

Uderlei Doniseti Silveira Covissi

**Efeito do Estresse Osmótico na Topologia
do DNA e no Reconhecimento Molecular
pela Enzima BamHI**

1910000950



UDERLEI DONISETI SILVEIRA COVISSI

**EFEITO DO ESTRESSE OSMÓTICO NA
TOPOLOGIA DO DNA E NO
RECONHECIMENTO MOLECULAR PELA
ENZIMA *Bam*HI**



UDERLEI DONISETI SILVEIRA COVISSI

**EFEITO DO ESTRESSE OSMÓTICO NA TOPOLOGIA
DO DNA E NO RECONHECIMENTO MOLECULAR
PELA ENZIMA *Bam*HI**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio
Preto, para obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas: Área de concentração em Genética.

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto.

São José do Rio Preto

2000



950/00



AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. João Ringente Neto, pela oportunidade e pela orientação.

Ao Prof. Gustavo Cavali, pelo valioso auxílio na elaboração
da dissertação.

Aos amigos Alexandre Bastos, Paulo Roberto Salazar e Dora Cássia
Bastardo pelas produções artísticas realizadas.

Aos amigos Alexandre Pinheiro, Cássia, Adriana Rodrigues, Alvaro,

Thiago, Pedro de Souza, pela companhia e por me fazerem lembrar

Ao prof. Dr. Marcelo André, por me fazer lembrar de muitas
coisas.

Ao prof. Dra. Claudia Maria, Cássia, pelo apoio e pela amizade.

Aos meus pais.

Aos meus filhos Ian e Júlia e a minha esposa Sandra.

Por fim, ao Deus onipotente, por me fazer lembrar de tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr João Ruggiero Neto pela oportunidade e pela orientação.

Ao Luiz Gustavo Covizzi pelo valioso auxílio na digitação e montagem.

Ao Antônio Aparecido Barbosa, Paulo Roberto Salinas e Ilva Cecílio Bernardes pelos prestativos auxílios acadêmicos.

Aos colegas Alexandre Rodrigues Guerzoni, Adriana Rodrigues Alves e Fátima Pereira de Souza pelo companheirismo da rotina laboratorial.

Ao prof. Dr Marcelo Andrês Fossey pela amizade no transcorrer desses anos

A prof. Dra Claudia Márcia Carareto pelo empenho para a conclusão deste trabalho.

A Fundação Educacional de Fernandópolis pelo apoio recebido.



Ao Centro Universitário de São José do Rio Preto – UNIRP pelo apoio durante a realização desta.

Aos professores e amigos dos Departamentos de Física e de Biologia do IBILCE-UNESP pela amizade durante esse tempo de convívio.

Aos funcionários da Biblioteca do IBILCE-UNESP pela presteza ao longo do desenvolvimento deste estudo.

A minha família e meus amigos pela paciência e compreensão durante as etapas mais difíceis.

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	8
1.1 - Níveis de estruturas primária e secundária do DNA.....	9
1.1.1 - Estrutura primária.....	9
1.1.2 - Estrutura secundária.....	10
1.1.3 - Formas de dupla hélice.....	16
1.2 - Estrutura terciária do DNA.....	19
1.2.1 – Super-hélice.....	19
1.2.2 – Quantificação de super-hélice.....	24
1.2.3 - Enzimas que controlam a super-hélice.....	29
1.2.4 - Formas alternativas do DNA.....	31
1.2.5 - Efeito do ambiente na topologia do DNA.....	32
1.2.5.1 - Temperatura:.....	32
1.2.5.2 - Solventes orgânicos neutros:.....	33
1.2.5.3 - Força Iônica.....	34
1.2.6 - Conseqüências biológicas da super-hélice.....	34
1.3 - Interações específicas entre proteínas e DNA.....	41
1.4 - Interações específicas entre enzimas de restrição e o DNA.....	43
1.5 – Objetivos.....	45

2 – MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 – Purificação do DNA plasmidial.....	46
2.2 – Ensaio <i>in vivo</i>	48
2.3 – Ensaio <i>in vitro</i>	50
2.4 - Digestão do DNA com <i>Bam</i> HI sob estresse osmótico.....	52
3 – RESULTADOS	55
3.1 - Ensaio <i>in vivo</i> para topologia do DNA	55
3.2 – Ensaio de corte e religação do pUC18 realizados <i>in vitro</i>	64
3.3 – Interações específicas entre a enzima <i>Bam</i> HI e DNA.....	71
3.3.1 – Especificidade de reação da <i>Bam</i> HI pelo sítio canônico.....	75
3.3.2 – Especificidade de reação da <i>Bam</i> HI por dois sítios estrela	78
3.3.3 – Atividade estrela da <i>Bam</i> HI sob diferentes temperaturas.....	85
4 - DISCUSSÃO	88
4.1 – Produção de super-hélice <i>in vivo</i>	88
4.2 – Produção de super-hélice <i>in vitro</i>	91
4.3 – Interação entre <i>Bam</i> HI e o pUC18.....	94
5 – CONCLUSÃO	103
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
7 – RESUMO.....	122
8 – Abstract	124

1 – INTRODUÇÃO

O modelo de dupla fita helicoidal proposto por Watson e Crick (1953) revolucionou as Ciências Biológicas, possibilitando o surgimento da Biologia Molecular moderna. A partir desta descoberta, os cientistas contemporâneos puderam conhecer melhor a hereditariedade diretamente na sua fonte, ou seja, na molécula de ácido desoxirribonucléico, DNA. Novas técnicas foram então criadas para desvendar informações, tais como hibridizações de regiões homólogas, sequenciamento e ampliações de seqüências específicas. Com o passar de quase cinco décadas após a publicação do trabalho de Watson e Crick (1953), muitos grupos de pesquisadores ainda estudam a estrutura desta molécula informativa e este tema parece nunca deixar de ser atual. Para entendermos a função do DNA é conveniente conhecermos as suas particularidades estruturais e só então elaborar um modelo para explicar o funcionamento de um determinado gene.



1.1 – Níveis de estruturas primária e secundária do DNA

Apesar de parecer uma molécula extremamente simples na sua composição (quatro nucleotídeos diferentes), o DNA apresenta uma considerável complexidade estrutural. Assim como as proteínas, a estrutura do DNA pode ser dividida didaticamente em níveis de arranjos diferentes para a sua melhor compreensão. Podemos destacar as estruturas primária, secundária e terciária.

1.1.1 – Estrutura primária

A composição química, bem como a disposição de seus constituintes, recebe um enfoque especial quando tratamos a molécula neste nível. O DNA é originado da polimerização de várias unidades formadas por três elementos: uma pentose cíclica com a deficiência de uma hidroxila do carbono 2' (2'-desoxirribose), um fosfato ligado ao carbono 5' da pentose e uma base nitrogenada ligada ao carbono 1' da pentose, através de uma ligação glicosídica. Esta última ligação provoca a formação de dois tipos de orientações diferentes na



molécula: a forma anti, onde a base nitrogenada está posicionada no sentido oposto ao da pentose-fosfato e a forma syn onde a ligação glicosídica sofre uma rotação de 180^0 (Sundaralingan, in Komberg, 1992).

A base nitrogenada pode ser uma purina, formada por dois anéis heterocíclicos (adenina e guanina) ou uma pirimidina, formada por um único anel (citosina e timidina). O conjunto total é chamado de nucleotídeo e a polimerização destes é feita por ligações covalentes (ligações fosfodiéster) entre o fosfato do carbono 5' e uma hidroxila do carbono 3' da pentose (Garrett e Grisham, 1995).

1.1.2 – Estrutura secundária

A estrutura secundária refere-se à dupla fita helicoidal, onde duas cadeias polinucleotídicas complementares interagem entre si por ligações fracas do tipo pontes de hidrogênio. Este compartilhamento do átomo de hidrogênio ocorre entre os grupos amina e cetona de uma purina e uma pirimidina, sendo sempre três pontes entre G e C e duas pontes entre A e T. As fitas estão dispostas



de maneira antiparalelas, uma no sentido $5' \rightarrow 3'$ e a outra no sentido $3' \rightarrow 5'$.

Além das pontes de hidrogênio, outras interações fracas são importantes para a manutenção da estrutura de dupla-hélice do DNA. A estrutura em hélice é estabelecida principalmente por interações fracas como, por exemplo, forças de empilhamento entre as bases nitrogenadas, mantidas por forças de van der Waals que ocorrem entre as regiões apolares. Estas interações são até mais importantes do que as pontes de hidrogênio para a estabilização da estrutura secundária do DNA. Devido a não polaridade das bases nitrogenadas, elas são posicionadas no interior da dupla fita e a região composta pelo açúcar (polar) e pelo fosfato (carregado) são direcionados para o exterior. A repulsão eletrostática das cargas negativas dos fosfatos são responsáveis pela definição do diâmetro da dupla hélice (Calladine e Drew, 1997).

A disposição das duas pentoses, onde as bases nitrogenadas complementares estão atracadas não é de total oposição, formando um ângulo diferente de 180° . A região onde o ângulo formado entre os dois açúcares é maior que 180° recebe o nome de



sulco maior, e conseqüentemente a outra é chamada de sulco menor (Calladine e Drew, 1997).

A figura 1 mostra de forma bastante simplificada os componentes do DNA, açúcar, fosfato e base nitrogenada e as estruturas primária e secundária da molécula.

Com exceção de algumas regiões dos anéis que compõem as bases nitrogenadas, o DNA apresenta um alto grau de hidratação. Esta característica é fornecida pela carga do fosfato e pela grande polaridade dada pelas hidroxilas da pentose. A solvatação do DNA influencia diretamente a forma da molécula, podendo alterar a conformação da dupla hélice de acordo com o grau de hidratação.



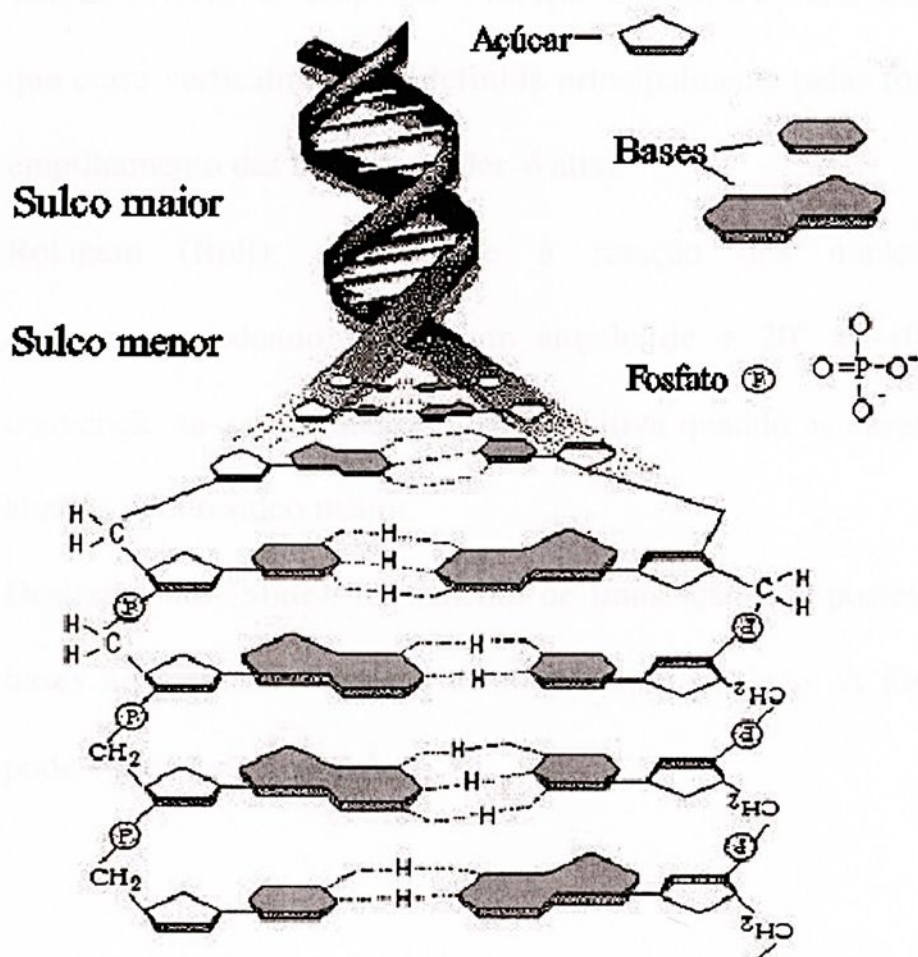


FIGURA 1: Componentes e estrutura do DNA. Os níveis de estrutura primária (parte baixa) com seus componentes descritos ao lado e estrutura secundária (parte alta) com as cavidades maior e menor formadas no DNA. Figura disponível em:

http://members.tripod.com/geneticweb/dna_molecule.html

Os nucleotídeos podem apresentar ainda três tipos de movimentos com relação ao par de base adjacente (figura 2):

- Torção (Twist): corresponde à rotação em torno do eixo da hélice que corre verticalmente. É definida principalmente pelas forças de empilhamento das bases (van der Waals).
- Rolagem (Roll): corresponde à rotação dos nucleotídeos adjacentes, podendo formar um ângulo de $+ 20^\circ$ a -10° . Por convenção, dá-se o nome de forma positiva quando as bases estão abertas para o sulco menor.
- Deslizamento (Slide): movimento de translação que posiciona as bases adjacentes levemente deslocadas para o lado. A distância pode variar de $+ 3$ a $-2 \text{ \AA}$.



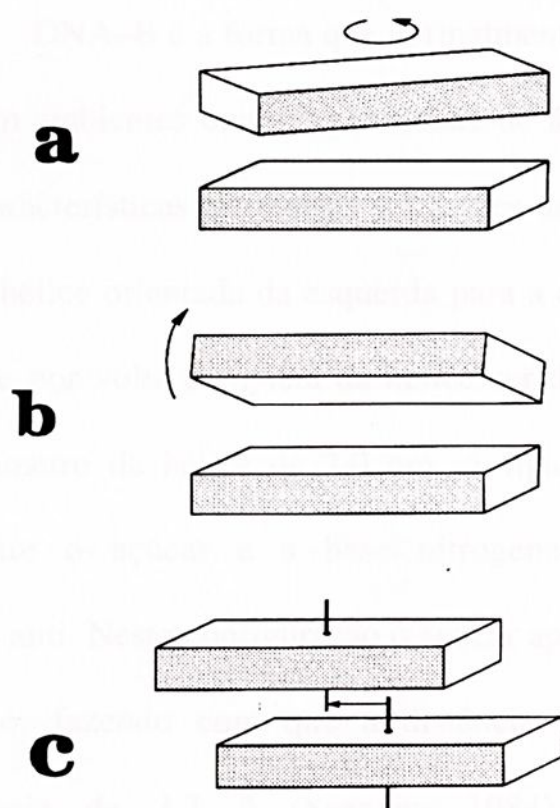


FIGURA 2: Tipos de movimentos que acontecem com os nucleotídeos. a) indica a movimentação de torção (twist); b) mostra o movimento de rolagem (roll) e c) o deslocamento lateral (slide). As setas indicam o sentido do movimento (Calladine e Drew, 1997).

1.1.3 – Formas da dupla hélice

DNA-B é a forma que normalmente existe nas células, e ocorrem em ambientes onde a quantidade de água é muito grande (92%). As características estruturais marcantes desta forma são as de apresentar a hélice orientada da esquerda para a direita, o número de pares de base por volta completa da hélice ser de aproximadamente 10,5 e o diâmetro da hélice de 2,0 nm. A ligação glicosídica que acontece entre o açúcar e a base nitrogenada encontra-se na configuração anti. Nesta configuração o açúcar apresenta-se na forma C2' – endo, fazendo com que a distância entre dois fosfatos adjacentes seja de 3,7 Å (Saenger, 1984). Devido a estas particularidades, o sulco maior do DNA apresenta-se largo e profundo e o sulco menor apresenta-se estreito e profundo.

A forma de DNA-A é observada quando o DNA é submetido a desidratação (75% de água). Normalmente este tipo de conformação é observado *in vitro*, entretanto algumas regiões do DNA como região promotora ou sítios de ligação para fatores de transcrição poderiam estar envolvidas com este tipo de estrutura (Bates e Maxell, 1993). A baixa umidade leva a algumas alterações na estrutura



secundária do DNA, sendo que o açúcar aparece na forma C3' – endo e a ligação glicosídica aparece na forma anti. A relação de pares de base por volta aumenta para aproximadamente 11, o diâmetro da dupla hélice passa a ser maior (2,3 nm) e, como consequência, o sulco maior apresenta-se estreito e fundo, e o sulco menor aparece mais largo e raso (Bates e Maxell, 1993 e Saenger, 1984).

A outra forma é o DNA-Z. Ao contrário das formas anteriores, o sentido do giro da dupla hélice nesta forma de DNA é da direita para a esquerda. Esta conformação pode ser encontrada em moléculas que apresentam uma sequência de purina-pirimidina alternadas, especialmente guanina-citosina, em altas concentrações de sal. A configuração do açúcar é C2' – endo para os nucleotídeos dA, dT, dC e C3' – endo para a dG. Como consequência, a ligação glicosídica aparece na forma anti para os três primeiros e syn para a guanina (Sinden, 1994). Este tipo de estrutura caracteriza-se por apresentar 12 pares de bases por volta; o diâmetro da hélice é de 1,8 nm e o sulco maior é plano e o sulco menor estreito e fundo. A inserção em plasmídeos de pequenos fragmentos com sequência purina-pirimidina pode induzir a transição B→Z quando o plasmídeo



forma super-hélice negativa (Bates e Maxwell, 1993 e Felsenfeld, 1985).

Tabela 1: Principais características encontradas nas três formas mais importantes de DNA. (Sinden, 1994, Bates e Maxwell, 1993 e Saenger, 1984).

Características	DNA-B	DNA-A	DNA-Z
Sentido da hélice	Direita	Direita	Esquerda
Resíduos por volta	10,5	11	12
Ângulo de torção (Twist)	34,5°	33°	- 30°
Diâmetro da hélice (angstrom)	20	23	18
Configuração da ligação glicosídica	Anti	Anti	Anti (A, T e C) Syn (G)
Forma do açúcar	C2' – endo	C3' – endo	C3' – endo (A, T e C) C2' – endo (G)
Sulco maior	Largo e fundo	Estreito e fundo	Plano
Sulco menor	Estreito e fundo	Largo e raso	Estreito e fundo

1.2 – Estrutura terciária do DNA

1.2.1 – Super-hélice

A estrutura terciária do DNA consiste em um outro enrolamento sofrido pela dupla hélice. Utilizamos o termo super-hélice para referir-nos a este tipo de estrutura.

A matemática tem auxiliado bastante os biólogos moleculares a entenderem este tipo de estrutura, criando assim uma área denominada topologia do DNA. No caso, moléculas que apresentam o mesmo tamanho e diferentes conformações terciárias são chamados de isômeros topológicos ou topoisômeros.

O DNA circular, encontrado em vírus, bactérias e fungos, é um excelente objeto para o estudo da topologia do DNA, devido ao seu tamanho, que facilita a extração e purificação e a existência de um número grande de enzimas capazes de alterar a sua estrutura. Além disso, essas formas topológicas são facilmente quantificáveis através de experimentos simples de eletroforese em gel de agarose (Keller, 1975; Shure e Vinograd, 1976; Bates e Maxwell, 1993).



No início dos anos 60, através da ultracentrifugação e micrografia eletrônica, foram descobertos dois tipos de DNAs de vírus do políoma: o componente I que apresentava um alto coeficiente de sedimentação e era resistente a desnaturação (chamado posteriormente de super-helicoidal) e o componente II com um coeficiente de sedimentação menor, conhecido hoje como circular relaxado (figura 3). A forma I pode ser convertida na II pelo rompimento de uma das fitas pela enzima Dnase I. A taxa de mobilidade eletroforética apresentada pela forma I é cerca de 20% mais rápida que a mobilidade da forma II (Adams, 1992).

A forma I pode também apresentar duas variantes:

Super-hélice negativa: O tensionamento adicionado ao DNA, ocorre no sentido contrário a torção do B-DNA. Por esse motivo, é também chamado de subenrolamento.

Super-hélice positiva: A torção ocorre no mesmo sentido da dupla hélice e por esse motivo é muitas vezes chamada de forma superenrolada, tornando a dupla-hélice ainda mais compacta.



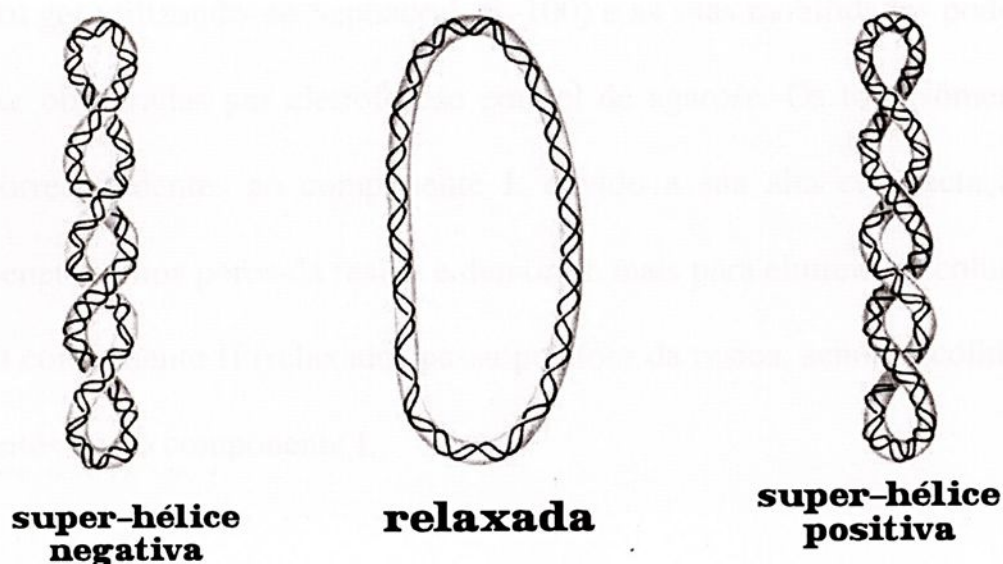


FIGURA 3: DNA circular encontrado em bactérias. Por apresentarem a mesma composição química essas moléculas são chamadas de topoisômeros. A forma relaxada aparece no centro da figura e as formas de super-hélices são representadas nas laterais.

As duas configurações apresentadas pelos plasmídeos (relaxada e superelícoidal) podem ser separadas através de filtração em gel utilizando-se Sephacryl (S-100) e as suas mobilidades podem ser observadas por eletroforese em gel de agarose. Os topoisômeros correspondentes ao componente I, devido a sua alta compactação, penetram nos poros da resina e demoram mais para eluírem da coluna. O componente II (relaxado) passa por fora da resina, sendo recolhido antes que o componente I.

Um exemplo desse tipo de procedimento para a separação das formas relaxadas e superelícoidais é mostrado na figura 4.



1.2.2 - Quantificação de super-hélice

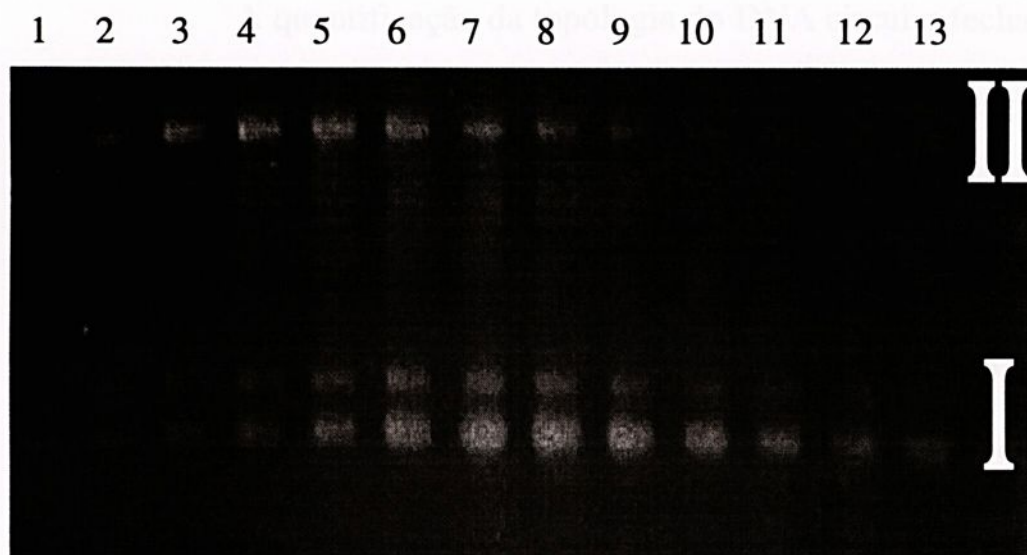


FIGURA 4: Separação das formas do plasmídeo pUC18 purificadas por filtração em gel pela resina Sephacryl S-100. As frações eluídas da coluna foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e posteriormente corados com brometo de etídio (colunas 1-13). A configuração em super-hélice apresenta uma maior migração.

1.2.2 – Quantificação de super-hélice

A quantificação da topologia do DNA circular fechado é feita pelo número de ligações da dupla fita (Lk), ou seja, pela quantidade de voltas que a dupla hélice dá em torno de si mesmo e denominada “linking number”. Este número quantifica uma propriedade topológica de uma fita fechada que representa o número de vínculos topológicos que impede a separação longitudinal das duas fitas de DNA. Se a molécula de DNA circular estiver tensionada, ou seja, se sua energia elástica for diferente daquela do plasmídeo relaxado e seu número de voltas for Lk , podemos dizer que ela está subtencionada ou sobretencionada por ΔLk , onde:

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0$$

sendo ΔLk a variação do número de voltas encontradas entre a forma relaxada e a forma superhelicoidal, Lk o número de voltas apresentadas pelo plasmídeo tensionado e Lk_0 o número de voltas apresentadas pelo plasmídeo relaxado.



Podemos usar como exemplo o plasmídeo pUC18 de *Escherichia coli*, que é constituído por 2686 pb. O número de voltas completas deste plasmídeo no estado relaxado (Lk_0) é dado pela razão entre o número de pares de base totais (N) e o número de pares de base por volta da dupla fita (h). Então teremos:

$$Lk_0 = \frac{N}{h}$$

E neste exemplo temos, portanto:

$$Lk_0 = \frac{2686}{10,5} = 256$$

Se Lk for menor que o Lk_0 , por exemplo 250, então teremos:

$$\Delta Lk = 250 - 256 = -6$$

Isto significa que o DNA está subenrolado ou tem um déficit de 6 voltas e forma super-hélice negativa.

Entretanto, o parâmetro ΔLk não é suficiente para expressar o quanto uma molécula de DNA está tencionada, pois isto depende muito do comprimento da molécula. Existe uma diferença

muito grande em se remover 6 voltas de uma molécula que tem 256 e outra que apresenta apenas 56, por exemplo. A maneira mais correta de se expressar este estado de tensão é através da densidade de super-hélice, definida como:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}$$

No exemplo acima, $\sigma = -6/256 = -0,022$.

Em plasmídeos extraídos de *Escherichia coli* a densidade de super-hélice normalmente encontrada é $\sigma = -0,06$.

O número de ligações (Lk), uma invariante topológica, é descrita em termos de duas propriedades geométricas: torção ("Twist" Tw) e da contorção do eixo ("Writhe" Wr) (Fuller, 1971)

$$Lk = Tw + Wr$$

$$\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$$

Onde Tw representa o enrolamento individual de uma fita de DNA em torno da outra e Wr é o enrolamento espacial do eixo da hélice (Bates e Maxwell, 1993; Scovell, 1986).

A densidade de super-hélice encontrada “in vivo” produz um ΔLk relativamente grande, sendo de difícil resolução em gel de agarose. Para ser separado em gel, devemos lançar mão de alguns artifícios. Uma metodologia bastante utilizada é a interação de algumas drogas intercalantes, como o brometo de etídio (figura 5), cloroquina ou actinomicina D ao DNA (Snyder et al, 1989; Bailey et al, 1993; Wu e Schurr, 1989). A intercalação do brometo de etídeo ao DNA provoca um relaxamento na super-hélice positiva, levando a produção de super-hélice negativa (DNA subenrolado).

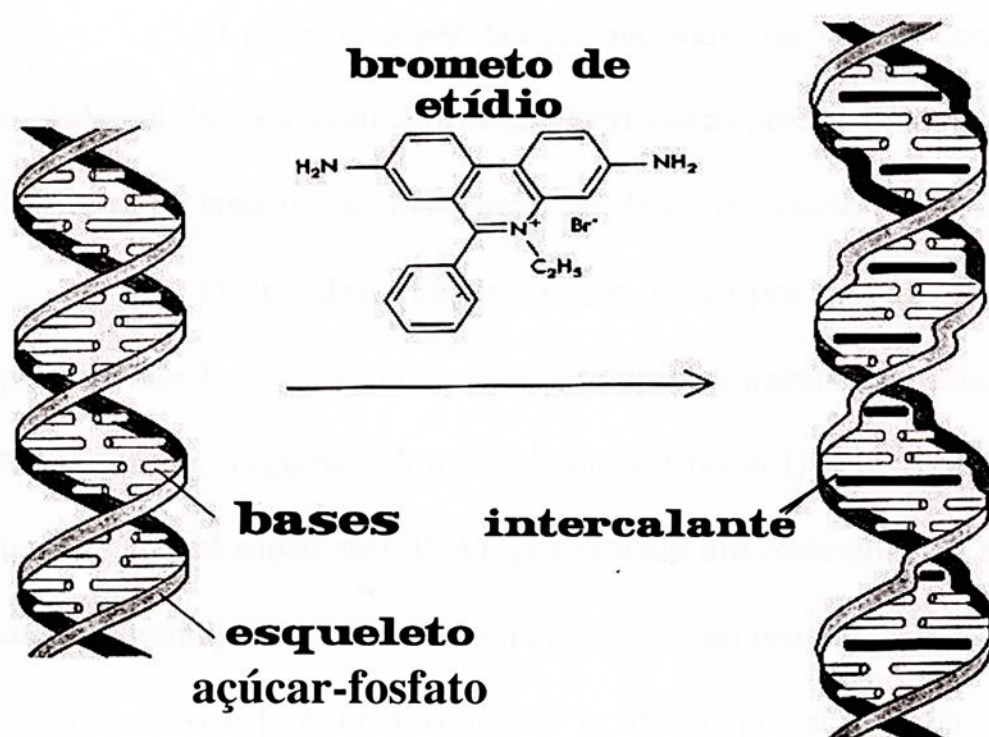


FIGURA 5 : Deformações ocorridas na dupla-hélice provocadas pela intercalação do brometo de etídio. Ao intercalar ao DNA, o brometo de etídio provoca o aumento de 26° no sentido negativo.

1.2.3 – Enzimas que controlam a super-hélice .

O grau de super-hélice, que varia de acordo com a atividade celular, e a manutenção de determinado nível topológico, é feita por uma classe de enzimas chamadas de DNA topoisomerases.

Dentro desta classe existem dois tipos de enzimas, a topoisomerase I e a topoisomerase II, esta última também chamada de DNA girase em bactérias. A topoisomerase I (topo I) apresenta alta afinidade ao seu substrato (DNA), provocando um corte em uma das fitas. A extremidade 5' do DNA livre liga-se a um resíduo de tirosina da topoisomerase I. A enzima passa a fita íntegra através da fita cortada e refaz a ligação fosfodiéster, desligando-se do DNA (Wang, 1982).

A DNA topoisomerase I de bactérias relaxa preferencialmente super-hélice negativa, mas também apresenta afinidade por super-hélice positiva (Wang, 1987). Devido a sua capacidade de cortar apenas uma das fitas, a topo I relaxa o número de ligações em uma unidade. A atividade desta enzima não necessita de ATP ou Mg^{+2} , embora Mg^{+2} , Ca^{+2} e Mn^{+2} potencializem a sua atividade (Wang, 1985).



A enzima DNA topoisomerase II ou DNA girase apresenta a capacidade de introduzir super-hélice negativa ao DNA. Esta enzima liga-se ao DNA de forma não covalente, sem necessidade de cofator, causando o rompimento das ligações fosfodiéster em ambas as fitas. No entanto, para ocorrer a passagem das fitas intactas através das rompidas a enzima necessita de cátions divalentes e ATP. A topoisomerase II refaz as ligações fosfodiéster e permanece ligada ao DNA. Somente após a hidrólise do ATP é que a enzima é liberada. O número de voltas introduzidas após a reação enzimática é de duas. A enzima pode produzir super-hélice negativa, relaxar super-hélice positiva ou decatenar moléculas circulares de DNA. No caso da reação ocorrer na ausência de ATP, a DNA girase pode relaxar super-hélice positiva (Menzel, e Gellert, 1994).



1.2.4 – Formas alternativas do DNA

O H-DNA: Normalmente este tipo de estrutura envolve seqüências ricas em TC repetidas algumas vezes que desnatura-se, associando ao sulco maior em uma região adjacente. Esta configuração do DNA acontece em resposta a super-hélice negativa ou pH ácido (por exemplo pH 5), onde ocorre a protonação dos resíduos de citosina. Essa necessidade de íons H^+ para formação dessa estrutura é que dá o nome de H-DNA a esta conformação (Bates e Maxell, 1993). Algumas dessas regiões com a forma H-DNA foram encontradas *in vivo* e estão associadas a seqüências reguladoras da expressão de alguns genes (Kornberg e Baker, 1992).

Estrutura cruciforme corresponde a seqüências repetidas e invertidas que aparecem em determinados trechos do DNA (seqüências palindrômicas). Estas sofrem desnaturação para aliviar a tensão exercida pela super hélice negativa e formam dois grampos laterais na dupla hélice.



1.2.5 – Efeito do ambiente na topologia do DNA

A molécula de DNA normalmente é muito longa e por este motivo está diretamente exposta a mudanças no ambiente. Como já visto, a manutenção da estrutura do DNA é feita principalmente por interações fracas e estas sofrem influência direta do meio. Fatores ambientais, tais como temperatura (Depew e Wang, 1975) ou osmolaridade (Lee, Mizusawa e Kakefuda, 1981) podem afetar o nível de super-hélice.

1.2.5.1 – Temperatura:

Em um experimento clássico de recircularização de plasmídeos, Depew e Wang (1975) observaram que ocorre uma flutuação relativamente grande no número de voltas (Δ LK) de plasmídeos em função da temperatura. Nestes experimentos, plasmídeos foram relaxados pelo rompimento de uma das fitas pela enzima Dnase I e recircularizados em diferentes temperaturas pela enzima DNA ligase. Quando o ensaio foi feito em temperaturas



menores (ex. 14°C), o número de super-hélices produzidas foi maior que em temperaturas maiores.

Em ensaios *in vivo*, Goldstein e Drlica (1984) observaram também que plasmídeos extraídos de bactérias crescidas a 17°C apresentaram número de voltas (Lk) duas vezes maior que quando a cultura foi crescida a 37°C . Em ambos os casos foram encontradas super-hélices negativas.

1.2.5.2 – Solventes orgânicos neutros:

A molécula de DNA encontra-se altamente hidratada e esta camada de solvatação participa diretamente na manutenção da configuração da dupla hélice e em eventos de reconhecimentos moleculares envolvendo proteínas e DNA. O aumento da osmolaridade induz a liberação de moléculas de água que solvatam o DNA (atividade de água). Esta desidratação leva a uma perturbação estrutural resultando no subenrolamento do DNA (Lee, Mizusawa, e Kakefuda, 1981). Estes solventes neutros não apresentam a



capacidade de ligarem-se ou de interferirem de qualquer maneira com a molécula de DNA a não ser pelo efeito de água.

1.2.5.3 – Força Iônica

O grupo fosfato, componente do DNA, apresenta carga negativa. A existência dessas cargas iguais e localizadas nos nucleotídeos adjacentes ou em fitas opostas na mesma molécula, causa uma repulsão eletrostática que pode desestabilizar a dupla hélice. Normalmente esta estabilização é feita por cátions, como por exemplo o Na^+ , que neutraliza essas cargas negativas. O alívio na repulsão diminui o diâmetro e conseqüentemente causa um superenrolamento na molécula de DNA (Bednar et al, 1994 e Anderson e Bauer, 1978).

1.2.6 – Conseqüências biológicas da super-hélice

Ao longo da evolução das espécies foram selecionadas características biológicas que permitiram a capacidade de adaptação



do organismo às condições ambientais. O que encontramos hoje é um conjunto de fatores que determinam alguma vantagem adaptativa a este organismo, para responder de maneira eficiente às condições adversas ou a alterações bruscas do meio em que vivem. Mudanças ambientais, tais como estresse osmótico, temperatura e pH interferem diretamente na estrutura e função das macromoléculas celulares. Alterações, mesmo que pequenas desses componentes, podem comprometer o funcionamento celular (Yancey et al, 1982). Certamente a necessidade da célula não é produzir o máximo com um custo mínimo, como o que ocorre em uma fábrica. Gargalos, indesejáveis numa linha de produção industrial, são primordiais para o controle das funções celulares.

O processo de formação de super-hélice está associado ao aumento da energia livre, sendo liberada espontaneamente pela quebra de pelo menos uma das fitas do DNA. Também a separação das duas fitas é favorecida pela super-hélice negativa. Esta energia pode afetar a estrutura e a dinâmica da dupla hélice, influenciando diretamente os processos de duplicação e transcrição do DNA. Desta maneira, a super-hélice negativa pode ser considerada como sendo a



forma ativadora do DNA (Goldstein e Drlica, 1984; Borowiec e Gralla, 1985; Drlica, 1984).

Certos promotores são ativados por altos níveis de super-hélice negativa, outros por baixos níveis de super-hélice negativa e outros não são afetados por super-hélice (Lilley et al, 1996). Normalmente os níveis celulares da DNA topoisomerase I e da DNA girase são controlados para regular o nível de super-hélice da célula. Em bactérias, o relaxamento do DNA estimula a transcrição dos genes *gyrA* e *gyrB*, codificadores das subunidades polipeptídicas formadoras da enzima girase (Menzel e Gellert, 1983). Já altos níveis de super-hélice negativa aumentam a expressão do gene *topA*, que codifica para a enzima DNA topoisomerase I (Wang, 1996; Tse-Dinh, 1985).

Durante o processo de transcrição ocorre a produção de super-hélice pelo complexo enzimático da RNA polimerase, sendo que super-hélice positiva é produzida à frente da região de transcrição e super-hélice negativa é gerada por onde passou a RNA polimerase (figura 6). O nível de super-hélice após o processo de transcrição é controlado pelas topoisomerases (Rahmouni e Wells, 1992).



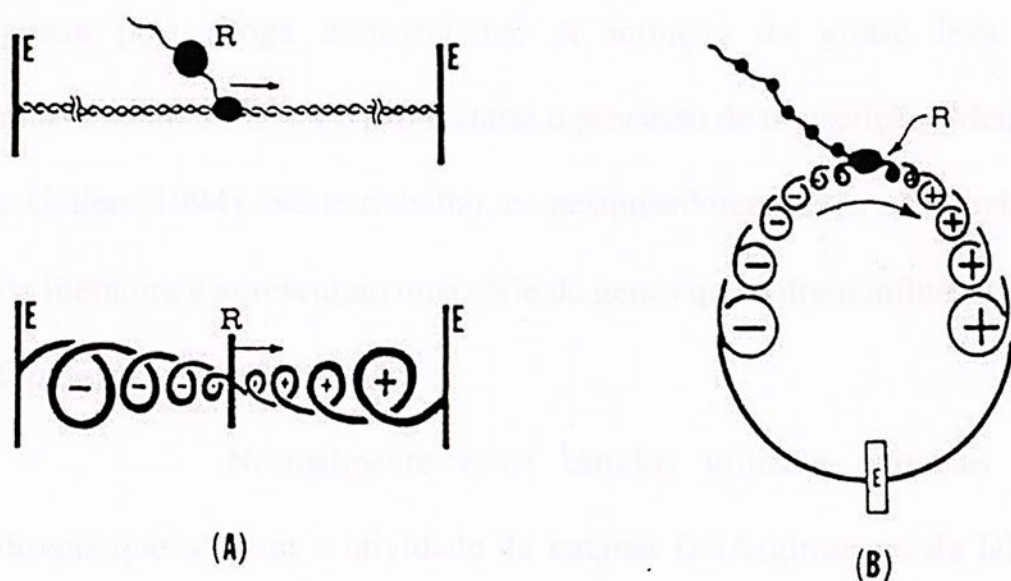


FIGURA 6: Produção de super-hélice pelo processo de transcrição. Super-hélice positiva é produzida à frente e negativa atrás do complexo RNA polimerase (R). A figura (A) indica uma molécula linear de DNA ancorada a alguma estrutura cromossômica e (B) a molécula circular.

Experimentos indicam que de 40% a 70% dos promotores respondem de alguma forma a inibição da enzima DNA girase pela droga comermicina. A inibição da girase leva ao relaxamento do DNA e isto afetaria o processo de transcrição (Menzel e Gellert, 1994). Neste trabalho, os pesquisadores fazem uma revisão da literatura e apresentam uma série de genes que sofrem influência da topologia na sua expressão.

Normalmente estes estudos utilizam mutantes ou drogas que alteram a atividade da enzima DNA girase ou da DNA topoisomerase I. A transcrição pode sofrer uma influência positiva do aumento da super-hélice (ativação da expressão de alguns genes) ou negativa em outros casos (Menzel e Gellert, 1994).

Como o nível de super-hélice pode sofrer influência direta do ambiente, alguns genes específicos podem ter então sua expressão condicionada às características do meio, como por exemplo transições de ambientes aeróbicos para anaeróbicos, mudanças do cultivo para um meio pobre em nutrientes e alterações na osmolaridade ou temperatura. Mudanças que diminuem o nível de ATP celular levam à diminuição da atividade da enzima DNA girase,



e conseqüentemente, à diminuição da super-hélice negativa (Dorman, 1995).

Em cianobactéria do gênero *Gleotece*, Page e Gallon, (1992) observaram que culturas crescidas em condições aeróbicas apresentam atividade de DNA topoisomerase I e nenhuma atividade de girase. Em condições de anaerobiose, a atividade da girase é observada e a da topoisomerase I não acontece. Sabe-se que em *E. coli* a síntese de girase e de topoisomerase é regulada pelo grau de super-hélice de seus próprios promotores.

Outro sistema de regulação que ocorre tanto em eucariontes como em procariontes é o sistema *proU*. Muitas células possuem a capacidade de responder ao estresse osmótico através do acúmulo intracelular de osmólitos, como por exemplo a glicina-betaína usada como osmoprotetor em diversos organismos. O locus *proU* codifica para um sistema de transporte de membrana induzido pela glicina-betaína, de grande importância para a adaptação celular ao choque osmótico. A expressão do *proU* é induzida em nível transcricional pela adição de osmólitos, entre eles o glutamato de potássio, no meio de cultivo (Prince e Villarejo, 1990).



O superenrolamento do DNA desenvolve um papel importante na indução osmótica do gene *proU*. Quando estas culturas foram submetidas a tratamento com inibidores de DNA girase (novobiocina e ácido nalidíxico), foi observado uma redução na expressão do gene de fusão *proU-LacZ* em *Salmonella typhimurium*, crescidas em ambientes com alta osmolaridade (Higgins et al, 1988). Isto indica que a transcrição do promotor *proU* é sensível ao grau de super-hélice.

Normalmente a regulação da transcrição gênica está relacionada a fatores protéicos que apresentam a capacidade de reconhecerem e interagirem com regiões específicas do DNA chamadas de promotores. Este reconhecimento depende de duas propriedades do DNA. A primeira seria a capacidade da proteína em reconhecer as características estruturais globais e locais da sequência específica de nucleotídeos da dupla hélice e a segunda seria a da capacidade de flexão local do DNA (Travers, 1989).



1.3 – Interações específicas entre proteínas e DNA

Interações entre proteínas e sítios específicos do DNA tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisadores, por estar diretamente relacionado com eventos celulares, tais como, duplicação, transcrição e recombinação (Krajewaska, 1992 e Sidorava e Rau, 2000). Essas interações intermoleculares são mediadas por ligações fracas (Johnson e McKight, 1989 e Ptashne, 1989), que sofrem influência direta das condições do meio solvente. A capacidade de adaptação de alguns organismos à adversidades pode estar relacionada a alterações nestas ligações, culminando com a regulação de alguns genes (Dorman, 1995).

O reconhecimento específico entre proteínas e o DNA–B ocorre principalmente no sulco maior do DNA pela sua topologia, pois é largo o suficiente podendo acomodar estruturas como α -hélice das proteínas e também pela exposição dos grupos funcionais das bases. Este sulco é rico em doadores e aceptores de pontes de hidrogênio, sendo que o reconhecimento é distinto para as quatro bases nitrogenadas (Steitz, 1993). Estudos de difração de raio X e NMR têm mostrado que o aminoácido arginina, que apresenta um

grupo guanidina na cadeia lateral, freqüentemente faz duas pontes de hidrogênio, uma com o N_7 e outra com o O_6 da guanina. A arginina também pode interagir com o N_7 de duas adeninas adjacentes. A glutamina liga seus grupos doador e acceptor de pontes com a adenina. O ácido glutâmico pode interagir com dois N_2 de duas adeninas adjacentes. A interação do tipo van der Waals que ocorre entre a resíduos não polares da proteína e o grupo metil da adenina, parece também contribuir com a especificidade (Sinden, 1994).

O sulco menor do B-DNA é mais estreito e profundo, dificultando portanto a interação das bases com o DNA. Este possui um número menor de doadores para ponte de hidrogênio (apenas um grupo amina da guanina). Os aceptores de hidrogênio da guanina, adenina e citosina estão localizados na mesma posição. A distinção ocorre apenas no código binário e na sua orientação (CG de AT e GC).

As interações específicas entre proteínas e a forma A-DNA são mais raras, já que a cavidade maior apresenta-se mais estreita e profunda, dificultando o reconhecimento (Steitz, 1993).



1.4 – Interações específicas entre enzimas de restrição e o DNA

Endonucleases de restrição constituem modelos atrativos para o estudo do reconhecimento específico entre proteínas e DNA, devido a diversidade de enzimas e de sítios reconhecidos por elas. Estas têm a capacidade de ligar-se ao DNA com a mesma afinidade em todos os sítios. Entretanto, a clivagem do seu sítio específico (sítio canônico) vai depender da presença de íons Mg^{++} na reação, como foi observado para a enzima *EcoRV* (Taylor et al, 1991). A interação dessa enzima com o centro do sítio de reconhecimento faz um extenso contato com o sulco maior do DNA, incluindo doze pontes de hidrogênio (Kostrewa e Winkler, 1995). Os íons Mg^{++} participam da ativação de moléculas de água para o ataque nucleofílico e conseqüentemente a hidrólise da ligação fosfodiéster (Baldwin, Vipond e Halford, 1995). O Mg^{++} também induz a mudanças conformacionais no complexo enzima-substrato (Jeltsch et al, 1993).

Enzimas de restrição apresentam sensibilidade pela mudança conformacional do substrato, interferindo diretamente na cinética da reação de hidrólise (Hensley et al 1990). Alterações nos



parâmetros experimentais, tais como temperatura, força iônica e densidade de super-hélice afetam a topologia do DNA, alterando a cinética de clivagem (Nardone et al 1990).

O reconhecimento do sítio específico pela enzima de restrição envolve interações mediadas por moléculas de água. Alterações na camada de solvatação do DNA podem interferir no reconhecimento, diminuindo a especificidade de clivagem com o aparecimento de novos sítios. Esta característica das enzimas de restrição é conhecida como atividade estrela. O aumento da pressão osmótica diminui a especificidade de reconhecimento do DNA pela enzima de restrição (Robinson e Sligar, 1994).



1.5 – Objetivos

A proposta deste trabalho é a de estudar as mudanças torsionais do plasmídeo pUC18, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, induzidos pelo estresse osmótico gerado pela adição de co-solventes neutros, como a sacarose e o glicerol.

Os ensaios *in vitro* visam correlacionar o potencial químico da água, modificado pela presença dos co-solventes, com a variação do número de voltas (ΔLk) observadas no plasmídeo.

Pretende-se também avaliar os efeitos do estresse osmótico na capacidade de reconhecimento e clivagem de sítios canônicos e sítios estrela por enzimas de restrição, utilizando como modelo a *Bam*HI.

Nos estudos *in vivo* pretende-se analisar o efeito do estresse osmótico sobre a expressão do gene de resistência a ampicilina e suas conseqüências sobre o estado conformacional do plasmídeo.



2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Purificação do DNA plasmidial

Culturas de bactéria *E. coli*, linhagem HB101, contendo o plasmídeo pUC18 que codifica para a resistência ao antibiótico ampicilina (Amp^R), foram crescidas até a fase estacionária em meio LB (Tryptona 1%, Extrato de Levedura 0,5% e NaCl 1%) a 37 ° C, na presença de 20 µg/ml de ampicilina sob constante agitação. O plasmídeo foi extraído pelo método da lise alcalina (Sambrook et al, 1989). Após o crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 6000 rpm em uma centrífuga Sorvall RC5B a 4° C, durante dez minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a lise com dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,5% num pH 12, durante dez minutos em temperatura ambiente.

Após a lise a amostra foi tratada com uma solução de acetato de potássio e ácido acético 10 %. Posteriormente a amostra foi incubada durante 10 minutos em gelo, e em seguida centrifugado a 6000 rpm por quinze minutos a 4° C. Com a redução do pH o



plasmídeo pUC18 renatura-se com certa facilidade, por apresentar uma estrutura circular, podendo ser isolado no sobrenadante. Este foi precipitado com 0,6 vezes o volume total com isopropanol. A amostra ficou em repouso durante dez minutos em temperatura ambiente e posteriormente foi centrifugado a 10000 rpm por quinze minutos a 4° C. O precipitado foi lavado com etanol 70% gelado, seco e ressuspendido em tampão TE (Tris-EDTA), composto por 10mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA com um pH 8.

A amostra foi tratada com 20 µg/ml da enzima ribonuclease a 37° C durante uma hora. O plasmídeo foi purificado pelo Kit Pureprep da Pharmacia e ressuspendido em Tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8 e 1mM de EDTA). Os diferentes topoisômeros obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM de Tris-base, 2 mM de Na₂EDTA e 20 mM de acetato de sódio).

O gel foi corado na ausência de luz durante trinta minutos com brometo de etídio numa concentração de 1 µg/ml. As bandas foram observadas por transiluminação com luz ultra violeta e a imagem foi captada por um sistema Eagle eye II da Stratagene, munido de uma câmera CCD de alta resolução acoplada a um



microcomputador. Os resultados foram analisados pela densitometria utilizando o programa BandLeader.

Os topoisômeros gerados são distribuídos em populações caracterizadas por números de voltas completas que flutuam de duas a três unidades ($Lk \pm i$) em relação ao valor do topoisômero central Lk . A densitometria da distribuição das bandas representa uma envoltória gaussiana, e o deslocamento do centro desta distribuição permite calcular o efeito das condições do meio solvente na topologia do DNA (Keller, 1975 e Wang, 1994). Os resultados foram apresentados em gráfico que relaciona a distância da migração do centro da distribuição gaussiana (cm) com a variação na concentração de ampicilina.

2.2 – Ensaios *in vivo*

Bactérias HB101 contendo o plasmídeo pUC18 foram submetidas ao cultivo sob condições fisiológicas ou de estresse osmótico, produzido pelo aumento na concentração de sacarose. Após o crescimento, o plasmídeo foi purificado utilizando o Kit Pureprep da



Pharmacia e ressuspendido em Tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8 e 1mM de EDTA). A eletroforese para a separação dos diferentes topoisômeros foi feita em gel de agarose 1%. Entretanto o número elevado de voltas apresentado pelo plasmídeo não permitem a resolução dos memos, migrando como uma única banda. Para possibilitar a resolução dos diferentes topoisômeros gerados, foram adicionados 10 $\mu\text{g/ml}$ da droga intercalante cloroquina ao gel e ao tampão antes da eletroforese. A presença do intercalante no gel tem efeito de diminuir Lk_0 , de tal maneira que a diferença ΔLk , fique reduzida ou até mesmo positiva, permitindo que pequenas variações, como por exemplo uma única volta, seja separado (Wu e Schurr, 1989 e Scovell, 1986).

A análise da expressão do gene da β -lactamase na topologia do pUC18 foi obtida por incrementos na concentração de ampicilina no meio de cultura.



2.3 – Ensaios *in vitro*

O plasmídeo pUC18 superelícoidal, purificado em larga escala foi relaxado por digestão com desoxirribonuclease I (Dnase I). Neste procedimento foram utilizados pequenas concentrações de Dnase I, de tal maneira que apenas uma das fitas fosse cortada (nicks). Alternativamente em alguns ensaios foram utilizados plasmídeos linearizados pela endonuclease de restrição HindIII em tampão contendo 100 mM de tampão Tris–acetato (pH 7,5), 10 mM de acetato de magnésio e 50 mM de acetato de potássio. O plasmídeo foi submetido a ensaios de ligação com a enzima T4 DNA ligase durante duas horas em tampão de ligação composto por 66 mM de Tris (pH 7,5), 6,6 mM de $MgCl_2$ e 1mM de ditioneitol (DTT). O estresse osmótico foi obtido variando a concentração de sacarose e glicerol. Os valores do potencial químico da água ($\ln a_w$) foi calculado a partir de valores tabelados da osmolaridade da solução de água/co-solvente, e da concentração molar da água pura:

$$\ln a_w = \frac{Osm}{55,5}$$



Onde os valores da osmolaridade são tabelados de uma solução água- co-solvente (Lide e Frederikse, 1997). O valor 55,5 corresponde ao número de moles de um quilograma de água.

Após a reação, os topoisômeros foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados posteriormente com brometo de etídio.

Durante o processo de recircularização a agitação térmica do meio induz a alterações na energia torcional dos plasmídeos, resultando portanto em flutuações no número de voltas dos plasmídeos circularizados. Esta flutuação pode ser observada e quantificada em termos de número de ligações, ou seja, número de voltas completas (linking number = Lk), maiores e menores que o seu valor médio para uma determinada condição experimental.

O número de repetição por volta da hélice foi determinado como sendo o resultado da divisão do número de pares de nucleotídeos que compõe o pUC18 (2686 pb) pelo número de ligações apresentado pelo plasmídeo (256 voltas para o plasmídeo relaxado).

$$Lk = \frac{N}{h}$$

onde h é a repetição helicoidal igual a 10,45 pb à 200 mM de NaCl e 37° C.

Experimentalmente a posição do centro da distribuição gaussiana de topoisômeros foi calculado pela somatória da intensidade das áreas de cada pico multiplicado pela distância percorrida no gel, dividido pela somatória de todas as áreas.

$$\text{Posição do centro de distribuição} = \frac{\sum (\text{área} \times \text{distância})}{\sum \text{área}}$$

O deslocamento entre os centros das distribuições gaussianas fornecem os valores de ΔLk .

2.4 – Digestão do DNA com *Bam*HI sob estresse osmótico

Para os ensaios de ligação sítio específica, os fragmentos de pUC18/*Pvu*II 322 pb e de pUC18/*Fok*I 613 pb foram produzidos pela clivagem com as respectivas enzimas, segundo as recomendações do laboratório fornecedor (Gibco), e extraídos

diretamente do gel de agarose utilizando o Kit Bandprep da Pharmacia.

O ensaio enzimático para a enzima *Bam*HI foi realizado a 37° C, na presença 100 mM de tampão Tris–acetato (pH 7,5), 10 mM de acetato de magnésio e 50 mM de acetato de potássio.

A eletroforese em agarose 1% foi feita em mini gel, durante 2 horas com aplicação de um campo elétrico de 8 V/cm. O gel foi corado posteriormente com 1µg/ml de brometo de etídio durante 30 minutos na ausência de luz. A imagem do gel foi captada por um sistema Eagle eye II da Stratagene, munido de uma câmera CCD acoplada a um microcomputador.

A eletroforese em poliacrilamida 9% foi realizada no sistema mini Protean A da Biorad, durante 1,5 hora e 12 V/cm. O gel foi corado com nitrato de prata. A imagem foi registrada por um scanner Artec AT3.

As imagens foram analisadas por densitometria, utilizando o programa BandLeader. A intensidade de cada banda foi calculada através da sua integração numérica. O erro (background) produzido pelas impurezas presentes na solução da enzima foi desconsiderado durante o cálculo da área de cada banda.



A fração de clivagem do DNA foi quantificada pela soma da intensidade de bandas dos produtos, dividido pela soma de todas as intensidade de bandas existentes na coluna (intensidade do fragmento inteiro mais a intensidade dos produtos).

$$\text{Fração de clivagem} = \frac{\text{soma das intensidades dos produtos}}{\text{soma de todas as intensidades}}$$

Os resultados foram apresentados em gráficos de fração de clivagem pelo logaritmo do potencial químico da água $\ln a_w$.

3 – RESULTADOS

3.1 – Ensaios *in vivo* para topologia do DNA

Para entender a influência da osmolaridade e da transcrição na produção de super-hélice no DNA, as bactérias foram cultivadas em meio fisiológico ou na presença de 20% de sacarose ($\ln a_w = -0,0142$), com aumento progressivo da concentração de ampicilina no meio de cultura. A adição de antibiótico foi feita com o objetivo de estimular a expressão do gene da β -lactamase, cujo produto altera o anel β -lactâmico da ampicilina. O efeito dessa droga é de inibir a atividade da enzima transpeptidase, responsável pelas ligações cruzadas dos peptídeoglicanos, componentes da parede celular bacteriana. A modificação do anel da ampicilina pela β -lactamase impede o reconhecimento e a interação desta com a transpeptidase, proporcionando resistência da bactéria contra o efeito da ampicilina.



A figura 7 mostra os topoisômeros resultantes do plasmídeo pUC18 isolado de culturas crescidas em condições fisiológicas ou de alta osmolaridade durante quatorze horas.

A concentração de cloroquina utilizada no gel é suficiente para relaxar totalmente super-hélice negativa e produzir super-hélice positiva. Desta forma podemos concluir que a maioria das bandas apresentadas no gel referem-se a super-hélice positiva, originadas pela intercalação da cloroquina. A ausência da droga no gel não permite a resolução dos diferentes topoisômeros, resultando em apenas uma banda referente a forma de super-hélice (coluna A).

A coluna M apresenta uma falha experimental onde a quantidade de DNA utilizada foi menor que as demais colunas. A resolução das diferentes bandas só foi possível através da densitometria da mesma.

O centro da distribuição gaussiana dos topoisômeros em cada condição de crescimento foi obtido através da densitometria de cada coluna do gel da figura 7. Um gráfico da posição do centro da distribuição em função da concentração de ampicilina usada em cada crescimento é mostrado na figura 8. Pelos resultados, podemos observar que o comportamento dos plasmídeos originários de

bactérias crescidas em condições de estresse osmótico ($\ln a_w = -0,0142$) apresentam uma maior migração do que aqueles extraídos de bactérias submetidas ao crescimento em osmolaridade fisiológica (figura 8). Este aumento é ainda maior quando ocorre o estímulo da expressão do gene da β -lactamase, pela adição crescente de ampicilina.



FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose 1% com clorquina. As amostras foram submetidas a um campo elétrico de 2 Voltagem, aplicação durante 5 horas, na presença de 10 µg/ml de clorquina. O pUC13 foi extraído de *E. coli* HB101 cultivada em condições fisiológicas (colunas de B a G) e as proteínas de 20% de soro (colunas de I a M). A concentração de ampicilina de cada cultivo foi: coluna A = 0 µg/ml nas colunas B a F: 10 µg/ml nas colunas C e I, 20 µg/ml nas colunas D e J, 40 µg/ml nas colunas E e K, 80 µg/ml nas colunas F e L, 160 µg/ml nas colunas G e M). CA indica a posição do formo em 100 nucleotídeos e a coluna A equivale a coluna B. O eletroforótipo foi desenvolvido com clorquina.



FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose 1% com cloroquina. As amostras foram submetidas a um campo elétrico de 2 Volts/cm, aplicado durante 6 horas, na presença de 10 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina fundida no gel. O pUC18 foi extraído de *E. coli* HB101 cultivada em condições fisiológicas (colunas de B a G) e na presença de 20% de sacarose (colunas de I a M). A concentração de ampicilina de cada cultivo foi variada (0 $\mu\text{g/ml}$ nas colunas B e H; 10 $\mu\text{g/ml}$ nas colunas C e I; 20 $\mu\text{g/ml}$ nas colunas D e J; 40 $\mu\text{g/ml}$ nas colunas E e K; 80 $\mu\text{g/ml}$ nas colunas F e L; 160 $\mu\text{g/ml}$ nas colunas G e M). CR indica a posição da forma circular relaxada e a coluna A equivale a coluna B submetida a eletroforese sem cloroquina no gel.

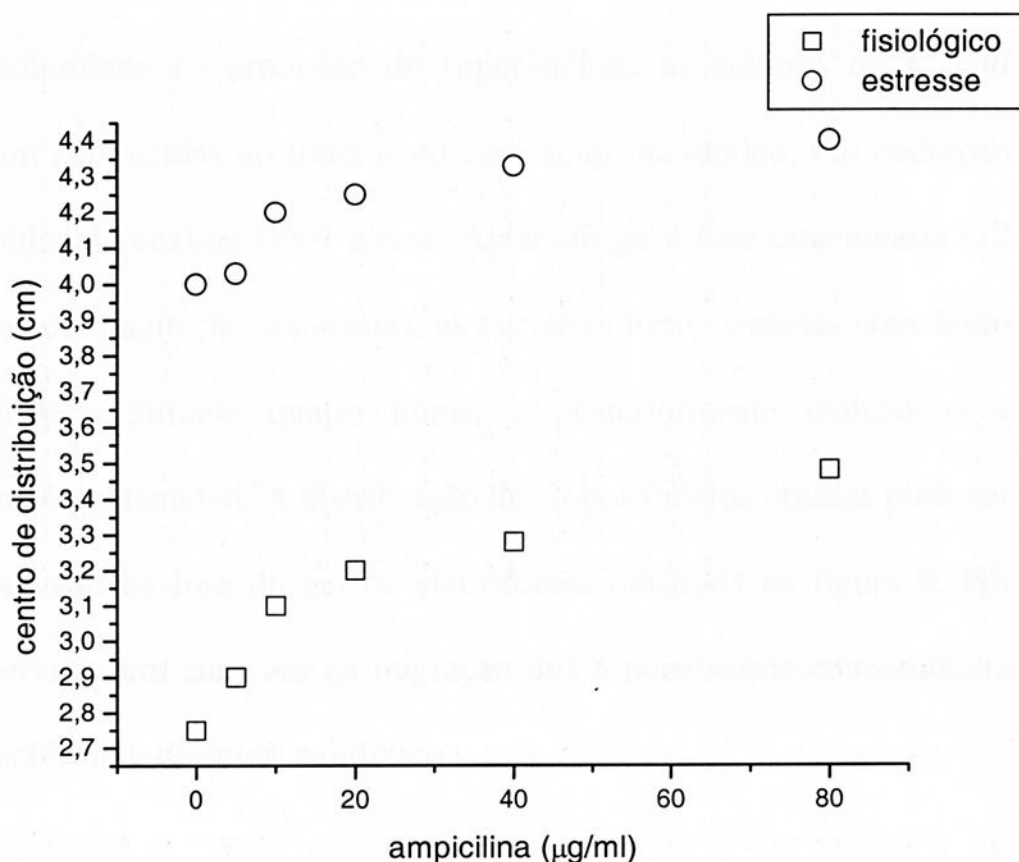


FIGURA 8: Distribuição de topoisômeros em função da concentração de ampicilina. A posição foi determinada através da densitometria das bandas do gel da figura 7. A posição é medida em cm em relação à banda referente aos plasmídeos relaxados. Os quadrados representam o cultivo feito em condições fisiológicas e os círculos representam o cultivo realizado sob estresse osmótico ($\ln a_w = -0,0142$).

Para esclarecer-se exatamente qual o efeito da osmolaridade na produção de super-hélice, as culturas de *E. coli* foram submetidas ao tratamento com ácido nalidíxico, um poderoso inibidor da enzima DNA girase. Após atingir a fase estacionária (12 horas com agitação constante), as bactérias foram tratadas com ácido nalidíxico durante quatro horas, e posteriormente realizamos a extração plasmidial. A distribuição dos topoisômeros obtidos pode ser observado na foto do gel de eletroforese mostrada na figura 9. Foi observado um aumento na migração dos topoisômeros concomitante ao acréscimo de ácido nalidíxico.



FIGURA 9: Efeito da inibição de DNA girase na topologia do plasmídeo pUC18. Eletroforese em gel de agarose 1% na presença de 10 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina, campo elétrico de 2 Volts/cm durante 6 horas. As amostras de pUC18 foram obtidas de bactérias crescidas na presença de 40 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina durante doze horas. Após o crescimento, adicionamos as seguintes concentrações de ácido nalidíxico: (A) nenhum B) 4 $\mu\text{g/ml}$; C) 8 $\mu\text{g/ml}$; D) 16 $\mu\text{g/ml}$; E) 32 $\mu\text{g/ml}$ e F) 64 $\mu\text{g/ml}$. Após quatro horas de constante agitação, os plasmídeos foram purificados e separados por eletroforese.

Alterações na mobilidade eletroforética dos topoisômeros pode ser determinada através do densitograma do gel como mostrado na figura 10 para as colunas B e E. A mobilidade das bandas deste gel confirmam o aumento na produção de super-hélice positiva, induzida pela intercalação da cloroquina. A figura 10 mostra um deslocamento maior dos plasmídeos referentes a coluna E (32 $\mu\text{g/ml}$), se comparado à distância de migração dos topoisômeros observados na coluna B (4 $\mu\text{g/ml}$). Pode-se notar um deslocamento das bandas de maior intensidade para a zona de maior migração (direita da figura).

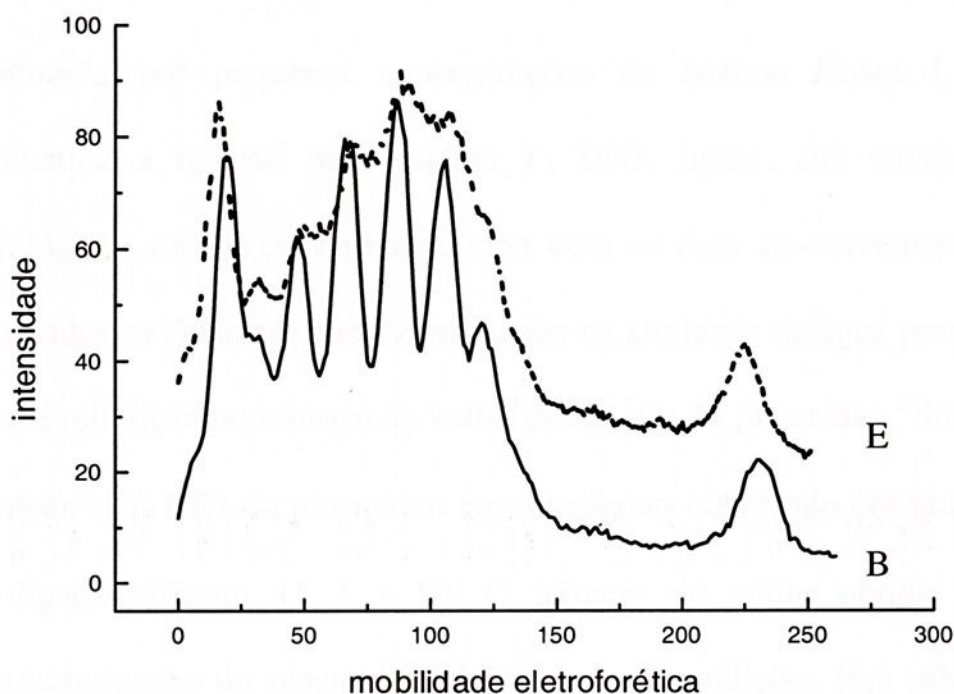


FIGURA 10: Densitograma das colunas B (sólido) e E (pontilhado) do gel da figura 9. O eixo Y é proporcional a intensidade de fluorescência emitido pelo brometo de etídeo intercalado nos topoisômeros produzidos durante o ensaio. O eixo X corresponde a distância percorrida pelos topoisômeros. A figura evidencia um aumento na intensidade das bandas com maior migração no gel (topoisômeros da direita).

3.2 – Ensaios de corte e religação do pUC18 realizados *in vitro*

A forma circular relaxada do plasmídeo pUC18, produzida por pequenas concentrações da enzima Dnase I, foi submetida a ligação pela enzima T₄ DNA ligase, sob condições fisiológicas ou de estresse osmótico com os dois co-solventes. Os resultados evidenciam que a diminuição na atividade da água provoca uma diminuição no número de voltas completas do plasmídeo “linking number” (Δ LK) do plasmídeo em relação ao observado em tampão de ligação (figura 11 A e B). O número de voltas obtido pela recircularização do plasmídeo pUC18 nestas condições (6,6 mM de cloreto de magnésio a 37° C), foi de + 1,8 voltas (Rybenkov, 1997 e Lee et al, 1981).

Os resultados também mostram que ocorre uma diferença no número de voltas de acordo com a temperatura, sendo que quando o ensaio foi realizado a 20° C o número de voltas apresentados pelo plasmídeo foi maior, se comparado ao ensaio sob 30° C. Para o cálculo do número de voltas nas diferentes temperaturas utilizamos a relação de $-0,012^\circ / ^\circ \text{C}$ (Depew e Wang, 1975) como fator de correção.



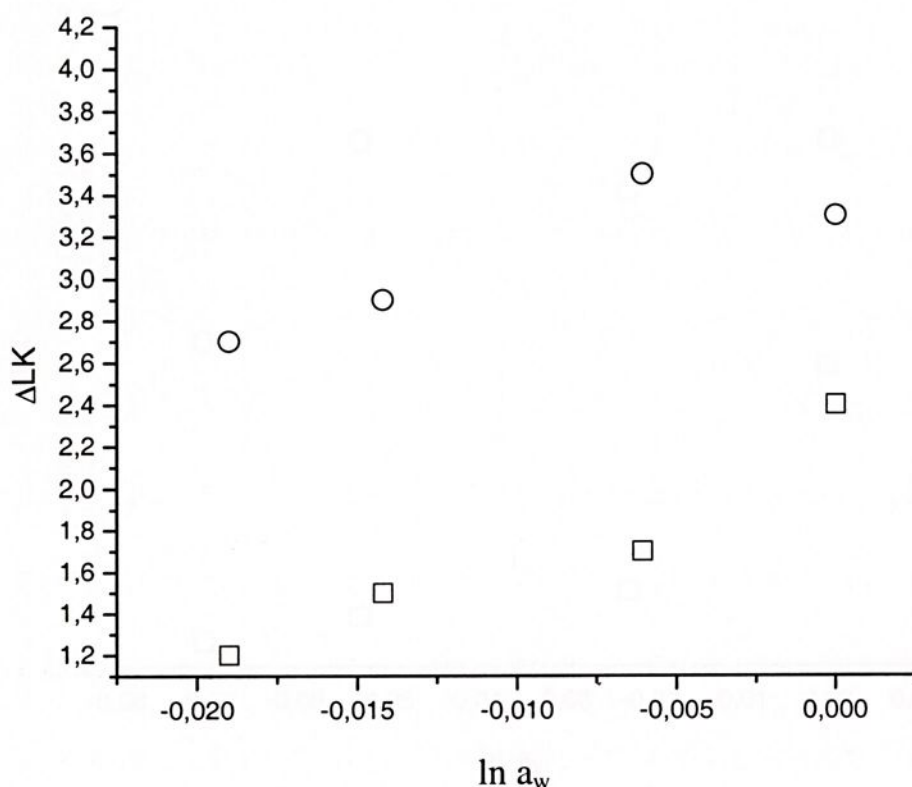


FIGURA 11A: Número de voltas ou “linking number” em função do potencial químico da água na presença de sacarose. O plasmídeo pUC18 foi relaxado pelo corte em uma das fitas pela enzima Dnase I e recircularizado por DNA ligase a 30°C (quadrado) e a 20°C (círculo), sob diferentes concentrações de sacarose. O resultado da eletroforese em gel de agarose foi analisado por densitometria para calcular o ΔLk .

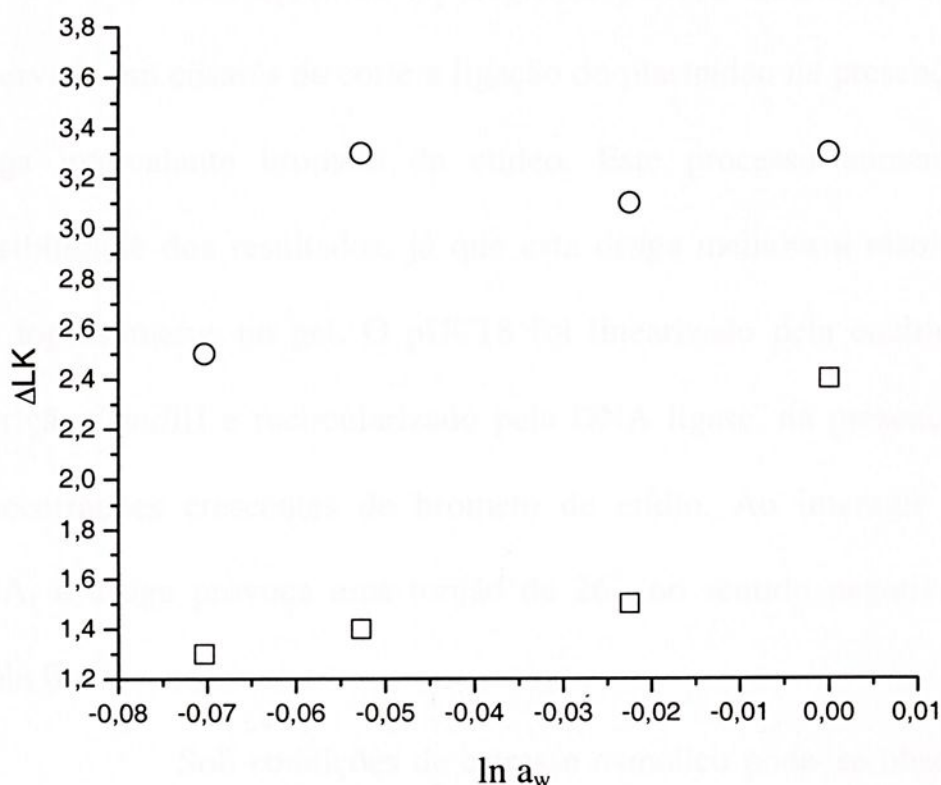


FIGURA 11B: Número de voltas ou “linking number” em função do potencial químico da água, na presença de glicerol. O plasmídeo pUC18 foi relaxado pelo corte em uma das fitas pela enzima Dnase I e recircularizado por DNA ligase a 30° C (quadrado) e a 20°C (círculo), sob diferentes concentrações de glicerol. O resultado da eletroforese em gel de agarose foi analisado por densitometria e usado para calcular o ΔLk .

Alterações na topologia do pUC18 também pode ser observada em ensaios de corte e ligação do plasmídeo na presença da droga intercalante brometo de etídeo. Este processo aumenta a sensibilidade dos resultados, já que esta droga melhora a resolução dos topoisômeros no gel. O pUC18 foi linearizado pela enzima de restrição *Hind*III e recircularizado pela DNA ligase, na presença de concentrações crescentes de brometo de etídio. Ao interagir com DNA, a droga provoca uma torção de 26° , no sentido negativo da dupla fita.

Sob condições de estresse osmótico pode-se observar sempre uma menor migração dos topoisômeros se comparados aos gerados durante a ligação sob condições fisiológicas. Isto pode ser confirmado e expressado pela variação na migração dos diferentes topoisômeros em gel de agarose (fig 12).



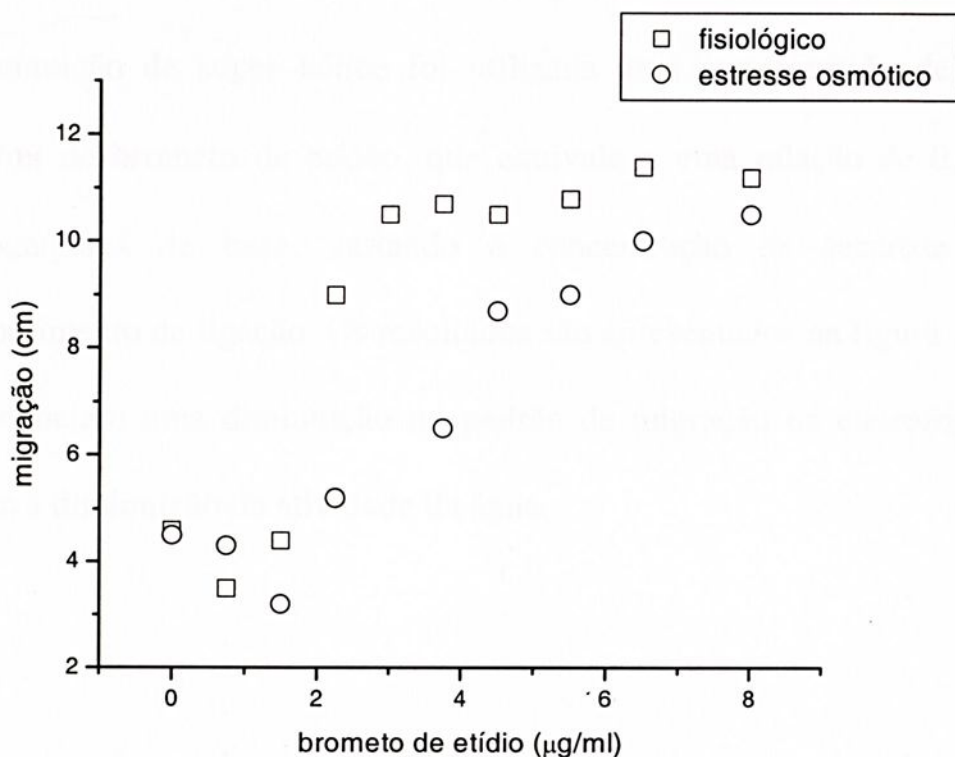


FIGURA 12: Alterações na migração eletroforética do plasmídeo pUC18 circularizado em tampão de ligação versus a concentração de brometo de etídio utilizada no ensaio ($\mu\text{g/ml}$), sob condições fisiológicas (quadrados) ou de estresse osmótico (círculos). O plasmídeo foi linearizado pela enzima *Hind* III e religado pela T4 DNA ligase em tampão contendo 6,6 mM de MgCl_2 , a 14°C e diferentes concentrações de brometo de etídio.

Para confirmar-se o impacto do estresse osmótico na diminuição de super-hélice foi utilizada uma concentração de 5,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídeo, que equivale a uma relação de 0,086 droga/pares de base, variando a concentração de sacarose no experimento de ligação. Os resultados são apresentados na figura 13 e evidenciam uma diminuição no padrão de migração na eletroforese com a diminuição da atividade da água.

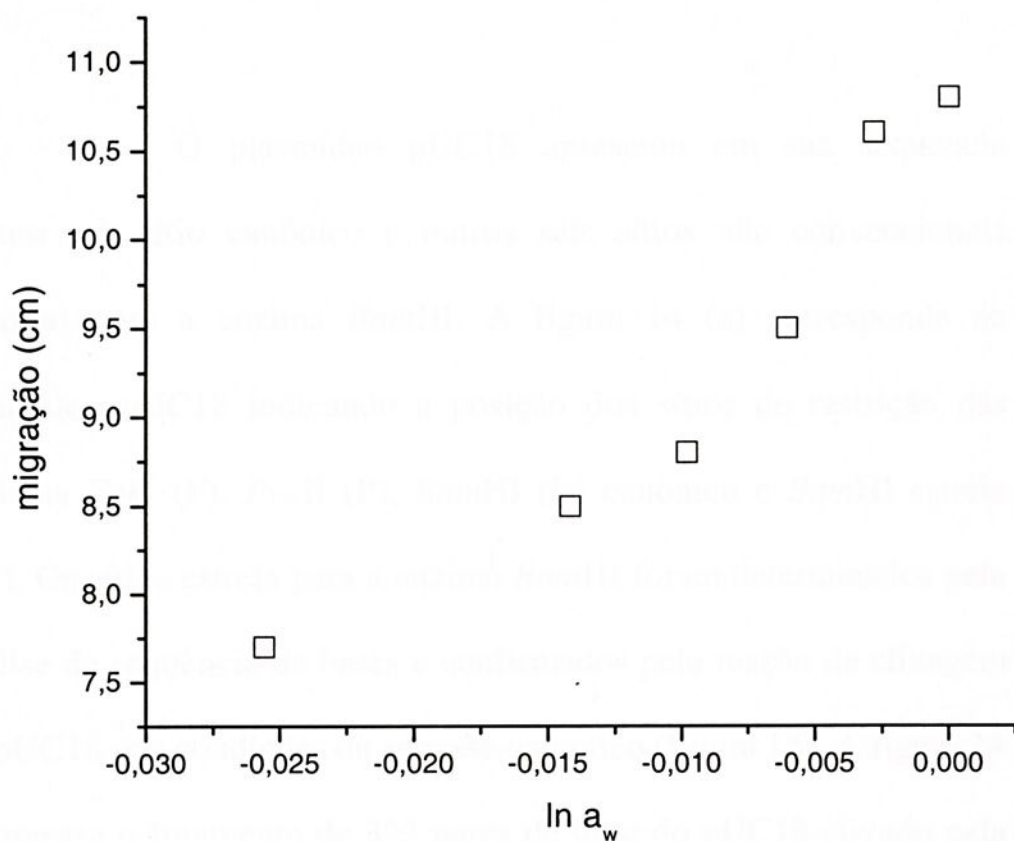


FIGURA 13: Relação existente entre a distância percorrida pelo centro da distribuição gaussiana e a diminuição na atividade da água. O pUC18 foi linearizado pela enzima *Hind*III e recircularizado por DNA ligase na presença de 5,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio, sob diferentes concentrações de sacarose, diminuindo a atividade da água.

3.3 – Interações específicas entre a enzima *Bam*HI e DNA

O plasmídeo pUC18 apresenta em sua sequência apenas um sítio canônico e outros seis sítios não convencionais (estrela) para a enzima *Bam*HI. A figura 14 (a) corresponde ao plasmídeo pUC18 indicando a posição dos sítios de restrição das enzimas *Fok*I (F), *Pvu*II (P), *Bam*HI (B) canônico e *Bam*HI estrela (B*). Os sítios estrela para a enzima *Bam*HI foram determinados pela análise da sequência de bases e confirmados pela reação de clivagem do pUC18 sob condições de estresse osmótico (figura 15). A figura 14 (b) mostra o fragmento de 322 pares de base do pUC18 clivado pela enzima *Pvu*II. Este fragmento apresenta o sítio canônico para a *Bam*HI, que produz um segmento de 211 e outro de 111 pares de base. A figura 14 (c) mostra o fragmento de 611 pares de base produzido pela restrição com a enzima *Fok*I, em destaque na figura 14 (a). Este fragmento apresenta dois sítios de restrição estrela para a enzima *Bam*HI (B*¹ B*²).



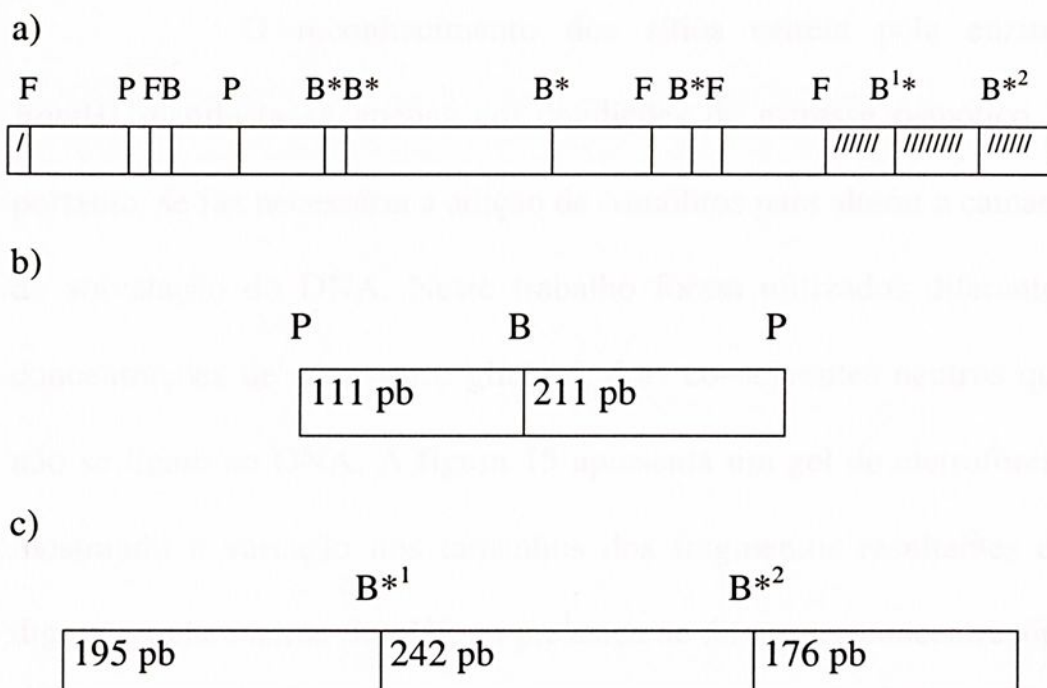


FIGURA 14 a: Mapa dos sítios de restrição para as enzimas *FokI* (F), *PvuII* (P), *BamHI* canônico (B) e *BamHI* estrela (B*). b): fragmento de 322 pares de base gerado pela clivagem com a enzima de restrição *PvuII* (P), contendo apenas o sítio canônico para a enzima *BamHI* (B). c) Fragmento de 613 pares de base, gerado pela digestão com a enzima *FokI* (F), que aparece em destaque em (a). Este fragmento apresenta dois sítios estrela para a enzima *BamHI*, B¹ *BamHI* GGATCT e outro com uma menor clivagem B² *BamHI* GGAACC. Os números representados dentro dos retângulos referem-se ao tamanho (em pares de nucleotídeos) dos fragmentos gerados pela clivagem.

O reconhecimento dos sítios estrela pela enzima *Bam*HI manifesta-se apenas em condições de estresse osmótico e, portanto, se faz necessária a adição de osmólitos para alterar a camada de solvatação do DNA. Neste trabalho foram utilizados diferentes concentrações de sacarose e glicerol, dois co-solventes neutros que não se ligam ao DNA. A figura 15 apresenta um gel de eletroforese mostrando a variação nos tamanhos dos fragmentos resultantes da digestão pela enzima *Bam*HI, na presença de diferentes concentrações de glicerol. Pode-se notar que alguns fragmentos somente são encontrados numa concentração maior que 20% de glicerol. Por outro lado, concentrações muito elevadas (acima de 40%) diminuem a afinidade de alguns desses sítios estrela.

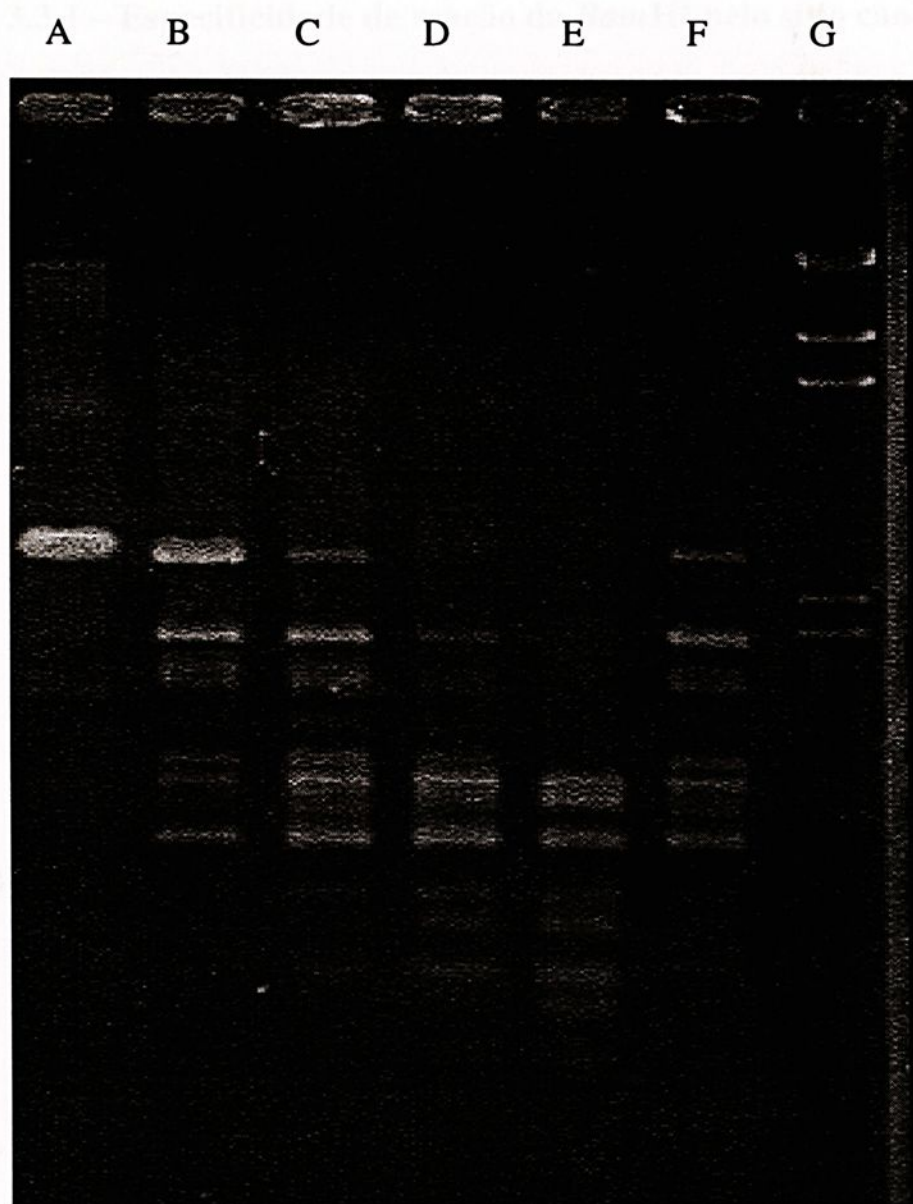


FIGURA 15: Efeito estrela para a *Bam*HI. Eletroforese em gel de agarose 1% do pUC18 submetido a digestão com *Bam*HI durante 24 horas. A) 0% de glicerol, B) 10% de glicerol, C) 20% de glicerol, D) 30% de glicerol, E) 40% de glicerol, F) 50% de glicerol e G) padrão de λ /HindIII

3.3.1 – Especificidade de reação da *Bam*HI pelo sítio canônico

Para estudar-se o comportamento do sítio canônico da enzima *Bam*HI, em situações fisiológicas e de estresse osmótico, foi isolado o fragmento do pUC18 como indicado na figura 14B (sítio canônico). Após a purificação, o fragmento foi submetido a reação de reconhecimento e clivagem pela enzima *Bam*HI.

A atividade da enzima *Bam*HI está diretamente associada a presença de íons divalentes, principalmente ao íon magnésio (Mg^{++}).

As figuras 16A e 16B mostram a relação existente entre a clivagem do fragmento de 322 pares de base, contendo apenas um sítio canônico para a enzima *Bam*HI, e a atividade de água, alterada pela adição de concentrações crescentes de glicerol representado na figura 16A ou de sacarose 16B.

Pode-se observar uma diminuição na fração de DNA clivado, proporcional a diminuição da atividade de água (aumento na concentração do co-solvente).



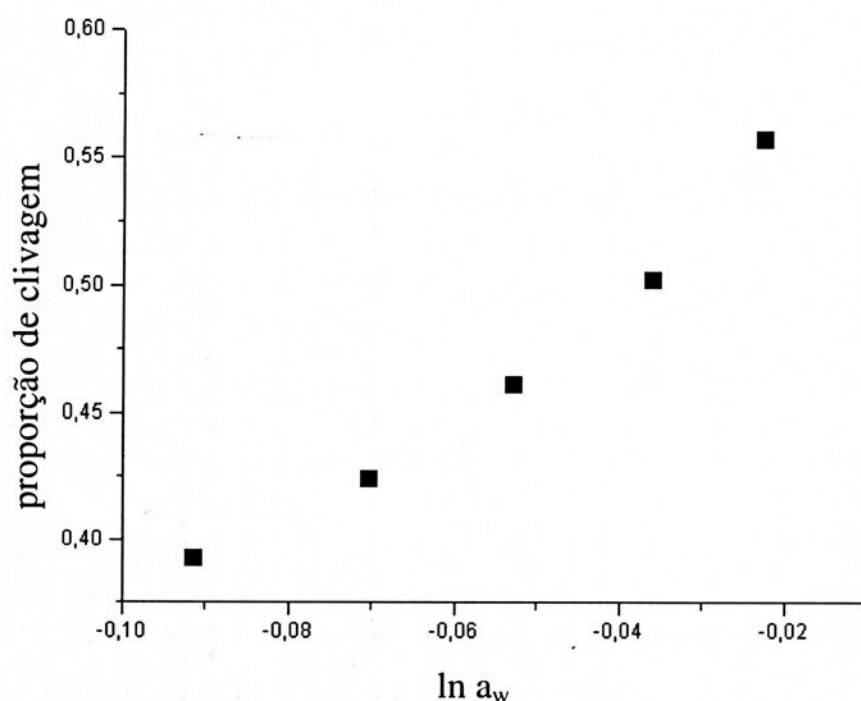


FIGURA 16A: Atividade da *BamHI* pelo sítio canônico na presença de glicerol. Representação da fração de clivagem pela atividade de água ($\ln a_w$) alterada por diferentes concentrações de glicerol. O ensaio foi realizado a 37° C, durante 20 minutos em tampão contendo 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 10 mM de NaCl.

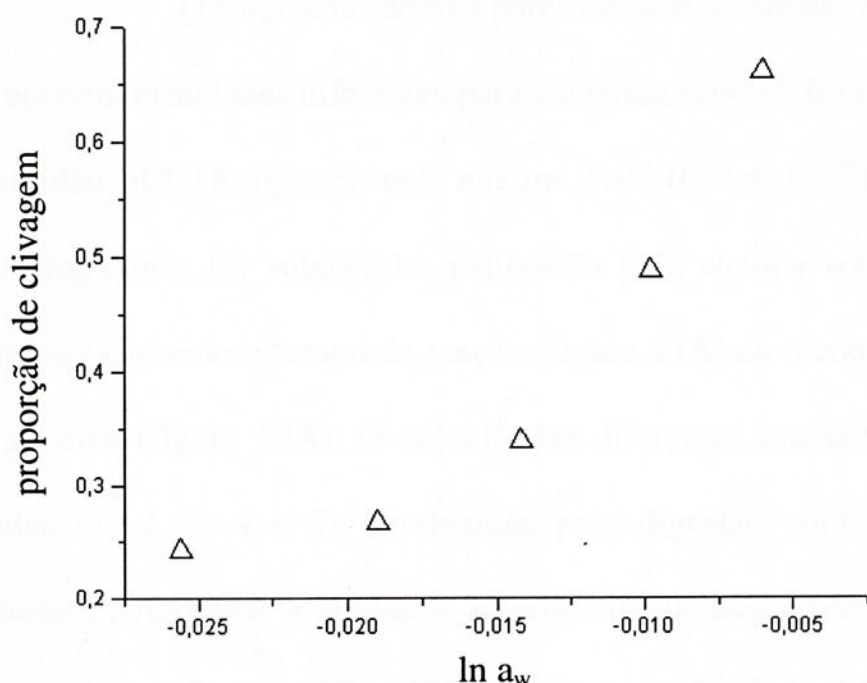


FIGURA 16B: Atividade da *BamHI* pelo sítio canônico na presença de sacarose. Representação da fração de clivagem pela atividade de água ($\ln a_w$) alterada por diferentes concentrações de sacarose. O ensaio foi realizado a 37° C, durante 20 minutos em tampão contendo 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 10 mM de NaCl.

3.3.2 – Especificidade de reação da *Bam*HI por dois sítios estrela

O fragmento de 613 pares de base, contendo dois sítios estrela com afinidades diferentes para a enzima *Bam*HI, foi isolado do plasmídeo pUC18 digerido pela enzima *Fok*I (613pb pUC18/ *Fok*I). Este fragmento foi submetido a digestão pela enzima sob estresse osmótico variando o tempo de reação (figura 17A) ou a concentração de glicerol (figura 18A). O cálculo das diferentes intensidades das bandas (1, 2, 3, 4 e 5), produzidas pela digestão com a *Bam*HI permitem determinar a atividade estrela. As análises destes géis são mostradas nas figuras 17B e 18B e indicam a afinidade diferenciada para cada sítio estrela. Esta afinidade foi calculada e expressa em termos de fração de clivagem pela atividade de água. Estes dados indicam que a substituição de timina pela adenina e timina por citosina reduz o padrão de corte, sendo o sítio GGATCT mais forte do que GGAACC.



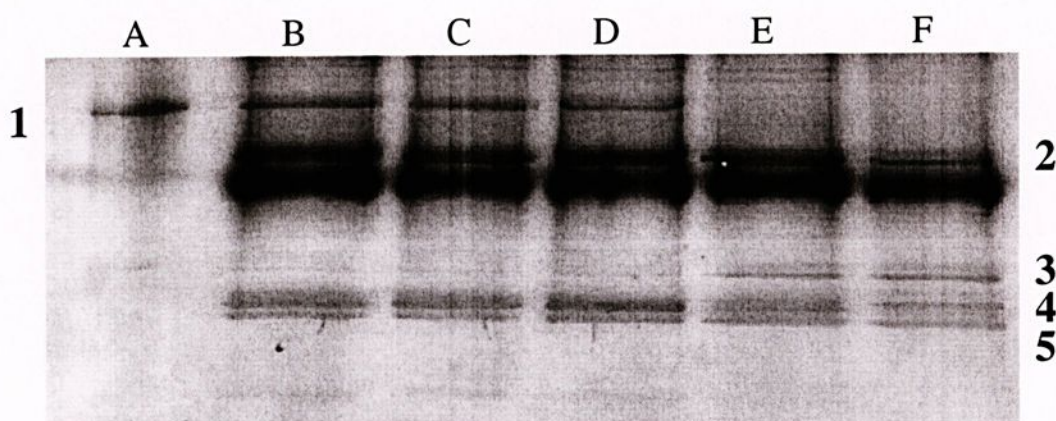


FIGURA 17A: Eletroforese em gel de poliacrilamida 9% mostrando a diferença de afinidade da enzima *Bam*HI pelos dois sítios estrela do fragmento de 613 pares de base. Os dois sítios, GGATCT (B^{*1}) e GGAACC (B^{*2}) foram analisados em função do tempo e sob estresse osmótico dado por 20% de glicerol. A coluna (A) corresponde ao fragmento na ausência da enzima, (B–F) fragmento mais 10 U da enzima com 10 mM de acetato de magnésio durante 20 (B), 40 (C), 60 (D), 120 (E) e 240 minutos (F). As bandas identificadas com um algarismo ao lado correspondem respectivamente ao fragmento íntegro de 613 pares de base (1), fragmento de 437 pares de base gerado pelo corte do sítio B^{*1} (2), fragmento de 242 pares de base produzido pelo corte dos dois sítios de restrição (3), fragmento de 195 pares de base produzido pelo corte do sítio B^{*1} (4) e fragmento de 176 pares de base produzidos pelo corte do sítio B^{*2} (5). A eletroforese foi feita durante 1,5 horas e campo elétrico de 7 Volts/cm.

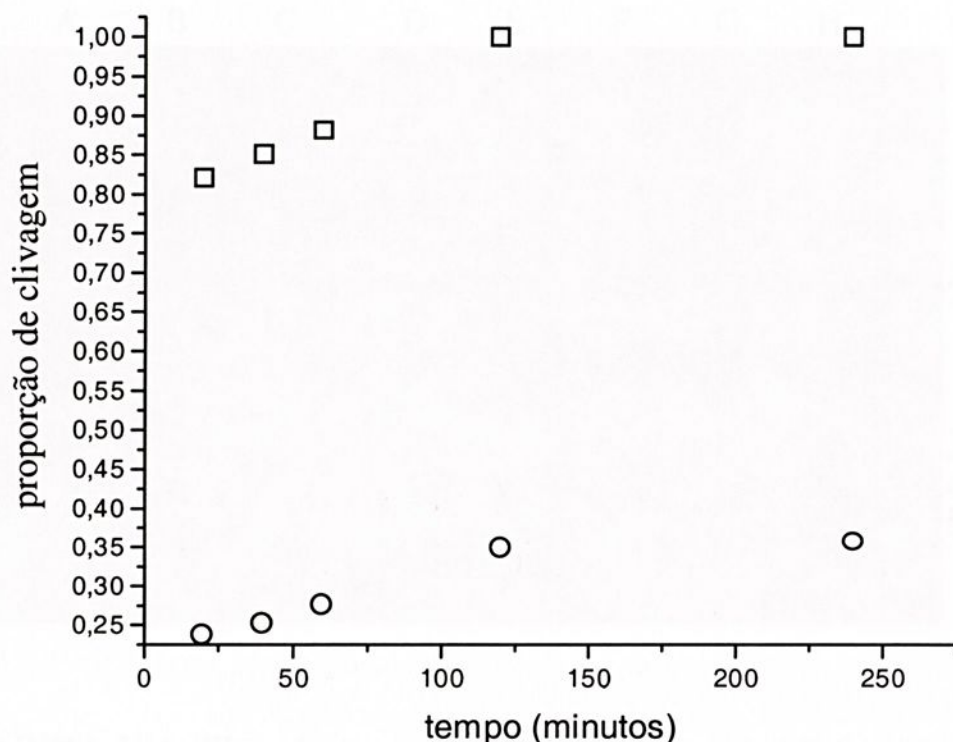


FIGURA 17B: Afinidade da *Bam*HI pelos sítios estrela, variando o tempo de reação. Atividade da enzima sobre os dois sítios estrela contidos no fragmento de 613 pares de base, em função do tempo de reação dado em minutos. A condição de estresse osmótico foi fornecido pela adição de 20% de glicerol ($\ln a_w = -0,022$). Os quadrados representam o sítio GGATCT e os círculos o sítio GGAACC.

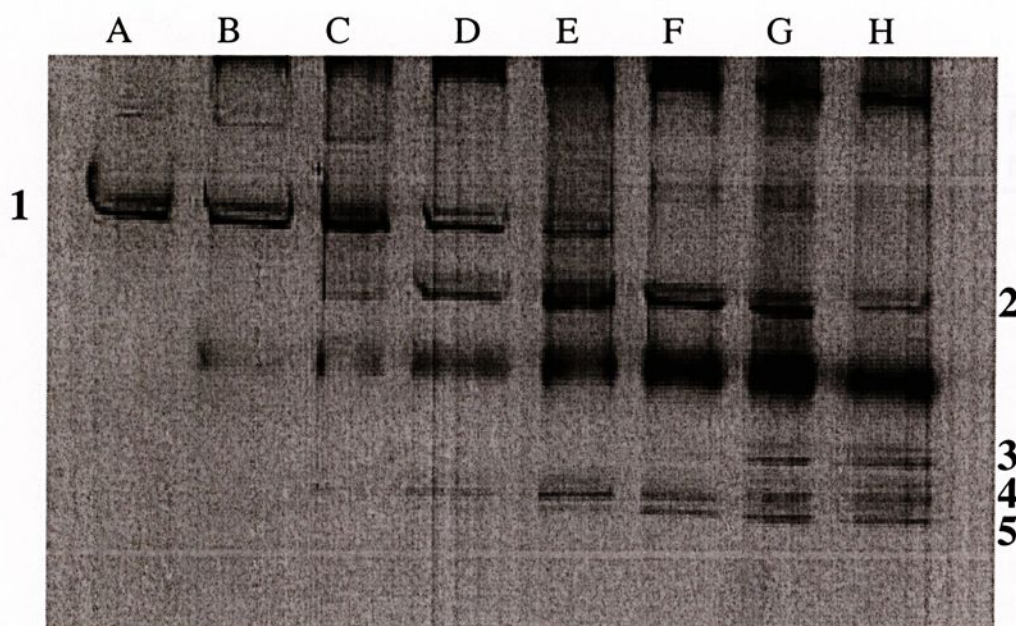


FIGURA 18A: Eletroforese em gel de poliacrilamida 9% mostrando a diferença de afinidade da enzima *Bam*HI por dois sítios estrela. Os dois sítios, GGATCT e GGAACC foram analisados pelo aumento da concentração de glicerol. A coluna (A) corresponde ao fragmento na ausência da enzima, (B) fragmento mais 10 U da enzima sem magnésio, (C) fragmento mais 10 U da enzima com 10 mM de acetato de magnésio, (D-H) idêntica ao C, entretanto contendo respectivamente 5, 10, 20, 30 e 40 % de glicerol. Reação enzimática por duas horas a 37° C, seguida de eletroforese durante 1,5 horas numa campo elétrico de 7 Volts/cm.

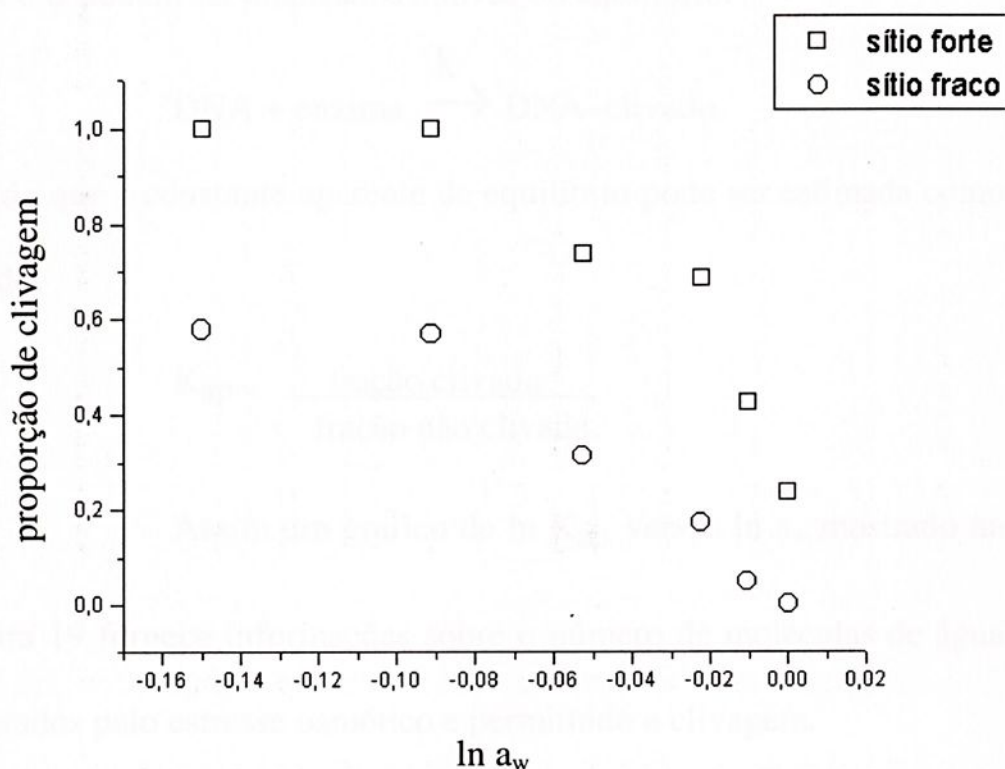
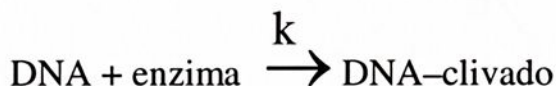


FIGURA 18B: Afinidade da *Bam*HI pelos sítios estrela, variando a atividade de água. Gráfico que relaciona a fração de clivagem do fragmento de 613 pares de base contendo os dois sítios estrela para a enzima *Bam*HI, versus a atividade da água em soluções de água-glicerol. Os quadrados representam o sítio GGATCT e os círculos o sítio GGAACC.

Os dados da clivagem dos dois sítios estrela das figuras 18A e B podem ser analisados através do equilíbrio:



Sendo que a constante aparente de equilíbrio pode ser estimada como sendo:

$$K_{ap} = \frac{\text{fração clivada}}{\text{fração não clivada}}$$

Assim um gráfico de $\ln K_{ap}$ versus $\ln a_w$ mostrado na figura 19 fornece informações sobre o número de moléculas de água liberados pelo estresse osmótico e permitindo a clivagem.

Existe uma relação direta entre a inclinação das retas apresentadas na figura 19 e o número de moléculas de água liberadas durante o estresse osmótico. No sítio GGATCT a inclinação da reta é de 55,2 enquanto que no sítio GGAACC esta inclinação cai praticamente pela metade (23,1). Isto evidencia que o número de moléculas de água liberadas no primeiro sítio é aproximadamente o dobro do segundo sítio, ou seja, cerca de 55 moléculas de água são liberadas da interface entre a *Bam*HI e o sítio GGATCT e aproximadamente 23 moléculas no sítio GGAACC.

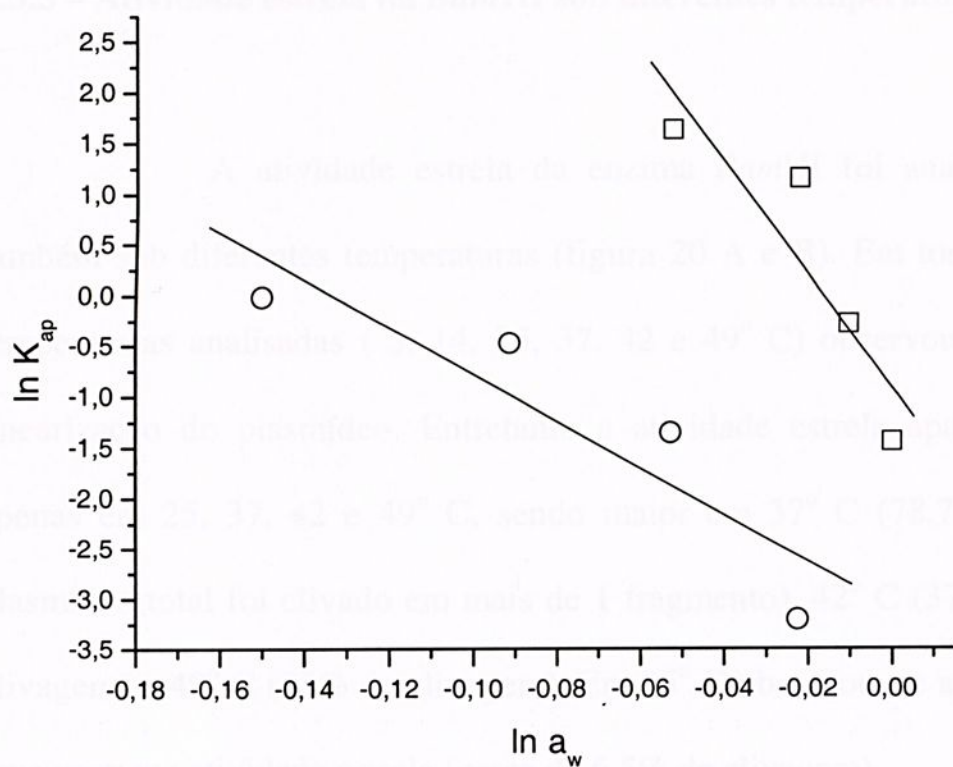


FIGURA 19: Gráfico de $\ln K_{ap}$ versus $\ln a_w$. Dados obtidos do gráfico da figura 18. Os quadrados representam o sítio GGATCT e os círculos o sítio GGAACC.

3.3.3 – Atividade estrela da *Bam*HI sob diferentes temperaturas

A atividade estrela da enzima *Bam*HI foi analisada também sob diferentes temperaturas (figura 20 A e B). Em todas as temperaturas analisadas (5, 14, 25, 37, 42 e 49° C) observou-se a linearização do plasmídeo. Entretanto a atividade estrela apareceu apenas em 25, 37, 42 e 49° C, sendo maior em 37° C (78,7% do plasmídeo total foi clivado em mais de 1 fragmento), 42° C (37% de clivagem) e 49° C (25% de clivagem). Em 25° C observou-se apenas uma pequena atividade estrela (cerca de 6,5% de clivagem).

Aumentos na temperatura do ensaio desidratam a dupla hélice, causando um efeito semelhante ao produzido pelo aumento na osmolaridade do meio.



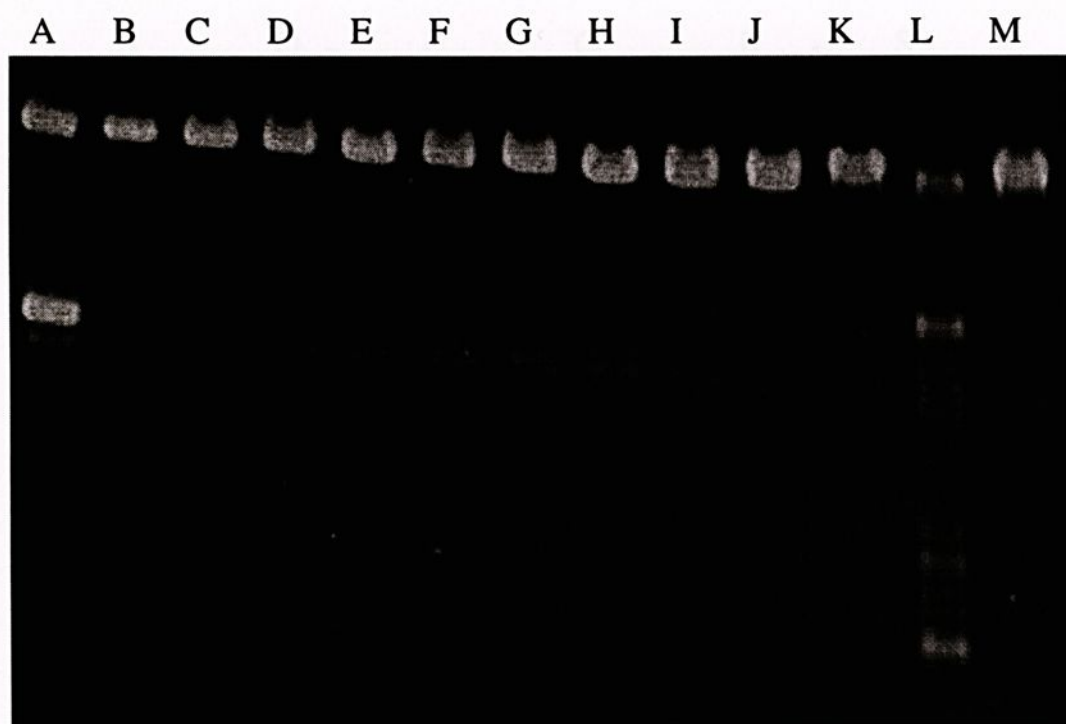


FIGURA 20A: Eletroforese em gel de agarose dos ensaios para atividade estrela da enzima *Bam*HI para o plasmídeo pUC18 sob diferentes temperaturas. O plasmídeo foi submetido à restrição sob condições fisiológicas, 30% de glicerol e 30% de sacarose respectivamente para cada temperatura testada. A coluna A corresponde ao pUC18 não clivado. Nas demais colunas as reações aconteceram em: BCD, 5° C; EFG, 14° C; HIJ, 25° C; KLM 37° C. O tempo de reação foi de 30 minutos.

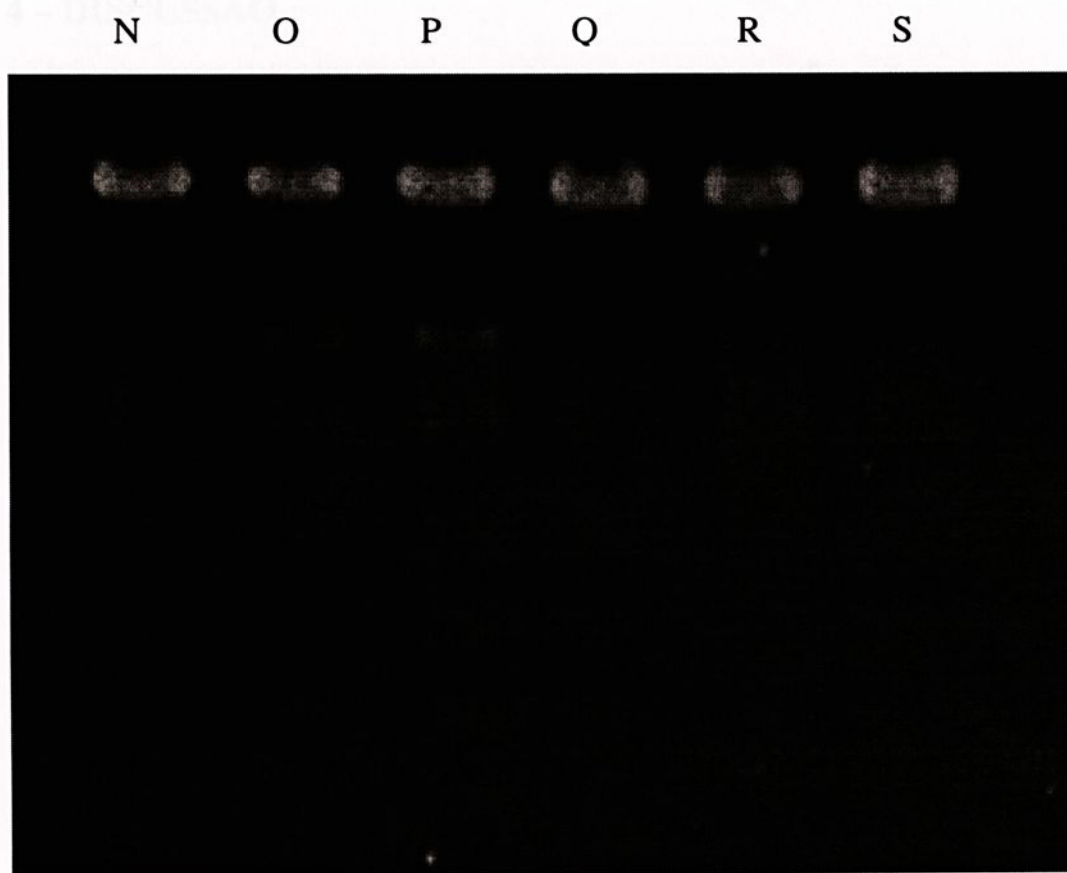


FIGURA 20B: A: Eletroforese em gel de agarose dos ensaios para atividade estrela da enzima *Bam*HI para o plasmídeo pUC18 sob diferentes temperaturas. O plasmídeo foi submetido à restrição sob condições fisiológicas, 30% de glicerol e 30% de sacarose respectivamente para cada temperatura testada. As colunas representam: NOP, 42° C e QRS, 49° C. O tempo de reação foi de 30 minutos.

4 – DISCUSSÃO

4.1 – Produção de super-hélice *in vivo*

Durante o processo de transcrição de um gene pela RNA polimerase, são formadas super-hélice positiva à frente e super-hélice negativa atrás do complexo (Wu et al, 1988 e Rahmouni e Well, 1992). Quanto menor for a taxa de elongação da cadeia de RNA, menor será a produção de super-hélice positiva (Tsao et al, 1989). Estes dois tipos de estruturas terciárias da dupla fita (positiva e negativa) podem ser controladas respectivamente pelas enzimas DNA girase (Menzel e Gellert, 1994) e DNA topoisomerase I (Wang, 1994, 1996). A inibição da girase leva a um aumento significativo de super-hélice positiva gerada pela transcrição (Wu et al, 1988). Experimentos de elongação da transcrição *in vitro*, realizados por Tsao, Wu e Lui (1989), na presença de topoisomerase I e na ausência de girase levam a produção de super-hélice altamente positiva. Estes fatos podem levar à reflexão sobre o motivo pelo qual as células ativas apresentam maior quantidade de super-hélice negativa, se comparado



à positiva. Uma resposta bastante coerente é de que a velocidade de reação é muito maior para relaxar super-hélice positiva que a observada para a topoisomerase I relaxar super-hélice negativa (Tsao et al, 1989 e Lilley et al, 1996). Reforçando este argumento, mutantes para a enzima topoisomerase I apresentam plasmídeos com alto nível de super-hélice negativa (Pruss e Drlica, 1986). Inibidores de girase ou mutantes do gene *gyr* tem uma redução no número de super-hélice negativa (Higgins, 1988).

Os resultados deste estudo indicam que incrementos na concentração de ampicilina resultam num aumento na produção de super-hélice positiva, induzida pela intercalação da cloroquina. Essa maior migração observada, tanto em condições fisiológicas como em condições de estresse osmótico, é o resultado de uma diminuição na quantidade de super-hélice negativa, possivelmente promovida pelo aumento na transcrição do gene da β -lactamase. A proposta deste trabalho pode ser confirmada pelo tratamento das culturas de bactérias com o ácido nalidíxico. Quando compara-se os dois resultados, verifica-se que em ambos os casos ocorre um aumento na migração dos topoisômeros, sendo que a migração foi maior quando o cultivo foi realizado na presença de 20% de sacarose.



Condições de estresse osmótico no meio de cultivo gera aumento na expressão do gene da β -lactamase (*amp^R*), culminando com um acréscimo no número de bactérias viáveis (Guerzoni, 1999).

O gene *amp^R* é constitutivo, isto é, não apresenta um sistema de controle da transcrição que envolva proteínas reguladoras. Portanto o principal tipo de controle na transcrição pode estar ligado a topologia do DNA.

O aumento de super-hélice positiva em plasmídeos purificados de culturas realizadas sob estresse osmótico é resultado do aumento da transcrição do gene *amp^R*. Este aumento parece estar relacionado com o controle da produção das enzimas reguladoras de super-hélice (topoisomerase I e girase), ou pelo balanço na atividade de cada enzima.

Estudos de expressão gênica do gene que codifica para a enzima nitrogenase em cianobactérias, demonstrou um controle dependente das quantidades de girase e topoisomerase I celular. Nesse caso a regulação é dependente da presença ou ausência de oxigênio. Em condições aeróbicas o extrato da cultura perde a capacidade de produzir super-hélice (Page e Gallon, 1992). Também a transcrição

do gene *nifA*, cujo produto é um regulador positivo da transcrição da nitrogenase, é totalmente inibida quando utilizados inibidores da atividade de girase (Ratet et al, 1989), ou seja, a transcrição desse gene é dependente de super-hélice negativa.

4.2 – Produção de super-hélice *in vitro*

Os resultados da ligação do plasmídeo pela DNA ligase, na presença de co-solventes, revelaram claramente que em condições de estresse osmótico ocorre uma variação no número de voltas do plasmídeo (ΔLk), induzindo um relaxamento na super-hélice positiva, concomitantemente à redução no potencial químico da água. Variações na temperatura do ensaio também influenciam na conformação do DNA e portanto na migração dos topoisômeros, indicando que temperaturas menores aumentam ainda mais a geração de super-hélice nos plasmídeos.

Esses resultados estão em concordância com os encontrados por Lee, Mizusawa e Kakefuda (1981). Neste trabalho os autores sugerem que o grau de super-hélice pode ser afetado pela



desidratação da dupla-fita. A liberação de moléculas de água levaria ao subenrolamento da dupla hélice do DNA, bem como permitiria mudanças na eficiência e ou na especificidade de interações entre ligantes e DNA.

Alterações na temperatura do ensaio estariam diretamente relacionadas com o número de super-hélice, sendo que o número de topoisômeros é aumentado com a redução da temperatura. Estes dados estão em concordância com os encontrados por Depew e Wang (1975). Esses autores observaram aumento de super-hélice do plasmídeo com a diminuição da temperatura.

Os resultados obtidos evidenciam que a intercalação do brometo de etídio leva a um relaxamento na super-hélice positiva, com posterior adição de super-hélice negativa. A diminuição na atividade da água também foi diretamente proporcional ao subenrolamento gerado.

Quando a ligação do plasmídeo foi efetuada na presença de brometo de etídio, observou-se que, em situação de estresse osmótico é necessário, praticamente, o dobro da concentração de droga para atingir o mesmo efeito encontrado para condições fisiológicas. A produção de super-hélice positiva pela intercalação do



brometo de etídio é diminuída exatamente devido ao aumento de super-hélice negativa da dupla fita nos ensaios realizados sob estresse osmótico. Também sob estresse osmótico ocorre uma diminuição na intercalação do brometo de etídio ao DNA.

No relaxamento do pUC18 em tampão de ligação foi necessária uma relação de uma molécula de brometo de etídio à cada 50 pares de base do plasmídeo, considerando que nessas condições de ligação o plasmídeo apresenta + 3,5 voltas. Esta mesma reação sob estresse osmótico (20% sacarose), considerando que o plasmídeo apresenta + 2 voltas, necessita de uma molécula de etídio a cada 96 pares de base. Se a constante de ligação fosse a mesma nos dois ensaios, seria esperado que a inversão da super-hélice positiva para negativa acontecesse em 0,4 $\mu\text{g/ml}$ e não em 1,6 $\mu\text{g/ml}$ como observado. Esses resultados indicam que a constante de ligação do brometo de etídio ao DNA sob estresse osmótico é 4 vezes menor se comparado a realizada em tampão de ligação.

A constante de ligação sob estresse osmótico observada neste estudo é da mesma ordem de grandeza da calculada por Varani et al (1987), utilizando a mesma concentração de etanol.



4.3 – Interação entre *Bam*HI e o pUC18

Endonucleases de restrição do tipo II apresentam a capacidade de reconhecer e ligar-se a uma sequência específica de quatro a seis pares de base na molécula do DNA. Esta classe de enzimas necessita de íons bivalentes, como por exemplo Mn^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , Ca^{++} e principalmente Mg^{++} (Vipond e Halford, 1995 e Vipond, Baldwin e Halford, 1995), como cofator para a reação de clivagem. O mecanismo de reconhecimento do sítio e clivagem pelas endonucleases já foi bastante estudado, e alguns modelos foram sugeridos para *Eco*RI e *Eco*RV (Jeltsch *et al*, 1993, 1995; Kostrewa e Winkler, 1995; Stöver *et al*, 1993; McClarin, *et al* 1986); *Fok*I (Wah *et al*, 1997 e 1998) e para *Bam*HI (Newman, *et al* 1995; Viadiu e Aggarwal, 1998). Com exceção da enzima *Fok*I, cuja região de clivagem está localizada distante do sítio de reconhecimento (Wa, 1998) as demais enzimas apresentam mecanismos semelhante no reconhecimento e catálise. Normalmente estas enzimas apresentam-se como homodímeros (Hensley *et al* 1990).



O sítio canônico para a enzima *Bam*HI é representado na figura 21, sendo que cada subunidade da enzima reconhece e corta um dos lados da seqüência (AGG).



FIGURA 21: Seqüência canônica reconhecida pela enzima de restrição *Bam*HI. Os números e as letras que aparecem na linha superior indica a posição de cada nucleotídeo com relação ao centro do sítio. As setas ($\uparrow\downarrow$) indicam os pontos de clivagem promovidos pela enzima.

A enzima *Bam*HI é um dímero constituído por uma subunidade L e outra R. A interação entre as subunidades e o seu respectivo sítio canônico (GGATCC) é mantida por um número muito grande de pontes de hidrogênio entre os seus aminoácidos e os nucleotídeos. Duas dessas pontes são feitas diretamente entre o

aminoácido Arg 155 e G 3. O resíduo de Asp 154 faz uma ponte com a C 2 e uma com C 3 e o resíduo de Asn 116 faz uma ponte com T 1 e uma outra com G 2. Os aminoácidos Asn 116 e Arg 122 combinam com uma rede de moléculas de água que mediam pontes de hidrogênio com A 1 (duas pontes) e G 2 (uma ponte). Todas as ligações citadas anteriormente aparecem duas vezes, já que ocorrem entre as subunidades L e R, com o sulco maior do DNA. Um número menor de ligações (apenas três pontes de hidrogênio) ocorrem entre o sulco menor do DNA e os aminoácidos, sendo entre a Asp 186 e G 2, Gli 197 e C 2 e entre a Met 198 e T 1. Outras pontes ocorrem entre o esqueleto açúcar-fosfato do DNA e os aminoácidos Asp 94, Glu 111 e Glu 113 (Newman et al 1995). O modelo da interação de um desses monômeros à metade do sítio canônico é mostrado na figura 22.



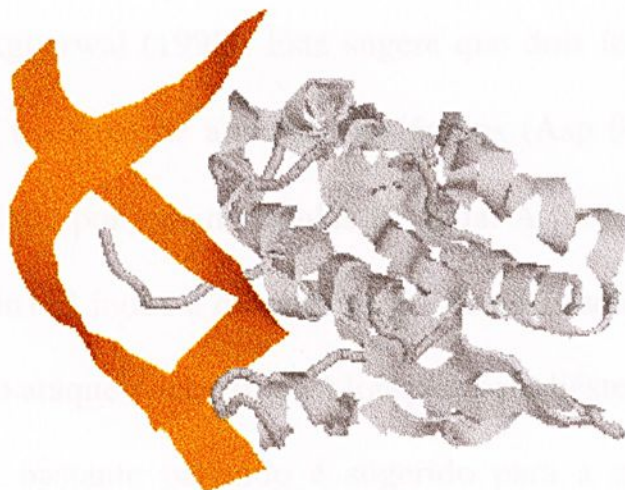


FIGURA 22: Interação entre uma subunidade da enzima *Bam*HI e o seu sítio canônico do DNA. Pontes de hidrogênio são estabelecidas principalmente com sulco maior do DNA, entretanto uma sequência do N-terminal faz contatos com o sulco menor. Figura disponível em: <http://www.pdb.bu.edu/>

A atividade dessas enzimas é dependente de íons divalentes (Jeltsch. et al, 1995 e Stöver, 1993). Um modelo bastante interessante para explicar a atividade catalítica da *Bam*HI foi sugerido por Viadiu e Aggarwal (1998). Este sugere que dois íons bivalentes interagem com resíduos de aminoácidos ácidos (Asp 94, Glu 111 e Glu 113), mediado por três moléculas de água. A presença do metal bivalente no Glu113 induz a desprotonação de uma molécula de água e esta provoca o ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster, rompendo-a. Um sistema bastante parecido é sugerido para a clivagem pela enzima *Eco*RV do seu sítio canônico (Vipond e Halford, 1995 e Vipond, Baldwin e Halford, 1995).

Em ambos os casos ocorre a participação efetiva de um grande número de moléculas de água no mecanismo de reconhecimento e clivagem do DNA pela enzima. Alterações na camada de solvatação que envolve os ácidos nucléicos podem modificar essa interação entre proteínas e DNA.

Os nossos resultados indicam uma forte evidência de que alterações que diminuem a atividade da água, como osmolaridade e temperatura, interferem no reconhecimento específico aminoácido-nucleotídeos.



O efeito estrela, encontrado nas enzimas de restrição do tipo II, é caracterizado pela diminuição da especificidade no reconhecimento do DNA pela enzima. Numa série de trabalhos, Robinson e Sligar. (1993, 1994, 1995 e 1996), mostraram que a osmolaridade do meio influencia diretamente no reconhecimento pela enzima do seu sítio específico. Nestes trabalhos os pesquisadores observaram que as enzimas de restrição *EcoRI*, *BamHI*, *PvuII* e a recombinase *Hin* passam a reconhecer outras regiões do DNA, quando aumenta a pressão osmótica no meio. Isto levaria a uma liberação de moléculas de água que controlam a especificidade do reconhecimento. Como resultado da liberação destas moléculas de água a enzima passa a reconhecer os sítios estrela. O principal argumento destes pesquisadores para esta afirmativa é o de que seus resultados indicam que uma elevação na pressão hidrostática reverte o efeito da pressão osmótica. Nenhuma outra propriedade do co-solvente, como viscosidade ou constante dielétrica, seria suficiente para explicar o efeito estrela. O aumento na osmolaridade provocaria uma diminuição na afinidade de clivagem da enzima pelo sítio canônico e um aumento pelo sítio estrela.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que a diminuição na atividade da água induz uma redução na reação enzimática, referente ao sítio canônico.

A enzima *Bam*HI pode reconhecer pelo menos 4 novos sítios estrela (GGAACC, GGCTCC, GAATCC ou GGATCN, onde N pode ser qualquer um dos três outros nucleotídeos). Neste trabalho observamos que a afinidade por dois destes sítios (GGATCT e GGAACC) é diferenciada pela enzima. A substituição de uma pirimidina por outra (C por T), localizada na extremidade do sítio, permite um maior grau de reconhecimento do DNA pela enzima, quando comparamos com a troca de uma pirimidina por uma purina (T por A), localizada no centro do sítio de reconhecimento.

As moléculas de água existentes entre a interface das bases nitrogenadas e a proteína, é que fornece a especificidade no reconhecimento e na clivagem das ligações fosfodiéster (Robinson e Sligar, 1993, 1994, 1995).

Essas moléculas de água que estão participando da ligação entre DNA e proteínas não são acessíveis ao solvente (Sidorova e Rau, 1996 e 2000). Esses autores sugerem que durante a interação entre a enzima *Eco*RI e o sítio canônico do DNA, em



situação de estresse osmótico, ocorre uma exclusão do soluto entre os dois, permitindo uma interação direta, sem soluto e sem água entre o DNA e a proteína. Com o sítio estreito também ocorre a exclusão do soluto, entretanto nesse tipo de interação é mantida uma grande quantidade de água na interface entre DNA-proteína.

Quando aparece na sequência de bases uma purina.purina / pirimidina.pirimidina, o número de torção é alto ($20 - 30^\circ$) se comparado à outras sequências ($10 - 20^\circ$). Nesta situação a rolagem é negativa e portanto aberto para o sulco maior. Quando a sequência é purina / pirimidina (GC/GC, AT/AT, GT/AC ou AC/GT) a rolagem é -20 e o deslizamento é zero, ou a rolagem é zero e o deslizamento é negativo. O ângulo formado pela torção diminui de 36 para 28° , sendo que a rolagem fica positivo e o deslizamento $+2$. Isso abre o sulco menor e consequentemente fecha o maior.

A sequência purina.pirimidina (A.T) do sítio canônico apresenta deslizamento e rolagem negativos, favorecendo a abertura do sulco maior e aumentando o reconhecimento. Sob condições de estresse osmótico ocorre a liberação de moléculas de água, diminuindo o ângulo de torção e favorecendo um deslizamento e rolagem positivos. Isto provocaria uma abertura do sulco menor e a



conformação dessa região seria próxima da forma de DNA-A. É importante notar que experimentos de recircularização de plasmídeos sob pressão hidrostática, mostraram que o aumento de pressão induz efeito oposto ao do estresse osmótico na super-hélice de DNA (Tang et al, 1998). Dessa forma a diminuição do reconhecimento do sítio canônico sob estresse osmótico pode não ser devido às moléculas de água liberadas, mas à alteração da conformação do DNA.

Para o sítio estrela forte (GGATCT), observamos a substituição da C3 por uma T, levando a perda de um grupo amina da citosina que faz ponte com o resíduo de asparagina 158. As forças de empilhamento do par TC.GA é de aproximadamente 1,5 Kcal/mol, sendo mais estável que CC.GG, o que pode facilitar ainda a abertura do sulco maior.

Para o sítio estrela fraco, onde ocorre a substituição da T1 por uma A, diminui o reconhecimento no sulco menor devido a não formação da ponte entre o resíduo de metionina e a T1 no sulco menor. Além disso formaria uma ponte extra entre a amida da A1_D e a carboxila da metionina. Essa ponte extra impediria a formação de kink e minimizaria o reconhecimento do sulco maior.



5 – CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o nível de super-hélice sofre influência direta das condições ambientais, bem como da expressão de determinados genes.

A diminuição da super-hélice negativa observada *in vivo* é consequência do aumento da transcrição do gene Amp^R, talvez associado com uma diminuição na produção e ou atividade da DNA girase, induzidos pelo estresse osmótico.

Os resultados *in vitro* sugerem que a diminuição na quantidade de super-hélice positiva estaria diretamente relacionada com a atividade de água. Aumento de osmolaridade do meio provoca a liberação de moléculas de água da dupla fita de DNA. Esta liberação da água induz mudanças estruturais caracterizadas pela redução no ângulo de torção, e conseqüente aumento na repetição helicoidal, uma transição à conformação A.

O reconhecimento específico existente entre o sítio canônico e a enzima é sensivelmente prejudicado pela alteração na conformação da molécula do DNA quando submetido à estresse osmótico.



O reconhecimento das seqüências de bases dos dois sítios estrela analisados é fornecido por esta flutuação conformacional. Além disso a liberação de moléculas de água aumenta a clivagem a estes sítios, sendo que este número é diretamente proporcional à eficiência de clivagem.

A troca da A1 por uma timina (sítio estrela fraco) provocaria uma diminuição na especificidade de reconhecimento pela enzima, pois pelo menos uma ponte de hidrogênio direta e duas indiretas estariam sendo afetadas. Uma abertura do sulco maior facilitaria a interação aos grupos doadores e aceptores do sítio forte. No sulco menor ocorreria um estreitamento, dificultando ainda mais a interação da enzima.



6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. L. P., KNOWLER, J. T., LEADER, D. P. *The biochemistry of the nucleic acid*. London: Chapman, Hall, 1992.

675p.

ANDERSON, P., BAUER, W. Supercoiling in closed circular DNA: Dependence Upon Ion Type and Concentration. *Biochemistry*, 17(4), p 594–600, 1978.

BAILEY, S., GRAVES, RR., MARSCH, G. Influence of DNA base sequence on the binding energetics of actinomycin D. *Biochemistry*, v. 32, p. 5881–5887, 1993.

BATES, A D.& MAXWELL, A, *DNA topology*. New York: IRL Press. In Focus, 1993. 114p.



BALDWIN, G. S., VIPOND, E. B., HALFORD, S. E.. Rapid reaction analysis of the catalytic cycle of the *EcoRV* restriction endonuclease. *Biochemistry*, v.34, p. 705–714, 1995.

BEDNAR, J., FURRER, P., STASIAK, A., DUBOCHET, J. EGELMAN, EH. & BATES, AD. The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during couterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. *J. Mol. Biol*, v. 235, p. 825–847, 1994.

BOROWIEC, J. A., GRALLA, D. J. All Three Elements of the *lac* p^s Promoter Mediant is Transcriptional Response to DNA Supercoiling. *J. Mol. Biol*, v. 195, p. 89 – 97, 1987.

CALLADINE, C. R., DREW, H. R. *Understanding DNA*. 2. ed. San Diego: Academic Press 1997. 283p

DEPEW, R. E., WANG, J. C. Conformational flutuation of DNA helix. *Proc. Nat. Acad. Sci.* v. 2, (11), p. 4275–4279. 1975



DORMAN, C. J. DNA Topology and the global control of bacterial gene Expression: Implications for the regulation of virulence gene expression. *Microbiology*, v. 141, p. 1271 – 1280, 1995.

DRLICA, K. The biology of bacterial DNA supercoiling. *Microbiol Review*, v. 48, p. 273–289, 1984.

FELSENFELD, G. DNA: the genetic material's double helix, the fundamental molecule of life, is variable and flexible. It interacts with regulatory proteins and other molecules to transfer hereditary message. *Sci American*, v. 253(4), p. 58–67, 1985.

FULLER, F. B. The writhing number of a space curve. *Proc. Nat. Acad. Sci.* v. 68, p. 815–819. 1971.

GARRET, R. H., GRISHAM, C. M. *Biochemistry*. New York: Saunders College Publishing, p. 550, 1995.



GOLDSTEIN, E., DRLICA, K. Regulation of bacterial DNA supercoiling: Plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 1984, 81, p 4046–4050.

GUERZONI, A. L. *Regulação da expressão do gene Amp^R induzida por osmólitos*. São José do Rio Preto, 1999. 65p. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

HENSLEY, P., NARDONE, G., CHIRIKJIAN, J. G., WASTNEY, M. E. The Time-resolved Kinetics of Super helical DNA Cleavage by BamHI Restriction Endonuclease. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 15300 – 15, 1990.

HIGGINS, C. F., DORMAN, C. J., STIRLING, D. A., WADDELL, L., BOOTH, I. R., MAY, G., BREMER, E. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell*, v. 52, p. 569–584. 1988.



JELTSCH, A., ALVES, J., WOLFES, H., MAASS, G., PINGOUD, A. Substrate-assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 8499–8503, 1993.

JELTSCH, A., ALVES, J., URBANKE, C., MAASS, G., ECKSTEIN, H., LIANSHAN, Z., BAYER, E., PINGOUD, A. A Dodecapeptide Comprising the Extended Chain-04 Region of the Restriction Endonuclease *EcoRI* Specifically Binds to the *EcoRI* Recognition Site. *J. Biol. Chem.* v. 90, p. 5122 – 29. 1995.

JELTSCH, A., MASCHKE, H., SELENT, U. WENZ, C., KÖHLER, E., CONNOLLY, B. A., THOROGOOD, H., PINGOUD, A. DNA binding specificity of *EcoRV* restriction endonuclease is increased by Mg^{+2} binding to a metal ion binding site distinct from the catalytic center of the enzyme. *Biochemistry*, v. 34, p. 6239–6246, 1995.



JOHNSON, P. F., McKIGHT, S. L. Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins. *Ann. Rev. of Biochemistry*, v. 58, p. 793, 1989.

KELLER, W. Determination of the number of superhelical turns simian virus 40 DNA by gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 72, p. 4876 – 4880, 1975.

KORNBERG, A., BAKER, T. A. *DNA replication*. 2. ed. New York: W. H. Freeman and Company. p.931, 1992.

KOSTREWA, D., WINKLER, FK. Mg^{2+} binding to the active site of *EcoRV* Endonuclease: A crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2 Å resolution. *Biochemistry*, v. 34, p. 683–696, 1995.

KRAJEWASKA, W. M. Regulation of transcription in Eukaryotes by DNA- Binding proteins. *J. Biochem.* v. 24 (12), p. 1885 – 1898, 1992.

LEE, C-H., MIZUSAWA, H., KAKEFUDA, T. Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 78, p.2838–2842, 1981.

LIDE, D. R., FREDERIKSE, H. P. R. *Handbook of chemistr and Phisics.* 78^a ed. editora CRC, p. 2496, 1997.

LILLEY, L., CHEN, D., BOWATER, RP. DNA supercoiling and transcription: topological coupling of promoters. *Quart. Rev.of Biophys*, v. 29(3), p. 203–225, 1996.

MCCLARIN, J. A., FREDERICK, C. A., WANG, B-C., GREENE, P., BOYER, H. W., GRABLE, J., ROSENBERG, J. M. Struture.of The DNA-Eco RI Endonuclease Recognition Complex at 3 Å Resolution. *Science* v. 234, p. 1526–41, 1986.

MENZEL, R., GELLERT, M. Regulation of the genes for *E. coli*

DNA gyrase: Homeostatic control of supercoiling. *Cell*, v. 34, p.

105–113, 1983.

MENZEL, R, GELLERT, M. *The Biochemistry and Biology of DNA*

Girase. DNA Topoisomerase : Biochemistry and Molecular

Biology. Edited by Leroy Liu. Ed. Academic Press inc., p. 39–

61, 1994.

NARDONE, G., WASTNEY, M. E., HENSLEY, P.. DNA structural

Polymorphism modulates the kinetics of superhelical DNA

cleavage by *Bam*HI restriction endonuclease. *J. Biol. Chem.*,

v.265 (25), p. 15308–15315, 1990.

NEWMAN, M., STRZELECKA, T., DONER, L. F., HILDKRAUT, I.,

AGGARWAL, .A. K. Structure of Bam Hi Endonuclease Bound

to DNA: Partial Folding and Unfolding on DNA Binding.

Science v. 269, p. 656–64, 1995.



PAGE, T. S., GALLON, J. R. DNA topoisomerases in *gloeotheca* (*Nageli*) sp ATCC 27152: a role in N_2 fixation? *New Phytol.* v. 121, p. 33 – 42. 1992.

PRINCE, W. S., VILLAREJO, M. R. Osmotic control of proU transcription is mediated through direct action of potassium glutamate on the transcription complex. *J. Biol. Chem.* v. 265(29), p. 17673–17679, 1990.

PRUSS, GJ., DRLICA, K. Topoisomerase I mutants: The gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc. Nat. Acad. Sci Proc. Nat. Acad. Sci*, v. 83, p. 8952–8956, 1986.

PTASHNE, M. How gene activators work. *Scient. Amer.*, p. 25–31, 1989.

RAHMOUNI, A. R., WELLS, RD., Direct Evidence for the Effect of Transcription on Local DNA Supercoiling *in vivo*. *J. Mol. Biol.* v. 223, p. 131 – 144, 1992.



RATET, P., PAWLOWSKI, K., SCHELL, J., BRUIJN, F. J. The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen-fixation regulatory gene *nifA* is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. *Mol. Microbiol.*, 3(6), p. 825–838, 1989.

RYBENKOV, V. V., VOLOGODSKII, V. A., COZZARELLI, N. R.. The effect of ionic conditions on DNA helical repeat, effective diameter and free energy of supercoiling. *Nucleic Acid. Res.*, v. 25(7), p. 1412–1418, 1997.

ROBINSON, R. C., SLIGAR, S. G. Molecular Recognition Mediated by Bound Water a Mechanism for Star Activity of the Restriction Endonuclease *EcoRI*. *J. Mol. Biol.*, v.234, p. 302–6, 1993.

ROBINSON, C. R., SLIGAR, S. G. Mediation of Molecular Recognition in Protein–DNA Complex by Bound Water: A Mechanism for “Star Activity” of Restriction Endonucleases. *J. Biophys.*, p. 66: A34. 1994.



ROBINSON, C. R., SLIGAR, S. G. Heterogeneity in Molecular Recognition by Restriction Endonucleases: Osmotic and Hidrostatic Pressure Effects on *BamHI*, *PvuII* and *EcoRV* Specificity. *Biochemistry*: v. 92, p. 3444–8. 1995.

ROBINSON, C. R., SLIGAR, S. G. Participation of Water in Hin Recombinase – DNA Recognition. *Protein Science*, v. 5, p. 2119–24, 1996.

SAENGER, W. *Principles of nucleic acid structure* Boston: Springer–Verlag. p. 556, 1984.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular cloning – A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press. 1989.

SCOVELL, WM. Supercoiled DNA. *J. of Chem. Educ.*, 63 (7), p. 562–565, 1986.



SIDOROVA, N., RAU, D. C. Differences in water release for the binding of *EcoRI* to specific and nonspecific DNA sequences.

Proc. Natl. Acad. Sci, v. 93, p. 12272–12277, 1996.

SIDOROVA, N., RAU, D. C. The dissociation rate of the *EcoRI*-DNA-specific complex is linked to water activity. *Biopolymers*, v. 53, p. 363-368, 2000.

SHURE, M., VINOGRAD, J. The number of superhelical turns in native virion SV40 DNA and minicol DNA determined by the band counting method. *Cell*, v. 8, p. 215–226, 1976.

SINDEN, R. R. *DNA structure and function*. San Diego: Academic Press, p. 398, 1994.

SNYDER, JC., HARTMAN, NG., D'ESTANTOIT, BL., KENNARDM O., REMETA, DP., BRESLAUUER, KJ. Binding of the actinomycin D to DNA: evidence for a non classical high-affinity binding mode that does not require GpC sites. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 86: 3968–3972, 1989.



STEITZ, T. A. *Structural studies of protein–nucleic acid interaction.*

New York: Cambridge University Press, p. 79, 1993.

STÖVER, T., KÖHLER, E. , FAGIN, U., WENDE, W., WOLFES,

PINGOUD, A. Determination of DNA Bend Angle Induced by the Restriction Endo – clease EcoRI in the Presence of Mg^{++} . *J. Biol. Chem.* p 268–12 e 8645–50, 1993.

SUNDARALINGAM, M. in KORNBERG, A., BAKER, T. A. *DNA*

replication. 2. ed. New York: W. H. Freeman and Company. p.931, 1992.

TANG, G-Q, TANAKA, N., KUNUGI, S. *In vitro* increases in

Plasmid DNA supercoiling by hydrostatic pressure. *Bioch. Et Bioph. Acta*,v. 1443, p. 364–368, 1998.

TAYLOR, J. D., BADCOE, I. G., CLARKE, A. R., HALFORD, S. E.

EcoRV restriction endonuclease binds all DNA sequences with Equal affinity. *Biochemistry*, 30, p 8743–53, 1991.



TRAVERS, AA. DNA conformation and protein binding. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 58, p. 427–452, 1989.

TSAO, Y-P., WU, H.-T., LUI, L. Transcription–Driver surcoiling of DNA: Direct Biochemical Evidence from in Vitro studies. *Cell*, v. 56, p. 111 – 118, 1989.

TSE–DINH, Y. Regulation of the Escherichia coli DNA Topoisomerase I Gene by supercoiling. *Nucl. Ac. Res.*, v. 13 p. 4751–4763. 1985.

VARANI, G., DELLA TORRE, L, BALDINI, G. Nonspecific interactions in dye binding to DNA influence of alcohol and amides. *Biophys. Chem.*, v. 28, p. 175–181, 1987.

VIADIU, H., AGGARWAL, A. K., The role of metals in catalysis the restrction endonuclease BamHI. *Nature struc.biology* p. 910 – 6, 1998.



VIPOND, I. B. & HALFOLD S. E. Specific DNA recognition by

EcoRV restriction Endo nuclease induced by calcium ions.

Biochemistry, v. 34 p 1113 – 1119, 1995.

VIPOND, I. B., BALDWIN, G. S., HALFOLD S. E. Divalent metal

ions at the active sites of the *EcoRV* and *EcoRI* restriction endo

nuclease. *Biochemistry* v. 34 p. 697 – 704, 1995.

WAH, D. A., HIRSCH, J. A., DORNER, L. F. SCHILDKRAUT, I.

AGGARWAL A. K., Structure of the multimodular

endonuclease *Fok I* bound to DNA. *Nature* v. 388 p. 97–100,

1997.

WAH, D. A., BITINAITE, J., SCHILDKRAUT, I., AGGARWAL,

K., Structure of *FokI* has implications for DNA cleavage. *Proc.*

Natl. Acad. Sci, v. 95, p. 10564–69. 1998.

WANG, J.C. DNA topoisomerases. *Scientific American*, v. 247, p. 84,

1982.

WANG, JC. DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem*, v. 54, p. 665, 1985.

WANG, JC. Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim. et Biophys. Acta*, v. 990, p. 1–11. 1987.

WANG, Z., HARSEY, Crucial role for DNA supercoiling in Um transposition: A kinetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 91, p. 699 – 703, 1994.

WANG, J. C. DNA Topoisomerases as Targets of herapeutics: DNA Topoisomerase : Biochem and Mol. Biol. Ed. Academic Press inc., p. 1–14, 1994.

WANG, JC. DNA Topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem*, v. 65, p. 635–692, 1996.

WATSON, JD., CRICK, FH. A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature*, v. 171, p. 373, 1953.

WU, H-Y., SHYY, S. , WANG, J. C., LIU, L. F. Transcription generates Positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, v. 53, p. 433 – 440, 1988.

WU, P., .SCHURR, J. M. Effects of chloroquine on the torsional dynamics And rigidities of linear and supercoiled DNAs at low ionic strength. *Biopolymers*, v. 28 p. 1695 – 1703, 1989.

YANCEY, P. H., CLARK, S. C., BOWLUS, R. D., SOMERO, G. N. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, v. 217 p. 1214 – 1222, 1982.



7 – RESUMO

Neste trabalho foi estimada a influência do estresse osmótico na topologia do DNA e no reconhecimento molecular da sequência de restrição pela endonuclease *Bam*HI. As alterações na topologia do DNA foram monitoradas através de mudanças na mobilidade e no número de voltas completas de plasmídeos. Nos experimentos *in vivo*, cepas de *E. coli* HB101 transformadas com o plasmídeo pUC18, que contém o gene de resistência a ampicilina *amp*^R, foram crescidas sob estresse osmótico e em diferentes concentrações de ampicilina. O plasmídeo extraído dessas culturas mostrou que o efeito do estresse osmótico é de induzir super-hélice positiva. O mesmo efeito é observado quando diferentes concentrações de ácido nalidíxico, um inibidor da DNA girase, é adicionado a cultura. Esses resultados sugerem que a atividade enzimática da DNA girase é reduzida sob estresse osmótico. Experimentos *in vitro* de circularização do plasmídeos (pUC18) linearizados ou relaxados pela T4 DNA ligase, na presença de solutos neutros, mostrou que a redução na atividade da água induz subenrolamento da dupla hélice. Este efeito foi confirmado por experimentos de circularização na presença de brometo de etídio.



A conformação do DNA resultante assemelha-se a forma A. Experimentos de clivagem do fragmento pUC18/*Pvu*II contendo o sítio canônico para a *Bam*HI e o fragmento *Fok*I que contém dois sítios não canônicos ou atividade estrela, mostrou que a atividade dessas enzimas é altamente dependente do estresse osmótico. A redução da atividade da água diminui o reconhecimento da enzima pelo sítio canônico e aumenta o reconhecimento dos sítios estrela. Os resultados obtidos sugerem que uma conformação semelhante a forma A, assumida pelo DNA sob estresse osmótico é responsável pela perda da especificidade da enzima para o sítio canônico. Isto acontece provavelmente devido a mudanças na topologia do sulco (estreitamento do maior e alargamento do menor), os quais pode diminuir o reconhecimento do sulco maior.

8 – ABSTRACT

In this work the influence of the osmotic stress on the DNA topology and on the molecular recognition of restriction sequences by the endonuclease BamHI was estimated. The alterations on the DNA topology were monitored through the changes in the electrophoretic mobility, and in the plasmids linking number.

In *in vivo* experiments, strains of *E. coli* HB101 transformed with pUC18 plasmid, containing the ampicilin resistance gene *amp^R*, were grown under osmotic stress and in different concentrations of ampicilin. The plasmids extracted from these cultures showed that the effect of osmotic stress is to induce positive super helix. The same effect was observed when different concentrations of nalidixic acid, an inhibitor of DNA girase, was added to the culture. These results suggest that the enzymatic activity of the DNA girase is reduced under osmotic stress.

In vitro experiments of circularization of linearized or relaxed plasmids, pUC18, by T4 DNA ligase, in the presence of neutral solutes, showed that the reduction of the water activity induces unwinding of the double helix. This effect was confirmed in



circularization experiments in the presence of ethidium bromide. The resulting DNA conformation is an A-like structure.

Experiments of clivage of the pUC18/PuvII fragment, containing the BamHI canonical site and the FokI fragment containing two non canonical or star activity, showing that the enzyme activity is highly dependent on the osmotic stress. The reduction of the water activity decreases the enzyme recognition to the canonical site while the recognition to the star sites is increased. The results presented suggest that the A-like DNA conformation assumed by the DNA under osmotic stress is responsible for the loss of specificity of the enzyme to the canonical site. This is probably due to the changes in the groove topology (narrowing of the major and broadening of the minor groove) which would decrease the recognition of the major groove.



