfico representa a absorbância em 660 nm medida a cada 2 horas do experimento em função do tempo.

O meio com a adição de trealose apresentou menor crescimento bacteriano nos dois tipos de medidas. A fase lag ou adaptativa apresentou-se menor na medida através do plaqueamento, que na medida realizada através do espectrofotômetro. As diferenças entre os gráficos do crescimento nos meios LB, LB-ampicilina e LB-glicerol não são consideradas significativas, sendo atribuídas à técnica.

III .1.4 – Análise da Topologia do Plasmídio pUC18 em gel de agarose

A análise do estado topológico dos plasmídios (pUC18), foi realizada através de eletroforese em gel de agarose dos plasmídios extraídos das bactérias crescidas nos meios de cultura nas diferentes condições de concentração de ampicilina e osmólito. Os plasmídios extraídos após 6 horas de cultura foram purificados e submetidos à eletroforese.

Moléculas de DNA com variação da densidade de super hélice possuem topologia e estrutura terciária diferentes. A molécula com alta densidade de super hélice é mais compacta e apresenta maior mobilidade quando submetida à eletroforese.

Os plasmídios caracterizados por diferentes densidades de super hélice migram no gel de agarose como um conjunto de bandas cujas intensidades são proporcionais às concentrações dos plasmídios. Cada banda representa um conjunto de plasmídios que possui um determinado valor de “linking number” (Lk).

Por serem plasmídios idênticos e diferirem apenas por sua estrutura terciária (Lk) são chamados isômeros topológicos ou topoisômeros.

Um conjunto de bandas no gel representa uma família de topoisômeros que diferem entre si por $\Delta Lk=1$ e a distribuição de concentrações destes topoisômeros é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$n=n_0 \exp (-\Delta G/RT) = n_0 \exp [-k(\Delta Lk)^2/RT] \text{ onde:}$$



n é a concentração da banda;

ΔG é a energia livre;

R é a constante dos gases;

T é a temperatura absoluta;

K é uma constante de proporcionalidade,

o que resulta numa distribuição gaussiana de intensidades (Keller, 1975).

O gel de agarose foi preparado na presença de diferentes concentrações de cloroquina que relaxa a molécula de DNA para níveis de compactação que tornam possível a resolução neste gel. (figura 12)

A concentração de cloroquina utilizada no gel 1 foi de 8 $\mu\text{g/ml}$ relaxam o plasmídeo reduzindo o grau de super hélice negativo, assim moléculas que possuem maior grau de torção são relaxadas, mas ainda apresentam maior mobilidade no gel de agarose. No gel 2 a concentração foi de 12 $\mu\text{g/ml}$, onde os topoisômeros em super hélice negativa relaxam ou invertem sua espiralização para super hélice positiva. A concentração de 16 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina no gel 3 causou a inversão para super hélice positiva, onde o topoisômero inicialmente mais negativo permanece mais próximo da forma relaxada e migra mais lentamente, assim, ao contrário do gel 1 o topoisômero com maior densidade de super hélice negativa tem menor mobilidade neste gel. Este comportamento das amostras no gel de agarose permite identificar que o plasmídeo encontra-se, inicialmente, em super-hélice negativa (Higgins et al, 1988).



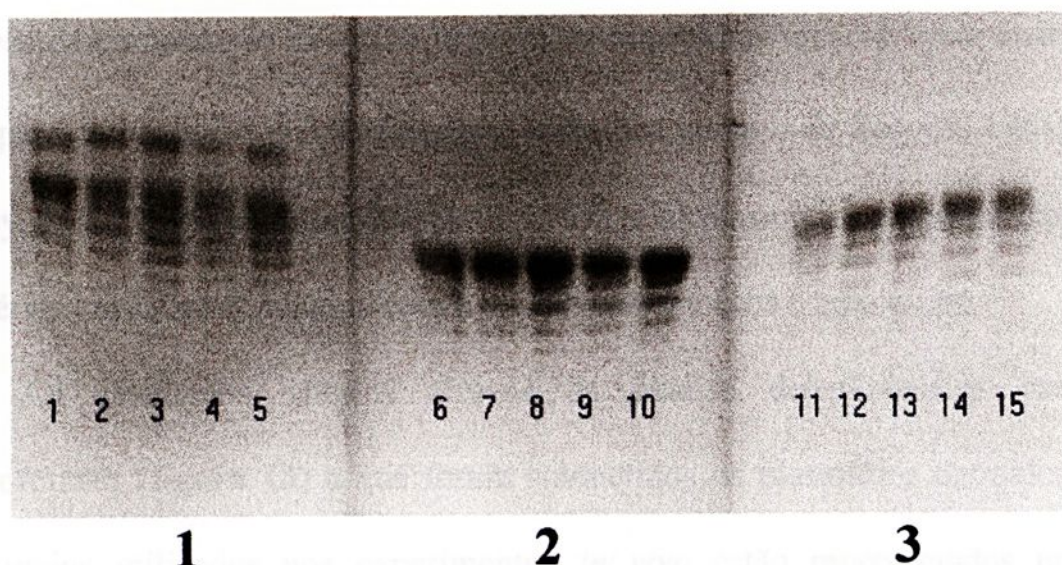


Figura 12 – Gel de agarose sendo as linhas 1, 6 e 11 correspondentes aos plasmídios extraídos do meio LB; 2, 7 e 12 ao meio LB-glicerol 0.16 M com 20 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina; 3, 8 e 13 ao meio LB-glicerol 0.16 M com 60 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina; 4, 9 e 14 ao meio LB-glicerol 0.16 M com 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina; e 5, 10 e 15 ao meio LB-glicerol 0.16 M com 140 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, a diferença de potencial elétrico foi de 1,2 V/cm, durante 40 horas a temperatura ambiente.

As diferenças na variação do linking number foram representadas como $\Delta(\Delta\text{Lk})$ o que resulta das diferenças de migração das amostras aplicadas ao gel de agarose.

A densitometria do gel fornece o perfil de distribuição das intensidade das bandas que é a distribuição gaussiana dos topoisômeros. O deslocamento do centro desta distribuição em relação a distribuição de referência permite estimar o ΔLk induzido.

A variação da densidade de super hélice ($\Delta\sigma$) pode ser determinada através da comparação do $\Delta(\Delta Lk)$ entre os plasmídios crescidos em meio LB, para os quais $\Delta\sigma = 0,06$ (segundo trabalhos como o de Scovell, 1984; Lilley, et al., 1996; Vologodskii, et al., 1992), e os plasmídios extraídos das bactérias crescidas nos meios com a adição de osmólitos e ampicilina.

Os resultados obtidos através da análise densitométrica das eletroforeses (figura 13) a que foram submetidos os plasmídios extraídos dos meios utilizados nos experimentos *in vivo* estão representados na tabela 3.

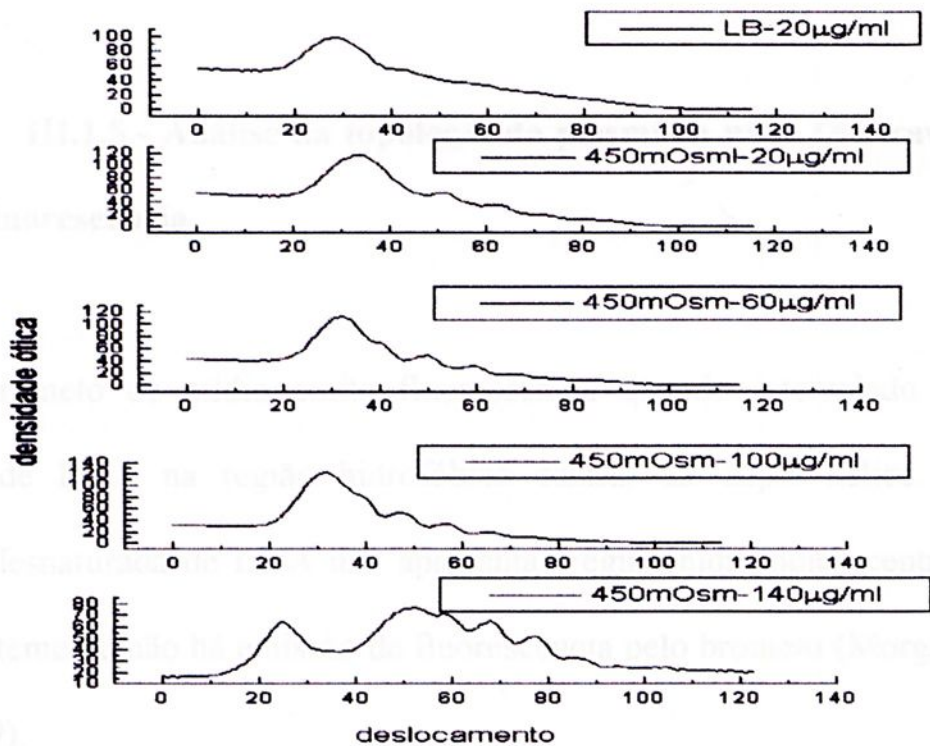


Figura 13 - análise densitométrica do gel de agarose apresentado na figura 12, onde observamos variação da densidade de super hélice em torno de $\Delta\sigma = -0,006$ ($\Delta(\Delta Lk) = -3$).

Tabela -3- Densidade de super hélice ($\Delta\sigma$) obtida dos plasmídios

extraídos dos meios de cultura utilizados nos experimentos *in vivo*.

Osmólitos	concentração(mOsm)	$\Delta\sigma$ 20 μ g/ml	$\Delta\sigma$ 140 μ g/ml
trealose	0 – 960	-0,066	—
trealose	550	-0,062	-0,068
trealose	680	-0,064	-0,069
NaCl	0 - 1440	-0,067	—
NaCl	840	-0,062	-0,068
NaCl	980	-0,064	-0,068
NaCl	1440	-0,067	-0,069
glicerol	450	-0,062	-0,066
glicerol	650	-0,064	-0,067
glicerol	900	-0,065	-0,068

III.1.5 - Análise da topologia do plasmídio pUC 18 através

de fluorescência

O brometo de etídio emite fluorescência quando intercalado na molécula de DNA na região hidrofóbica central da dupla hélice. A molécula desnaturada de DNA não apresenta região hidrofóbica central, consequentemente não há emissão de fluorescência pelo brometo (Morgam et al., 1979).

A intercalação do brometo de etídio relaxa a molécula anteriormente em super-hélice negativa podendo inverter a orientação topológica para super-hélice positiva. Nas moléculas com maior grau de super-hélice

negativa intercalam-se maior número de moléculas de brometo de etídio em relação à moléculas mais relaxadas ou super-hélice positiva, em consequência a fluorescência emitida é maior.

Fez-se então uma medida de fluorescência comparativa entre plasmídios extraídos de bactérias cultivadas sobre a influência dos osmólitos utilizados neste trabalho (trealose e glicerol).

Plasmídios com maior número de vínculos topológicos renaturam-se mais rapidamente após a elevação da temperatura à 96°C e resfriamento à 25°C. Em pH elevado (pH 12) a renaturação de moléculas lineares ou sem vínculos topológicos é dificultada. Assim, com a desnaturação e posterior resfriamento as moléculas sem vínculos topológicos não apresentam fluorescência e as moléculas com vínculos topológicos emitem fluorescência cuja intensidade é diretamente dependente do seu grau de super-hélice negativa.

Os resultados estão representados na **tabela 4**.



Tabela - 4 – Medidas fluorimétricas dos plasmídios após renaturação em tampão contendo brometo de etídio.

MEIO	INICIAL	APÓS RENATURAÇÃO
LB	31,6	11,6
LB-glicerol 650mOsm	34,6	19,7
LB-trealose 680mOsm	33,4	26,6

Os resultados indicam que o plasmídio extraído das bactérias crescidas em meio contendo trealose apresenta maior emissão de fluorescência, e, conseqüentemente, maior grau de super hélice negativa, que as moléculas obtidas apartir dos meios aos quais adicionou-se glicerol, para os mesmos valores de osmolalidade. Para o meio sem a adição de osmólito observamos que a emissão de fluorescência foi, ainda, menor que para o glicerol indicando que este também induz à super-hélice negativa.



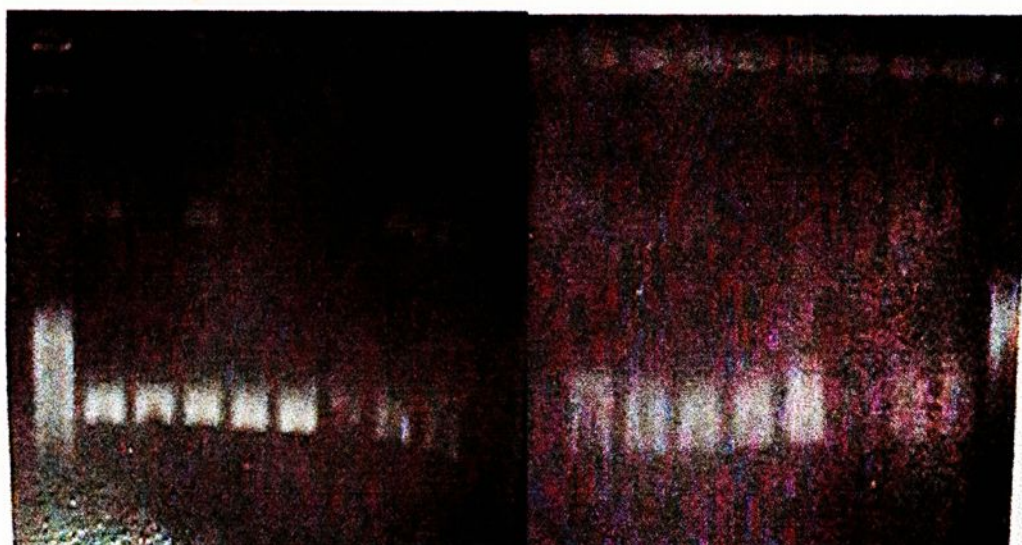
III.2 – Estudos *In Vitro*

Os experimentos *in vitro* permitiram a observação das alterações na topologia do plasmídio provocadas pelos osmólitos adicionados à solução de re-circularização da enzima T4 DNA ligase após a linearização com a enzima de restrição *Bam* *H*1.

O aumento da concentração de trealose entre 0 e 1080 mOsm, resultado demonstrado na **Figura 14**, resultou em aumento da densidade de super-hélice negativa,

Variando-se as concentrações de glicerol na solução de re-circularização, **figura 15**, notamos que apartir de 1130 mOsm não é observada alteração da topologia com concentrações ainda maiores deste osmólito.

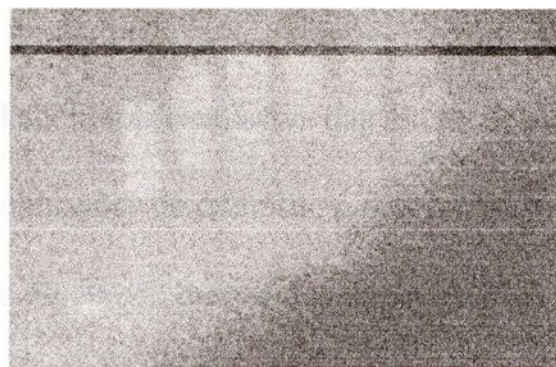




1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura 14 - Gel de agarose à 1,5% com adição de 8 $\mu\text{g/ml}$ e 16 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina, durante 30 horas, submetido à 1,3 volts/cm e mantido à temperatura de 4°C, onde as linhas:

- 1 - controle: plasmídeo sem ação das enzimas;**
- 2 - 0 mOsm reagindo juntamente com amostras com adição de cloreto de sódio;**
- 3 - 0 mOsm reagindo juntamente com amostras com adição de trealose;**
- 4 - 270 mOsm de trealose;**
- 5 - 540 mOsm de trealose;**
- 6 - 1080 mOsm de trealose;**
- 7 - 490 mOsm de cloreto de sódio;**
- 8 - 985 mOsm de cloreto de sódio;**
- 9 - 1970 mOsm de cloreto de sódio.**



1 2 3 4 5 6

Figura 15 - Gel de agarose à 1,5% com adição de 16 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina durante 30 horas, submetido à 1,3 volts/cm e mantido à temperatura de 4°C, onde foi adicionado glicerol nas concentrações de (1) 0 mOsm, (2) 567 mOsm, (3) 1134 mOsm, (4) 2268 mOsm, (5) 3402 mOsm e a linha 6 corresponde ao plasmídio extraído e não submetido à reação.

O ΔLk obtido pela adição dos vários osmólitos nos experimentos *in vitro* (Tabela 5) foi calculado em relação ao ΔLk do plasmídio re-circularizado sem a adição de osmólito a solução de re-circularização ($\Delta\text{Lk}=+2$).

Tabela 5 - Tabela representativa das alterações causadas pelas variações nas concentrações de osmólitos sobre o ΔLk obtido através da análise dos gráficos de densitometria dos experimentos *in vitro*

Osmólito e concentração (mOsm)	ΔLk	$\Delta\sigma$
1080 trealose	-4,0	-0,015
540 trealose	-3,0	-0,011
270 trealose	-2,0	-0,007
3402 glicerol	-4,5	-0,017
2268 glicerol	-4,5	-0,017
1134 glicerol	-4,0	-0,015
567 glicerol	-1,0	-0,003
0,0	+2,0	+0,007



IV - DISCUSSÃO

O efeito dos osmólitos sobre o crescimento bacteriano demonstrou-se distinto, observamos um maior crescimento bacteriano para o meio com adição de glicerol que para os meios com a adição de trealose e NaCl, sendo o NaCl o osmólito que causou maior inibição do crescimento em função da osmolaridade, como também na mesma osmolalidade com o aumento da concentração de ampicilina.

Alguns genes são estimulados pelo aumento da pressão osmótica do meio, outros são inibidos e, ainda, existem genes que não são sensíveis (Bates & Maxwell, 1994).

Aparentemente um aumento pequeno na osmolalidade resulta em ativação do gene *amp^R*, o que permite um crescimento bacteriano maior em meios com aumento da concentração de ampicilina, observado também por trabalhos de Prince & Villarejo, 1990, que investigavam transcrição *in vitro* do gene *amp^R* na presença de glutamato de potássio.

O glutamato de potássio é o primeiro osmo-protetor que tem sua concentração aumentada na célula bacteriana em situações de choque



osmótico, portanto mesmo utilizando outros osmólitos podemos relacionar nossos resultados com trabalhos que utilizam glutamato de potássio.

O glicerol e a trealose são osmo-protetores que possuem mecanismos de transporte do meio externo para o citoplasma de bactérias (Lucht e Bremer, 1994), como também em eucariotos como algas unicelulares, vegetais resistentes a alta concentração de sal e insetos expostos a temperaturas baixas. O NaCl não é um osmoprotetor e, como outros sais, seus íons podem alterar proteínas e reações bioquímicas intracelulares. (Yancey et al, 1982)

O NaCl inibiu o crescimento bacteriano, observado pelas curvas de crescimento e, também, a expressão do gene *amp^R*, através dos experimentos de medida da atividade β -lactamase.

A adição de trealose provocou ativação do gene *amp^R*, sendo que a atividade da enzima por célula foi maior em relação aos outros osmólitos utilizados. Isto pode ocorrer devido a maior estimulação do gene ou devido uma redução da velocidade de divisão celular. O meio contendo trealose apresentou a maior atividade da enzima após o crescimento e separação das células, o que foi mostrado pela maior produção de ácido penicilínico após a colocação de mais substrato (ampicilina).

O meio LB+ampicilina (60 μ g/ml), utilizado nos experimentos para avaliação do efeito direto dos osmólitos sobre a enzima, apresentou maior



atividade residual da enzima quando o osmólito adicionado foi a trealose. O que poderia indicar uma estimulação da trealose diretamente sob a atividade enzimática.

A maior atividade da enzima β -lactamase em números absolutos, ou seja, independente do número de células, foi observado para os meios contendo glicerol. As taxas de crescimento bacteriano variam diretamente com a atividade do gene *amp^R*, sendo a velocidade de crescimento das bactérias nitidamente maior nos meios com adição de glicerol, o que poderia indicar que o glicerol ativa a expressão gênica. Isto foi confirmado pela ausência de alterações significativas na atividade da enzima quando foi adicionado o glicerol ao meio LB+ampicilina após a separação das células. Assim o efeito observado deve ser resultado apenas da expressão do gene e não de um efeito direto do osmólito sobre a enzima.

A variação na densidade de super hélice ($\Delta\sigma$) dos plasmídios extraídos dos vários meios utilizados apresentaram pequena variação, decorrente da osmolaridade, nos experimentos em gel de agarose. No entanto, com a medida da fluorescência emitida pelo plasmídio em tampão contendo brometo de etídio observou-se um maior grau de super-hélice negativa dos plasmídios extraídos de bactérias crescidas no meio com a adição de trealose em relação ao glicerol, e de ambos em relação ao meio LB sem adição de osmólitos. Este



ultimo método mostrou-se mais sensível que o método com a utilização de eletroforese.

O efeito sobre a densidade de super hélice " σ ", decorrente do aumento da concentração de ampicilina e conseqüente estímulo a expressão do gene *amp^R* foi menor nos meios com a adição de NaCl.

Os resultados indicam que a adição de NaCl inibe a alteração topológica decorrente da transcrição e a trealose e, principalmente, o glicerol resultam num maior nível de torção devido a transcrição do gene *amp^R*.

Segundo os trabalhos de Liu & Wang, 1987 a expressão de um gene pode levar à alteração da densidade de super hélice por volta de 0,003 em plasmídios que não contenham genes que produzam proteínas com inserção na membrana celular, o que pode ser relacionado com os resultados deste trabalho, onde a indução da expressão do gene *amp^R* resultou no $\Delta\sigma$ entre 0,006 e 0,002 no entanto quando os valores foram 0,002 houve a maior inibição de expressão gênica que ocorreu para altas concentrações de NaCl.

Os experimentos para a análise da expressão do gene através da medida da atividade da enzima no meio demonstraram correlação entre atividade e sobrevivência da bactéria. As bactérias com maior nível de expressão do gene de resistência (obtido pela medida de atividade da enzima) apresentaram maior sobrevivência (observada pelas curvas de crescimento). Os plasmídios extraídos



dessas bactérias apresentavam maior alteração da topologia ($\Delta\sigma$), observado pela eletroforese e contagem de bandas dos plasmídios extraídos.

Nos experimentos *in vivo* e *in vitro* observamos aumento de super hélice negativa com a adição dos osmólitos, e com a indução da transcrição através do aumento da concentração de ampicilina, o que está de acordo com os experimentos de Anderson & Bauer, 1978; Prince & Villarejo, 1990; Higgins, et al., 1988; Herbst et al., 1994.



V - CONCLUSÃO

Os osmoprotetores adicionados aos meios de cultura permitiram maior velocidade e número final de bactérias que osmólitos não osmoprotetores.

O gene *amp^R* é estimulado em baixas osmolaridades, apresentando um limiar máximo de expressão a partir do qual é inibido.

Foi observada correlação entre crescimento bacteriano e expressão do gene *amp^R*.

A densidade de super hélice negativa aumenta em decorrência do aumento da osmolaridade do meio (observado em experimentos *in vivo* e *in vitro*) e da expressão do gene *amp^R*.

A maior variação da topologia do plasmídio decorrente do aumento da concentração de ampicilina do meio foi observada nos meios com maior atividade da enzima β -lactamase. O que é indicativo de alteração topológica devido a transcrição do gene.

A adição de ampicilina no meio após separação das células, as 10 horas de crescimento, demonstrou a existência de efeito residual da enzima β -lactamase.

O efeito residual foi aumentado com a adição de trealose indicando um possível efeito direto deste osmólito sobre a enzima.



O glicerol levou à maior atividade da enzima durante o crescimento, mas não apresentou efeito sobre a atividade residual da enzima após a centrifugação.

As medidas fluorimétricas demonstraram maior grau de super-hélice negativa para os plasmídios extraídos das bactérias cultivadas em meio com trealose em relação ao glicerol. O que indica um maior efeito topológico da trealose sobre o gene *amp^R*.

O efeito inibitório ou estimulante de determinados osmólitos sobre genes de resistência à antibióticos pode ser de grande utilidade no estudo da potencialização da terapêutica utilizada no tratamento de infecções em contato com fluídos orgânicos de alta osmolaridade.



VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, P.; BAUER, W. Supercoiling in Closed Circular DNA: Dependence upon Ion Type and Concentration. *Biochemistry*, v.17, p.594-600, 1978.
- BATES, A.D.; MAXWELL, A. *DNA Topology*. Oxford University Press, Oxford, UK, p. 1-103, 1994.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Inc, New Jersey, p. 321-360, 1994.
- CAYLEY, S.; LEWIS, B.A.; GUTTMAN, H.J.; RECORD, M.T. Characterization of the Cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a Function of External Osmolarity. *J. Mol. Biol.*, v.222, p.281-300, 1991.
- HERBST, B.; KNEIP, S.; BREMER, E. pOSEX: vectores for osmotically controlled and finely tuned gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*, v.151, p. 137-142, 1994.
- HIGGINS, F.C.; DORMAN, C.J.; STIRLING, D.A.; WADDEL, L., BOOTH, I.R.; MAY, G.; BREMER, E. A physiologic role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell*, v.52, p.569-584, 1988.



- LEWIN, B. *GENES VI*. Oxford University Press, OxfordUK, p. 285-426, 1997.
- LILLEY, D.M.J.; CHEN, D.; BOWATER, R.P. DNA supercoiling and transcription: topological coupling of promoters. *Quarterly Reviews of Biophysics, Cambridge University Press*, v. 29, n.3, p. 203-225, 1996.
- LIN, C.; LYU, Y.L.; LIU, L.F. A cruciform-dumbbell model for inverted dimer formation mediated by inverted repeats. *Nucleic Acids Research*. v. 25, n. 15, p. 3009-3016, 1997.
- LIU, L.F; WANG, J.C. Supercoiling of DNA template during transcription. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, v.84, p.7024-7027, 1987.
- LUCHT, J.M.; BREMER, E. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.14, p. 3-20, 1994.
- McCLELLAN, J.A.; BOUBLÍKOVÁ, P.; PALECEK, E.; LILLEY, D.M. Superhelical torsion in cellular DNA responds directly to environmental and genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 87, p.8373-8377, 1990.
- MORGAN, A.R.; LEE, J. S.; PULLYBLANK, D.E.; MURRAY N.L.; EVANS, D.H. Ethidium fluorescence assays Part I. *Nucleic Acids Research*, v. 7, n. 3, p. 547-569, 1979.



- MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.;
YALKEN, R.H. Manual of clinical microbiology, ed. 6^a. ASM Press,
Washington, D. C., p. 1327-1341, 1995.
- PRINCE, W.S.; VILLAREJO, M.R. Osmotic Control of *pro U*
Transcription Is Mediated through Direct Action of Potassium
Glutamate on the Transcription Complex. *J. Biol. Chem.*, v.265, n. 29, p.
17673-17679, 1990.
- PRUSS, G.J.; DRLICA, K. Topoisomerase I mutants: The gene on
pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA
supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.83, p.8952-8956, 1986.
- RAMIREZ, R.M.; VILLAREJO, M. Osmotic signal transduction to *proU*
is independent of DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*,
v. 173, n. 2, p. 879-885, 1991.
- SANBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a
Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press- N. York,
USA, 1989.
- SCOVELL, W. M. Supercoiled DNA. *Journal of Chemical Education*, v.
63, n.7, p. 562-565, 1984.
- VOLOGODSKII, A.V.; LEVENE, S.D.; KLENIN, K.V.; FRANK-
KAMENETSKII, M.; COZZARELLI, N.R. Conformational and
thermodynamic properties of supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.*, v.227, p.
1224-1243, 1992.



YANCEY, P.H.; CLARK M.E.; HAND S.C.; BOWLUS R.D.; SOMERO

G.N. Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems.

Science, v. 217, 1982.

WANG, J. C. Helical repeat of DNA in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.

76, n. 1, p. 200-203, 1979.

RECORD, M.T.; COURTENAY, E.S.; CAYLEY, D.S.; GUTTMAN, H.J.

Responses of *E. Coli* to osmotic stress: large changes in amounts of
cytoplasmatic solutos on water. *TIBS*, v. 23, p. 190-194, 1998.



