

CARINA OLIVEIRA LOPES KULISHEV

**PAPEL DA RESPOSTA SOS NO REPARO DE DANOS INDUZIDOS POR
MITOMICINA C E NA RESPOSTA AOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS
EM *Caulobacter crescentus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Microbiologia

Orientador: Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

KULISHEV, C. O. L. **Papel da resposta SOS no reparo de danos induzidos por mitomicina C e na resposta aos beta-lactâmicos em *Caulobacter crescentus***. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O sistema SOS é o principal paradigma de resposta celular a danos no DNA em procariotos. Este regulon controla a expressão de diversos genes, muitos envolvidos em mecanismos de reparo de DNA. O sistema SOS foi extensamente estudado em *Escherichia coli*, sendo que recentemente este regulon vem sendo caracterizado em outros organismos. Dentre eles, a *Caulobacter crescentus* vem emergindo como um modelo bacteriano alternativo interessante para o estudo de mecanismos de reparo de DNA e mutagênese. A caracterização de genes pertencentes ao sistema SOS em outros organismos demonstrou que as características da resposta SOS de *E. coli* não são universais. Recentemente, foram identificados em *C. crescentus* 37 genes pertencentes ao regulon SOS, sendo muitos de função desconhecida. O enfoque principal deste trabalho é aprofundar os estudos sobre a resposta SOS no modelo de *C. crescentus* e seu papel no reparo de DNA e mutagênese. Temos como objetivos específicos realizar uma análise funcional de alguns genes de função desconhecida regulados pela resposta SOS, e investigar os efeitos biológicos da indução deste regulon por antibióticos beta-lactâmicos em *C. crescentus*. Análises funcionais dos genes CC_3424 e CC_3467 mostraram que deleções nestes genes resultam em fenótipo de sensibilidade à mitomicina C (MMC). CC_3424 é conservado entre diferentes espécies bacterianas e a proteína codificada por este gene apresenta domínios de similaridade com glioxalases e dioxigenases. CC_3467 é conservado em várias alfa-proteobactérias, e possui similaridade com endonucleases. Os mecanismos de reparo de ligações cruzadas intercadeia (ICLs) no DNA podem ser dependentes de recombinação homóloga ou mediados pela via de Síntese Translesão (TLS). Ensaio de análise epistática mostraram que o gene CC_3424 não participa da mesma via que NER, TLS e recombinação homóloga na tolerância à MMC, enquanto que o gene CC_3467 atua na mesma via que NER e TLS no reparo destes danos. Acreditamos que o gene CC_3467 exerça função no reparo de ICLs, já que endonucleases são cruciais nestes mecanismos, e que CC_3424 atue detoxificando a MMC das células. Estudos dos efeitos biológicos da indução do sistema SOS por antibióticos beta-lactâmicos mostram que a cefalexina, um beta-lactâmico, induz este regulon em concentrações subinibitórias. Verificamos que cepas deficientes nos genes *oxyR*, *uvrA*, *dnaE2* e *dinB* são mais sensíveis a este antibiótico. Além disto, ensaios de mutagênese induzida por cefalexina mostraram que as cepas mutantes *mutM* e *mutY* apresentaram maior mutagênese após tratamento com cefalexina. Ensaio slot blot demonstraram que células tratadas com concentrações subinibitórias de cefalexina apresentam maior concentração de danos oxidativos do tipo 8-oxoguanina. Estes resultados demonstram que concentrações subinibitórias de cefalexina resultam em estresse oxidativo em *C. crescentus*, e que os danos 8-oxoguanina são as principais lesões formadas no DNA.

Palavras-chave: Resposta SOS. Mutagênese. *Caulobacter crescentus*. Mitomicina C. Beta-lactâmicos.

ABSTRACT

KULISHEV, C. O. L. **Role of the SOS response in the repair of damage induced by mitomycin C and in the response to beta-lactams in *Caulobacter crescentus***. 2014. 110 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The SOS response is the main paradigm for cellular responses to DNA damage in prokaryotes. This regulon controls the expression of several genes, many of which are involved in DNA repair mechanisms. The SOS response has been extensively studied in *Escherichia coli*, but recently it has also started to be better characterized in other organisms. *Caulobacter crescentus* has emerged as an interesting alternative bacterial model for DNA repair and mutagenesis studies. The characterization of SOS genes in other organisms has shown that *E. coli* SOS response characteristics are not universal. Recently, 37 genes composing the SOS regulon of *C. crescentus* have been identified and most of those encode proteins of unknown function. The main goal of this proposal is to obtain a better understanding about the SOS response in *C. crescentus* and its role in DNA repair and mutagenesis. As specific aims, we will undertake a functional analysis of some of the genes regulated by the SOS response, and will investigate the biological effects of the *sos* induction by beta-lactam antibiotics in *C. crescentus*. Functional analysis of the genes CC_3424 and CC_3467 showed that deletions in these genes result in a phenotype of sensitivity to mitomycin C. CC_3424 is conserved in several species of bacteria and has similarity to Glyoxalase e Dioxygenase proteins. CC_3467 is conserved in alpha-proteobacteria and has similarity to endonucleases. The mechanisms of interstrand crosslinks (ICLs) repair in the DNA are dependent on homologous recombination or Translesion Synthesis (TLS). Epistasis analysis showed that the gene CC_3424 does not participate in the same pathway as NER, TLS and homologous recombination in MMC tolerance, while CC_3467 gene functions in the repair of such damages together with TLS and NER pathways. We believe that the CC_3467 gene plays a role in the repair of ICLs, as endonucleases are crucial in these mechanisms, while CC_3424 acts in MMC cellular detoxification. Studies of biological effects of SOS induction by cephalexin (beta-lactam) showed that subinibitory concentrations of these antibiotics induce the SOS regulon. We also found that strains deficient in *oxyR*, *dnaE2*, *dinB* and *uvrA* genes are more sensitive to this antibiotic. In addition, mutagenesis experiments showed that subinibitory concentrations of cephalexin induced larger mutagenesis increases in *mutM* and *mutY* deficient mutants strains after treatment with this antibiotic. Slot blot assays showed that cells treated with subinibitory concentrations of cephalexin have higher concentrations of 8-oxoG oxidative damage compared with untreated cells, suggesting that this antibiotic induces the formation of these lesions in DNA of *C. crescentus*. Altogether, these results demonstrate that subinibitory concentrations of cephalexin leads to cellular oxidative stress in *C. crescentus* and the 8-oxoguanine damage is the major lesion formed in the DNA.

Keywords: SOS Response. Mutagenesis. *Caulobacter crescentus*. Mitomycin C. Beta-lactams.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Danos no DNA e vias de reparo e tolerância em bactérias

O DNA é uma importante molécula que mantém as informações genéticas celulares e, por isto, sua estabilidade e integridade são essenciais para a vida dos organismos. Os genomas celulares estão constantemente expostos a uma grande variedade de agentes endógenos e exógenos, que resultam em diferentes danos nas moléculas do DNA. Estes danos incluem, por exemplo, reações de desaminação, oxidação, alquilação e dimerização nas bases nucleotídicas, perda de bases, além de quebras simples ou duplas na molécula do DNA (TRUGLIO et al., 2006). Muitas destas lesões são extremamente deletérias para as células, e podem comprometer processos essenciais, como replicação e transcrição. Caso não sejam reparadas, muitas lesões podem levar a eventos mutagênicos ou citotóxicos (CLANCY, 2008). Para manter a integridade de seus genomas, os organismos desenvolveram diversos mecanismos de reparo de DNA capazes de lidar com diversas condições adversas (MILES; SANCAR, 1989). Além dos mecanismos de reparo de DNA responsáveis por remover os danos, as células também apresentam vias de tolerância ao dano que garantem a replicação do DNA quando as lesões não foram removidas (FRIEDBERG et al., 2006).

Nos próximos itens serão abordados alguns mecanismos de reparo e tolerância a danos no DNA, que serão importantes para o entendimento de vários aspectos abordados ao longo deste trabalho.

1.1.1 Agentes genotóxicos

Nesta seção serão abordados alguns aspectos relacionados aos agentes genotóxicos utilizados ao longo deste trabalho, são eles: luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mitomicina C (MMC) e metilmetanosulfonato (MMS). É importante ressaltar que as vias de induções de danos por estes compostos são muito complexas e, portanto, somente alguns pontos relevantes para o entendimento deste trabalho serão descritos.

A luz ultravioleta é um potente agente genotóxico e mutagênico, e quando absorvida diretamente pelo DNA, resulta em reações de dimerização entre bases pirimidinas adjacentes. Como consequência, dois danos principais são formados: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e, em menor grau, o fotoproduto 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP) (FRIEDBERG et al., 2006). A lesão CPD envolve a formação de ligação covalente entre os carbonos 5 e 6 de

bases pirimidinas adjacentes, originando um anel de ciclobutano. A lesão 6-4PP é caracterizada pela formação de uma ligação covalente entre pirimidinas adjacentes, entre os carbonos 4 e 6 (PFEIFER, 1997). As lesões do tipo CPD são cerca de 3 vezes mais frequentes que 6-4PP após exposição com luz UVC (FRIEDBERG et al., 2006). Além disto, lesões 6-4PP resultam em uma distorção na dupla hélice do DNA de 44° enquanto que lesões CPD distorcem a molécula somente 30° (KIM; CHOI, 1995; PARK et al., 2002). A sequência nucleotídica do DNA influencia na formação de ambas as lesões. Adutos do tipo CPD ocorrem com maior frequência entre T-T e menos frequentemente entre C-C (SETLOW; CARRIER, 1966), e danos 6,4PP ocorrem mais frequentemente entre T-C e C-C, e com menor frequência entre TT e CT (FRIEDBERG et al., 2006)

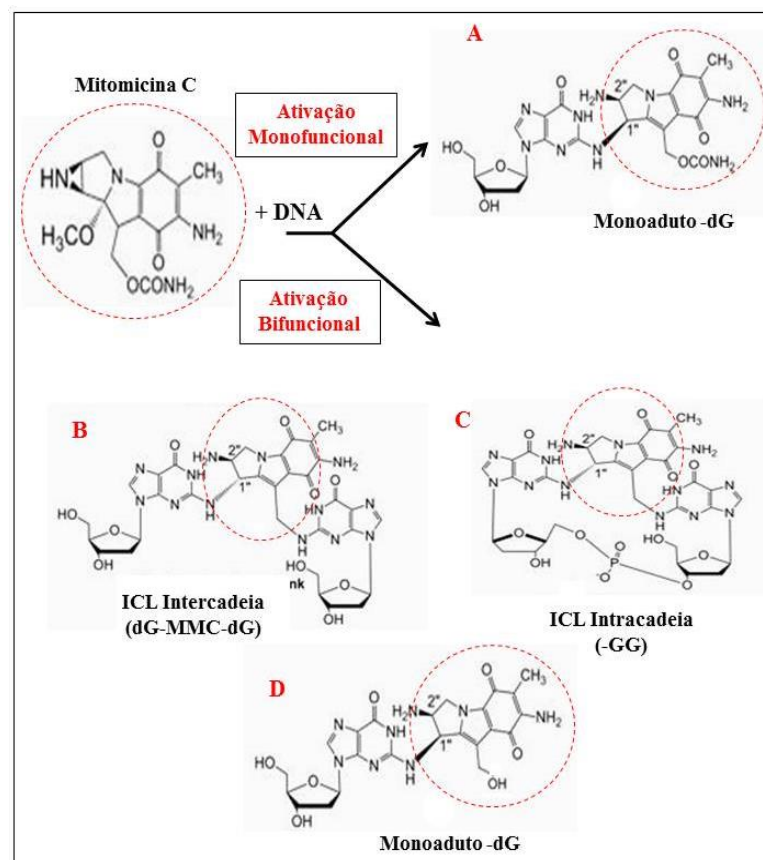
O metilmetanosulfonato é um composto alquilante monofuncional capaz de reagir covalentemente com um centro nucleofílico da molécula de DNA. Dentre os sítios que MMS modifica no DNA, podemos citar: posições N1, N3 e N7 da adenina e N3, N7 e O6 da guanina (FRIEDBERG et al., 2006). As modificações por este agente ocorrem mais frequentemente na guanina (N7) e adenina (N3), que resultam na formação de 7-metilguanina e 3-metiladenina, respectivamente (BERANEK, 1990).

O peróxido de hidrogênio é uma importante espécie química capaz de se difundir facilmente através das membranas celulares, e reagir com metais de transição (moléculas redutoras) através da reação de Fenton, formando o radical hidroxila (OH•). Os metais de transição mais relevantes envolvidos nesta reação são Cu^{1+} e Fe^{2+} (FRIEDBERG et al., 2006). Radicais OH• são extremamente reativos e resultam principalmente na retirada de átomos de hidrogênio do açúcar desoxirribose e adição de ligações insaturadas em bases nucleotídicas. Este agente pode resultar em severos danos à molécula de DNA, que incluem, por exemplo, quebras nas fitas do DNA e perda de bases (HALLIWELL, 1999).

A mitomicina C (MMC) é um antibiótico antitumoral isolado de *Streptomyces caespitosus* utilizado como tratamento quimioterápico contra diversas enfermidades, incluindo tumor gastrointestinal, câncer pancreático, gástrico, colo-retal e anal (HOFHEINZ et al., 2008). A forma intacta da molécula de MMC não é capaz de reagir e resultar em danos no DNA, para isto, estas moléculas devem passar por reações espontâneas que garantem a conversão desta molécula para forma alquilante, ativa e lesiva ao DNA. Esta conversão envolve reações de modificações enzimáticas ou reduções químicas alquilantes no grupo quinona desta molécula, e culmina com a formação de uma instável molécula alquilante altamente reativa. A forma alquilada da MMC atua preferencialmente nos resíduos 2-deoxiguanosina (dG) no sulco menor da hélice do DNA. O ataque desta molécula no DNA

pode ser mediado por uma ou duas reações de alquilação, e isto é determinante para o tipo de dano formado no DNA (Figura 1). A ocorrência de somente uma ativação alquilante resulta na formação de danos do tipo monoadutos-dG, e duas reações alquilantes culminam com a formação de três tipos distintos de danos: ligações cruzadas intercadeia, intracadeia ou monoaduto. Porém, as ligações cruzadas intracadeia ocorrem com menor frequência em relação aos demais danos (TOMASZ, 1995).

Figura 1 – Danos originados no DNA por mitomicina C



A ativação de somente uma função alquilante entre DNA e MMC resulta na formação de monoadutos, e a ativação de duas funções alquilantes resulta na formação de ligações intercadeia (B), Intracadeia (C) e monoaduto (D). As moléculas de mitomicina C estão destacadas com círculos vermelhos.

Fonte: modificado de MCvey (2010) e Tomasz (1995).

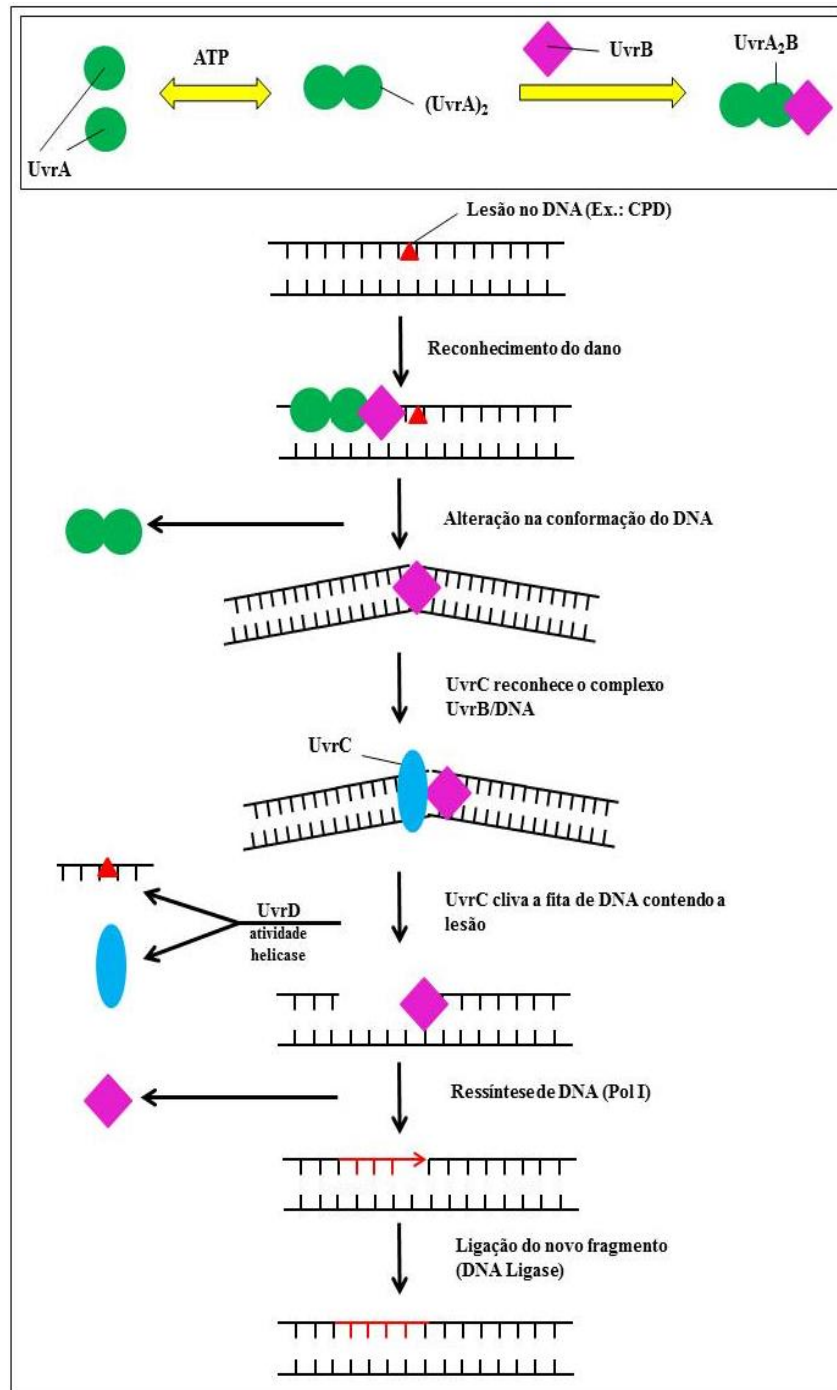
1.1.2 Reparo por excisão de nucleotídeos

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é considerado um dos mais versáteis e flexíveis, por atuar no reparo de uma grande variedade de lesões que resultam em distorções significativas na dupla-hélice da molécula de DNA. Dentre os danos mais relevantes reparados pela via NER, destacam-se CPDs e 6-4PPs, principais lesões induzidas

por luz UV (DE LAAT; JASPERS; HOEIJMAKERS, 1999; FRIEDBERG et al., 2006). Lesões do tipo 6-4PP resultam em distorções mais severas no DNA em relação a CPDs (PEARLMAN; PIRKLE; KIM, 1985), e lesões do tipo 6-4PP apresentam uma taxa de reconhecimento e incisão pela via NER superior ao observado para CPDs (CHANDRASEKHAR; VAN HOUTEN, 2000). Estes dados sugerem que, dependendo do grau de distorção na molécula de DNA, os danos são reconhecidos e reparados de modo mais eficiente.

Em *E. coli* a via NER é mediada pelos genes *uvrABC* (VAN HOUTEN et al., 2005), e esta via compreende essencialmente as seguintes etapas: reconhecimento e verificação do dano, excisão do trecho de ssDNA afetado, e ressíntese deste fragmento utilizando a fita complementar como molde (KUPER; KISKER, 2012). O reconhecimento da lesão é realizado pelas enzimas UvrA e UvrB, associadas como um heterotrímero (UvrA₂UvrB) ou heterotetrâmero (UvrA₂UvrB₂). A proteína UvrB possui função ATPase, e atua alterando a conformação do DNA possibilitando o reconhecimento da lesão por UvrC, que interage com o domínio do carboxi-terminal de UvrB e incisa o trecho afetado a 3' e 5' da lesão (TRUGLIO et al., 2006). A UvrC catalisa uma incisão quatro ligações fosfodiéster a 3' do dano e outra incisão oito ligações a 5' deste, liberando um fragmento de 12 nucleotídeos contendo o dano (VAN HOUTEN et al., 2005). A enzima UvrD (DNA helicase II) atua então removendo este fragmento e liberando a proteína UvrC do complexo enzimático, e a DNA polimerase I ressintetiza o fragmento de DNA, que é ligado ao DNA original pela DNA ligase I (TRUGLIO et al., 2006). Em *E. coli*, *uvrA* e *uvrB* são regulados pelo regulon SOS (seção 1.2), enquanto que *uvrC* é expresso constitutivamente. A figura 2 esquematiza as etapas envolvidas na via NER em *E. coli*.

Figura 2 – Representação esquemática da via de excisão de nucleotídeos em *E. coli*



Proteínas UvrA se associam e formam dímero $(UvrA)_2$ em presença de ATP. $(UvrA)_2$ interage com UvrB resultando no complexo $UvrA_2B$, o qual reconhece e se liga a lesão. Esta ligação desencadeia mudanças conformacionais no complexo, seguido de liberação das moléculas de UvrA. UvrC reconhece o complexo UvrB/DNA e catalisa duas incisões no DNA, uma à 5' e outra a 3' do dano. A UvrD Helicase remove e sequencia excisada (12 nucleotídeos) e libera a proteína UvrC do complexo. DNA polimerase I ressintetiza um fragmento de DNA utilizando a outra fita de DNA como molde, e a DNA ligase finalmente liga este novo fragmento ao DNA.

Estudos demonstraram que *E. coli* possui um gene regulado pela resposta SOS denominado *ydjQ* (ou *cho*) que codifica a proteína Cho, envolvida na via NER

(MOOLENAAR et al., 2002). Esta proteína apresenta similaridade com o domínio N-terminal de UvrC, e também é capaz de incisar o DNA à 3`da lesão, na presença de UvrB e UvrA (MOOLENAAR et al., 2002). Moolenaar e colaboradores (2002) demonstraram que em alguns tipos de danos no DNA, a incisão desempenhada por Cho na extremidade 3`da lesão é mais eficiente que a incisão realizada por UvrC. Eles propõem que a maioria das lesões são reparadas, a princípio, pela ação de UvrC, e os danos remanescentes são reparados pela ação conjunta das proteínas Cho e UvrC, que promovem incisões a 3`e 5`do dano, respectivamente.

1.1.3 Reparo por excisão de bases

O reparo por excisão de bases (BER) é provavelmente a via de reparo mais frequentemente utilizada na natureza, considerando que modificações de bases nucleotídicas ocorrem frequentemente no genoma das células (FRIEDBERG et al., 2006). A via BER apresenta um importante papel em evitar efeitos mutagênicos e citotóxicos mediados por danos no DNA, e atua em diversos tipos de lesões, como: nucleotídeos alterados, sítios abásicos, quebras na cadeia do DNA por agentes alquilantes, oxidativos ou radiações ionizantes (KIM; WILSON III, 2012). A via BER é considerada o principal mecanismo para remoção de lesões endógenas no DNA que causam pequenas distorções na dupla hélice do DNA (LINDAHL, 1993). Dentre os processos endógenos celulares que resultam em danos no DNA, incluem-se, por exemplo, reações hidrolíticas, como desaminação hidrolítica da citosina, guanina e adenina e reações oxidativas mediadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) (KROKAN; STANDAL; SLUPPHAUG, 1997).

A via BER é iniciada por uma classe especial de enzimas denominada DNA glicosilases, que reconhecem especificamente determinadas bases modificadas ou pareadas de modo inapropriado, e promovem a quebra da ligação N-glicosídica, removendo a base nitrogenada (FRIEDBERG et al., 2006). A bactéria *E. coli* apresenta oito tipos diferentes de DNA glicosilases descritas em seu genoma, incluindo Ung, Mug, Fpg, MutY, Nth, TagA, AlkA e Nei. Por outro lado, nosso modelo de estudo, *C. crescentus*, possui quase todas as glicosilases descritas para *E. coli*, com exceção da endonuclease VIII, codificada pelo gene *nei* (Tabela 1).

Tabela 1 – Genes pertencentes à via de reparo de excisão de bases de *Caulobacter crescentus*

Gene de <i>E. coli</i>	Locus em <i>C. crescentus</i>	Descrição	Característica
<i>mutY</i>	CC_0377 (CCNA_00381)	Adenina glicosilase	Glicosilase Monofuncional
<i>mutM (fpg)</i>	CC_3707 (CCNA_03822)	Formamidopirimidina DNA glicosilase	Glicosilase Bifuncional
<i>xthA</i>	CC_3706 (CCNA_03821)	Exodeoxiribonuclease III	AP endonuclease
	CC_2011 (CCNA_02090)	Exodeoxiribonuclease III	AP endonuclease
<i>ung</i>	CC_2084 (CCNA_02166)	Uracil-DNA-glicosilase	Glicosilase Monofuncional
	CC_1333 (CCNA_01394)	Uracil-DNA-glicosilase	Glicosilase Monofuncional
	CC_2333 (CCNA_02418)	Uracil-DNA-glicosilase	Glicosilase Monofuncional
	CC_1549 (CCNA_01618)	Uracil-DNA-glicosilase	Glicosilase Monofuncional
<i>nth</i>	CC_2272 (CCNA_02355)	Endonuclease III	Glicosilase Bifuncional
	CC_3731 (CCNA_03847)	Endonuclease III	Glicosilase Bifuncional
<i>tagA</i>	CC_0382 (CCNA_00386)	3-Metiladenina DNA glicosilase I	Glicosilase Monofuncional
<i>alkA</i>	CC_2201 (CCNA_02284)	3-metil-adenina DNA glicosilase II	Glicosilase Monofuncional

Fonte: Martins-Pinheiro, 2007.

Em geral, as DNA glicosilases atuam de maneira específica no reconhecimento de determinadas bases nucleotídicas pareadas erroneamente ou contendo danos. Estas enzimas podem ser monofuncionais, ou seja, atuam removendo somente a base nucleotídica e deixam

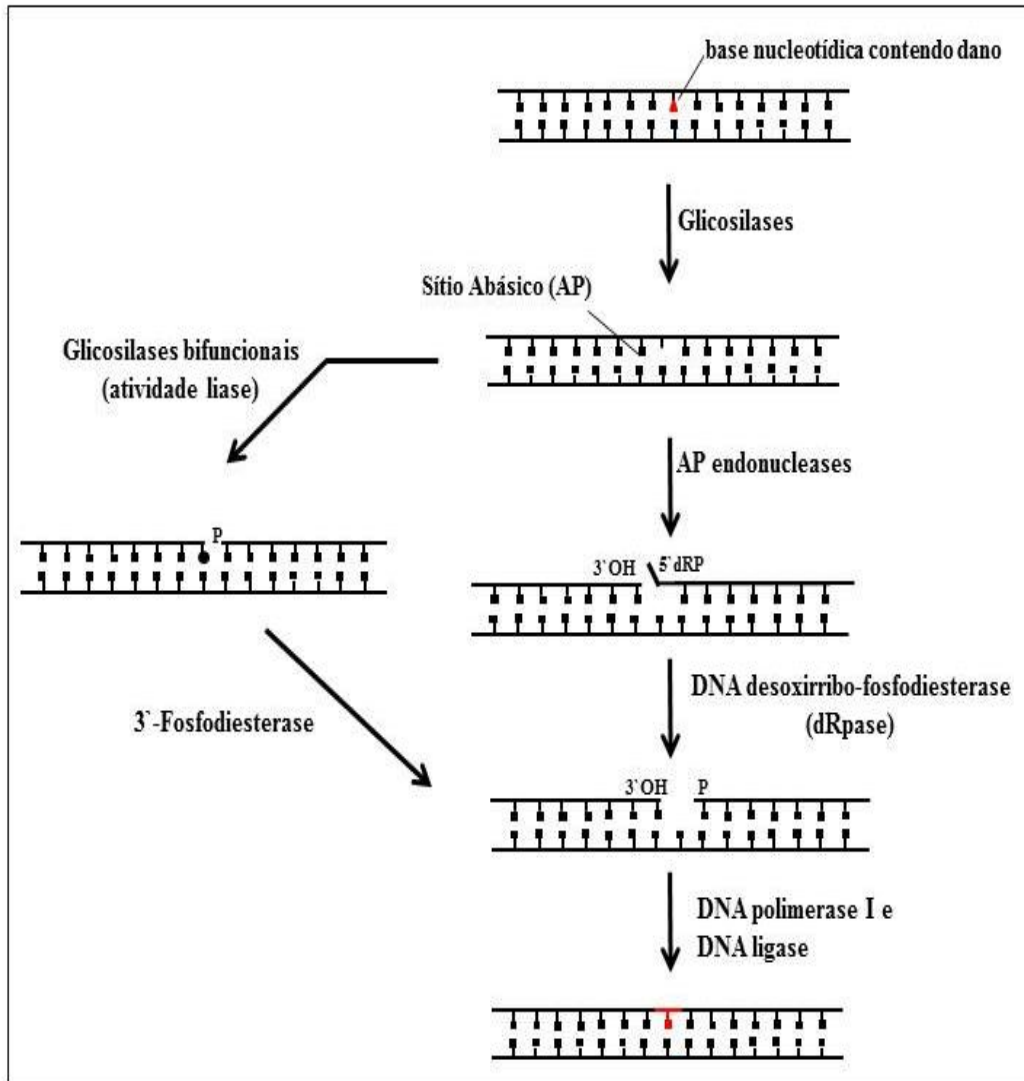
um sítio abásico (AP), ou bifuncionais que apresentam também atividade liase, promovendo a quebra do DNA a 3`do sítio AP (KROKAN; STANDAL; SLUPPHAUG, 1997).

A remoção dos sítios AP pode ser mediada por AP endonucleases e também por AP liases. As enzimas AP endonucleases hidrolisam a ligação fosfodiéster na porção 5`do sítio AP, originando uma extremidade 3`OH e outra 5`fosfato-desoxirribose. Estas enzimas são também responsáveis por remover sítios AP resultantes de eventos espontâneos na molécula do DNA. O resíduo 5`fosfato-desoxirribose (5`dRP) originado após a atividade das AP endonucleases é removido por enzimas DNA desoxirribo-fosfodiesterase (dRpases). Alternativamente, se o resíduo 5`dRP sofrer alguma alteração e não puder ser removido pelas dRpases, o reparo pode envolver a substituição de 2-10 nucleotídeos da fita danificada. Neste caso, a DNA polimerase promove um deslocamento nos nucleotídeos da fita contendo o dano, gerando uma protuberância (“flap”) que contém um resíduo dRP na extremidade 5`, que é clivado por flap endonucleases, e o nucleotídeo unido pela DNA ligase (DIANOV; PRICE; LINDAHL, 1992; LIU; KAO; BAMBARA, 2004).

As glicosilases com atividade AP liase incisam o DNA por uma reação de β -eliminação que resulta em resíduos desoxinucleosídeo-5'-fosfato 5'-terminal e aldeídos 3'-terminal $\alpha\beta$ -insaturados. O terminal 3'-fosfato e os aldeídos insaturados são processados pela enzima 3' fosfodiesterase (DEMPLE; HARRISON, 1994). Após a excisão da base danificada e do resíduo de desoxirribosefosfato, uma nova base nucleotídica é sintetizada e ligada ao DNA pela ação das enzimas DNA polimerase I e DNA ligase, respectivamente (FRIEDBERG et al., 2006).

O reparo de excisão de bases envolve basicamente 5 etapas: remoção da base contendo o dano ou base inapropriada resultando na formação do sítio AP, incisão da ligação fosfodiéster, remoção de resíduos 5'-fosfato-desoxirribose, reconhecimento e complementação da lacuna gerada na cadeia do DNA pela DNA polimerase I, e finalmente, a ligação do nucleotídeo recém introduzido na fita de DNA pela DNA ligase (FRIEDBERG et al., 2006; ZHARKOV, 2008). A Figura 3 esquematiza as etapas envolvidas na via BER.

Figura 3 – Representação esquemática da via de excisão de bases em *E.coli*



As DNA glicosilases são responsáveis por iniciar a via BER. Estas enzimas reconhecem e removem bases nucleotídicas contendo danos, gerando um sítio AP. Enzimas AP endonucleases promovem a remoção destes sítios AP, gerando um resíduo 5' fosfato-desoxirribose, que são removidos pela enzima desoxirribo-fosfodiesterase (dRpase). As enzimas AP liases incisam o DNA e resultam em resíduos desoxinucleosídeo-5'-fosfato 5'-terminal e aldeídos 3'-terminal $\alpha\beta$ -insaturados, que são processados por 3' fosfodiesterases. A DNA polimerase sintetiza um novo nucleotídeo e a DNA ligase promove a ligação deste ao DNA original.

1.1.3.1 Sistema GO

Em procarionotos, enzimas atuam em um elaborado sistema de reparo denominado sistema GO, que atua frente a danos do tipo 8 oxoguanina (8-oxo-7,8-dihidroguanina; abreviado como 8-oxoG), garantindo a integridade genômica (MICHAELS; MILLER, 1992).

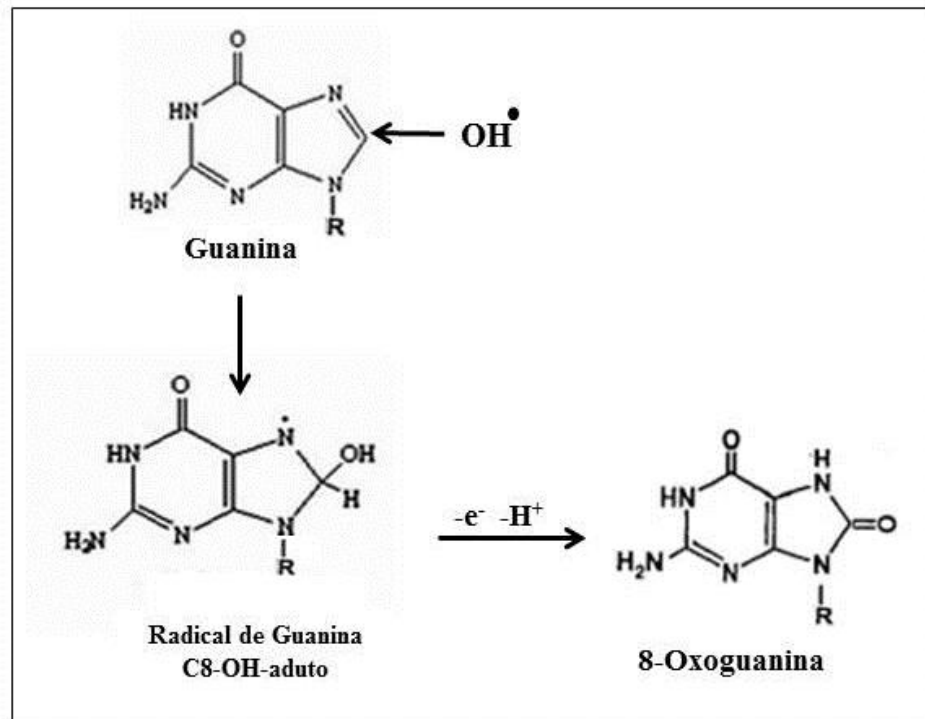
As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas a partir do próprio metabolismo celular, exposição a alguns agentes ambientais, incluindo oxidantes químicos,

metais e radicais livres, e também a partir de radiações ionizantes (DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007). Dentre as consequências de danos no DNA originados por ROS, pode-se citar a modificação de bases nucleotídicas, danos nas moléculas de açúcar, quebras na cadeia do DNA, formação de sítios abásicos e ligação cruzada entre proteínas e DNA (FRIEDBERG et al., 2006).

Os nucleotídeos são considerados importantes alvos das ROS, e a guanina é mais susceptível à oxidação em relação aos demais nucleotídeos por apresentar menor potencial redox (NEELEY; ESSIGMANN, 2006). Um dos produtos mais estudados gerados a partir da oxidação da guanina é a 8-oxoG (BURROWS; MULLER, 1998), e esta lesão é utilizada como marcador celular indicativo de estresse oxidativo (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004). Bactérias que apresentam altos níveis de guanina e citosina no genoma são mais suscetíveis a estes danos, e portanto, mecanismos de reparo de 8-oxoG são considerados cruciais (KURTHKOTI et al., 2010). A formação desta lesão envolve primeiramente um ataque de radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) no carbono 8 da guanina, que origina uma molécula intermediária de aduto C8-OH-, que sofre reação de oxidação (perde um elétron (e^-) e um próton (H^+)), e resulta na lesão 8-oxoG (Figura 4).

O dano 8-oxoG é considerado mutagênico por resultar em uma modificação no nucleotídeo guanina, o qual adquire a capacidade de se emparelhar tanto à base cognata, citosina, quanto à base não cognata, adenina, podendo resultar em lesões pré mutagênicas que geram eventos de transversão $\text{G:C} \rightarrow \text{T:A}$ (GROLLMAN; MORIYA, 1993). Diferentes DNA polimerases apresentam distintas preferências em inserir adenina ou citosina frente ao dano 8-oxoG. DinB, uma DNA polimerase de translesão, é capaz de utilizar o nucleotídeo oxidado 8-oxoG como substrato e pode pareá-lo frente a citosina ou preferencialmente frente a adenina (FOTI et al., 2012). A lesão 8-oxoG é caracterizada como pré-mutagênica e não letal, considerando que estes danos não bloqueiam a progressão das DNAs polimerases, e também não resultam em severas distorções estruturais na dupla hélice do DNA (WALLACE et al., 2002). Esta lesão oxidativa pode ser detectada através de diversos ensaios, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector eletroquímico ou com auxílio de métodos imunológicos (DELANEY et al., 2007).

Figura 4 – Representação esquemática da oxidação de guanina para 8-oxoguanina

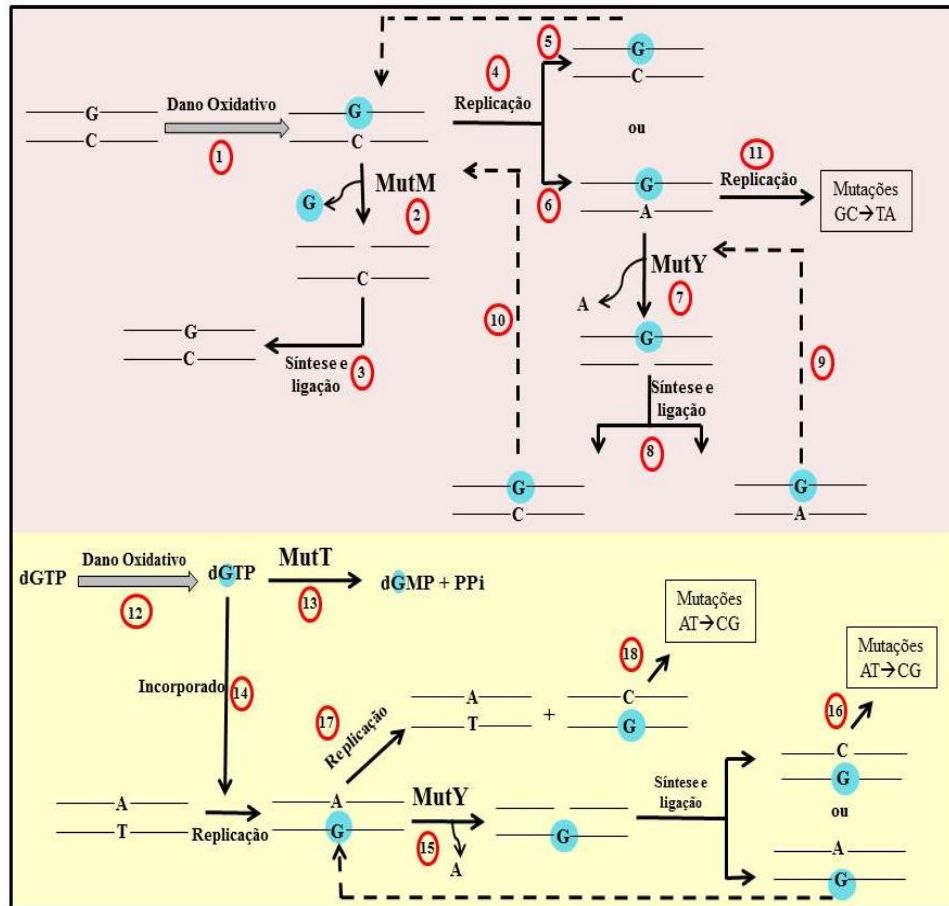


Radicais hidroxilas originados após estresse oxidativo celular podem reagir com o carbono 8 da guanina e resultar em um radical de guanina C8-OH-aduto que, então pode ser oxidado a 8-oxoguanina.

Fonte: modificado de Lovell et al.(2007).

Em *E. coli*, o Sistema GO é composto pelas enzimas MutM, MutY e MutT, as quais atuam conjuntamente na prevenção dos efeitos mutagênicos gerados pela lesão 8-oxoG. As etapas envolvidas nesta via de reparo encontram-se esquematizadas na Figura 5. O primeiro passo deste mecanismo envolve a participação da glicosilase MutM (formamidopirimidina DNA-glicosilase – Fpg), que atua reconhecendo e excisando danos 8-oxoG quando estes se encontram pareados com o nucleotídeo citosina. Se este reparo não ocorrer antes do evento de replicação, o nucleotídeo adenina pode ser então inserido frente a 8-oxoG. Neste caso, a glicosilase MutY desempenha um importante papel por reconhecer e remover preferencialmente a adenina pareada a 8-oxoG. Além disto, para evitar o potencial mutagênico de adutos de 8-oxoG; a proteína MutT atua no pool de nucleotídeos, hidrolisando d(8-oxoGTP) à sua forma monofosfatada, que não pode ser incorporada durante a replicação, prevenindo com isto, a incorporação desta base oxidada no DNA (DELANEY et al., 2007; FRIEDBERG et al., 2006).

Figura 5 – Representação esquemática do sistema de reparo GO



O estresse oxidativo pode resultar em danos do tipo 8-oxoG (1). A base oxidada 8-oxoG (círculos azuis) pode ser removida pela glicosilase MutM (2), e o reparo subsequente pela via BER pode restaurar o pareamento original GC (3). Caso eventos de replicação (4) ocorram antes do reparo por MutM, polimerases replicativas podem incorporar citosina (5) ou preferencialmente adenina(6) frente a 8-oxoG. A glicosilase MutY atua removendo a adenina pareada com 8-oxoG (7), gerando um gap que é preenchido pela via BER. A síntese de nucleotídeos durante o reparo pode restaurar o pareamento 8-oxoG:C (8), que pode ser corrigido por MutM (10). Este reparo pode também resultar no pareamento 8-oxoG:A (8), o qual pode ser alvo de MutY (9). Caso eventos de replicação ocorram antes do reparo por MutY, transversões GC→TA podem ser fixadas (11). O pool de nucleotídeos também pode ser alvo de ROS, e dGTPs oxidados podem resultar em 8-oxodGTPs (12). Os trifosfatos oxidados podem ser hidrolisados por *mutT* a monofosfato (8-oxodGMP) (13), ou podem ser incorporados frente a adenina (14). MutY pode atuar removendo a adenina (15) pareada a 8-oxoG e favorecer a fixação da mutação AT→CG (16) Eventos de replicação podem ocorrer antes do reparo por MutY (17), o que também favorece mutações AT→CG (18).

Fonte: modificado de Kurthkoti et al. (2010).

1.1.4 Síntese translesão

Em princípio, a maioria dos danos no DNA é corrigida por mecanismos de reparo de excisão, porém quando a forquilha de replicação atinge a área lesada, estes mecanismos perdem a capacidade de atuação. Neste caso, o mecanismo de tolerância a danos denominado síntese translesão (TLS) é extremamente importante por promover o desbloqueio da

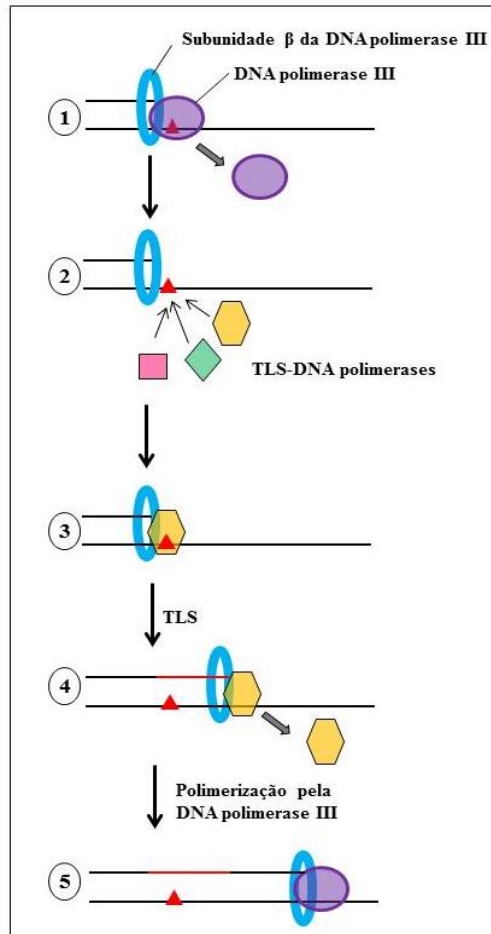
replicação e garantir a sobrevivência celular (INDIANI; O'DONNELL, 2013). A via TLS envolve a participação de polimerases específicas denominadas DNA polimerases da família Y ou TLS-DNA polimerases, que são capazes de sintetizar DNA frente a lesões no DNA, como por exemplo, dímeros de pirimidinas. Estas enzimas são pouco processivas, não apresentam atividade exonucleolítica revisora 3' - 5', e podem resultar em altas taxas de erro, promovendo um aumento da mutagênese durante a replicação (FRIEDBERG et al., 2006). Evidências vêm sendo acumuladas demonstrando que as bactérias expressam estas enzimas em condições diversas, tais como entrada em fase estacionária e exposição a antibióticos, potencialmente modulando suas taxas de mutação (GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007). Desta forma, além de atuarem promovendo a sobrevivência celular, estas enzimas parecem ser fundamentais na geração de variabilidade genética, modulação da evolução e disseminação de resistência a drogas (FUCHS; FUJII, 2013).

Em *E.coli*, a via TLS é dependente das DNA polimerases IV e V, codificadas pelos genes *dinB* e *umuDC*, respectivamente (TANG et al., 1999; WAGNER et al., 1999). A polimerase V é expressa tardiamente após a indução do sistema SOS, e está associada com a maior parte da mutagênese dependente da via TLS (INDIANI; O'DONNELL, 2013). A atividade da polimerase V é dependente de RecA, que após formar filamentos nucleoprotéicos no ssDNA e se tornar ativa (RecA*), promove a clivagem de UmuD (resulta em UmuD'), o qual se associa com UmuC formando o complexo UmuD'₂C. As proteínas UmuC e UmuD' inibem o processo de recombinação homóloga, devido a interação direta entre UmuD'₂C e os filamentos nucleoproteicos RecA/ssDNA (REHRAUER et al., 1996; SZPILEWSKA et al., 1995). A forma não clivada UmuD₂ atua na prevenção de mutagêneses através de UmuC ou DinB, e a forma clivada UmuD'₂ favorece eventos mutagênicos via Pol V (OLLIVIERRE; BEUNING, 2010). O processo de síntese translesão desempenhado pela DNA polimerase V em geral resulta em mutações numa frequência alta de 10⁻³ a 10⁻⁴ (TANG et al., 2000). A atividade desta polimerase é dependente de RecA e também ATP (FUJII; GASSER; FUCHS, 2004). Além disto, a proteína SSB e a subunidade β da DNA polimerase III podem também atuar aumentando a eficiência da síntese translesão (FUJII; GASSER; FUCHS, 2004; PHAM et al., 2002).

De acordo com o modelo descrito por Fuchs e Fujii (2013) o processo de síntese translesão em *E. coli* envolve basicamente as seguintes etapas: DNA polimerase replicativa (DNA polimerase III) ao encontrar uma lesão que bloqueia a replicação irá se dissociar da forquilha de replicação e do DNA; TLS-DNA polimerase se liga nesta região e sintetiza DNA ao longo do trecho de DNA contendo o dano; TLS-DNA polimerase se dissocia do complexo

e a DNA polimerase replicativa se liga e retoma a síntese de DNA (Figura 6). Estudos demonstraram também que a interação entre DNA polimerase IV e V com o grampo β (“ β clamp”) no DNA é essencial para a atividade de síntese translesão desempenhada por estas enzimas (BECHEREL; FUCHS; WAGNER, 2002).

Figura 6 – Representação esquemática da síntese translesão em procariotos.



1) A DNA polimerase III ao encontrar um dano que bloqueia a replicação não poderá sintetizar DNA frente a este trecho, e irá se dissociar da forquilha de replicação. 2 e 3) DNAs polimerases alternativas capazes de realizar síntese translesão são recrutadas, se ligam e sintetizam DNA ao longo deste trecho. 4) Após a síntese de DNA frente ao dano é finalizada, a TLS-DNA polimerase se dissocia. 5) A polimerase replicativa retoma a síntese de DNA.

Fonte: modificado de Fuchs e Fujii (2013).

Apesar da DNA polimerase II não ser incluída no grupo das polimerases da família Y, estudos comprovaram que esta enzima é capaz de realizar síntese translesão frente a sítios AP (Paz-Elizur et al., 1996), à base alquilada 3, N^4 -etenocitosina (AL MAMUN; HUMAYUN, 2006), e também frente a algumas ligações cruzadas intercadeia (BERARDINI; FOSTER; LOECHLER, 1999). Napolitano e colaboradores (2000) demonstraram também que dependendo da natureza do dano no DNA e também da sequência nucleotídica afetada, as três

DNA polimerases SOS-dependentes, PolIV, PolV e Pol II, podem estar envolvidas com a síntese translesão. Além disto, estudos descrevem também o envolvimento da DNA polimerase I na síntese translesão frente a danos do tipo ligação cruzada induzidos por psoraleno (ZIETLOW; BESSHO, 2008).

1.1.5 Reparo de ligações cruzadas intercadeia no DNA

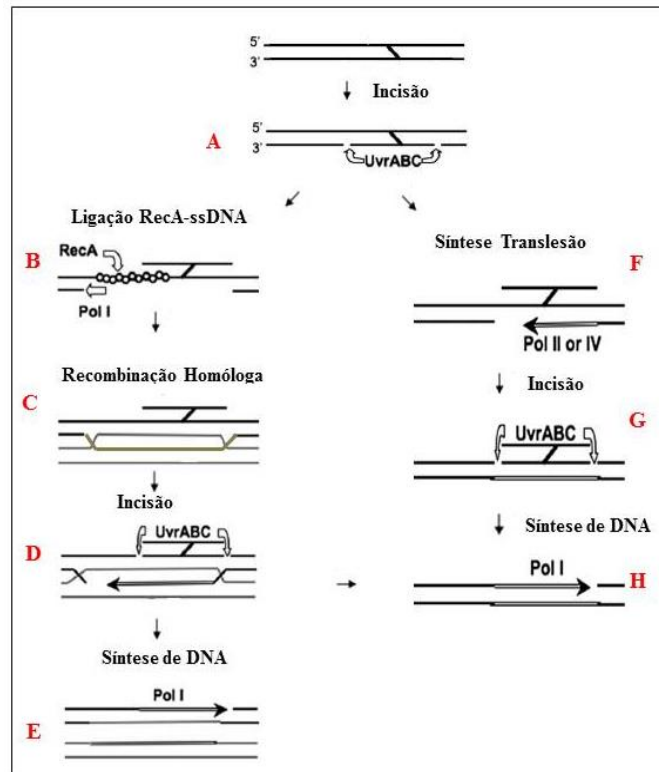
As ligações cruzadas (ICLs) afetam o metabolismo do DNA e são consideradas muito deletérias e citotóxicas para as células por bloquearem processos essenciais de replicação, transcrição e reparação, uma vez que impedem a separação das duas fitas do DNA. Por isso, mecanismos celulares para detecção e remoção de ICLs são cruciais para a sobrevivência celular (SCHÄRER, 2010). O reparo de ICLs em *E. coli* é bem caracterizado e pode envolver dois mecanismos de reparo distintos, os quais demandam a atividade concomitante de diferentes vias de reparo de DNA. As etapas envolvidas neste reparo encontram-se esquematizadas na Figura 7.

O primeiro mecanismo envolve a participação da via NER associada com eventos de recombinação homóloga. Neste mecanismo, o complexo formado pelas endonucleases Uvr(A)₂BC atua primeiramente excisando o DNA em ambos os lados que margeiam a lesão. Em seguida, a DNA polimerase I, que apresenta atividade exonucleolítica 5' → 3', atua nesta região e resulta na formação de DNA fita simples (ssDNA). RecA reconhece e se liga na região ssDNA, e promove a recombinação homóloga entre DNA livre de dano e DNA contendo ICL. Em seguida, a DNA polimerase I catalisa a síntese de DNA ao longo da região com ICL, e Uvr(A)₂BC age excisando o fragmento de DNA contendo a lesão. Por último, a DNA polimerase I sintetiza DNA na lacuna presente na fita de DNA (MCVEY, 2010).

Na ausência de sequências homólogas de DNA ou proteína RecA, um segundo mecanismo de reparo de ICLs é empregado em *E. coli*, sendo este dependente das vias NER e TLS. De fato, a reparação independente de homologia representa um papel importante em bactérias, já que estes organismos apresentam genomas pequenos e haplóides, e a falta de fragmentos de DNA como moldes, pode inviabilizar a recombinação por homologia (HINZ, 2010). Este segundo mecanismo envolve a participação inicial do complexo enzimático Uvr(A)₂BC, que promove uma incisão no DNA em ambos os lados que margeiam a lesão ICL. Em seguida, DNAs polimerases capazes de realizar síntese translesão atuam sintetizando DNA ao longo do fragmento contendo o dano ICL. Posteriormente, o complexo endonucleásico Uvr(A)₂B promove novamente uma incisão em ambos os lados do segmento

com ICL, e a DNA polimerase I atua incorporando nucleotídeos na lacuna remanescente na fita de DNA, completando o processo de reparo (SCHÄRER, 2010).

Figura 7 – Representação esquemática dos mecanismos envolvidos no reparo de ligações cruzadas intercadeia em *E.coli*



(A) Uvr(A)₂BC incisa o segmento de DNA em ambos os lados da ICL. (B) A atividade exonucleolítica de PolII é responsável por formar um região ssDNA próximo ao ICL que é reconhecida e coberta por RecA. (C) RecA promove a invasão da fita e recombinação homóloga, seguida pela síntese de DNA opostamente ao ICL. As junções de Holliday são originadas e resolvidas nesta etapa. (D) Uvr(A)₂BC realiza outra incisão em ambos os lados da região flanqueadora da ICL, liberando o segmento que contém este dano. (E e H) Síntese de DNA pela Pol I finaliza o processo de reparo. (F) Na via de reparo de ICL independente de recombinação homóloga, DNAs polimerases promovem a síntese translesão frente à ICL. (G) Uvr(A)₂BC realiza incisão nas regiões que flanqueiam o dano, e libera o segmento contendo a ICL.

Fonte: modificado de Hinz (2010)

Diferenças estruturais nas ICLs geradas podem resultar em distintos mecanismos para reparar estas lesões. Estudo realizado por Berardini, Foster e Loechler (1999) mostrou que ICLs originadas por tratamento com psoralenos não são reparadas pelo mecanismo dependente de TLS. Além disto, diferentes ICLs podem requerer a participação de distintas DNA polimerases da família Y no reparo destes danos. Foi demonstrado que distintas DNA polimerases estão envolvidas na síntese translesão de ICLs, e que a estrutura destas lesões afetam a eficiência da translesão (SCHÄRER, 2010). Ademais, em *E.coli*, ICLs entre guaninas (N²-N²) não sofrem síntese translesão pela DNA polimerase II (PolII), mas sim pela

DNA polimerase IV (PolIV) (KUMARI, et al., 2008). Os reparos de ICLs envolvendo a síntese translesão por Pol II e Pol IV não são propensos a erros, ou seja, mutações não são incorporadas durante o processo de reparo (SCHÄRER, 2010). Apesar de pouco eficiente, a polimerase I também foi capaz de realizar síntese translesão frente a danos ICLs provocados por psoraleno (ZIETLOW; BESSHO, 2008).

1.2 O regulon SOS

O sistema SOS está presente em procariotos e está envolvido no reparo e tolerância a danos no DNA, na regulação da divisão celular e na manutenção da integridade da forquilha de replicação. Esse sistema foi melhor caracterizado em *Escherichia coli*, e é responsável por lidar com distintas situações de danos e promover respostas adequadas nas células (CROWLEY; COURCELLE, 2002; FRIEDBERG et al., 2006).

A regulação deste sistema em resposta a danos no DNA é dependente dos produtos dos genes *recA* e *lexA*. A Figura 8 esquematiza os eventos envolvidos na indução desta resposta. Em um estado celular não induzido, os genes pertencentes a esse sistema são reprimidos pela proteína LexA, a qual interage com sequências regulatórias específicas dos respectivos genes, denominadas “caixa SOS” (FRIEDBERG et al., 2006). Estas sequências operadoras se localizam em proximidade ou sobrepostas ao sítio de ligação da RNA polimerase e, portanto, a ligação de LexA a este trecho afeta o início do processo de transcrição (revisto por ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007). O sistema SOS é induzido pelo acúmulo de trechos de fitas simples no DNA (ssDNA), que são formados por bloqueio da replicação cromossomal e problemas na recombinação (BUTALA; ZGUR-BERTOK; BUSBY, 2009). Após se ligar a íons de Mg^{2+} e em presença de ATP, a proteína RecA interage com regiões ssDNA e se torna ativa (RecA*), formando fragmentos de nucleoproteínas (KOVACIC et al., 2013). Nesta forma, RecA* se liga ao repressor LexA, promovendo a auto-clivagem deste entre a ligação Ala⁸⁴-Gly⁸⁵ desta proteína. A proteína RecA* atua ativando o sistema SOS por diminuir os níveis intracelulares de moléculas de LexA intactas, e com isto, promove a dissociação deste repressor de sequências operadoras no DNA (BUTALA et al., 2011). Depois de clivada, LexA perde a capacidade de se ligar às sequências operadoras (KOVACIC et al., 2013), e a repressão dos genes do regulon SOS é interrompida. A transcrição destes genes resulta na produção de enzimas específicas necessárias para proteção contra os danos celulares (COURCELLE et al., 2001).

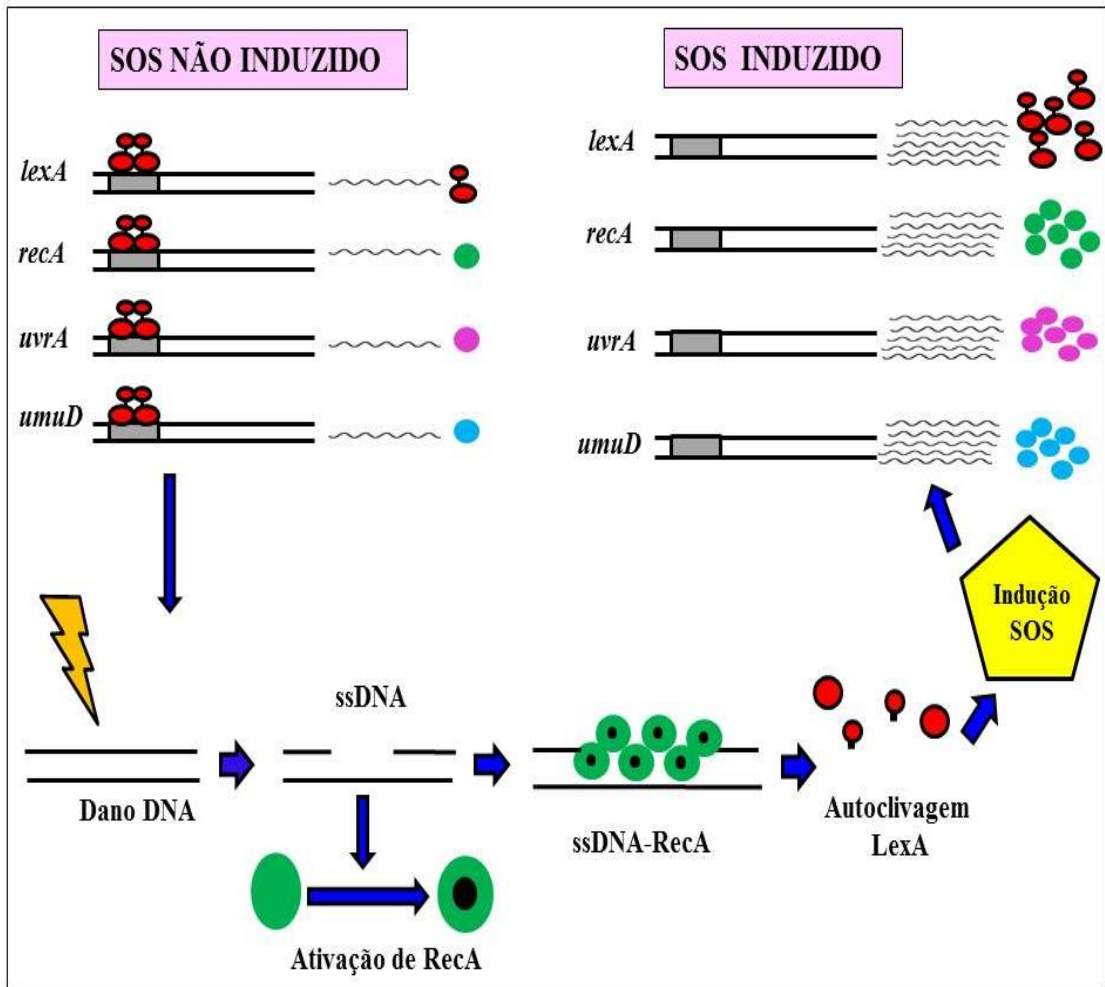
À medida que os danos no DNA são reparados ou tolerados, o nível do sinal indutor diminui, acarretando na diminuição da conversão da proteína RecA em RecA*. Com isso, tem-se novamente um acúmulo da proteína LexA intacta, a qual passa a se ligar aos operadores, resultando na repressão transcricional de genes do sistema SOS.

A parada da forquilha de replicação é considerada um dos principais sinais responsáveis pela indução da resposta SOS, e culmina, em princípio, com a indução de alguns genes SOS (como *recA* e *ssb*), que atuam na estabilização e proteção da forquilha. Em seguida, um segundo grupo de genes é induzido para lidar com os danos no DNA através de mecanismos específicos de reparo, incluindo, por exemplo: *uvrA*, *uvrB*, *ruvAB*, *uvrD*, *recN*, *ydjQ* (WALKER, 1984). Em situações onde as lesões não podem ser reparadas por estes mecanismos, o sistema SOS atua regulando a expressão de polimerases especiais responsáveis pela síntese de DNA frente a esses danos (Descritas na seção 1.1.4).

A estabilização e desmontagem dos filamentos nucleoprotéicos RecA-ssDNA são regulados pelos genes *dinI* e *recX*, respectivamente (RENZETTE; GUMLAW; SANDLER, 2007). Esta regulação garante flexibilidade nos processos de “montagem” e “desmontagem” de filamentos de RecA, que são extremamente importantes para o equilíbrio de algumas funções celulares, incluindo recombinação celular, indução do regulon SOS e mutagênese SOS-dependente (SCHLACHER; GOODMAN, 2007).

Os genes *recA* e *lexA* são controlados por LexA, porém são expressos em níveis significativos mesmo em células em estado não induzido (SASSANFAR; ROBERTS, 1990). A expressão basal de genes SOS em condições de não indução é mantida pela sequência imperfeita do sítio operador ou devido a promotores alternativos (FERNÁNDEZ DE HENESTROSA et al., 2000). Esses níveis basais de LexA e RecA são justificáveis pelo seu papel importante no controle da resposta SOS. Além disso, a proteína RecA também está envolvida em diversos processos celulares, como: recombinação homóloga, ligação ao DNA, hidrólise de ATP e indução de autoclivagem (KOWALCZYKOWSKI et al., 1994).

Figura 8 – Representação esquemática da indução da resposta SOS



Na ausência de indução do regulon SOS, LexA se mantém ligada a sequências operadoras dos genes regulados pela resposta SOS, reprimindo-os. A presença de danos no DNA resultam na formação de trechos de fitas simples (ssDNA) na molécula de DNA. A proteína RecA reconhece e se liga nestas regiões, torna-se ativa, e promove a auto clivagem de LexA. A forma clivada de LexA não se liga às caixas SOS, e os genes SOS deixam de ser reprimidos e atuam codificando proteínas que lidam com as lesões presentes no DNA.

1.2.1 Sistema SOS: *E. coli* versus *C. crescentus*

O regulon SOS foi extensamente estudado em *E. coli*. Através de análise genética tradicional, a maioria dos genes pertencentes a este regulon foi identificada e caracterizada, ao longo de mais de quarenta anos de estudo. Mais recentemente, análises realizadas *in silico* e análises de microarranjos de DNA colaboraram na identificação de genes adicionais pertencentes a este regulon neste organismo (COURCELLE et al., 2001; FERNÁNDEZ DE HENESTROSA et al., 2000).

Atualmente, mais de quarenta genes foram descritos como pertencentes ao regulon SOS de *E.coli*, e a caracterização deste regulon em outras espécies apresentou um paradigma

fascinante. Os genes induzidos pelo regulon SOS apresentam alguns aspectos funcionais que variam muito entre as diferentes espécies, enquanto outros são relativamente específicos para determinados grupos bacterianos (revisto por ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007). Portanto, a regulação dos genes SOS descrita para *E. coli* não deve ser considerada como modelo universal para outras bactérias.

Os genes *recA* e *lexA* são extensamente conservados em genomas bacterianos, sendo raras as exceções de espécies que não apresentam estes genes. Desta forma, a imensa maioria das espécies parece possuir um grupo de genes regulados em resposta a lesões no DNA por este sistema. Entretanto, todos os outros aspectos da resposta SOS parecem divergir imensamente em diferentes espécies (revisto por ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007). Primeiramente, a sequência operadora (caixa SOS) reconhecida por LexA varia enormemente, sendo apenas razoavelmente conservada em grupos filogeneticamente muito próximos. Além disso, o conjunto de genes regulados também varia consideravelmente, de forma que vários genes pertencentes a este regulon em *E. coli* não são regulados pelo SOS em outras bactérias, ou mesmo estão ausentes de seus genomas. O inverso também é verdadeiro. Genes identificados como pertencentes a este regulon em outras bactérias, alguns deles bem conservados, estão ausentes do genoma de *E. coli*. Por outro lado, alguns temas parecem ser constantes dentro do regulon SOS em diferentes modelos, tais como a regulação de diversos genes de reparo de DNA e recombinação, a regulação de genes que inibem a divisão celular, e a regulação de DNA polimerases envolvidas em síntese translesão. Logo, a resposta SOS em diferentes espécies apresenta uma enorme divergência, e por isso, diversos genes controlados pelo regulon SOS em outros modelos bacterianos devem ser melhor caracterizados e identificados (KAWAI; MORIYA; OGASAWARA, 2003).

Neste trabalho, utilizamos a bactéria *Caulobacter crescentus* como modelo para estudos do regulon SOS, dando continuidade a uma linha de pesquisa já desenvolvida por nosso grupo (DA ROCHA et al., 2008; GALHARDO et al., 2005). *C. crescentus* é uma alfa-proteobactéria, não patogênica, que vive em diversos ambientes aquáticos e também no solo. Esta bactéria apresenta um ciclo assimétrico de divisão celular e também um ciclo de vida dimórfico, já que a divisão celular resulta em duas células filhas morfológicamente distintas: uma célula móvel e uma célula sésil (“célula talo”). A forma celular móvel não é capaz de iniciar o processo de replicação do DNA, e para isto, necessita se diferenciar na célula sésil para garantir que ocorra divisão celular (revisto por TSOKOS; LAUB, 2012).

C. crescentus vem emergindo como um interessante modelo alternativo para estudos de mecanismos de reparo de DNA e mutagênese. Dentre alguns fatores que favorecem a

utilização desta bactéria como modelo, podemos incluir: disponibilidade da completa sequência do seu genoma, facilidade de cultivo e disponibilidade de uma grande gama de ferramentas para análise genética.

Nosso grupo já conseguiu significativos avanços no estudo da resposta SOS em *C. crescentus*. As polimerases codificadas pelo operon *umuDC* em *E. coli* são consideradas as mais importantes para a replicação frente a lesões induzidas por luz UV (NOHMI, 2006). No genoma de *C. crescentus*, no entanto, não foram identificados homólogos de *umuDC*, o mesmo ocorrendo para a maioria dos genomas bacterianos. Em *C. crescentus*, foi caracterizado o operon *imuAB dnaE2* (GALHARDO et al., 2005), que assim como o operon *umuDC* em *E. coli*, é regulado pelo sistema SOS. A mutagênese induzida por mitomicina C se mostrou completamente dependente da atividade destes genes, enquanto que a mutagênese induzida por luz UV se mostrou apenas parcialmente dependente de *imuAB dnaE2* (GALHARDO et al., 2005). Desta forma, estes genes codificam proteínas envolvidas em síntese translesão. Entretanto, pelo menos para lesões causadas por luz ultravioleta, outros genes também podem estar envolvidos no processo de síntese translesão nesta bactéria.

Através de uma análise de bioinformática, 37 genes componentes do regulon SOS de *C. crescentus* foram identificados por nosso grupo (Tabela 2) (DA ROCHA et al., 2008). Além disto, ensaios de microarranjos realizados em *C. crescentus* posteriormente por Modell, Hopkins e Laub (2011), demonstram que estes mesmos genes são regulados em resposta a danos no DNA. Além do operon *imuAB dnaE2* descrito acima, outros genes claramente envolvidos em reparo de DNA fazem parte deste regulon, tais como *uvrA*, *uvrB* e *recA*. Entretanto, a maioria dos genes regulados codificam proteínas de função desconhecida. É interessante notar que a maioria dos genes mais fortemente induzidos pela resposta SOS são precisamente genes de função desconhecida (DA ROCHA et al., 2008). Portanto, estes devem possuir papel relevante na fisiologia celular após a introdução de lesões no DNA.

Um exemplo que ilustra este fato é o checkpoint de filamentação em *C. crescentus*. Em situações de perturbações, não favoráveis à sobrevivência celular, o sistema SOS pode agir bloqueando a divisão celular. Este mecanismo de controle é considerado por alguns pesquisadores como um exemplo de checkpoint bacteriano (AUTRET et al., 1997). Em *E. coli* este mecanismo é mediado pela proteína Sula, membro do regulon de LexA. Em situações em que o sistema SOS é induzido, a transcrição de *sula* é altamente induzida (COURCELLE et al., 2001). Esta proteína interage com FtsZ, inibindo a formação do anel no septo divisional (MUKHERJEE; CAO; LUTKENHAUS, 1998). Isto resulta em um

crescimento celular sem que a divisão celular seja estabelecida, originando células com aspecto filamentosas (HUISMANM; D'ARI; GOTTESMAN, 1984).

Erill e colaboradores (2006) demonstraram que a maioria das bactérias não possuem em seus genomas homólogos de *sulA*, e que a presença deste gene está restrita a organismos mais próximos filogeneticamente a *E. coli*. Em *Bacillus subtilis*, por exemplo, a proteína YneA, não homóloga à SulaA, desempenha a mesma função que SulaA, atuando como um supressor da divisão celular durante a resposta SOS (KAWAI; MORIYA; OGASAWARA, 2003). Um estudo desenvolvido em *C. crescentus* demonstrou que a cepa deficiente no gene *lexA* apresenta um fenótipo de células filamentosas (DA ROCHA et al., 2008). Como homólogos de *sulA* não estão presentes nestes organismos, foi sugerida a presença de outros mecanismos distintos de bloqueio da divisão celular, os quais podem ser mediados pelo sistema SOS, responsáveis por este fenótipo.

De fato, recentemente foi identificado o gene (CC_1927) responsável por este checkpoint em *C. crescentus* (MODELL; HOPKINS; LAUB, 2011), sendo este um dos genes de função desconhecida previamente identificados como regulado pelo SOS em nosso trabalho (Tabela 2) (DA ROCHA et al., 2008). Da mesma maneira, é nossa expectativa que outros genes pertencentes a este regulon também possuam papéis relevantes na resposta SOS nesta bactéria.

Tabela 2 – Genes identificados por análise *in silico* como componentes do regulon SOS em *C. crescentus*

		(continua)
ORF	Nome do gene/Anotação em <i>C. crescentus</i> CB15	Expressão Relativa (<i>lexA</i> /cepa selvagem)
CC_1902	<i>lexA</i>	43.2 ± 9.3
CC_0627	Proteína hipotética	40.3 ± 11.8
CC_3467	Proteína hipotética conservada	37.5 ± 10.5
CC_3518	Proteína hipotética conservada	27.4 ± 4.8
CC_2332	Proteína hipotética conservada	18.8 ± 6.8
CC_2333	Proteína relacionada à uracila glicosilase	8.3 ± 1.2
CC_1926	<i>dnaE</i> /DNA polimerase III, subunidade alfa	1.6 ± 0.6
CC_1927	Proteína hipotética	17.7 ± 6.2
CC_3213	<i>imuA</i> (inducible mutagenesis protein A), em operon com ImuB (DNA polimerase família Y) e DnaE2	16.2 ± 4.7

Tabela 2 – Genes identificados por análise *in silico* como componentes do regulon SOS em *C. crescentus*

ORF	Nome do gene/Anotação em <i>C. crescentus</i> CB15	Expressão Relativa (<i>lexA</i> /cepa selvagem)
CC_2272	Proteína da família da Endonuclease III	14.7 ± 3.1
CC_3424	Proteína hipotética conservada	13.62 ± 5.5
CC_1330	Proteína com domínio radical SAM	11.7 ± 3
CC_1054	Proteína hipotética	11.3 ± 5.5
CC_2040	RNA helicase dependente de ATP, família DEAD/DEAH	9.1 ± 3.4
CC_1087	<i>recA</i> /recombinação de DNA	9.0 ± 1.5
CC_2879	Proteína hipotética	8.0 ± 1.6
CC_2880	Proteína hipotética	9.74 ± 3.7
CC_2881	<i>uvrC</i> /exonuclease ABC, subunidade C	1.7 ± 0.3
CC_3038	Proteína hipotética conservada	5.3 ± 0.8
CC_3037	Proteína hipotética conservada	7.7 ± 1.9
CC_3036	Proteína hipotética	7.3 ± 1.2
CC_3039	Proteína hipotética	4.4 ± 0.2
CC_3356	Proteína hipotética	6.3 ± 2.5
CC_1531	Proteína hipotética	5.9 ± 1.1
CC_1983	<i>recN</i>	5.6 ± 1.6
CC_0140	<i>comM</i> /proteína de competência ComM	4.7 ± 0.1
CC_0383	Proteína hipotética	5.0 ± 2.7
CC_3238	<i>ruvC</i>	5.1 ± 1.9
CC_3237	<i>ruvA</i>	5.0 ± 0.8
CC_3236	<i>ruvB</i>	3.4 ± 0.4
CC_3225	Caixa sensora histidina quinase/regulador de resposta	4.8 ± 1.9
CC_0382	<i>tag</i> / DNA- metiladenina glicosilase I	3.4 ± 1.2
CC_2590	<i>uvrA</i> / exonuclease ABC, subunidade A	3.5 ± 1.0
CC_1532	Proteína hipotética conservada	3.1 ± 0.7
CC_3515	Proteína hipotética conservada	3.1 ± 0.6
CC_1665	<i>dnaB</i> /DNA helicase replicativa	0.3 ± 0.1
CC_2433	Proteína hipotética conservada	0.1 ± 0.0

Fonte: modificado de Da Rocha et al. (2008).

Neste trabalho, buscamos caracterizar funcionalmente os genes CC_0627 (CCNA_00663), CC_3467 (CCNA_03580), CC_3424 (CCNA_03537) e CC_2040 (CCNA_02121). Conforme descrito por Da Rocha e colaboradores (2008), estes genes são fortemente regulados pelo sistema SOS. Os fatores de indução (nível de expressão relativa comparando células que expressam o regulon SOS constitutivamente com células selvagens não tratadas com agentes genotóxicos) observados em nossos estudos anteriores são: gene CC_0627, 40 vezes; CC_3467, 37 vezes; CC_3424, 13 vezes e CC_2040, 9 vezes (Tabela 2). Além disso, estes genes apresentam algumas características que justificam sua escolha, as quais serão descritas abaixo.

O gene CC_0627 não possui homólogos no banco de dados. Análises de domínios revelam que a proteína codificada apresenta alguma similaridade com endonucleases. Este gene foi recentemente caracterizado por outro grupo que o denominou *bapE*. Estes pesquisadores mostraram que a proteína BapE apresenta atividade de endonucleases *in vitro* e apresenta função em processos de morte celular programada em bactérias (BOS; YAKHNINA; GITAI Z, 2012). O gene CC_3467 é bastante conservado em várias alfa-proteobactérias, e análise de domínios revela similaridade com endonucleases (Apêndice – Figura A4). O gene CC_3424 é extremamente conservado em várias espécies de bactérias, e apresenta domínios protéicos similares à glioxalases e dioxigenases, que estão envolvidas com resistência a antibióticos, em particular à bleomicina (Apêndice – Figura A5). O gene CC_2040 codifica uma proteína similar a proteínas da família Lhr, que são helicases de DNA e RNA ATP-dependentes.

1.3 Antibióticos, danos no DNA e a resposta SOS

Além de agentes que causam danos diretos ao DNA, a resposta SOS é ativada por diversos outros estresses ambientais, tais como alterações no pH, aumento na pressão, e exposição à cromato (revisado por ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007). O exato mecanismo através do qual a resposta SOS é induzida por estes agentes, ou seja, os mecanismos através dos quais estes formam sinal indutor do SOS (trechos de DNA em simples fita), ainda é tema de discussão. Dentre os diversos agentes capazes de induzir a resposta SOS em bactérias, especial atenção tem sido dirigida aos antibióticos.

A indução do SOS por antibióticos da classe das quinolonas, tais como o ácido nalidíxico e seus derivados, já é bem conhecida, visto que estas drogas agem justamente sobre o metabolismo de DNA bacteriano, atuando como inibidoras da DNA girase, sendo

promotoras de quebras duplas no DNA que resultam no bloqueio da replicação (DRLICA; ZHAO, 1997). Entretanto, outras classes de antibióticos, em especial beta-lactâmicos, também parecem induzir a resposta SOS em várias espécies de bactérias (revisto por ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007), embora seu mecanismo de ação (inibição da síntese da parede celular) não possua nenhuma relação óbvia com o metabolismo de DNA. Em *E. coli*, foi relatada a indução da resposta SOS por beta-lactâmicos, mediada pelo sistema de transdução de sinal de dois componentes *dpiBA*, que segundo o modelo proposto, inibe a replicação, induzindo o SOS (MILLER et al., 2004). Estes autores propõem que a indução da resposta SOS é um mecanismo protetor, pois reduz a velocidade de crescimento e inibe a divisão celular, protegendo a célula contra drogas que requerem metabolismo ativo para exercer seus efeitos tóxicos, como é o caso desta classe de antibióticos. Além disto, um estudo realizado recentemente por Plata e colaboradores (2013) demonstrou que antibióticos beta-lactâmicos também induzem a resposta SOS em *Staphylococcus aureus*. Segundo estes pesquisadores, antibióticos beta-lactâmicos atuam interferindo nas funções da proteína PBP1, o que resultaria na parada da divisão celular e desencadeamento da resposta SOS.

Kohanski, Depristo e Collins (2010) demonstraram também que os antibióticos beta-lactâmicos causam lesões oxidativas no DNA, induzindo mutagênese. A indução do regulon SOS por antibióticos varia entre diferentes microorganismos e antibióticos. Antibióticos aminoglicosídeos, tetraciclina e rifampicina, por exemplo, são indutores da resposta SOS em *Vibrio cholerae*, mas não induzem esta resposta em *E. coli* (BAHAROGLU; MAZEL, 2011).

A resposta SOS invariavelmente controla DNA polimerases de baixa fidelidade, envolvidas em síntese translesão, e de potencial altamente mutagênico quando usando DNA sem lesões como molde. O sucesso evolutivo dos micro-organismos depende de um aprimoramento constante de suas taxas de mutação, para que estes aperfeiçoem a capacidade de adaptação frente às frequentes mudanças no ambiente (DENAMUR; MATIC, 2006). As mutações podem apresentar diferentes impactos no organismo, podendo ser deletérias, neutras ou benéficas (COOPER; LENSKI, 2000). As mutações contribuem significativamente para o surgimento de novos caracteres em uma população e mesmo em taxas reduzidas podem resultar em significativa mudança na adaptação de microorganismo, como exemplo o surgimento de resistência a antibióticos (DENAMUR; MATIC, 2006; WOODFORD; ELLINGTON, 2007). Fenômenos de mutagênese mediados por DNA polimerases de baixa fidelidade e regulados pela resposta SOS, vêm sendo relacionados com o surgimento de resistência de antibiótico. Kohanski, Depristo e Collins (2010) demonstraram que concentrações subletais de alguns antibióticos podem conduzir à multirresistência bacteriana.

Em *E. coli* foi demonstrado que o surgimento da resistência à ciprofloxacina durante infecção experimental requer a indução da resposta SOS e a atividade das DNA polimerases da família γ UmuD₂C e DinB. Estes pesquisadores mostraram também que a inibição da resposta SOS resulta em uma diminuição na sobrevivência e mutagênese de células tratadas com ciprofloxacina (CIRZ et al., 2005; CIRZ; ROMESBERG, 2006). De forma semelhante, a DNA polimerase codificada por *dnaE2* foi implicada no desenvolvimento de resistência à antibióticos em modelos murinos de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (BOSHOF; REED; BARRY, 2003). Além disto, foi demonstrado que diversos beta-lactâmicos são capazes de induzir a transcrição do gene *dinB* em *E. coli*, e com isto elevar a mutagênese, independente do regulon SOS (PEREZ-CAPILLA et al., 2005). Considerando o importante papel do sistema SOS na aquisição de resistência a antibióticos, estudos vêm sendo direcionados buscando-se o desenvolvimento de inibidores seletivos deste regulon, que combinados com os antibióticos, poderiam atuar reduzindo o surgimento de resistência a estas drogas (DO THI et al., 2011).

1.4 Antibióticos beta-lactâmicos e o estresse oxidativo

Os antibióticos beta-lactâmicos são agentes bactericidas que atuam inibindo a síntese de peptidoglicano da parede celular, por se ligarem de maneira covalente às proteínas PBPs que catalisam a reação de transpeptidação, podendo ocasionar morte celular (revisto por CHAMBERS, 2003).

Foi demonstrado que antibióticos bactericidas das classes de beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos resultam em estresse oxidativo celular em bactérias gram negativas e positivas (FOTI et al., 2012). O estresse oxidativo resulta em vários efeitos no DNA, incluindo danos oxidativos em bases nucleotídicas e moléculas de fosfato-açúcar, assim como quebras simples (SSB) e duplas (DSB) na molécula do DNA. Além disto, SSBs localizadas em sítios próximos e opostos no DNA podem resultar em DSBs após eventos de replicação (revisto por SLUPPHAUG; KAVLI, B; KROKAN, 2003). Se não reparadas, DSBs podem ser letais para as células, enquanto que lesões em bases nucleotídicas podem ser mutagênicas e/ou citotóxicas (PFEIFFER; GOEDECKE; OBE, 2000). A via de reparo de recombinação homóloga mediada por RecBCD apresenta papel crucial no reparo de DSBs (KUZMINOV, 1999).

O estresse oxidativo envolve a formação concomitante de múltiplos danos, sendo que mais de 20 lesões em bases nucleotídicas foram identificadas. O dano 8-oxoG é considerado o

mais prevalente entre as lesões que acometem bases purínicas, enquanto o timina glicol (Tg) é mais frequente entre as bases pirimídicas. Outra lesão muito frequente é formamidopirimidina Fapy-dG (2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina), considerada o segundo principal produto da oxidação da guanina. A remoção das bases oxidadas Tg envolvem a participação de endonuclease III (Endo III) e endonuclease VIII (Endo VIII), codificada pelos genes *nth* and *nei*, respectivamente, em *E.coli*. Por outro lado danos do tipo formamidopirimidina são removidos pela DNA glicosilase Fpg, codificada pelo gene *mutM*. Danos Fapy-dG e Tg são considerados menos mutagênicos em relação ao dano 8-oxoG (DIANOV et al., 2000; PATRO et al., 2007). Por outro lado, lesões Fapy e Tg são altamente citotóxicos para as células, por atuarem bloqueando a transcrição e replicação (BASU et al., 1989). Já as lesões 8-oxoG são consideradas extremamente mutagênicas e pouco citotóxicas (WALLACE et al., 2002).

Independente dos alvos macromoleculares dos antibióticos bactericidas nas células, estas drogas geram ROS do tipo radical hidroxila (OH•), que é bastante deletéria e pode resultar em danos no DNA, lipídeos, proteínas e, conseqüentemente, resultar em morte celular (FOTI et al., 2012; KOHANSKI et al., 2007). Na presença de íons Fe^{2+} , a reação de Fenton é a principal responsável pela formação de radicais OH• (TOUATI, 2000). Os danos gerados por este radical no DNA podem ocorrer de maneira direta ou indireta, e se não reparados, podem resultar em acúmulos de mutações (DEMPLE; HARRISON, 1994; FRIEDBERG et al., 2006). Kohanski, Depristo e Collins (2010) demonstraram ainda que tratamentos com concentrações subletais de alguns antibióticos bactericidas (incluindo beta lactâmicos) resultam em multirresistência a antibacterianos, atribuída à formação de ROS que resultam em eventos de mutagênese nas células. Segundo Dwyer, Kohanski e Collins (2009) há três possibilidades para antibióticos promoverem aumento na mutagênese cromossomal: interação direta entre DNA e agente antibacteriano; indução de estresse oxidativo ou indiretamente, através da ação de DNA polimerases propensas a erros que atuam na tolerância a danos induzidos por estes agentes.

Foti e colaboradores demonstraram que antibióticos bactericidas, incluindo os beta-lactâmicos, resultam em lesões oxidativas do tipo 8-oxoG no DNA de células bacterianas. A ocorrência destas lesões em sítios próximos pode resultar em quebras de fita dupla no DNA, pela ação das glicosilases, e isto contribui para a citotoxicidade destes antibióticos (FOTI et al., 2012). Além disto, estudos demonstraram que as lesões 8-oxoG presentes no DNA estão sujeitas a outros eventos oxidativos que podem culminar com a formação de lesões derivadas de hidantoína. Estes danos podem ser tolerados pela síntese translesão em *E.coli*, e são extremamente mutagênicas para as células (HENDERSON et al., 2003)

Além de beta-lactâmicos gerarem ROS, estes também induzem mutagênese dependente de enzimas polimerases da família Y em *E.coli*. Gutierrez e colaboradores (2012) demonstraram que concentrações subinibitórias de antibióticos beta-lactâmicos induzem o regulon RpoS, resultando em uma redução na fidelidade da replicação e, conseqüentemente, aumento da mutagênese dependente da Polimerase IV (DinB). Além disto, Neeley e colaboradores (2007) demonstraram em *E. coli* que a DNA polimerase V é fundamental para a translesão eficiente frente a lesões oxidativas de guanina, o que resulta em um aumento nos níveis de mutagênese dependente da resposta SOS.

1.5 Objetivos

Nosso objetivo principal neste trabalho é aprofundar os estudos sobre a resposta SOS no modelo de *C. crescentus*, desvendando seu papel no reparo de DNA e mutagênese, e avaliando o efeito de sua indução por antibióticos. Nosso trabalho foi dividido em dois objetivos principais:

- Análise funcional de alguns genes regulados pela resposta SOS em *C. crescentus*, investigando seu papel no reparo de DNA e mutagênese.
- Estudo dos efeitos biológicos da indução do sistema SOS por antibióticos beta-lactâmicos.

4 CONCLUSÕES

4.1 Análise funcional de genes pertencentes ao regulon SOS

- A cepa deficiente no gene CC_0627 não apresentou fenótipo de sensibilidade frente aos agentes genotóxicos luz UV, MMS e MMC.
- A cepa deficiente no CC_2040 apresentou modesto fenótipo de sensibilidade à H₂O₂ e MMC.
- As cepas deficientes nos genes CC_3424 e CC_3467 se mostraram consideravelmente mais sensíveis à MMC em relação à cepa parental.
- A tolerância à MMC mediada gene CC_3424 não depende das vias NER, TLS e recombinação homóloga, e possivelmente este gene atua detoxificando a MMC das células.
- O gene CC_3467 atua conjuntamente com a via TLS e com sobreposição parcial de função com NER no reparo de ICLs por MMC. Este gene possivelmente exerce atividade de endonulcase e apresenta papel no reparo de ICLs induzidas por MMC.
- Os genes CC_3467 e CC_3424 atuam em vias distintas para promover tolerância à MMC.
- A cepa duplo mutante CC_3467 *recA* se mostrou inviável, indicando uma interação genética do tipo sintética letal entre a via de recombinação e CC_3467.

4.2 Efeitos biológicos da indução do sistema SOS por antibióticos beta-lactâmicos

- Concentrações subinibitórias de cefalexina resultam em indução moderada da resposta SOS *C. crescentus*.
- Cepas deficientes nos genes *dnaE2*, *oxyR*, *uvrA* e *dinB* são ligeiramente mais sensíveis à cefalexina em relação a cepa selvagem.
- As cepas selvagem e deficiente no gene *dnaE2* não apresentaram diferenças significativas na mutagênese após tratamento com concentrações subinibitórias de cefalexina
- As cepas deficientes nos genes *mutM* e *mutY* apresentaram aumento na mutagênese após tratamento com concentrações subinibitórias de cefalexina.

- Ensaios de imuno slot blot mostraram que células tratadas com concentrações subinibitórias de cefalexina apresentam maior concentração de danos oxidativos do tipo 8-oxoG em relação as células não tratadas com este antibiótico.

REFERÊNCIAS¹

- AL MAMUN, A. A. M.; HUMAYUN, M. Z. *Escherichia coli* DNA polymerase II can efficiently bypass 3,N4-ethenocytosine lesions *in vitro* and *in vivo* **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 593, n. 1, p. 164-176, 2006.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. *Escherichia coli*, plasmids and bacteriophages. **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley e Sons, 1999. p.5-9.
- AUTRET, S.; LEVINE, A.; HOLLAND, I. B.; SERROR, S. J. Cell cycle checkpoints in Bacteria. **Biochemie**, v. 79, n. 9, p. 549-554, 1997.
- AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **Software Bioestat versão 5.3**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá; 2007.
- BAHAROGLU, Z.; MAZEL, D. *Vibrio cholerae* Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2438-2441, 2011.
- BASU, A. K.; LOECHLER, E. L.; LEADON, S. A.; ESSIGMANN, J. M. Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n 20, p. 7677-7681, 1989.
- BECHEREL, O. J.; FUCHS, R. P.; WAGNER, J. Pivotal role of the β -clamp in translesion DNA synthesis and mutagenesis in *E. coli* cells. **DNA Repair**, v.1, n.9, p. 703-708, 2002.
- BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 231, n.1, p. 11-30, 1990.
- BERARDINI, M.; FOSTER, P. L.; LOECHLER, E. L. DNA polymerase II (polB) is involved in a new DNA repair pathway for DNA interstrand cross-links in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.9, p. 2878-2882, 1999.
- BERGDOLL, M.; ELTIS, L. D.; CAMERON, A. D.; DUMAS, P.; BOLIN, J. T. All in the family: structural and evolutionary relationships among three modular proteins with diverse functions and variable assembly. **Protein Science**, v. 7, n. 8, p. 1661-1670, 1998.
- BERNAT, B. A.; LAUGHLIN, L. T.; ARMSTRONG, R. N. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. **Biochemistry**, v. 36, n. 11, p. 3050-3055, 1997

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOS, J.; YAKHNINA, A. A.; GITAI Z. BapE DNA endonuclease induces an apoptotic-like response to DNA damage in *Caulobacter*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 44, p. 18096-18101, 2012.

BOSHOFF, H. I.; REED, M. B.; BARRY, C. E.; MIZRAHI, V. DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v.113, n. 2, p.183-193, 2003.

BROSH JR, R. M. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 8, p. 542–558, 2013.

BURROWS, C. M.; MULLER, J. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109–1152, 1998

BUTALA, M.; ZGUR-BERTOK, D.; BUSBY, S. J. The bacterial LexA transcriptional repressor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 1, p. 82–93, 2009.

BUTALA, M.; KLOSE, D.; HODNIK, V.; REMS, A.; PODLESEK, Z.; KLARE, J. P.; ANDERLUH, G.; BUSBY, S. J. W.; STEINHOFF, H. J.; ZGUR-BERTOK, D. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 15, p. 6546-6557, 2011.

CHAMBERS H. F. Antibióticos beta-lactâmicos e outros inibidores da síntese de parede celular: compostos beta-lactâmicos. In: KATZUNG, B. (Ed.). **Farmacologia: básica e clínica**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2003. p. 256.

CHANDRASEKHAR, D.; VAN HOUTEN, B. In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and nucleotide level in *Escherichia coli*. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.450, n.1, p. 19-40, 2000.

CIRZ, R. T.; CHIN, J. K.; ANDES, D. R.; DE CRECY-LAGARD, V.; CRAIG, W. A.; ROMESBERG, F. E. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. **PLOS Biology**, v.3, n. 3, p.e176, 2005.

CIRZ, R. T.; ROMESBERG, F. E. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 220–225, 2006.

CLANCY, S. DNA damage e repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p.103, 2008.

COOPER, V. S.; LENSKI, R. E. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 736-739, 2000.

COURCELLE, J.; KHODURSKY, A.; PETER, B.; BROWN, P. O.; HANAWALT, P. C. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 158, n. 1, p. 41-64, 2001.

CROWLEY, D. J.; COURCELLE, J. Answering the call: coping with DNA damage at the most inopportune time. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 66-74, 2002.

CZECZOT, H.; TUDEK, B.; LAMBERT, B.; LAVAL, J.; BOITEUX, S. *Escherichia coli* Fpg protein and UvrABC endonuclease repair DNA damage induced by methylene blue plus visible light *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 11, p. 3419-3424, 1991.

DA ROCHA, R. P.; DE MIRANDA PAQUOLA, A. C.; DO VALLE MARQUES, M.; MENCK, C. F. M.; GALHARDO, R. S. Characterization of the SOS regulon of *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 4, p. 1209-1218, 2008.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941-950, 2007.

DE LAAT, W. L.; JASPERS, N. G.; HOEIJMAKERS, J. H. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes and Development**, v. 13, n. 7, p. 768-785, 1999.

DELANEY, S.; NEELEY, W. L.; DELANEY, J. C.; ESSIGMANN, J. M. The substrate specificity of MutY for hyperoxidized guanine lesions *in vivo*. **Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1448-1455, 2007.

DEMPLE, B.; HARRISON, L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 915-948, 1994.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 820-827, 2006.

DIANOV, G.; PRICE, A.; LINDAHL, T. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 4, p. 1605-1612, 1992.

DIANOV, G. L.; THYBO, T.; DIANOVA, I. I.; LIPINSKI, L. J.; BOHR, V. A. Single nucleotide patch base excision repair is the major pathway for removal of thymine glycol from DNA in human cell extracts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11809-11813, 2000.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCI OGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1102-1115, 2002.

DO THI, T.; LO'PEZ, E.; RODRI'GUEZ-ROJAS, A.; RODRI'GUEZ-BELTRA'N, J.; COUCE, A.; GUELFO, J. R.; CASTAN'EDA-GARCIA, A.; BLA'ZQUEZ, J.. Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 531-538, 2011.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 3, p. 377-392, 1997.

- DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482-489, 2009.
- ELY, B. Genetics of *Caulobacter crescentus*. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 372-384, 1991.
- ERILL, I.; CAMPOY, S.; MAZON, G.; BARBE, J. Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 1, p. 66-77, 2006.
- ERILL, I.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 6, p. 637-656, 2007.
- EVINGER, M.; AGABIAN, N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. **Journal of Bacteriology**, v. 132, n. 1, p. 294-301, 1977.
- FEIERBERG, I.; CAMERON, A., D.; ÅQVIST, J. Energetics of the proposed rate-determining step of the glyoxalase I reaction. **FEBS letters**, v. 453, n.1, p. 90-94, 1999.
- FERNÁNDEZ DE HENESTROSA, A. R.; OGI, T.; AOYAGI, S.; CHAFIN, D.; HAYES, J. J.; OHMORI, H.; WOODGATE, R. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1560-1572, 2000.
- FOTI, J. J.; DEVADOSS, B.; WINKLER, J. A.; COLLINS, J. J.; WALKER, G. C. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, v.336, n. 6079, p. 315-319, 2012.
- FRIEDBERG, E. C., G. C. WALKER, W. SIEDE, R. D. WOOD, R. A. SCHULTZ, AND T. ELLENBERGER. **DNA Repair and Mutagenesis**. ASM Press, Washington D. C, 2006.
- FUCHS R. P.; FUJII, S. Translesion DNA synthesis and mutagenesis in prokaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 5, p. a012682, 2013.
- FUJII, S.; GASSER, V.; FUCHS, R. P. The biochemical requirements of DNA polymerase V-mediated translesion synthesis revisited. **Journal of Molecular Biology**, v. 341, n. 2, p. 405-417, 2004.
- FURDA, A. M.; BESS, A. S.; MEYER, J. N.; VAN HOUTEN, B. Analysis of DNA damage and repair in nuclear and mitochondrial DNA of animal cells using quantitative PCR. **In DNA Repair Protocols**. Humana Press, 2012. p. 111-132.
- GALHARDO, R. S.; ROCHA R. P.; MARQUES, M. V.; MENCK, C. F. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 8, p. 2603-2614, 2005.
- GALHARDO, R. S.; HASTINGS, P. J.; ROSENBERG, S. M. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p. 399-435, 2007.

GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Molecular Biology of the Cell**, v. 3, n. 8, p. 913-926, 1992.

GROLLMAN, A. P.; MORIYA M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 7, p. 246-249, 1993.

GUTIERREZ, A.; LAURETI, L.; CRUSSARD, S.; ABIDA, H.; RODRIGUEZ-ROJAS, A., BLAZQUEZ, J.; BAHAROGLU, Z.; MAZEL, D.; DARFEUILLE, F.; VOGEL, J.; MATIC, I. B-lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. **Nature Communications**, v. 4, p. 1610, 2012

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, n. 1, p. 37-52, 1999.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HENDERSON, P. T.; DELANEY, J. C.; MULLER, J. G.; NEELEY, W. L.; TANNENBAUM, S. R.; BURROWS, C. J.; ESSIGMANN, J. M. The hydantoin lesions formed from oxidation of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine are potent sources of replication errors in vivo. **Biochemistry**, v. 42, n. 31, p. 9257-9262, 2003.

HINZ, J. M. Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, n. 6, p. 582-603, 2010.

HOFHEINZ, R. D.; BEYER, U.; AL-BATRAN, S. E.; HARTMANN, J. T. Mitomycin C in the treatment of gastrointestinal tumours: recent data and perspectives. **Onkologie**, v. 31, n. 5, p. 271 – 281, 2008.

HUISMAN, O.; D'ARI, R.; GOTTESMAN, S. Cell division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 14, p. 4490-4494, 1984.

INDIANI, C.; O'DONNELL, M. A proposal: Source of single strand DNA that elicits the SOS response. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, p. 312-323, 2013.

ITALIANI, V.; ZULETA, L. F. G.; MARQUES, M. V. The transcription termination factor Rho is required for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 181-194, 2002.

ITALIANI, V. C.; SILVA NETO, J. F.; BRAZ, V. S.; MARQUES, M.V. Regulation of catalase-peroxidase KatG is OxyR-dependent and Fur-independent in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1734-1744, 2011.

JAIN, R.; KUMAR, P.; VARSHNEY, U. A distinct role of formamidopyrimidine DNA glycosylase (MutM) in down-regulation of accumulation of G, C mutations and protection against oxidative stress in mycobacteria. **DNA Repair**, v. 6, n. 12, p. 1774-1785, 2007.

KAWAI, Y.; MORIYA, S.; OGASAWARA, N. Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1113-1122, 2003.

KIM, J. K.; CHOI, B. S. The Solution Structure of DNA Duplex-Decamer Containing the (6-4) Photoproduct of Thymidylyl (3'→ 5') Thymidine by NMR and Relaxation Matrix Refinement. **European Journal of Biochemistry**, v. 228, n. 3, p. 849-854, 1995

KIM, Y. J.; WILSON III, D. M. Overview of base excision repair biochemistry. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 3, 2012.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A.; COLLINS, J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797, 2007.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 311-320, 2010.

KOVACIC, L.; PAULIC, N.; LEONARDI, A.; HODNIK, V.; ANDERLUH, G.; PODLESEK Z.; ZGUR-BERTOK, D.; KRIZAJ, I.; BUTALA, M. Structural insight into LexA-Reca* interaction. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 6546– 6557, 2013.

KOWALCZYKOWSKI, S. C.; DIXON, D. A., A.; EGGLESTON, K.; LAUDER, S. D.; REHRAUER, W. M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 401–465, 1994.

KROKAN, H.; STANDAL, R.; SLUPPHAUG, G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 1-16, 1997.

KUMARI, A.; MINKO, I. G.; HARBUT, M. B.; FINKEL, S. E.; GOODMAN, M. F.; LLOYD, R. S. Replication bypass of interstrand cross-link intermediates by *Escherichia coli* DNA polymerase IV. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27433-27437, 2008.

KUPER, J.; KISKER, C. Damage recognition in nucleotide excision DNA repair. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2012.

KUPER, J.; KISKER, C. DNA Helicases in NER, BER, and MMR. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 767, p. 203–224, 2013.

KURTHKOTI, K.; SRINATH, T.; KUMAR, P.; MALSHETTY, V. S.; SANG, P. B.; JAIN, R.; VARSHNEY, U. A distinct physiological role of MutY in mutation prevention in mycobacteria. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 88-93, 2010.

KUZMINOV, A. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 4, p. 751–813, 1999.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709-715, 1993.

LIU, Y.; KAO, H. I.; BAMBARA, R. A. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 589-615, 2004.

LOVELL, M. A.; MARKESBERY, W. R. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7497-7504, 2007.

MARQUES, R. C. P. **Identificação de genes de reparo de DNA em *Caulobacter crescentus* através da seleção de clones sensíveis a agentes genotóxicos**. 2008. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MARTINS-PINHEIRO, M. **Busca por genes relacionados a fenótipos mutadores em *Caulobacter crescentus***. 2007. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MCVEY, M. Strategies for DNA interstrand crosslink repair: insights from worms, flies, frogs, and slime molds. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, n. 6, p. 646-658, 2010.

MICHAELS, M. L.; CRUZ, C.; GROLLMAN, A. P.; MILLER, J. H. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 15, p. 7022-7025, 1992.

MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7, 8-dihydro-8-oxoguanine). **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6321, 1992.

MILES, G. M.; SANCAR, A. DNA repair. **Chemical Research in Toxicology**, v. 2, n. 4, p. 197-226, 1989.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972. p. 466.

MILLER, C.; THOMSEN, L. E.; GAGGERO, C.; MOSSERI, R.; INGMER, H.; COHEN, S. N. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1629–1631, 2004.

MODELL, J. W.; HOPKINS, A. C.; LAUB, M. T. A DNA damage checkpoint in *Caulobacter crescentus* inhibits cell division through a direct interaction with FtsW. **Genes & Development**, v. 25, n. 12, p. 1328-1343, 2011.

MOOLENAAR, G. F.; VAN ROSSUM-FIKKERT, S.; VAN KESTEREN, M.; GOOSEN, N.Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1467-1472, 2002.

MUKHERJEE, A.; CAO, C.; LUTKENHAUS, J. Inhibition of FtsZ polymerization by Sula, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 2885-2890, 1998.

NAPOLITANO, R.; JANEL-BINTZ, R.; WAGNER, J.; FUCHS, R. P. P. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 22, p. 6259-6265, 2000.

NATHAN, P.; NEWTON, A. Identification of two new cell division genes that affect a high-molecular-weight penicillin-binding protein in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2319-2327, 1988.

NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 491-505, 2006.

NEELEY, W. L.; DELANEY, S.; ALEKSEYEV, Y. O.; JAROSZ, D. F.; DELANEY, J. C.; WALKER, G. C.; ESSIGMANN, J. M. DNA polymerase V allows bypass of toxic guanine oxidation products in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 17, p. 12741-12748, 2007.

NOHMI T. Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 231-253, 2006.

OLLIVIERRE, J. N.; FANG, J.; BEUNING, P. J. The roles of UmuD in regulating mutagenesis. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 947680, 2010.

PARK, H.; ZHANG, K.; REN, Y.; NADJI, S.; SINHA, N.; TAYLOR, J. S.; KANG, C. Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p. 15965-15970, 2002.

PATRO, J. N.; WIEDERHOLT, C. J.; JIANG, Y. L.; DELANEY, J. C.; ESSIGMANN, J. M.; GREENBERG, M. M. Studies on the Replication of the Ring Opened Formamidopyrimidine, Fapy. dG in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 46, n. 35, p. 10202-10212, 2007.

PAZ-ELIZUR, T.; TAKESHITA, M.; GOODMAN, M.; O'DONNELL, M.; LIVNEH, Z. Mechanism of Translesion DNA Synthesis by DNA Polymerase II COMPARISON TO DNA POLYMERASES I AND III CORE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 40, p. 24662-24669, 1996.

PEARLMAN, D. A.; PIRKLE, D. H.; KIM, S. H. Molecular models for DNA damaged by photoreaction. **Science**, v. 227, n. 4692, p. 1304-1308, 1985.

PEREZ-CAPILLA, T.; BAQUERO, M. R., GOMEZ-GOMEZ, J. M., IONEL, A., MARTIN, S., BLAZQUEZ, J. SOS-independent induction of *din B* transcription by beta-lactam-

- mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 4, p. 1515-1518, 2005.
- PFEIFER, G. P. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. 2, p. 270-283, 1997.
- PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W., & OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289-302, 2000.
- PHAM, P.; SEITZ, E. M.; SVELIEV, S.; SHEN, X.; WOODGATE, R.; COX, M. M.; GOODMAN, M. F. Two distinct modes of RecA action are required for DNA polymerase V-catalyzed translesion synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n.17, p. 11061-11066, 2002.
- PRENTKI, P.; KRISCH, H. M. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, v. 29, n. 3, p. 303-313, 1984.
- PLATA, K. B.; RIOSA, S.; SINGH, C. R.; ROSATO, R. R.; ROSATO, A. E. Targeting of PBP1 by β -lactams Determines recA/SOS Response Activation in Heterogeneous MRSA Clinical Strains. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61083, 2013.
- RANGANATHAN, S.; WALSH, E. S.; TEW, K. D. Glyoxalase I in detoxification: studies using a glyoxalase I transfectant cell line. **Biochemical Journal**, v. 309, p. 127-131, 1995.
- RENZETTE, N.; GUMLOW, N.; SANDLER, S. J. DinI and RecX modulate RecA–DNA structures in *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 103-115, 2007.
- REHRAUER, W. M.; LAVERY, P. E.; PALMER, E. L.; SINGH, R. N.; KOWALCZYKOWSKI S. C. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. I. LexA repressor cleavage is competitive with binding of a secondary DNA molecule,” **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23865–23873, 1996.
- ROSCHE, W. A.; P. L. FOSTER. Determining mutation rates in bacterial populations. **Methods**, v. 20, n. 1, p. 4-17, 2000.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, 2001. v. 1-3.
- SANDERS, L. H.; SUDHAKARAN, J.; SUTTON, M. D. The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, n. 1, p. 89-96, 2009.
- SASSANFAR, M.; ROBERTS, J. W. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. **Journal of Molecular Biology**, v. 212, n. 1, p. 79-96, 1990.
- SCHÄRER, O. D. Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, n. 6, p. 552-566, 2010.

SCHLACHER, K.; GOODMAN, M. F. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 587-594, 2007.

SETLOW, R.; CARRIER, W. L. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. **Journal of Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 237-254, 1966.

SHAW, K. J.; MILLER, N.; LIU, X.; LERNER, D.; WAN, J.; BITTNER, A.; MORROW, B. J. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 105-122, 2003.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutation **Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1, p. 231-251, 2003.

SZPILEWSKA, H.; BERTRAND, P.; BAILONE, A.; DUTREIX, M. In vitro inhibition of RecA-mediated homologous pairing by UmuD'C proteins. **Biochimie**, v. 77, n. 11, p. 848-853, 1995.

TANG, M.; SHEN, X.; FRANK, E. G.; O'DONNELL, M.; WOODGATE, R.; GOODMAN, M. F. UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 16, p. 8919-8924, 1999.

TANG, M.; PHAM, P.; SHEN, X.; TAYLOR, J. S.; O'DONNELL, M.; WOODGATE, R.; GOODMAN, M. F. Roles of *E. coli* DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. **Nature**, v. 404, n. 6781, p. 1014-1018, 2000.

THORNALLEY, P. J. Glutathione-dependent detoxification of α -oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. **Chemico-biological Interactions**, v. 111, p. 137-151, 1998.

TOMASZ, M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). **Chemistry & Biology**, v. 2, n. 9, p. 575-579, 1995.

TOUATI, D. Iron and oxidative stress in bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 1-6, 2000.

TRUGLIO, J. J.; CROTEAU, D. L.; VAN HOUTEN, B.; KISKER, C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. **Chemical reviews**, v. 106, n. 2, p. 233-252, 2006.

TSOKOS, C. G.; LAUB, M. T. Polarity and cell fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 744-750, 2012

VAN HOUTEN, B.; CROTEAU, D. L.; DELLAVECCHIA, M. J.; WANG, H.; KISKER, C. 'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. **Mutation**

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 577, n. 1, p. 92-117, 2005.

WAGNER, J.; GRUZ, P.; KIM, S. R.; YAMADA, M.; MATSUI, K.; FUCHS, R. P.; NOHMI, T. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 4, n. 2, p. 281-286, 1999.

WALKER, G. C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 1, p. 60, 1984.

WALLACE, S. S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 1, p. 1-14, 2002.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 1, p. 5-18, 2007.

ZEIBELL, K.; AGUILA, S.; SHI, V. Y.; CHAN, A.; YANG, H.; MILLER, J. H. Mutagenesis and repair in *Bacillus anthracis*: the effect of mutators. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2331-2338, 2007.

ZHANG, J.; MADDEN, T. L. PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. **Genome Research**, v. 7, n. 6, p. 649-656. 1997.

ZHARKOV, D. O. Base excision DNA repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 10, p. 1544-1565, 2008.

ZIETLOW, L.; BESSHO, T. DNA Polymerase I-mediated translesion synthesis in RecA-independent DNA interstrand cross-link repair in *E. coli*. **Biochemistry**, v. 47, n. 19, p. 5460-5464, 2008.