INGRID REALE ALVES

**Estudo da Síntese Translesão em *Caulobacter*
*crescentus***

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

São Paulo

2018

INGRID REALE ALVES

**Estudo da Síntese Translesão em *Caulobacter*
*crescentus***

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Rodrigo da Silva
Galhardo

Versão Original.

São Paulo

2018

RESUMO

**ALVES, I. R. ESTUDO DA SÍNTESE TRANSLEÇÃO EM *Caulobacter crescentus*.
Tese de doutorado em Microbiologia – Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.**

Como é de suma importância a integridade da informação contida no DNA, este recebe proteção contra agentes danosos que podem prejudicar sua estrutura. Mesmo em caso de dano, a célula possui um grupo de proteínas que estão envolvidas na correção e mitigação destes danos. O primeiro grupo é um conjunto de proteínas envolvidas no reparo de DNA livre de erro. Caso estas proteínas não consigam minimizar os danos, outro conjunto de proteínas é expresso como uma alternativa ao reparo. Dentre estas, estão as DNA polimerases especializadas em usar uma fita de DNA danificada como molde para replicação. Este mecanismo possibilita à célula sobreviver aos danos potencialmente citotóxicos, às custas de mutagenese. Em bactérias, a resposta ao dano de DNA envolve um conjunto de proteínas que são expressas como parte da resposta SOS. Dentre elas estão enzimas envolvidas na síntese transleção (TLS). Diferentemente de *Escherichia coli* que possui três polimerases propensas a erro especializadas em TLS, *Caulobacter crescentus* possui um cassete mutagênico *imuABC* que está implicado na síntese de DNA usando como molde uma fita danificada. Neste trabalho, estudamos o mecanismo de TLS mediado por ImuABC nesta bactéria, e encontramos uma série de diferenças com o mecanismo de *bypass* realizado pela principal polimerase implicada em TLS em *E. coli* (Pol V). As proteínas ImuABC quando expressas em níveis máximos da resposta SOS não são capazes de aumentar as taxas de mutagenese espontânea. O produto do operon *imuABC*, diferentemente da Pol V, não necessita de RecA para realizar TLS. Apenas a expressão destas proteínas em um background sem o gene *recA* já é suficiente para que ocorra a mutagenese induzida por UVC. Ao estudar a mutagenese como resposta ao dano de DNA induzido por radiação UVC em níveis genômicos em *C. crescentus*, notamos que a maioria das mutações encontradas está presente em regiões que possuem pirimidinas adjacentes que sabidamente são extremamente reativas à radiação UVC, levando à formação de fotoprodutos. Nossos dados sugerem que existe uma região no cromossomo circular de *C. crescentus* que é preferencialmente mutada, e este acúmulo de mutações pode ser consequência do reparo que acontece próximo à origem replicativa, deixando as mutações acumuladas próximas à região de término da replicação.

Palavras chave: Síntese transleção, Dano no DNA, ImuABC, *Caulobacter crescentus*

ABSTRACT

ALVES, I. R. STUDY OF TRANSLESION DNA SYNTHESIS IN *Caulobacter crescentus*. PhD thesis in Microbiology – Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2018.

As the integrity of information contained in DNA is of utmost importance, it receives protection against harmful agents that may harm its structure. Even in case of damage, the cell has a group of proteins that are involved in the correction and mitigation of these damages. The first group is a set of proteins involved in error-free DNA repair. If these proteins fail to minimize damage, another set of proteins is expressed as an alternative to repair. Among these are DNA polymerases that specialize in using a damaged DNA strand as a template for replication. This mechanism enables the cell to survive potentially cytotoxic damage at the expense of mutagenesis. In bacteria, the DNA damage response involves a set of proteins that are expressed as part of the SOS response. Among them are enzymes involved in translesion synthesis (TLS). Unlike *Escherichia coli* that has three TLS error-prone polymerases, *Caulobacter crescentus* bears the *imuABC* mutagenic cassette that is involved in DNA synthesis using a damaged template. In this work, we studied the mechanism of TLS mediated by ImuABC in this bacterium, and we found a number of differences relative to the characteristics of the principal polymerase involved in TLS in *E. coli* (Pol V). ImuABC proteins when expressed at maximum levels of the SOS response are not able to increase the rates of spontaneous mutagenesis. ImuABC, unlike Pol V, does not require RecA to perform TLS. The presence of these proteins in a background without the *recA* gene is sufficient for UVC-induced mutagenesis to occur. In studying mutagenesis as a response to DNA damage induced by UVC radiation at genomic levels in *C. crescentus*, we noted that most of the mutations found are present in regions that have adjacent pyrimidines, which are known to be extremely reactive to UVC radiation, leading to the formation of photoproducts. Our data suggest that there is a region on the circular chromosome of *C. crescentus* that is preferably mutated, and this accumulation of mutations may be a consequence of the repair occurring near the replicative origin, leaving the accumulated mutations close to the replication termination region.

Keywords: Translesion DNA synthesis, DNA damage, ImuABC, *Caulobacter crescentus*

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

μG – Micrograma

μg/mL – Micrograma por mililitro

μL – Microlitro

μM - Micromolar

4-NQO – 4-nitroquinolana 1-oxido

6-4 pp – 6,4- Pirimidina pirimidona

AAF – N-acetylaminofluorene

cDNA – DNA complementar

CDS – Sequência de DNA codificante

CEFAP – Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa

CPD – Dímero de Pirimidina Ciclobutano

dG – Desoxiguanosina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO₆₀₀ – Densidade óptica com absorbância em 600 nanômetros

DO₅₅₀ – Densidade óptica com absorbância em 550 nanômetros

fsDNA – Fita-simples de DNA

g – Força centrífuga relativa

GC – Guanosina e Citosina

GG – Guanosina-Guanosina

J/m² – Joule por metro quadrado

Kbp – Quilo pares de bases

L – Litro

M – Molar

mL - Mililitro

mM – Milimolar

MMC – Mitomicina C

MMR – *Mismatch repair* (reparo de bases mal emparelhadas)

MMS – Metil metanosulfonato

Na-MOPS – MOPS sódio

NAPs – Proteínas de Associação ao Nucleóide

NFZ – Nitrofurazona

OriC – Origem cromossômica (Origem de replicação)

pb – Par de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo

Pol II – Polimerase II

Pol III – Polimerase III

Pol IV – Polimerase IV

Pol V – Polimerase V

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa

RecA* - Proteína RecA ativa

Rif^R – Rifampicina resistentes

RNA – Ácido ribonucleico

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

Ssb – Proteína de ligação a fita-simples de DNA

T – Timina

TLS – *Translesion synthesis* (síntese translesão)

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UV – Ultra-Violeta

UVC – Radiação Ultravioleta C

1 INTRODUÇÃO

Por volta dos anos 50 do século XX o DNA (ácido desoxirribonucleico), molécula responsável pela hereditariedade, foi caracterizada estruturalmente por Watson & Crick (Watson & Crick, 1953). No final do seu artigo emblemático, os dois pesquisadores comentam que a sua organização em dupla hélice possibilita a transmissão de informação de uma célula para outra. A forma desta molécula e suas características únicas permitem a codificação de informações necessárias para a produção de todo o conteúdo celular, assim como a fabricação de novas células.

O conjunto destas características faz do DNA uma molécula extremamente importante. As células possuem componentes especializados em replicar sua informação (proteínas presentes no replissomo – ver tópico a seguir) e um conjunto de mecanismos de reparo de DNA e de tolerância aos danos que podem ser ocasionados durante o processo de replicação ou por agentes nocivos endógenos e/ou exógenos à célula (Friedberg et al., 2006).

1.1 - CROMOSSOMO BACTERIANO: ORGANIZAÇÃO E COMPACTAÇÃO

Em bactérias, o genoma geralmente está organizado em um cromossomo circular que se encontra em diferentes níveis de compactação durante o ciclo celular. Esta organização diferenciada permite uma série de processos como a replicação do DNA, transcrição em moléculas de RNA e recombinação (Badrinarayanan et al., 2015). O mais interessante é que em procariotos todos estes processos acontecem de forma concomitante com a migração destes cromossomos para os polos distintos da célula durante a divisão celular (Badrinarayanan et al., 2015). Hoje se sabe que o nucleóide bacteriano não está organizado de forma aleatória no citoplasma e, dependendo das condições de crescimento, pode mudar a sua distribuição. Isso só acontece porque o DNA está ligado às proteínas de associação ao nucleóide (NAPs: *nucleoid associated proteins*) (Badrinarayanan et al., 2015; Lewis et al., 2000). Ao se associarem ao DNA, estas proteínas modulam a natureza dinâmica do nucleóide, e regulam a expressão gênica (revisto por Dillon & Dornam, 2010).

1.2 – REPLISSOMO

Para que a divisão celular seja completada em todos os organismos, é necessário que aconteça primeiramente a duplicação do genoma. Este processo é responsabilidade de um grupo de proteínas conservadas em todos os domínios da vida, que são fundamentais para a replicação do DNA (Yao & O'Donnell, 2010; O'Donnell et al., 2013). Os principais componentes do replissomo de *Escherichia coli* incluem as proteínas DnaB (helicase), Ssb (*Single-Strand DNA-Binding* ou Proteína de Ligação a Fita-simples de DNA), DnaG (primase) e a holoenzima DNA Polimerase III (associada aos complexos de proteínas *beta-clamp* e *clamp loader*). As funções destas proteínas envolvem respectivamente a separação da dupla-hélice em duas fitas simples de DNA (fsDNA); ligação à fsDNA, estabilização e remoção de estruturas secundárias; confecção de iniciadores para replicação; além da replicação do DNA com alta processividade e precisão (Yao & O'Donnell, 2010).

Na presença de dano no DNA, a Polimerase III (Pol III), especializada em duplicar o genoma, fica impossibilitada de cumprir sua função, e pode ser substituída por outras polimerases que fazem a síntese de DNA na presença de dano. Estas enzimas propensas a erro usam os demais componentes do replissomo para fazer uma síntese através da lesão (Síntese translesão: TLS). Ao se ligar à cinta deslizante beta (*beta-clamp*) e à proteína DnaB, este replissomo especializado em fazer o *bypass* de lesões move-se lentamente e de forma breve até ser substituído pelos componentes do replissomo clássico que prossegue com a síntese de DNA livre de erro (O'Donnell et al., 2013).

1.2.1 – Replicase (Pol III)

A Pol III é uma holoenzima formada por 10 proteínas que podem ser divididas em três conjuntos funcionais diferentes. Em *E. coli* o cerne catalítico está duplicado, e sua constituição inclui as proteínas α (codificada por *dnaE*), ϵ (*dnaQ*) e θ (*holE*), sendo a proteína α a polimerase responsável pela síntese de DNA, enquanto que ϵ é encarregado da correção de erros da replicação, e θ é uma proteína estrutural envolvida na estabilização da holoenzima Pol III (O'Donnell, 2006). O outro complexo funcional consiste na cinta deslizante β ou *beta-clamp* (codificada por *dnaN*) (β_2 -*clamp*) que é um fator de processividade que assegura a ligação da Pol III com o DNA e, por fim, o *clamp loader* (DnaX_{cx}) que é um complexo de 6 proteínas: γ (*dnaX* – transcrito completo), τ_2

(também codificado pelo gene *dnaX* – em um quadro de leitura alternativo), δ (*holA*), δ' (*holB*), χ (*holC*) e ψ (*holD*) (Robison & Van Oijen, 2013; O'Donnell, 2006). Na ausência de qualquer um dos grupos citados anteriormente, o cerne catalítico das replicases, responsável pela síntese de uma nova fita de DNA, não tem o mesmo nível de afinidade entre seus componentes, e sua ação não é distinguível de outros grupos de Polimerases quanto à processividade. Todavia, quando trabalham em conjunto, podem ser caracterizados como uma replicase livre de erro e altamente processiva (McHenry, 2011a).

O produto do gene *dnaE*, a proteína catalítica α (Pol III), que está implicada na replicação livre de erro em bactérias Gram-negativas, possui todos os domínios comuns às DNA polimerases, sendo eles *palm* (participa da catálise), *thumb* (ajuda na estabilização da ligação com o DNA) e *fingers* (liga-se aos dNTPs que estão sendo recrutados para a extensão da nova fita de DNA) (McHenry, 2011a; Yang & Woodgate, 2007). Esta proteína faz parte da Família C de DNA Polimerases, que agrupa a maioria das enzimas que conseguem sintetizar o DNA com precisão. Porém, o seu domínio *palm* possui um dobramento característico de polimerases da Família X, que é constituída de enzimas que replicam o DNA com uma processividade menor quando comparadas com as replicases (McHenry, 2011a).

A duplicação do genoma é catalisada pelo produto do gene *dnaE*. Porém, bactérias com Gram + utilizam além desta proteína o produto do gene *polC* para a síntese de DNA (McHenry, 2011b). Este codifica uma DNA polimerase da mesma família, homóloga à DnaE. Experimentos mostraram que em *Bacillus subtilis* a síntese de DNA é dividida por estas proteínas de acordo com a fita que está sendo sintetizada. Sendo DnaE responsável pela síntese da fita descontínua, enquanto que PolC sintetiza sem interrupção a fita contínua (McHenry, 2011b). Bruck e colaboradores (2003) mostraram que apesar de ambas proteínas estarem envolvidas na duplicação do genoma, o produto do gene DnaE é menos processivo *in vitro* ao replicar a fita descontínua quando comparado com o produto do gene PolC. Entretanto, a taxa de replicação mais lenta não contribui para o aumento da taxa de erro desta polimerase (McHenry, 2011b).

A Pol III duplica o DNA com alta fidelidade, inserindo um nucleotídeo errado a cada 10^5 a 10^6 incorporados (Yao & O'Donnell, 2010). E mesmo ao falhar, existe um mecanismo associado ao cerne catalítico com atividade de exonuclease de revisão 3' – 5' que possui a capacidade de correção, e que diminui a possibilidade de erro de incorporação para 10^{-7} (Yao & O'Donnell, 2010). Quando agregada ao cerne catalítico, o

beta-clamp assegura que a ligação entre o DNA e a Pol III continue íntegra, conferindo processividade à replicação (Yao & O'Donnell, 2010). Por fim, o *clamp loader* usa a energia da hidrólise do ATP para permitir que o *beta-clamp* desempenhe seu papel (O'Donnell, 2006); somado a esta atividade, o *clamp loader* ainda participa da organização do replissomo de uma forma que possibilite a ligação deste com a helicase DnaB durante a incorporação de novos nucleotídeos (Yao & O'Donnell, 2010).

A eficiência da replicação do DNA é, em grande parte, consequência da ação precisa da subunidade α – que possui um sítio catalítico compacto e especializado, e como resultado, este mecanismo é facilmente perturbado pela presença de lesões na fita molde de DNA (Yang & Woodgate, 2007; McHenry, 2011b). Com o objetivo de assegurar o término da duplicação do genoma, as células possuem outro grupo de polimerases, que diferentemente da Pol III especializada na duplicação do genoma, conseguem replicar o DNA usando como molde uma fita lesionada (Sale et al., 2012). A síntese translesão (TLS), que é consequência da ação deste grupo de polimerases especializadas propensas a erro, é um mecanismo de tolerância ao dano de DNA que impede o colapso da forquilha replicativa, quando a replicase não consegue prosseguir com a síntese de DNA (Sale et al., 2012).

1.2.2 – Duplicação do genoma

Na maioria das bactérias, a replicação possui uma origem única no cromossomo que é o ponto de partida para a formação de ambas as forquilhas que irão se mover em sentidos opostos ao replicar o DNA (Revisado por O'Donnell et al., 2013). Em *E. coli*, esta região é chamada de OriC, e neste microrganismo este processo é iniciado quando a proteína DnaA reconhece uma sequência específica, dando início à formação da bolha de replicação ao desenovelar a dupla hélice. Após este passo, a proteína DnaB é recrutada para esta bolha replicativa nascente e se desloca na fita descontínua para dar início a formação do Primossomo (DnaB - helicase + DnaG - primase). Esta estrutura é extremamente importante, uma vez que é responsável pela síntese do iniciador de RNA que é necessário para síntese de DNA da fita contínua e para os fragmentos de Okazaki de aproximadamente 4000 pares de base (pb) que são sintetizados na fita descontínua. Após a síntese do primeiro iniciador, a Pol III é formada (como descrito anteriormente) para começar a síntese de DNA (este mecanismo é revisto Robinson & Van Oijen, 2013).

Quando ligada ao terminal do iniciador, a Pol III replica o DNA com muita eficiência. Estudos de *single molecule* usando fluorescência mostram que sua taxa de replicação é de 500 - 1000 pb por segundo (Tanner et al., 2009; O'Donnell, 2006). Entretanto, a taxa de progressão do replissomo pode ser extremamente variada em diferentes organismos. Mesmo dentro do filo Bacteria, alguns representantes como *E. coli* replicam o DNA em uma velocidade maior quando comparados com outros, como *Caulobacter crescentus*, que replica seu genoma lentamente, com uma velocidade característica de um representante do filo Archaea (O'Donnell et al., 2013).

A replicação do DNA em todos os organismos só pode ocorrer no sentido 5' – 3' como consequência de uma característica das polimerases - que iniciam a replicação a partir de uma hidroxila no carbono 3' do açúcar, logo, apenas a fita *leading* pode ser sintetizada de forma contínua. A outra fita (descontínua) é sintetizada de forma concomitante à primeira, porém em pequenos fragmentos (Okazaki), no sentido oposto ao movimento da DnaB (Robinson & Van Oijen, 2013). Estudos sugerem que esta sincronia ao replicar ambas as fitas só é possível pela presença de uma pequena volta na fita usada como molde, formada dentro da bolha de replicação, que possibilita acesso 5' – 3' para ambos os cernes catalíticos da Pol III presentes no replissomo (Hamdan et al., 2009).

Durante o movimento das forquilhas em direções opostas, estas acabam encontrando sítios de terminação que estão localizados antes da finalização da duplicação do genoma (O'Donnell et al., 2013). Em *E. coli*, as regiões de terminação, chamadas de Ter, também são específicas. Estes sítios estão agrupados em 10 sequências (cinco em cada lado do *replicon*) que são reguladas pela proteína de ligação ao DNA Tus. Após esta interação entre Tus e a fita de DNA, uma barreira polar é formada, impedindo que o replissomo continue se movimentando (Dewar & Walter, 2017).

1.3 - MECANISMOS DE RESPOSTA AO DANO NO DNA (DDR)

Na presença de danos no DNA, as células procarióticas e eucarióticas selecionaram estratégias que restauram a sequência original do DNA com pouco ou nenhum dano a sua estrutura. O conjunto destes mecanismos é comumente chamado de reparo de DNA livre de erro. Geralmente, estes mecanismos estão envolvidos na reparação de lesões, e são recrutados de forma prioritária frente a estes danos para que replicação do DNA prossiga sem nenhum ônus celular. No entanto, nem sempre estes mecanismos são suficientes para

a correção destes erros, levando a célula para vias de tolerância ao dano do DNA, que diferentemente dos mecanismos de reparo livre de erro, evitam o efeito citotóxico das lesões à custa, frequentemente, do aumento da taxa de mutação (Friedberg et al., 2006).

Para organismos aeróbicos, o DNA está embebido em um ambiente rico em água e oxigênio o que facilita o aparecimento de lesões espontâneas (dano endógeno) (Friedberg et al., 2006). Além das lesões ocasionadas por componentes endógenos que podem lesionar esta macromolécula, alguns agentes químicos e físicos são responsáveis por interagir de forma negativa com o DNA, levando a modificações em sua estrutura. Dentre estes componentes genotóxicos, a radiação UV é responsável pela indução de várias lesões citotóxicas, como os dímeros ciclobutano de pirimidina (CPDs: *Cyclobutane Pyrimidine Dimers*) e os fotoprodutos (6,4) pirimidina – pirimidona (Pfeifer et al., 2005). Além destas lesões que são comumente formadas, a radiação UVC (que foi amplamente utilizada neste trabalho) pode levar ao aparecimento de outras lesões minoritárias como os dímeros de purina e monoadutos de pirimidona (Pfeifer et al., 2005).

Além da radiação, drogas antitumorais como a Mitomicina C (MMC) interagem negativamente com o DNA, formando várias lesões. No ambiente intracelular, a MMC sofre uma redução que leva a sua interação com resíduos de desoxiguanosina (dG) no DNA, que terá como consequência a formação de adutos MMC – dG (Weng et al., 2010). Além disto, esta droga também é capaz de atacar sítios de guanosina – guanosina (GG) o que pode acarretar em ligações cruzadas na mesma fita de DNA ou em fitas de DNA adjacentes (Weng et al., 2010). Estas lesões são potencialmente citotóxicas uma vez que servem de bloqueio tanto para replicação quanto para a transcrição (Weng et al., 2010).

Além destes agentes genotóxicos clássicos, hoje existe uma preocupação com um novo grupo de drogas. Os antibióticos descobertos no final da década de 20 do século XX por Fleming foram responsáveis por uma das revoluções da medicina durante a segunda guerra mundial. Estas drogas vêm sendo utilizadas no controle de infecções bacterianas que acometem seres humanos, porém uma das consequências do seu uso indiscriminado é o aparecimento de linhagens resistentes, isso porque um dos alvos dos antibióticos é o DNA bacteriano. Os danos causados nesta molécula pelos antibióticos podem ser responsáveis por induzir uma resposta global (reposta SOS), o que ocasionará a expressão de um grupo de proteínas que vai processar este dano, podendo levar ao aumento das taxas de mutação, e desta forma conferir resistência a estas linhagens em ambientes estressantes (Qin et al., 2015).

1.3.1 – Bloqueio e colapso da forquilha replicativa

A persistência de lesões na fita molde de DNA pode bloquear a replicação quando estas distorções entram em choque com o replissomo. Isso acontece porque as polimerases responsáveis pela duplicação do genoma possuem características estruturais que as impossibilitam, quase sempre, de usar como molde uma fita danificada. Esta seletividade assegura que não acontecerá a incorporação de bases erradas durante o processo de alongamento da replicação. Esta especialização é responsável pela duplicação do genoma de forma eficaz e precisa (Yeeles et al., 2013).

A localização de lesões nas fitas contínua ou descontínua pode ter um papel determinante no mecanismo celular que será recrutado para que aconteça o processo de mitigação destes erros. Como a replicação na fita descontínua ocorre com a polimerização de pequenas regiões (fragmentos de Okazaki) pela Pol III, é mais provável que mecanismos de reiniciação da replicação ocorram preferencialmente em decorrência da descontinuidade deste processo, sendo desta forma a TLS um mecanismo mais propício a ser recrutado na fita contínua (Yeeles et al., 2013).

Já para lesões localizadas no molde usado para a replicação da fita contínua, os mecanismos de tolerância são mais complexos. Sabe-se que a presença de danos neste molde impede quase sempre a progressão do replissomo e para que este aparato prossiga, é necessário o *bypass* da lesão por polimerases especializadas que podem replicar o DNA usando como molde uma fita danificada. De forma alternativa, a correção destes danos também pode ser feita via reinício da síntese de DNA à frente desta lesão, seguido pelo reparo pós-replicação (Yeeles et al., 2013). Caso nenhum destes mecanismos seja recrutado, acontecerá o colapso da forquilha replicativa que é extremamente citotóxico.

1.3.2 – Sistema SOS

Ao estudar cepas de *E. coli* irradiadas com UV, Evelyn Witkin propôs, no final da década de 60 do século XX, a existência de uma via comum de genes que provavelmente era regulada por um repressor que seria inativado na presença de dano no DNA (Witkin, 1967). Em meados da década de 70, Radman complementou a descoberta de Witkin ao propor um “mecanismo de replicação celular que tendia ao aumento das taxas de mutação” – e para que isso acontecesse, era necessária a presença dos produtos dos genes *recA* e *lexA* (Radman, 1975). Hoje sabemos que a resposta SOS é o principal mecanismo

de resposta ao dano de DNA em procariotos, tendo como uma das suas consequências a mitigação do efeito citotóxico do dano através do aumento da taxa de mutação via TLS (Schlacher & Goodman, 2007).

Depois de 60 anos de descoberta (Witkin, 1967), hoje se sabe que em *E. coli*, em condições sem estresse, uma proteína repressora (LexA) reprime um grupo de ~ 40 genes (Courcelle et al., 2001) que estão envolvidos em vários processos celulares como inibição da divisão celular, reparo por excisão de nucleotídeos e TLS (Radman, 1975; Courcelle et al., 2001; Erill et al., 2007). Parte destes genes foi identificada pelo grupo de Graham Walker ao realizar uma varredura genética usando o fago Mud. Neste trabalho, eles inseriram este fago carregando o gene *lacZ* desprovido de promotor de forma aleatória no cromossomo de *E. coli*. As linhagens carregando este elemento foram tratadas com MMC e UVC, e tiveram os níveis de expressão dos genes fusionados a este sistema quantificados usando o ensaio de β -galactosidade. Como resultados, eles obtiveram um grupo de genes que eram induzidos por dano (*damage inducible*), sendo este fenótipo abolido em mutantes *recA* e *lexA* (Kenyon & Walker, 1980). Posteriormente, todo o regulon foi determinado em experimentos de microarranjos de DNA (Courcelle et al., 2001).

A proteína RecA, envolvida na resposta SOS, funciona como um sensor de dano ao DNA, ligando-se a regiões em fita simples (fsDNA), que não foram replicadas como consequência do bloqueio da polimerase replicativa frente ao dano. Ao ligar-se à fsDNA, a proteína RecA forma filamentos de nucleoproteína tornando-se ativada (RecA*). Quando o repressor LexA se liga a esse complexo (fsDNA+RecA*) é induzido a um processo de clivagem autocatalítica, que permite a expressão dos genes da resposta SOS, incluindo aqueles que codificam as polimerases capazes de usar uma fita de DNA danificado como molde para a replicação. Após o reparo ou o *bypass* das lesões, RecA torna-se inativa pela ausência de fsDNA (Schlacher & Goodman, 2007; Erill et al., 2007) (Figura 1).

RESPOSTA SOS

A) AUSÊNCIA DE DANO

RNA - Polimerase

B) PRESENÇA DE AGENTE GENOTÓXICO

Figura 1. Esquema da resposta SOS em *E. coli* descoberta por Witkin. A) Na ausência de dano no DNA o repressor LexA está ligado ao box SOS, impedindo a transcrição dos genes pela RNA polimerase. B) Na presença de um agente genotóxico, vai haver o acúmulo de fsDNA, que é reconhecido pela proteína RecA. Esta proteína começa a se ligar nestas regiões até se tornar uma nucleoproteína ativa. A ativação de RecA vai mediar a autoclivagem de LexA, e como consequência, seu desligamento do box SOS, permitindo a transcrição dos genes induzidos por esta resposta pela RNA polimerase.

1.3.3 - Diversidade de polimerases em procariotos e síntese translesão de DNA (TLS)

As polimerases podem ser divididas em seis famílias diferentes, com base na homologia entre suas sequências (Jarosz et al., 2007). A Família Y de polimerases reúne proteínas com homólogos em todos os domínios da vida; estas enzimas são especializadas em realizar TLS (Yeeles et al., 2013). Em *E. coli* existem cinco DNA polimerases, sendo três delas induzidas como parte da resposta SOS ao dano de DNA (Pol II, Pol IV e Pol V). Sabe-se que estas proteínas estão envolvidas na via TLS de tolerância ao dano neste organismo (Napolitano et al., 2010).

A Pol II de *E. coli*, codificada pelo gene *polB*, é uma proteína da família B de polimerases que realiza TLS (Wang & Yang, 2009). Nesta enzima estão conservados todos os motivos proteicos presentes nas replicases, assim como a atividade de exonuclease de revisão, o que é incomum para uma TLS-DNA-Polimerase (Wang & Yang, 2009). *In vitro* a Pol II é capaz de fazer o *bypass* de lesões como sítios abásicos, ϵ C e adutos AAF (Al Mamun & Humayun, 2006; Becherel & Fuchs, 2001; Paz-Elizur et al., 1996). Foi relatado que *in vivo* a Pol II é responsável por aumentar a frequência de deleções (-2nt) ao sintetizar DNA sobre adutos AAF (Fuchs & Fujii, 2007).

DinB (Pol IV) é a única DNA polimerase da Família Y que é conservada em todos os domínios da vida, incluindo em humanos com a Pol κ (Fuchs et al., 2004). Codificada pelo gene *dinB*, também conhecido na literatura como *dinP* (ambos aceitos), a Pol IV não possui atividade de exonuclease de revisão 3' – 5' e realiza TLS (Wagner et al., 1999). Jarosz e colaboradores (2006) mostraram que DinB participa do mecanismo de tolerância a danos causados por Nitrofurazona (NFZ) *in vivo* (adutos N^2 -dG), e atua em conjunto com a proteína UmuD'₂C na sobrevivência à 4-hidroxiaminoquinolona-n-óxido (adutos de 4-NQO) em *E. coli*. Assim como para várias polimerases especializadas em TLS, o mutante *dinB* é viável em *E. coli* (Goodman & Woodgate, 2013). Em outras bactérias como *C. crescentus* e *Mycobacterium tuberculosis*, a expressão de *dinB* não é induzida por SOS (Galhardo et al., 2005; Rocha et al., 2008; Ordonez et al., 2014), e esta proteína não participa de mecanismos de tolerância ao dano aos agentes descritos para *E. coli* em *C. crescentus* (dados não publicados). No entanto em experimentos de mutagenese espontânea realizados recentemente por nosso grupo, os resultados mostraram que o mutante *dinB* desta bactéria apresenta menos *frameshifts* -1 espontâneos quando comparado com as linhagens selvagem e mutante *imuC* (Valencia, 2017). Este mesmo fenótipo já foi associado a proteína DinB em *E. coli* (Godoy et al., 2007).

A Pol V (UmuD'₂C) de *E. coli* é uma polimerase da Família Y, composta pelo produto gênico do operon *umuDC* regulado pela resposta SOS nesta bactéria (Erill et al., 2007; Ippoliti et al., 2012). Kato e Shinoura (1977), ao realizarem uma varredura genética mostraram que mutações no gene *umuC* resultam na ausência de mutagênese induzida por UV em *E. coli*. Um estudo posterior de Rajagopalan e colaboradores (1992) mostrou que o produto gênico dos genes *umuDC* estão envolvidos no *bypass* de lesões *in vitro*, porém neste trabalho eles acreditavam que estas proteínas, juntamente com a Pol III, faziam o *bypass* das lesões através de um complexo proteico chamado de Mutassomo. Na década de 90, os trabalhos de Reuven e colaboradores (1999), Tang e colaboradores (1999) e Bruck e colaboradores (1996) foram importantes para confirmar o papel dos produtos dos genes *umuDC* na tolerância de dano no DNA como polimerase capaz de realizar TLS em *E. coli* (Reuven et al., 1999; Tang et al., 1999), sendo que a proteína UmuC mantém esta habilidade de polimerização mesmo na ausência da Pol III (Bruck et al., 1999).

Hoje sabemos que a Pol V de *E. coli* é composta de duas proteínas diferentes: o dímero UmuD'₂ e a proteína UmuC (Bruck et al., 1996). A proteína UmuD sofre uma autoclivagem estimulada por RecA após o início da resposta SOS, dando origem a UmuD', fundamental para interação com UmuC e a formação da Pol V (UmuD'₂C) (Ippoliti et al., 2012). Dentre as três polimerases envolvidas em mecanismos de tolerância ao dano de DNA em *E. coli* é correto afirmar que a Pol V é a responsável por fazer o *bypass* da maioria das lesões que podem acometer o genoma desta bactéria.

1.3.3.1 - Mecanismos de TLS mediado pelas polimerases Pol IV e Pol V

Existem algumas informações disponíveis na literatura sobre o mecanismo pelo qual a proteína DinB (Pol IV) faz o *bypass* de lesões em *E. coli*. Em 2007, o grupo de Graham Walker mostrou que o dímero UmuD₂ e a proteína RecA modulam a atividade desta polimerase em diversos substratos de DNA. Eles sugerem que as proteínas citadas anteriormente restringem o potencial mutagênico desta polimerase para *frameshifts* -1 ao tornar seu sítio ativo seletivo para o *bypass* de apenas algumas modificações na estrutura do DNA (Godoy et al., 2007). Neste trabalho, eles também sugerem que este controle vai ser mais relaxado em uma fase mais avançada da resposta SOS, e que DinB poderá ser mais mutagênico em fases crônicas desta resposta ao dano em decorrência desta regulação (Godoy et al., 2007).

Em um trabalho mais recente, Mallik e colaboradores (Mallik et al., 2015) mostraram que após a indução da resposta SOS, as proteínas DinB e RecA fusionadas com marcadores fluorescentes formam um foco em lesões de quebra-dupla de DNA. Eles sugerem que a interação destas proteínas *in vivo* é importante para restaurar a forquilha replicativa e evitar o seu colapso (Mallik et al., 2015). Scotland e colaboradores (2015) sugeriram que ao superexpressar a proteína DinB, ela ganha acesso a forquilha replicativa (na ausência de danos no DNA), e este mecanismo é consequência de uma troca entre a Pol IV e a Pol III que resulta em queda da sobrevivência em *E. coli* (Scotland et al., 2015). Eles chamam atenção que a troca entre estas enzimas, mediada pela interação com o *beta-clamp*, é um mecanismo interessante que fornece pistas de como a TLS é regulada *in vivo* ao permitir o acesso a forquilha replicativa da proteína DinB mesmo na ausência de danos.

A Pol V é altamente propensa a erro ao replicar o DNA. Por volta da década de 80 do século passado os primeiros modelos de TLS frente à fotoprodutos para esta enzima surgiram na literatura (Bridges & Woodgate, 1985a; Bridges & Woodgate, 1985b). O primeiro deles, chamado de modelo *two-step* (dois passos) (Bridges & Woodgate, 1985b), recebeu este nome porque os autores acreditavam que a TLS de fotoprodutos acontecia em um processo que abrangia dois passos principais, sendo eles: A Pol III seria responsável por inserir um nucleotídeo de forma oposta ao primeiro (3') T (timina) do dímero T-T (consequência da radiação UV), já o segundo passo envolveria a aproximação da proteína RecA da região da lesão que irá possibilitar a interação da Pol III com as proteínas que compõem a Pol V para que em conjunto elas incorporem o próximo nucleotídeo (segundo (5') T que compõe o dímero T-T).

No começo da década de 90, um segundo modelo foi proposto por Echols & Goodman (Echols & Goodman, 1990) para a TLS da Pol V. Eles intitularam este trabalho como *Mutation induced by DNA damage: A many protein affair* (Mutações induzidas por dano no DNA: um caso de várias proteínas). O título não poderia ser mais preciso para o que eles propunham neste trabalho. Neste modelo, eles acreditavam que a holoenzima Pol III ao encontrar uma lesão sofria um processo de desaceleração que culminava com o recrutamento e montagem de um complexo proteico chamado por eles de “Mutassomo” – este era composto por uma série de proteínas como RecA, UmuC, UmuD', Ssb, além da Pol III (com *beta-clamp* e *clamp loader* associados). O mutassomo seria responsável por fazer o *bypass* das lesões. Neste modelo, eles já levavam em conta que a proteína RecA era fundamental para que acontecesse a clivagem de UmuD para UmuD' (Bruck et al., 1996). Logo após a esta proposta, ficou claro que além da clivagem desta proteína,

era necessária a presença deste dímero (UmuD'₂) para caracterizar a Pol V como polimerase propensa a erro capaz de fazer o *bypass* de lesões independente da presença da Pol III: o complexo proteico UmuD'₂C purificado quando testado em ensaios de replicação mostra sinais claros de síntese translesão em *E. coli* (Bruck et al., 1999). Além disso, ficou provado que a Pol III não está associada à replicação propensa a erro neste organismo – uma vez que ela é responsável pela duplicação do genoma bacteriano livre de erro e com alta processividade (Yao & O'Donnell, 2010).

Hoje existem dois modelos de TLS para a Pol V aceitos na literatura (Figura 2), e ambos herdaram do modelo de Mutassomo de Echols & Goodman a noção de que a proteína RecA* (quando ativa) tem um papel chave neste mecanismo. Estes autores acreditavam que esta proteína possuía um papel fundamental na mutagênese, já que células deficientes em *lexA* e *recA* não eram mutáveis na presença de radiação UVC, mesmo com o produto dos genes *umuD*⁺ e *umuC*⁺ sendo expressos em altos níveis de forma constitutiva nestas linhagens (Blanco et al., 1982). O primeiro deles é o modelo chamado de “*Trans* – ativação da Pol V por RecA” desenvolvido pelo grupo de Myron Goodman em 2006 (Schlachter et al., 2006). A teoria deles é que existe um acúmulo de RecA* ativo em fsDNA em *trans* (que não está sendo replicada), que quando em contato com a Pol V (à jusante) torna-a ativa (Figura 2). Neste mesmo trabalho, foi testado um modelo alternativo para o acúmulo de RecA* em *cis* que não teve sucesso para TLS. Eles explicam que esta teoria foi pensada com base na argumentação da Navalha de Occam (*que explica eventos baseado somente nas premissas que são necessárias para a explicação do mesmo*), ou seja, por parcimônia não teria porque RecA* se posicionar a montante da forquilha replicativa (ver modelo alternativo abaixo), já que esta ação poderia bloquear o progresso da Pol V.

O segundo modelo proposto em 2009 por Fujii & Fuchs (Fujii & Fuchs, 2009) assim como o modelo anterior, foca na importância da proteína RecA e do *beta-clamp* para que aconteça TLS mediada pela Pol V. Neste modelo eles fazem uma analogia para explicar a TLS, sendo que de forma figurada a Pol V seria um trem que desliza sobre um trilho que seria composto por proteínas RecA ativa para que o *bypass* de lesões aconteça. Além da nucleoproteína RecA, acredita-se que o *beta-clamp* tenha um papel importante para estabilizar a ligação da fsDNA molde com a Pol V que desliza sobre moléculas de RecA* em *cis*, e as retira do DNA para fazer TLS.

SÍNTESE TRANSLEÇÃO PolV

A) Clivagem de UmuD

B) MODELO RecA EM *trans*: Mutassomo

C) MODELO RecA EM *trans*: Trilho

Figura 2. Participação de RecA no processo de TLS mediado pela DNA Pol V. Figura esquemática dos modelos de TLS vigentes para a Pol V de *E. coli*. A) Autoclivagem da proteína UmuD estimulada pela presença de RecA ativa. B) Modelo do Mutassomo proposto pelo grupo de Goodman. Nesta figura apresentamos o modelo vigente em que se acredita que a Pol V necessita da presença de RecA ativa em *trans* para o fazer o *bypass* de lesões que não são replicadas pela Pol III – Eles nomearam este mecanismo como Mutassomo porque além da polimerase propensa a erro, envolve um grande conjunto de proteínas que estão implicadas na replicação livre de erro e que são necessárias para TLS. C) Modelo proposto por Fujii & Fuchs também chama atenção para a necessidade da interação de RecA ativa com a Pol V para que aconteça o *bypass* da lesão. Neste modelo eles fazem a analogia ao trilho (nucleofilamento de RecA ativa) e o trem (Pol V) para explicar como acontece a síntese translesão em *E. coli*.

Como descrito anteriormente, a Pol IV e Pol V foram estudadas exaustivamente nas últimas décadas, uma vez que são as polimerases responsáveis pela síntese translesão em *E. coli* (organismo modelo da biologia molecular). Porém, algumas bactérias não possuem o operon *umuDC* que codifica a Pol V, e utilizam uma outra maquinaria para fazer o *bypass* das lesões (McHenry, 2011a).

1.3.4 - Algumas bactérias utilizam outra Pol III para fazer TLS: o cassette mutagênico *imuABC* (*dnaE2*)

Algumas bactérias possuem uma cópia extra do gene *dnaE*, chamada de *dnaE2*, que codifica uma subunidade α “alternativa” que não está envolvida na duplicação do genoma, e sim no *bypass* de lesões que bloqueariam a síntese de DNA feita pelo produto do gene *dnaE* em microrganismos (McHenry, 2011b). Bactérias que usam a proteína DnaE2 para fazer TLS geralmente não possuem ortólogos de *umuDC* (McHenry, 2011a).

A mutagênese induzida por dano dependente de DnaE2 foi caracterizada primeiro em *Mycobacterium tuberculosis* e *Caulobacter crescentus* (Boshoff et al., 2003; Galhardo et al., 2005). Boshoff e colaboradores observaram que em *Mycobacterium* a segunda cópia do gene *dnaE* (*dnaE2*) é regulada *in vitro* por vários agentes genotóxicos, e a perda desta proteína reduz a sobrevivência à radiação UV e a virulência em camundongos (Boshoff et al., 2003). Este grupo foi o primeiro a associar esta proteína como um importante fator que contribui para o surgimento de mutações de resistência a agentes antibacterianos (Boshoff et al., 2003).

Em 2005 nosso grupo mostrou que o gene *dnaE2* (que também pode ser chamado de *imuC* por ser o terceiro gene do operon *imuABC*) faz parte do cassette mutagênico *imuABdnaE2* induzido por dano em *C. crescentus*, que é responsável pela mutagênese induzida por MMC, e participa de uma das vias de mutagênese induzida por UV neste organismo (Galhardo et al., 2005); o prefixo “*imu*” usado para identificar estes genes é uma referência ao termo *inducible mutagenesis* (mutagênese induzível). Nossos dados indicam que estes genes estão na mesma via de epistasia, uma vez que mutantes simples dos genes *imuA*, *imuB* e *imuC* (*dnaE2*), bem como combinações destas deleções gênicas, inibem a mutagênese induzida pelos agentes descritos anteriormente (Galhardo et al., 2005). Vale a pena ressaltar a importância e o pioneirismo deste trabalho ao associar a ação conjunta destes genes como resposta ao dano no DNA. McHenry em 2011 (McHenry, 2011b) chamou atenção para a grande dispersão destas proteínas em genomas

bacterianos sequenciados até o momento da publicação do seu trabalho e, como é importante que mais estudos se concentrem neste cassete mutagênico como uma forma de entender o mecanismo de ação responsável pela mutagênese induzida por dano mediado por estas proteínas, inclusive para tentar contornar os problemas de resistência bacteriana aos antibióticos. Seguindo a sugestão deste autor, utilizaremos neste trabalho o nome *imuC* para esta segunda cópia de *dnaE*.

O cassete mutagênico regulado pela resposta SOS descoberto por Galhardo e colaboradores é altamente difundido em bactérias (Galhardo et al., 2005). A proteína ImuA é a que possui a sequência menos conservada, com similaridade com as proteínas ImuA' de *M. tuberculosis*, assim como RecA e Sula (Warner et al., 2010; Galhardo et al., 2005). Em *E. coli*, RecA está envolvida no reparo por recombinação homóloga, indução da resposta SOS, processamento da proteína UmuD' e associação com a Pol V para fazer o *bypass* de lesões, enquanto que Sula atua no controle da divisão celular (Altschul et al., 1997; Galhardo et al., 2005). No entanto, o papel de ImuA na tolerância ao dano de DNA em organismos que possuem este operon mutagênico ainda é desconhecido. A proteína ImuB possui similaridade com proteínas da Família Y de polimerases (Galhardo et al., 2005), e possui todos os domínios proteicos típicos desta família que é especializada em TLS. Mudanças em regiões da sequência que codificam resíduos catalíticos conservados em polimerases desta família sugerem que esta proteína não é funcional como polimerase (Warner et al., 2010). Por outro lado, Warner e colaboradores observaram que a proteína ImuB de *Mycobacterium* interage com o *beta-clamp* deste organismo, associação que não é observada entre ImuC e β -*clamp*. Neste mesmo trabalho eles mostraram que ImuB também é capaz de interagir com a proteína ImuC (Warner et al., 2010). Com estas informações em mãos, este grupo criou a hipótese de que ImuB possui um possível papel acessório/regulatório na síntese translesão catalisada pela proteína ImuC (Galhardo et al., 2005, Warner et al., 2010).

Em bactérias do gênero *Pseudomonas*, este cassete mutagênico também está presente. Em *P. putida*, o produto gênico do gene *imuC* não possui efeito significativo no aumento de deleções de 1 par de base (Koorits et al., 2007), enquanto a proteína ImuB parece estar envolvida no acúmulo destas mutações na fase fase estacionária (Koorits et al., 2007), o que demonstra um papel antagônico destas proteínas. Em *Pseudomonas aeruginosa*, Cirz e colaboradores identificaram em experimentos de larga escala genes que são induzidos por dano, e dentre eles estão o que codifica a polimerase DinB (Pol IV), e o operon *imuABC*, e alertaram para a importância destes genes em mediar o

aumento da taxa de mutação e como consequência favorecer o aumento dos casos de resistência bacteriana neste organismo (Cirz et al., 2006). Mais recentemente nosso grupo também vem investigando o papel da resposta SOS e destas polimerases na mutagenese induzida por dano que contribui para a resistência a antibióticos (Valencia et al., 2017).

1.4 - *Caulobacter crescentus*: UM MODELO ALTERNATIVO PARA BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA

O avanço dos estudos em biologia molecular só foi possível graças ao progresso na compreensão de um microrganismo extremamente popular nos meios acadêmicos: *E. coli*. Esta bactéria se tornou modelo para uma série de fenômenos que explicam de forma complexa e precisa mecanismos de regulação gênica, replicação do DNA e mecanismos de reparo de DNA e tolerância ao dano (Friedberg et al., 2006). Porém, mesmo sendo um excelente organismo modelo, esta bactéria não consegue explicar como alguns destes mecanismos funcionam em outros microrganismos.

Buscando suprir estas lacunas, outras bactérias têm sido usadas como modelo para diferentes áreas de estudo da Biologia. Um exemplo disso é *C. crescentus*, pertencente ao grupo Caulobacterales, descrito em 1935 por Henricini e Johnson (Henricini & Johnson, 1935). Neste trabalho, os autores chamam atenção para a morfologia única deste grupo, o que levou a criação de uma nova ordem taxonômica. Dentro desta encontra-se *C. crescentus*. Hoje esta é caracterizada como uma α -proteobactéria, Gram-negativa, de vida livre, que possui vários atributos fisiológicos e funcionais que a tornam um excelente modelo para a biologia molecular. Este microrganismo possui um ciclo celular com divisão assimétrica, que como consequência, gera dois tipos celulares morfologicamente distintos. Apenas as células fixas, chamadas de talo, conseguem replicar o seu DNA e prosseguir a divisão celular, gerando ciclicamente dois tipos celulares: células flageladas e talo (Collier, 2012). Esta sua característica particular chamou atenção de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo que a utilizam para entender o controle do ciclo celular em bactérias e mecanismos de replicação de DNA.

C. crescentus também é um organismo extremamente interessante quando se trata de genética. A holoenzima DNA Polimerase III ainda não foi caracterizada nesta bactéria, porém, análises comparativas entre os genomas sequenciados e depositados em bancos de dados até o momento mostram que a subunidade θ de *E. coli*, codificada pelo gene *holE*, que tem sua função associada com a estabilização da subunidade ϵ (*dnaQ*) no cerne

catalítico e ligação dos componentes da replicase (Taft-Benz & Schaaper, 2004), está confinada somente no grupo das enterobactérias (Dietrich et al., 2014). Logo, estudos usando como modelo outra Pol III são limitados para o entendimento do funcionamento desta holoenzima para a síntese de DNA livre e propensa a erro em procariotos bacterianos (Jensen et al., 2001).

Uma série de ferramentas genéticas já foi desenvolvida para *C. crescentus* para facilitar a manipulação genética deste organismo (e. g. Thanbichler et al., 2007). Estas técnicas podem consolidar esta bactéria como um modelo genético alternativo às enterobactérias.

Em 2010, Marks e colaboradores sequenciaram o genoma de uma linhagem derivada da CB15 (primeira linhagem de *C. crescentus* que teve seu genoma sequenciado em 2001 por Nierman e colaboradores). Esta linhagem foi chamada de NA1000 e o seu genoma apresenta 4.016.942 pb que codificam 3.767 genes que estão espalhados em um cromossomo único circular (sua sequência completa pode ser acessada no link a seguir: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?gn:T00841). Este genoma (Marks et al., 2010), será usado como referência ao longo deste trabalho.

Hoje sabemos que o cassete mutagênico *imuABC* é amplamente disperso na natureza, e a presença destes genes em genomas bacterianos é mais frequente que o operon *umuDC*. A compreensão de particularidades de seu mecanismo de ativação pode ser extremamente elucidativa para compreender como a maioria das bactérias faz o *bypass* de lesões e toleram a interação com agentes genotóxicos. Logo, estudar o funcionamento deste mecanismo é fundamental para contribuir com informações que permitam focar em novos alvos moleculares que nos permitam ampliar as ferramentas na luta contra a resistência bacteriana que utilizam polimerases diferentes da Pol V.

Além de genes envolvidos em TLS, nosso grupo tem se esforçado para caracterizar outros genes que fazem parte da resposta SOS em *C. crescentus* (Rocha et al., 2008). Como resultado, em 2015 Lopes-Kulishev e colaboradores (Lopes-Kulishev et al., 2015) mostraram que o produto do gene *mmcB*, induzido por SOS, é necessário para que aconteça a mutagênese induzida por mitomicina C mediada por ImuABC (Galhardo et al., 2005; Lopes-Kulishev et al., 2015). O fenômeno de mutagênese induzida por MMC é inibido na ausência de *mmcB* (que é induzido pela resposta SOS). O mesmo não é observado para danos causados por luz UV. Esta proteína processa o dano induzido por este agente genotóxico, permitindo acesso da maquinaria de TLS (ImuABC). A mutagênese induzida por UV, é independente de processamento por MmcB e parcialmente

dependente de ImuABC. Outra parte do nosso grupo está concentrada em desvendar este componente independente de ImuC e dependente de SOS para a mutagênese induzida por UV. Somado a estes esforços, recentemente publicamos um trabalho mostrando que em *C. crescentus* a TLS mediada por ImuABC não depende da presença de RecA (Alves et al., 2017) – apêndice 8. Estes dados serão descritos ao longo desta tese.

Em 2012, Bos e colaboradores chamaram atenção para um mecanismo de resposta ao dano de DNA presente em *C. crescentus* que é inteiramente independente da ação de TLS-DNA-Polimerases presentes neste organismo. A proteína BapE é induzida em consequência da resposta SOS nesta bactéria e desempenha um mecanismo apoptose-like que ao se deparar com danos no DNA não mitigados por mecanismos de reparo livre de erro, direciona a célula para uma morte-programada mediada pela endonuclease BapE (Bos et al., 2012).

Além da resposta SOS ao dano de DNA, outros pesquisadores que estudam *C. crescentus* identificaram outro regulon que é também induzido pela presença de lesões de DNA (Modell et al., 2014). Neste trabalho eles caracterizaram um novo inibidor da divisão celular, produto do gene *didA* que é responsável pela filamentação das células na presença de dano no DNA. A proteína DidA se liga à FtsN levando ao bloqueio da citocinese. A regulação deste gene é feita por DriD de forma independente de LexA/RecA (Modell et al., 2014). Este mesmo grupo em 2011 (Modell et al., 2011) caracterizou a proteína SidA que é induzida em consequência da resposta SOS em *C. crescentus*. O produto do gene *sidA* é um inibidor da divisão celular que irá atrasar a progressão do ciclo celular na presença de dano no DNA (Modell et al., 2011).

Mesmo não sendo uma bactéria oportunista e/ou patogênica; *C. crescentus* vem recebendo atenção na comunidade científica ao redor do mundo por ser um excelente modelo para estudar a replicação de DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular. Somada a este repertório de técnicas, a presença de genes que codificam as proteínas ImuABC em seu genoma tornam esta bactéria extremamente interessante para prosseguir os estudos de TLS em bactérias que utilizam modelos diferentes da Pol V.

5 CONCLUSÕES & DISCUSSÃO GERAL

- Diferentemente da Pol V, a indução da expressão dos genes *imuABC* em níveis máximos obtidos na resposta SOS é insuficiente para aumentar as taxas de mutagênese espontânea.

Algumas bactérias como *C. crescentus* não possuem ortólogos do operon *umuDC*. Elas utilizam o produto do cassete mutagênico ImuABC para fazer o *bypass* na presença de lesões no DNA, impedindo o colapso da forquilha – que é um evento potencialmente citotóxico. Alguns trabalhos mostraram que a Pol V pode assumir a forquilha replicativa mesmo na ausência de dano, e como consequência, levar ao aumento as taxas de mutação espontânea. Nossos dados para *C. crescentus* sugerem que ImuABC não tem acesso a forquilha replicativa e/ou não é mutagênica quando está sintetizando o DNA usando como molde uma fita de DNA integra, sem lesões.

- A expressão de *imuABC* em níveis máximos obtidos na resposta SOS não promove mudanças na tolerância e mutagênese a MMC e UVC em *C. crescentus*.

Apenas o aumento da expressão dos genes que fazem parte do cassete mutagênico não foi suficiente para alterar as taxas de sobrevivência nem para aumentar a mutagênese induzida por UVC e MMC em *C. crescentus*.

- ImuABC não precisa de RecA na forquilha para fazer o *bypass* de lesões induzidas por UVC.

Diferentemente dos modelos de TLS mediados pela Pol IV e Pol V que já foram propostos para *E. coli*, nossos resultados mostraram que mesmo na ausência de RecA, a expressão de *imuABC* é capaz de restaurar a mutagênese induzida por UVC em um *background* sem a indução da resposta SOS. Estes dados sugerem um mecanismo de TLS novo para bactérias, que pode ser importante para elucidar como bactérias que não possuem ortólogos dos genes *umuDC* acumulam mutações.

- Existe uma complementação dos espectros de mutação induzidas por UVC nas linhagens *PimuA* e $\Delta recA PimuAo^c$.

Ao sequenciarmos regiões do gene *rpoB* (que quando mutado confere resistência à rifampicina) das linhagens *PimuA* (controle) e $\Delta recA PimuAo^c$ (TLS em níveis da resposta SOS), observamos uma equivalência das mutações, o que sugere que a compensação do fenótipo observado na linhagem $\Delta recA PimuAo^c$ quando comparada com a cepa controle é de fato uma consequência da mutagênese mediada por ImuABC.

- Ensaios de mutagênese induzida por UVC com doses crescentes mostram que existem dois mecanismos que são responsáveis pela mutagênese causada por este agente. Com o aumento da dose de UVC, a TLS fica mais prevalente.

Estudos em *E. coli* sugerem que a força de ligação do repressor LexA e a região operadora dos genes que são induzidos em consequência da resposta SOS é responsável por modular a expressão diferenciada de grupos de genes diferentes na presença de dano no DNA. Ainda não foram publicados dados da força dos operadores dos genes que fazem parte da resposta SOS em *C. crescentus*, porém é possível inferir que o acúmulo de dano no DNA causado pelo aumento da dose de UVC pode estar relacionado ao aumento da ativação da TLS em comparação com o outro mecanismo de resposta a radiação UVC, que é mais ativo em doses menores.

- Existe um componente independente de *imuABC* que está envolvido na mutagênese induzida por MMS em *C. crescentus*.

Quando comparamos as taxas de mutagênese induzida por MMS entre as linhagens selvagem (NA1000) e o mutante *imuC*, não observamos diferenças entre as frequências de mutantes induzidos por dano entre as duas cepas. Este dado sugere que outro mecanismo, diferente da TLS mediada por estas proteínas, é responsável pela mutagênese induzida por este agente.

- Sobrevivências diferentes ao UVC levam a taxas de mutação diferentes.

Quando sequenciamos linhagens derivadas da cepa selvagem (NA1000) irradiadas com 300 J/m² obtemos taxas de sobrevivência diferentes, usando diferentes metodologias experimentais. Condições que levam à 10% de sobrevivência promovem aumentos pequenos na mutagênese, enquanto que condições onde a toxicidade da luz UV é maior geram mais mutações

- No cromossomo circular de *C. crescentus* existem duas regiões espelhadas mais próximas ao término que são preferencialmente mutadas por UVC.

Observamos um padrão claro em que as mutações estão agrupadas em espelho próximo a regiões próximas ao término da replicação. Este fenômeno pode refletir diferenças na eficiência de mecanismos de reparo de DNA entre regiões próximas ao início da replicação e o término da replicação.

- Mutações induzidas por UVC derivadas da linhagem selvagem de *C. crescentus* não estão preferencialmente associadas com a replicação contínua ou descontínua.

A replicação do DNA em *C. crescentus* acontece a partir de uma origem única e segue de forma bidirecional. A replicação da fita descontínua é consistente com várias entradas da replicase que poderia afetar a percepção de lesões pela maquinaria replicativa. Porém nossos dados mostram que não existe um viés de fita replicada nas mutações induzidas por UVC em genomas irradiados.

- Mutações induzidas por UV na linhagem *imuC* mostram uma organização espacial similar à encontrada na linhagem NA1000.

Nossos dados de sequenciamento genômico da linhagem deficiente em TLS ainda são preliminares, pois o número de mutações encontradas é pequeno, necessitando de sequenciamentos adicionais. Porém, a distribuição das substituições encontradas neste genoma parece seguir o mesmo padrão encontrado no cromossomo da cepa selvagem. Isso pode ser um indicativo de que a organização espacial das mutações é consequência da diferença de eficiência de mecanismos de reparo ao longo do cromossomo, e não apenas um viés relacionado a TLS mediada por ImuC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Mamun, A. A., Humayun, M. Z. 2006. *Escherichia coli* DNA polymerase II can efficiently bypass 3, N(4) - ethenocytosine lesions in vitro and in vivo. *Mutation Research*. 593: 164 – 176.

Alves I. R., Lima-Noronha, M. A., Silva, L. G., Fernández-Silva, F. S., Freitas, A. L. D., Marques, M. V., Galhardo, R. S. 2017. Effect of SOS-induced levels of imuABC on spontaneous and damage-induced mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *DNA Repair (Amst)*.59:20-26. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.09.003.

Arias-Cartin, R., Dobihal, G. S., Campos, M., Surovtsev, I. V., Parry, B., Jacobs-Wagner, C. 2016. Replication fork passage drives asymmetric dynamics of a critical nucleoid-associated protein in *Caulobacter*. *The EMBO Journal* 36, 301-318. doi: 10.15252/emboj.201695513.

Badrinarayanan, A., Le, T. B., and Laub, M. T. 2015. Bacterial chromosome organization and segregation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 31: 171–199. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125211>.

Bagg, A., Kenyon, C. J., & Walker, G. C. (1981). Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), 5749–5753.

Becherel, O. J., and Fuchs, R. P. 2001. Mechanism of DNA polymerase II-mediated frameshift mutagenesis. *PNAS*. 98: 8566 – 8571.

Bjedov, I., Dasgupta, C. N., Slade, D., Le Blastier, S., Selva, M., & Matic, I. 2007. Involvement of *Escherichia coli* DNA Polymerase IV in Tolerance of Cytotoxic Alkylating DNA Lesions in Vivo. *Genetics*, 176(3), 1431–1440. <http://doi.org/10.1534/genetics.107.072405>.

Bos, J., Yakhnina, A. A., & Gitai, Z. (2012). BapE DNA endonuclease induces an apoptotic-like response to DNA damage in *Caulobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44): 18096–18101. <http://doi.org/10.1073/pnas.1213332109>.

Boshoff, H. I., Reed, M. B., Barry, C. E. 3rd, Mizrahi, V. 2003. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. 18;113(2):183-93.

Bridges, B. A., and Woodgate, R. 1985. Mutagenic repair in *Escherichia coli*: products of the recA gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12): 4193–4197.

Bridges, B. A., and Woodgate, R. 1985. The two-step model of bacterial UV mutagenesis. *Mutat Res.* 150(1-2): 133 – 9.

Bruck, I., Goodman, M. F., O'donnell, M. 2003. The Essential C Family DnaE Polymerase Is Error-prone and Efficient at Lesion Bypass. *J Biol Chem.* 7; 278(45): 44361 – 8 . doi: [10.1074/jbc.M308307200](https://doi.org/10.1074/jbc.M308307200).

Bruck, I., Woodgate, R., McEntee, K., Goodman, M. F. 1996. Purification of a soluble UmuD'C complex from *Escherichia coli*. Cooperative binding of UmuD'C to single-stranded DNA. *The Journal of Biological Chemistry.* 271: 10767 – 10774.

Burckhardt, S. E., Woodgate, R., Scheuermann, R. H., & Echols, H. 1988. UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification, and cleavage by RecA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(6), 1811–1815.

Christen, B., Abeliuk, E., Collier, J. M., Kalogeraki, V. S., Passarelli, B., Collier, J. A., Shapiro, L. 2011. The essential genome of a bacterium. *Molecular Systems Biology.* 7,528. <http://doi.org/10.1038/msb.2011.58>.

Cirz, R. T., O'Neill, B. M., Hammond, J. A., Head, S. R., & Romesberg, F. E. 2006. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS Response and Its Role in the Global Response to the Antibiotic Ciprofloxacin. *Journal of Bacteriology*, 188(20): 7101–7110. <http://doi.org/10.1128/JB.00807-06>.

Collier, J. 2012. Regulation of chromosomal replication in *Caulobacter crescentus*. *Plasmid.* V:67(2). 76 – 87. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.12.007>.

Costes, A., and Lambert, S. A. E. 2013. Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery. *Biomolecules.* 3(1): 39 – 71. <http://doi.org/10.3390/biom3010039>.

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

Dewar, J. M., and Walter, J. C. 2017. Mechanisms of DNA replication termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 18: 507 – 516. doi:10.1038/nrm.2017.42.

Dietrich, M., Pedró, L., García, J., Pons, M., Hüttener, M., Paytubi, S., Madrid, C., Juárez, A. 2014. Evidence for Moonlighting Functions of the θ Subunit of *Escherichia coli* DNA Polymerase III. *J. Bacteriol.* 196(5): 1102 – 1112. doi: 10.1128/JB.01448-13.

Dillon, S. C., Dorman, C. J. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol.* 8 (3):185-95. doi: 10.1038/nrmicro2261.

Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., Crow, J.F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics.* 148: 1667 – 1686.

Echols, H., and Goodman, M. F. 1990. Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. *Mutation Research/DNA Repair*. 36: 301- 311.

Ely, B., Gibbs, W., Diez, S., and Ash, K. 2015. The *Caulobacter crescentus* transducing phage Cr30 is a unique member of the T4-like family of myophages. *Current Microbiology*. 70(6): 854–858. <http://doi.org/10.1007/s00284-015-0799-5>.

Ennis, D. G., Levine, A. S., Koch, W. H., Woodgate, R. 1995. Analysis of recA mutants with altered SOS functions, *Mutat. Res. Repair*. 336: 39 – 48, [http://dx.doi.org/10.1016/0921-8777\(94\)00045-8](http://dx.doi.org/10.1016/0921-8777(94)00045-8).

Erill, I., Campoy, S., and Barbé, J. 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 637–656. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x.

Evinger, M., and Agabian, N. 1977. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *Journal of Bacteriology*. 132(1): 294 – 301.

Fleming, A. 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*. 10(3): 226 – 236.

Foster, P. L. 2006. Methods for Determining Spontaneous Mutation Rates. *Methods in Enzymology*. 409: 195 – 213. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)09012-9](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)09012-9).

Foster, P. L., Hanson, A. J., Lee, H., Popodi, E. M., and Tang, H. 2013. On the Mutational Topology of the Bacterial Genome. *G3: Genes|Genomes|Genetics*. 3(3): 399–407. <http://doi.org/10.1534/g3.112.005355>.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., Ellenberger, T. 2006. *DNA Repair and Mutagenesis*. Ed. AMS Press. p 9 – 47. Washington, DC.

Fuchs, R. P. 2016. Tolerance of lesions in *E. coli*: Chronological competition between Translesion Synthesis and Damage Avoidance. **DNA Repair. (Amst)**. 44:51-58. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.05.006.

Fuchs, R. P., and Fujii, S. 2007. Translesion synthesis in *Escherichia coli*: lessons from the NarI mutation hot spot. *DNA Repair*. 6: 1032 – 1041.

Fuchs, R. P., Fujii, S., and Wagner, J. 2004. Properties and functions of *Escherichia coli*: pol IV and pol V. *Advances in Protein Chemistry*. 69: 229 – 264.a

Fujii, S., and Fuchs, R. P. 2004. Defining the position of the switches between replicative and bypass DNA polymerases. *The EMBO Journal*. 23(21): 4342 – 4352. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600438>. b.

Fujii, S., and Fuchs, R. P. 2009. Biochemical basis for the essential genetic requirements of RecA and the β -clamp in Pol V activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(35): 14825 – 14830. <http://doi.org/10.1073/pnas.0905855106>.

Fulconis, R., Mine, J., Bancaud, A., Dutreix, M., and Viovy, J-L. 2006. Mechanism of RecA-mediated homologous recombination revisited by single molecule

nanomanipulation. The EMBO Journal. 25(18): 4293 – 4304.
<http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601260>.

Furusawa, M. 2012. Implications of fidelity difference between the leading and the lagging strand of DNA for the acceleration of evolution. *Frontiers in Oncology*. 2. 144.
<http://doi.org/10.3389/fonc.2012.00144>.

Galhardo, R. S., Rocha, R. P., Marques, M. V., Menck, C. F. M. 2005. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic acid research*. 33(8): 2603 – 2614.

Gawel, D., Maliszewska – Tkaczyk, M., Jonczyk, P., Schaaper, R. M., Fijalkowska, I. 2002. Lack of strand bias in UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. P 4449 – 4454.

Godoy, V. G., Jarosz, D. F., Simon, S. M., Abyzov, A., Ilyin, V., & Walker, G. C. 2007. UmuD and RecA Directly Modulate the Mutagenic Potential of the Y-family DNA Polymerase DinB. *Molecular Cell*. 28(6): 1058 – 1070.
<http://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.025>.

Goodman, M. F. 2014. The Discovery of Error-prone DNA Polymerase V and Its Unique Regulation by RecA and ATP. *The Journal of Biological Chemistry*., 289(39): 26772–26782. <http://doi.org/10.1074/jbc.X114.607374>.

Goodman, M. F., and Woodgate, R. 2013. Translesion DNA Polymerases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5(10): <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a010363>.

Goosen, N., Moolenaar, G. F. 2007. Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)*; 7(3): 353-79. doi: [10.1016/j.dnarep.2007.09.002](http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.002).

Grzesiuk, E., Janion, C. 1996. MMS-induced mutagenesis and DNA repair in *Escherichia coli* dnaQ49: contribution of UmuD' to DNA repair. *Mutat Res*. 15: 362 (2): 147-54.

Gutierrez, A., Laureti, L., Crussard, S., Abida, H., Rodríguez-Rojas, A., Blázquez, J., Baharoglu, Z., Mazel, D., Darfeuille, F., Vogel, J., Matic, I. 2013. β -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity, *Nat. Commun*. 4 - 1610, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2607>.

Hall, B. M., Ma, C.-X., Liang, P., & Singh, K. K. 2009. Fluctuation AnaLysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria–Delbrück fluctuation analysis. *Bioinformatics* 25(12): 1564–1565.
<http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp253>.

Hamdan, S. M., Loparo, J. J., Takahashi, M., Richardson, C. C., & van Oijen, A. M. 2009. Dynamics of DNA replication loops reveal temporal control of lagging-strand synthesis. *Nature*, 457(7227), 336–339. <http://doi.org/10.1038/nature07512>.

Hanahan, D. 1989. Biologically pure *Escherichia coli* cell line which is a *deoR* mutant and which is more transformation efficient with foreign plasmids than *deoR Escherichia coli* cell lines, process for obtaining these cell lines. *Methods of use*. U.S. patent 4, 851, 348.

Henrici, A. T., and Johnson, D. E. 1935. Studies of Freshwater Bacteria: II. Stalked Bacteria, a New Order of Schizomycetes . Journal of Bacteriology. 30(1): 61– 93.

Inamura, E., Katayama, T., Taguchi, S. 2017. Absorption of Low-Dose Ultraviolet Radiation by Mycosporine-like Amino Acids Induced by the Dinoflagellate *Prorocentrum micans*. Plankton and Benthos Research. Vol. 12 No. 1 p. 15-24. <http://doi.org/10.3800/pbr.12.15>.

Ippoliti, P. J., DeLateur, N. A., Jones, K. M., Beuning, P. J. 2012. Multiple strategies for translesion synthesis in bacteria. Cells. 1: 799 – 831. doi: 10.3390/cells1040795.

Jarosz, D. F., Beuning, P. J., Cohen, S. E., Walker, G. C. 2007. Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. Trends Microbiol.15(2): 70 - 7.

Jarosz, D. F., Godoy, V. G., Delaney, J. C., Essigmann, J. M., Walker, G. C. 2006. A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates. Nature letters. 439: 225 – 228.

Jenal, U., and Fuchs, T. 1998. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. The EMBO Journal. 17(19): 5658 – 5669. <http://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5658>.

Jensen, R. B., Wang, S. C., & Shapiro, L. 2001. A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. The EMBO Journal, 20(17), 4952–4963. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4952>

Juran, B. D., & Lazaridis, K. N. 2008. Genetics and Genomics of PBC. Clinics in Liver Disease, 12(2): 349–ix. <http://doi.org/10.1016/j.cld.2008.02.007>.

Kato, T., and Shinoura, Y. 1977. Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. Mol Gen Genet. 156(2): 121 - 31.

Kenyon, C. J., and Walker, G. C. 1980. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 77(5): 2819–2823.

Kim, S.-R., Maenhaut-Michel, G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Ohmori, H. 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: An overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94(25): 13792–13797.

Kimura, S., Tahira, Y., Ishibashi, T., Mori, Y., Mori, T., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. 2004. DNA repair in higher plants; photoreactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells. Nucleic Acids Research, 32(9), 2760–2767. <http://doi.org/10.1093/nar/gkh591>.

Kisker, C., Kuper, J., and Van Houten, B. 2013. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 5(3): a012591. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a012591>.

Koorits, L., Tegova, R., Tark, M., Tarassova, K., Tover, A., Kivisaar, M. 2007. Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. DNA repair. 6: 863 – 868.

Kreuzer, K. N. 2013. DNA Damage Responses in Prokaryotes: Regulating Gene Expression, Modulating Growth Patterns, and Manipulating Replication Forks. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology., 5(11): a012674. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a012674>.

Krishna, S., Maslov, S., and Sneppen, K. 2007. UV-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli* SOS Response: A Quantitative Model. PLoS Computational Biology. 3(3): e41. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030041>.

Lang, K. S., Hall, A. N., Merrikh, C. N., Ragheb, M., Tabakh, H., Pollock, A. J., Merrikh, H. (2017). Replication-Transcription Conflicts Generate R-Loops that Orchestrate Bacterial Stress Survival and Pathogenesis. *Cell*, 170(4), 787–799.e18. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.044>

.Lewis, P. J., Thaker, S. D., and Errington, J. 2000. Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. The EMBO Journal, 19(4): 710–718. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.4.710>.

Li, S., and Waters, R. 1998. *Escherichia coli* Strains Lacking Protein HU Are UV Sensitive due to a Role for HU in Homologous Recombination. Journal of Bacteriology. 180(15): 3750–3756.

Liang-dong Lu(吕亮东), Qing Sun(孙青), Xiao-yong Fan(范小勇), Yi Zhong(钟怡), Yu-feng Yao(姚玉峰), Guo-Ping Zhao(赵国屏) (2010). Mycobacterial MazG Is a Novel NTP Pyrophosphohydrolase Involved in Oxidative Stress Response. The Journal of Biological Chemistry. 285(36): 28076 – 28085. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.088872>.

Lopes-Kulishev, C. O., Alves, I. R., Valencia, E. Y., Pidhirnyj, M. I., Fernández-Silva, F. S., Rodrigues, T. R., Guzzo, C. R., Galhardo, R. S. 2015. Functional characterization of two SOS-regulated genes involved in mitomycin C resistance in *Caulobacter crescentus*. DNA Repair (Amst). 33:78-89. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.06.009.

Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. H., and Helleday, T. 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3799–3811. <http://doi.org/10.1093/nar/gki681>.

Maliszewska-Tkaczyk, M., Jonczyk, P., Bialoskorska, M., Schaaper, R. M., Fijalkowska, I. J. 2000. SOS mutator activity: Unequal mutagenesis on leading and lagging strands. PNAS. vol. 97 no. 23. doi: 10.1073/pnas.220424697.

Mallik, S., Popodi, E. M., Hanson, A. J., and Foster, P. L. 2015. Interactions and Localization of *Escherichia coli* Error-Prone DNA Polymerase IV after DNA Damage. Journal of Bacteriology. 197(17), 2792–2809. <http://doi.org/10.1128/JB.00101-15>.

Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M. J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. 1993. The Lancet. 341(8846): 647 – 651.

Marks, M. E., Castro-Rojas, C. M., Teiling, C., Du, L., Kapatral, V., Walunas, T. L., and Crosson, S. 2010. The Genetic Basis of Laboratory Adaptation in *Caulobacter crescentus*. Journal of Bacteriology. 192(14): 3678 – 3688. <http://doi.org/10.1128/JB.00255-10>

Marlen Adler, Mehreen Anjum, Otto G. Berg, Dan I. Andersson, Linus Sandegren; High Fitness Costs and Instability of Gene Duplications Reduce Rates of Evolution of New Genes by Duplication-Divergence Mechanisms, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 31, Issue 6, 1 June 2014, Pages 1526–1535, <https://doi.org/10.1093/molbev/msu111>

Martins-Pinheiro, M., Marques, R. C., and Menck, C. F. 2007. Genome analysis of DNA repair genes in the alpha proteobacterium *Caulobacter crescentus*. BMC Microbiology. 7, 17. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-7-17>.

Martomo, S. A., Yang, W. W., Wersto, R. P., Ohkumo, T., Kondo, Y., Yokoi, M., Gearhart, P. J. 2005. Different mutation signatures in DNA polymerase η - and MSH6-deficient mice suggest separate roles in antibody diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102(24): 8656–8661. <http://doi.org/10.1073/pnas.0501852102>.

McHenry, C. S. 2011. Bacterial replicases and related polymerases. Current Opinion in Chemical Biology. 15(5): 587–594. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.018>. b.

McHenry, C. S. 2011. Breaking the rules: bacteria that use several DNA polymerase IIIs. EMBO Reports. 12(5): 408 – 414. <http://doi.org/10.1038/embor.2011.51>. a.

Merrikh, H., Machon, C., Grainger, W. H., Grossman, A. D., Soutanas, P. 2011. Co-directional replication-transcription conflicts lead to replication restart. Nature. 470, 554–557. doi:10.1038/nature09758.

Modell, J. W., Hopkins, A. C., and Laub, M. T. 2011. A DNA damage checkpoint in *Caulobacter crescentus* inhibits cell division through a direct interaction with FtsW. Genes & Development. 25(12), 1328–1343. <http://doi.org/10.1101/gad.203891>.

Modell, J. W., Kambara, T. K., Perchuk, B. S., and Laub, M. T. 2014. A DNA Damage-Induced, SOS-Independent Checkpoint Regulates Cell Division in *Caulobacter crescentus*. PLoS Biology. 12(10), e1001977. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001977>.

Mohl, D. A., Easter, J., and Gober, J. W. 2001. The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. Molecular Microbiology. 42: 741–755. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02643.x.

Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., and Fuchs, R. P. P. 2000. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. The EMBO Journal. 19(22): 6259–6265. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6259>

Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J., Fuchs, R. P. P. 2000. All three SOS – inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV e Pol V) are involved in induced mutagenesis. *The EMBO jornal*. 19(22): 6259 – 6265.

Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J., Fraser, C. M. 2001. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7): 4136 – 4141. <http://doi.org/10.1073/pnas.061029298>.

Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., & Yura, T. 1998. Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.*, 64(5), 1694–1699.

O'Donnell, M. 2006. Replisome Architecture and Dynamics in *Escherichia coli*. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 281, NO. 16, pp. 10653–10656. doi: 10.1074/jbc.R500028200.

O'Donnell, M., Langston, L., Stillman, B. 2013. Principles and concepts of DNA replication in bacteria and eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5(7): 10.1101/cshperspect.a010108 a010108. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>.

Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., and Rouviere-Yaniv, J. 2009. The HU Regulon Is Composed of Genes Responding to Anaerobiosis, Acid Stress, High Osmolarity and SOS Induction. *PLoS ONE.*, 4(2), e4367. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0004367>.

Ordenez, H., Uson, M. L., & Shuman, S. 2014. Characterization of three mycobacterial DinB (DNA polymerase IV) paralogs highlights DinB2 as naturally adept at ribonucleotide incorporation. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 11056–11070. <http://doi.org/10.1093/nar/gku752>.

Bjedov, I., Dasgupta, C. N., Slade, D., Le Blastier, S., Selva, M., & Matic, I. (2007). Involvement of *Escherichia coli* DNA Polymerase IV in Tolerance of Cytotoxic Alkylating DNA Lesions *in Vivo*. *Genetics*, 176(3), 1431–1440. <http://doi.org/10.1534/genetics.107.072405>.

Blanco M., Herrera G., Collado P., Rebollo J. E., Botella L. M. 1982. Influence of RecA protein on induced mutagenesis. *Biochimie*. 64(8-9):633-6.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.

P. Caillet-Fauquet, G. Maenhaut-Michel. 1988. Nature of the SOS mutator activity: genetic characterization of untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.* 213: 491–498, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00339621>.

Paz-Elizur, T., Takeshita, M., Goodman, M., O'Donnell, M., and Livneh, Z. 1996. Mechanism of translesion DNA synthesis by DNA polymerase II. Comparison to DNA polymerases I and III core. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 24662 – 24669.

Pfeifer, G. P., You, Y. H., Besaratinia A. 2005. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res.* 1;571(1-2):19-31.

Pfeifer, G. P., You, Y. H., Besaratinia, A. (2015). Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res.* 571(1-2): 19 - 31.

Qin, T.-T., Kang, H.-Q., Ma, P., Li, P.-P., Huang, L.-Y., & Gu, B. 2015. SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. *Annals of Translational Medicine.*, 3(22), 358. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.09>.

R. Peng, J. Chen, W. Feng, Z. Zhang, J. Yin, Z. Li, Y. Li. 2017. Error-prone DnaE2 balances the genome mutation rates in *Myxococcus xanthus* DK1622. *Front. Microbiol.* 8. 1–10, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00122>.

Radman, R. 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* 5A: 355 - 67.

Rajagopalan, M., Lu, C., Woodgate, R., O'Donnell, M., Goodman, M. F. 1992. Activity of the purified mutagenesis proteins UmuC, UmuD' and RecA in replicative by-pass of an abasic DNA lesions by DNA polymerase III. *PNAS.* 89: 10777 – 107781.

Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. 2010. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids.* 592980. <http://doi.org/10.4061/2010/592980>.

Reuven, N. B., Arad, G., Maor –Shashani, A., Livneh, Z. 1999. The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA and SSB and is specialized for translesion replication. *The journal of Biological Chemistry.* 274(45): 31763 – 31766.

Ricci, D. P., Melfi, M. D., Lasker, K., Dill, D. L., McAdams, H. H., and Shapiro, L. 2016. Cell cycle progression in *Caulobacter* requires a nucleoid-associated protein with high AT sequence recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 113(40): E5952 – E5961. <http://doi.org/10.1073/pnas.1612579113>.

Robinson, A., van Oijen, A. M. 2013. Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies. *Nat Rev Microbiol.* 11(5): 303 - 15. doi: 10.1038/nrmicro2994.

Rocha, R. P.; Paquola, A. C. M.; Marques, M. V.; Menck, C. F. M.; Galhardo, R. S. 2008. Characterization of the SOS regulon of *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology.* 190(4): 1209 – 1218.

Sale, J. E., Lehmann, A. R., Woodgate, R. 2012. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(3): 141–152. <http://doi.org/10.1038/nrm3289>

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 74(12): 5463 – 5467.

- Sassanfar, M, Roberts, J. W. 1990.. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. J Mol Biol. 5: 212 (1): 79 - 96. doi:[10.1016/0022-2836\(90\)90306-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90306-7).
- Schlacher, K., Cox, M. M., Woodgate, R., Goodman, M. F. 2006. RecA acts in *trans* to allow replication of damaged DNA by DNA polymerase V. *Nature* 442: 883 - 887. doi:10.1038/nature05042.
- Schlacher, K., Goodman, M. F. 2007. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8: 587 - 594. doi:10.1038/nrm2198.
- Schrader, J. M., and Shapiro, L. 2015. Synchronization of *Caulobacter Crescentus* for Investigation of the Bacterial Cell Cycle. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (98): 52633. Advance online publication. <http://doi.org/10.3791/52633>.
- Schrader, J. M., Li, G.-W., Childers, W. S., Perez, A. M., Weissman, J. S., Shapiro, L., & McAdams, H. H. 2016. Dynamic translation regulation in *Caulobacter* cell cycle control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(44): E6859 – E6867. <http://doi.org/10.1073/pnas.1614795113>.
- Scotland, M. K., Heltzel, J. M. H., Kath, J. E., Choi, J.-S., Berdis, A. J., Loparo, J. J., & Sutton, M. D. 2015. A Genetic Selection for *dinB* Mutants Reveals an Interaction between DNA Polymerase IV and the Replicative Polymerase That Is Required for Translesion Synthesis. *PLoS Genetics*, 11(9): e1005507. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005507>.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature Biotechnology* 1, 784 – 791. doi:10.1038/nbt1183-784.
- Sommer, S., Bailone, A., and Devoret, R. 1993. The appearance of the UmuD'C protein complex in *Escherichia coli* switches repair from homologous recombination to SOS mutagenesis. *Molecular Microbiology*. 10: 963–971. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00968.x.
- Soultanas, P. 2011. The replication-transcription conflict. *Transcription*. 2(3): 140 –144. <http://doi.org/10.4161/trns.2.3.15908>.
- Strauss, B. S., Roberts, R., Francis, L., and Pouryazdanparast, P. 2000. Role of the *dinB* Gene Product in Spontaneous Mutation in *Escherichia coli* with an Impaired Replicative Polymerase. *Journal of Bacteriology*. 182(23): 6742 – 6750.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 189(1): 113 - 30.
- Taft-Benz, S. A., Schaaper, R. M. 2004. J. Bacteriol. 186 (9) 2774-2780. doi:10.1128/JB.186.9.2774-2780.
- Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R., Goodman, M. F. 1999. UmuD'₂C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *PNAS*. 96: 8919 – 8924.

Taylor, J. A., Panis, G., Viollier, P. H., and Marczynski, G. T. 2017. A novel nucleoid-associated protein coordinates chromosome replication and chromosome partition. *Nucleic Acids Research*. 45(15), 8916 – 8929. <http://doi.org/10.1093/nar/gkx596>.

Thanbichler, M., Iniesta, A. A., & Shapiro, L. (2007). A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*, 35(20), e137. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm818>.

Thanbichler, M., Iniesta, A. A., and Shapiro, L. 2007. A comprehensive set of plasmids for vanillate and xylose - inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*. 35(20): e137. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm818>.

Valencia, E. Y., Esposito, F., Spira, B., Blázquez, J., & Galhardo, R. S. (2017). Ciprofloxacin-Mediated Mutagenesis Is Suppressed by Subinhibitory Concentrations of Amikacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), e02107–16. <http://doi.org/10.1128/AAC.02107-16>.

Veaute, X., and Fuchs, R. P. 1993. Greater susceptibility to mutations in lagging strand of DNA replication in *Escherichia coli* than in leading strand. *Science*. 261(5121): 598 -600.

Wagner, J., Gruz, P., Kim, S., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P. P., Nohmi, T. 1999. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA Pol IV, involved in mutagenesis. *Molecular Cell*. 4: 281 – 286.

Wang, F., & Yang, W. 2009. Structural Insight Into Translesion Synthesis By DNA Pol II. *Cell*. 139(7), 1279–1289. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.043>.

Warner, D. F., Ndwandwe, E. D., Abrahams, G. L., Kana, B. D., Machowski, E. E. 2010. Essential roles for *imuA*' and *imuB*- encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS*. 1 – 6.

Watson, J. D.; Crick, F. H. C. 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 171: 737-738.

Weng, M., Zheng, Y., Jasti, V. P., Champeil, E., Tomasz, M., Wang, Y., Tang, M. 2010. Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. *Nucleic Acids Research*. 38(20): 6976–6984. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq576>.

Witkin, E. M. 1967. The radiation sensitivity of *Escherichia coli* B: A hypothesis relating filament formation and prophage induction. *PNAS*. 57: 1275 – 1279.

Wyrick, J. J., and Roberts, S. A. 2015. Genomic Approaches to DNA repair and Mutagenesis. *DNA Repair*. 36. 146–155. <http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.018>.

Yang, W. & Woodgate, R. 2007. What a difference a decade makes: Insights into translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(40): 15591–15598. <http://doi.org/10.1073/pnas.0704219104>.

Yao, N. Y. & O'Donnell, M. 2010. SnapShot: The Replisome. *Cell*, 141(6): 1088–1088.e1. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.042>.

Yeeles, J. T. P., Poli, J., Mariani, K. J., and Pasero, P. 2013. Rescuing Stalled or Damaged Replication Forks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5(5): a012815. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a012815>

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Lista de mutações encontradas nos genomas usados como controle sem irradiar, mostrando o tipo da mutação, posição e o fenótipo

Locus	Mutação	Posição	Natureza da mutação
CCNA_00944	Inserção (+G)	1028157	Mudança da matriz de leitura
CCNA_00987	Deleção (-A)	1068007	Mudança da matriz de leitura
CCNA_01467	T - C	1582587	S: Fenilalanina por Ácido Glutâmico
CCNA_01803	T - C	1936766	Mutação silenciosa
CCNA_03557	C - G	3731598	S: Arginina por Prolina
CCNA_03876	T - A	4059568	S: Ácido glutâmico por Ácido aspártico
CCNA_03239, CCNA_03240, CCNA_03241	Deleção (-2,627 pb)		

S: Substituição de aminoácido

APÊNDICE 2. Mapas dos genomas derivados da linhagem selvagem NA1000 após irradiação com UVC. Mapa NA1000 1 e NA1000 4 foram gerados usando o Geneious 8.1.

APÊNDICE 3. Mapas dos genomas derivados da linhagem selvagem NA1000 após irradiação com UVC. Mapa NA1000 5 e RSG 479 foram gerados usando o Geneious 8.1.

APÊNDICE 4. Mapas dos genomas derivados da linhagem selvagem NA1000 após irradiação com UVC. Mapa RSG 480 e RSG 481 foram gerados usando o Geneious 8.1.

APÊNDICE 5. Mapas dos genomas derivados da linhagem selvagem NA1000 após irradiação com UVC. Mapa RSG 488 e RSG 489 foram gerados usando o Geneious 8.1.

APÊNDICE 6. Mapa de genoma derivado da linhagem selvagem NA1000 após irradiação com UVC. Mapa RSG 490 foi gerado usando o Geneious 8.1.

APÊNDICE 7. Localização das mutações representadas no Pan Genoma da NA1000 nos 16 intervalos do mapa cromossômico de *C. crescentus*.

Mapa Genômico		
Região	Intervalo (pb)	Número de mutações
9	0 - 252683	3
10	252684 - 505366	1
11	503367 - 758049	1
12	758049 - 1010732	1
13	1010733 - 1263415	7
14	1263416 - 1516098	4
15	1516099 - 1768781	1
16	1768782 - 2021464	6
1	2021465 - 2274147	3
2	2274148 - 2526830	1
3	2526831 - 2779513	3
4	2779514 - 3032196	15
5	3032197 - 3284879	1
6	3284880 - 3537562	4
7	3537563 - 3790245	
8	3790246 - 4042929	
Total		51

APÊNDICE 8. Lista das vizinhanças dos dímeros e seu posicionamento em relação a Fita + ou Fita – e a determinação da fita contendo a lesão usada como molde para a replicação da região com a mutação

Linhagem	Posição	Fita +	Fita -	Posição da lesão
RSG490	1051154	CTC	GAG	<i>Lagging</i>
RSG490	1118066	CCT	GGA	<i>Lagging</i>
RSG490	1385074	TTG	AAC	<i>Lagging</i>
RSG490	2548615	GGA	CCT	<i>Lagging</i>
RSG490	2727311	CAT	GTC	<i>Lagging</i>
RSG489	513995	CTG	GAC	<i>Lagging</i>
RSG489	1370096	ATC	TAG	<i>Lagging</i>
RSG489	1890603	CATA	GTAT	-
RSG489	1959428	GAAG	CTTC	<i>Leading</i>
RSG489	2009904	TCC	AGG	<i>Leading</i>
RSG488	2733261	TGG	ACC	<i>Lagging</i>
RSG488	2795628	CCG	GGC	<i>Leading</i>
RSG488	2947165	TCA	AGT	<i>Leading</i>
RSG488	3026719	GCC	CGG	<i>Leading</i>
RSG488	3332821			-
RSG479	205800	CAG	GTC	<i>Leading</i>
RSG479	434104	CAG	GTC	<i>Leading</i>
RSG479	1128647	TCA	AGT	<i>Lagging</i>
RSG479	1254082	TAC	ATG	-
RSG479	1515372	GAC	CTG	<i>Leading</i>
RSG479	2368980	CTTC	GAAG	<i>Leading</i>
RSG480	1191154	CCC	GGG	<i>Lagging</i>
RSG480	3510768	GAT	CTA	<i>Lagging</i>
RSG481	170745	GCC	CGG	<i>Lagging</i>
RSG481	1254082	TAC	ATG	-
RSG481	2201742	GAA	CTT	<i>Lagging</i>
NA1000 1	1260469	TAC	ATG	
NA1000 1	1345766	GAT	CTA	<i>Leading</i>
NA1000 1	2053632	TCG	AGC	<i>Leading</i>
NA1000 1	3044829	GCC	CGG	<i>Leading</i>
NA1000 1	3370908	CCG	GGC	<i>Leading</i>
NA1000 2	1196930	GTCC	CATC	<i>Lagging</i>
NA1000 2	1192654	TCC	AGG	<i>Lagging</i>
NA1000 2	1254082	TGC	ACG	
NA1000 2	3026 719	GCC	CGG	<i>Leading</i>
NA1000 2	3026769	ATA	TAT	
NA1000 2	3026791	CTA	GAT	<i>Leading</i>
NA1000 2	3026793	A-AC	T-TC	<i>Lagging</i>

NA1000 2	3026804	ATT	TAA	<i>Leading</i>
NA1000 2	3026808	GCC	CGG	<i>Leading</i>
NA1000 2	3026812	CCG	GGC	<i>Leading</i>
NA1000 2	3026835	ATC	TCG	<i>Leading</i>
NA1000 2	3026852	GCC	CGG	<i>Leading</i>
NA1000 2	3026859	GGC	CCG	<i>Lagging</i>
NA1000 2	3030 603	GCC	CGG	<i>Leading</i>
NA1000 4	1644971	CCT	GGA	<i>Lagging</i>
NA1000 4	2248735	TCG	AGC	<i>Leading</i>
NA1000 4	3347457	CTC	GAG	<i>Leading</i>
NA1000 5	65217	GGATC	CCTAG	<i>Leading</i>
NA1000 5	899256	C-CA	G-GT	<i>Lagging</i>
NA1000 5	2868064	TGA	ACT	<i>Lagging</i>

Rosa: Posição do dímero (Fita + ou Fita -);

Azul: Lesão posicionada na fita Lagging;

APÊNDICE 9