

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**MARINA ROCHA BORGES DA FONSECA**

**Análise transcriptômica e funcional da regulação da resposta SOS por  
ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa***

Tese 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

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**MARINA ROCHA BORGES DA FONSECA**

**Análise transcriptômica e funcional da regulação da resposta SOS por  
ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa***

Tese 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: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

Versão original.

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rocha Borges da Fonseca, Marina  
Análise transcriptômica e funcional da regulação  
da resposta SOS por ciprofloxacina em *Pseudomonas*  
*aeruginosa* / Marina Rocha Borges da Fonseca;  
orientador Rodrigo da Silva Galhardo. -- São Paulo,  
2022.

96 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiologia. 2. Resistência bacteriana às  
drogas. 3. Regulação bacteriana da expressão gênica.  
4. Expressão gênica. I. da Silva Galhardo, Rodrigo,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Marina Rocha Borges da Fonseca

Título da Dissertação/Tese: Análise transcriptômica e funcional da regulação da resposta SOS por ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa*

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



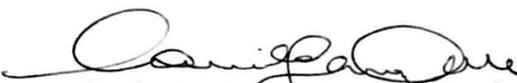
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **900/2017** referente ao projeto intitulado: "**Análise transcriptômica e funcional da regulação da resposta SOS por ciprofloxacina em Pseudomonas aeruginosa**" sob a responsabilidade de **Marina Rocha Borges da Fonseca** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Rodrigo da Silva Galhardo**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2017.

  
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

  
Profa. Dra. **Camila Squarzon Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo, não somente pela orientação, mas principalmente pela disposição em manter um diálogo constante com seus alunos. Foi uma honra ser aluna de um cientista brilhante, que sempre manteve a sensatez e empatia diante de qualquer adversidade.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido através do processo no 2018/15819-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Às agências de fomento federais, Capes e CNPq, é através do trabalho contínuo dessas instituições que se sustenta a ciência brasileira

Aos movimentos estudantis que lutam constantemente pelas Universidades públicas do Brasil.

Aos governantes que fortaleceram as Universidades públicas, me proporcionando um ensino de qualidade que sempre me abriu portas.

Aos professores parceiros, Profa. Dra. Marilis Marques, Prof. Dr. Carlos Menck, Prof. Dr. Márcio Dias e Profa. Dra. Cristina Martinez, pelas colaborações que renderam muito aprendizado durante a realização do projeto.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e do Instituto de Ciências biomédicas, que garantiram o bom funcionamento do nosso ambiente de trabalho mesmo diante dos riscos impostos pela pandemia.

À Gisele e Renato, funcionários da secretaria de pós-graduação em Microbiologia, pela dedicação que sustenta todos os títulos e publicações produzidos em nosso curso.

Aos amigos feitos dentro dos laboratórios do ICB, com quem dividi reagentes, equipamentos, risos e lágrimas.

Aos meus sogros, que me deram o apoio que nem eu sabia que precisava.

Aos meus pais, que garantiram a base educacional e as oportunidades certas para a cientista que sempre existiu em mim.

À minha irmã, Juliana, a minha pessoa mais importante do mundo.

Finalmente, ao meu marido, Pedro Henrique, que me deu todo o suporte para resistir às dificuldades que surgiram ao longo do percurso. A parceria que construímos é o meu projeto mais especial.

## RESUMO

FONSECA, M. R. B. Análise transcriptômica e funcional da regulação da resposta SOS por ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa*. 2022. 96 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Todos os organismos vivos devem lidar com danos ao DNA provenientes de várias fontes, como a luz UV que irradia do sol, antibióticos e estresse oxidativo. Os danos ao DNA estimulam várias respostas e as células bacterianas se desenvolveram para neutralizá-los através da regulação positiva de vários mecanismos para reparar e tolerar esses danos. A resposta SOS é a principal via ativada durante o estresse genotóxico, e pode alterar o equilíbrio entre mutagênese e integridade do genoma. A formação de fita simples de DNA atrai e ativa a proteína RecA, criando filamentos que promovem a autoclivagem do repressor LexA, induzindo a expressão de todos os genes que contêm a sequência promotora conhecida como "SOS-box". *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista com grande plasticidade fenotípica, e não surpreendentemente, a resposta SOS não é a única via ativada após dano ao DNA. Pelo mesmo estímulo, *P. aeruginosa* induz a produção de piocinas (sistema *prt*) e uma via de autólise (sistema *alp*). As piocinas são bacteriocinas antimicrobianas que geralmente têm como alvo diferentes cepas da mesma espécie, mas sua produção tem um custo porque as células que as produzem lisam e morrem. O sistema *alp* também induz a morte celular, mas tem sido associado à virulência em modelos animais. Não está clara a razão para as três respostas serem reguladas pelo mesmo estímulo, já que desempenham atividades conflitantes como reparo e autólise. Além da complexa ativação regulatória das respostas durante o estresse genotóxico, genes regulados pela resposta SOS sem funções claras podem oferecer novas percepções sobre o cenário da resposta celular a essas condições. O gene *PA0922* é regulado diretamente por LexA e é apontado como um provável regulador transcricional e um gene de reparo, mas nenhum estudo foi focado em sua função molecular. Este estudo tem como objetivo caracterizar a expressão de cada um dos três sistemas regulados por repressores do tipo LexA após lesão por UV e ciprofloxacina e identificar a função de um provável fator de transcrição regulado pela resposta SOS, o gene *PA0922*. Realizamos análise de sequenciamento de RNA total e qPCR para definir o curso de expressão de genes de cada *regulon* e descobrimos que a resposta SOS é a mais

rapidamente ativada, apenas 15 minutos após o tratamento com UV. O sistema *prt* é fortemente induzido logo em seguida, sendo o sistema *alp* o último. Além disso, identificamos diferenças no perfil geral de expressão entre danos UV e ciprofloxacina onde o dano UV tem uma indução mais forte do sistema *alp* em comparação com ciprofloxacina. No caso do gene *PA0922*, através da análise de sequenciamento de RNA verificamos que a deleção deste gene pode interferir na ativação da resposta ao estresse genotóxico no tratamento com ciprofloxacina e possivelmente modular a resposta SOS. Além disso, a superexpressão de *PA0922* é tóxica para *P. aeruginosa*, altera o formato da célula bacteriana e reprime a expressão de um dos sistemas de secreção do tipo 6.

Palavras-chave: Microbiologia. Resistência bacteriana às drogas. Regulação bacteriana da expressão gênica. Expressão gênica.

## ABSTRACT

FONSECA, M. R. B. Transcriptomic and functional analysis of the regulation of the SOS response by ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. 2022. 96 p. Thesis (Ph. D. thesis in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

All living organisms must deal with DNA damage coming from various sources, like UV light radiating from the sun, antibiotics, and oxidative stress. DNA damage stimulates various responses, and bacterial cells have evolved to counteract by overexpressing several mechanisms to repair and tolerate these damages. The SOS response is the main common pathway activated during genotoxic stress that can shift the balance between mutagenesis and genome integrity. The formation of single stranded DNA attracts and activates the RecA protein, creating protein-nucleofilaments that promote the autocleavage of the LexA repressor, inducing the expression of all genes that contain the SOS-box promoter sequence. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen with great phenotypic plasticity, and not surprisingly, the SOS response is not the only pathway activated after DNA damage. By the same stimulus, *P. aeruginosa* induces the production of pyocins (*prt* system) and an autolysis pathway (*alp* system). Pyocins are antimicrobial bacteriocins that usually target different strains of the same species, but its production comes with a cost because the cells that make it lyse and die. The *alp* system also induces cell death, but it has been linked to virulence in animal models. It is not clear why the three responses are regulated by the same stimulus having conflicting activities like repair and autolysis. Apart from the intricate regulatory activation of responses during genotoxic stress, genes regulated by the SOS response with no unclear functions may offer new insights on the landscape of transcription in these conditions. The *PA0922* gene is directly regulated by LexA and is annotated as a probable transcriptional regulator and a repair gene, but no study was focused on its molecular activities. This study aims to characterize the expression of each of the three systems regulated by LexA-like repressors after UV and ciprofloxacin damage and to identify the function of a probable transcription factor regulated by the SOS response, the gene *PA0922*. We performed total RNA sequencing analysis and qPCR to define the course of expression of each regulon and found that the SOS response is the fastest activated one, only 15 minutes after UV treatment. The *prt* systems is strongly induced right after, and the *alp* system being the

last one. Additionally, we identified differences in the general profile of expression between UV and ciprofloxacin damages, where the UV damage has an apparent stronger induction of the *alp* system compared to ciprofloxacin. In the matter of the *PA0922* gene, through RNA sequencing analysis we found that the deletion of this gene can interfere with the activation of the genotoxic stress response in treatment with ciprofloxacin and possibly modulate the SOS response. Also, the overexpression of *PA0922* is toxic to *P. aeruginosa*, changes the bacterial shape and represses the expression of a bacterial type 6 secretion system.

Keywords: Microbiology. Bacterial resistance to drugs. Bacterial gene expression. Regulation. Gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da ativação da resposta SOS bacteriana .....	20
Figura 2 – Representação esquemática da ativação da expressão de piocinas .....	24
Figura 3 – Representação esquemática da ativação da expressão do sistema <i>alp</i> .....	25
Figura 4 – Esquema da regulação da expressão global em resposta ao estresse genotóxico .....	27
Figura 5 – Esquema da organização cromossômica do gene <i>PA0922</i> e seus vizinhos .....	29
Figura 6 – Razão da expressão de genes da resposta SOS em condições de estresse .....	47
Figura 7 – Atividade do promotor <i>recA</i> em resposta a ciprofloxacina .....	48
Figura 8 – Sobrevivência e atividade do promotor <i>recA</i> em resposta a luz UV .....	49
Figura 9 – Perfil geral da visão geral da expressão diferencial de PAO1 em duas condições de estresse por danos no DNA .....	51
Figura 10 – Intersecção entre os genes diferencialmente expressos em tratamento com ciprofloxacina e luz UV .....	52
Figura 11 – Processos biológicos alterados por danos no DNA causados por ciprofloxacina .....	53
Figura 12 – Processos biológicos alterados por danos no DNA causados por luz UV .....	53
Figura 13 – <i>Heat-map</i> com dados de expressão diferencial de genes regulados por repressores do tipo LexA .....	55
Figura 14 – Aumento relativo da expressão de genes regulados por repressores LexA-like após tratamento com luz UV .....	56
Figura 15 – Representação esquemática da linha do tempo das respostas a danos no DNA .....	58
Figura 16 – Estrutura predita da proteína PA0922 pelo programa AlphaFold .....	59
Figura 17 – Deleção do gene <i>PA0922</i> .....	60
Figura 18 – Experimento de sensibilidade à cisplatina .....	62
Figura 19 – Resultado do experimento de frequência de mutantes induzida por ciprofloxacina .....	62
Figura 20 – Curvas de crescimento durante super-expressão de <i>PA0922</i> .....	63

Figura 21 – Microscopia de contraste de fase durante a superexpressão de <i>PA0922</i> .....	64
Figura 22 – Ensaio de super-expressão do gene <i>PA0922</i> mas linhagens PAO1, $\Delta recA$ , $\Delta alpA$ , $\Delta prtN$ e $\Delta dinB$ .....	66
Figura 23 – Perfil geral da expressão de PAO1 e PAO1 $\Delta PA0922$ em resposta à ciprofloxacina .....	67
Figura 24 – <i>Heat-map</i> com dados de expressão diferencial de genes durante o tratamento com ciprofloxacina nas linhagens PAO1 e PAO1 $\Delta PA0922$ .....	69
Figura 25 – Níveis absolutos de indução dos genes <i>recA</i> e <i>dinB</i> em condição de estresse genotóxico .....	70
Figura 26 – Perfil geral da expressão gênica durante a superexpressão de <i>PA0922</i> .....	72
Figura 27 – Processos biológicos alterados pela superexpressão de <i>PA0922</i> .....	74
Figura 28 – Teste de indução da proteína PA0922 com IPTG em linhagem BL-21 .....	77
Figura 29 – Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética .....	78
Figura 30 – Ensaio de sensibilidade à metanosulfonato de metila (MMS) .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de genes da resposta SOS de <i>P. aeruginosa</i> e a atividade relacionada .....	22
Tabela 2 – Lista de cepas utilizadas no estudo .....	32
Tabela 3 – Lista de oligos usados ao longo do estudo .....	35
Tabela 4 – Lista de vetores usados ao longo do estudo e suas características .....	37
Tabela 5 – Condições definidas para o RNA-seq .....	50
Tabela 6 – Total de genes com expressão alterada após danos no DNA causados por exposição à 0,5x CIM de ciprofloxacina .....	51
Tabela 7 – Total de genes com expressão alterada após danos no DNA causados por exposição à 45 J/m <sup>2</sup> .....	51
Tabela 8 – Total de genes com expressão alterada após danos no DNA causados por exposição à 0,5x CIM de ciprofloxacina na linhagem PAO1 $\Delta$ PA0922 .....	67
Tabela 9 – Lista dos 30 genes mais diferencialmente expressos nos transcriptoma .....	70
Tabela 10 – Total de genes com expressão alterada após a superexpressão do gene PA0922 com 0,2% de L-arabinose por 2 horas .....	72
Tabela 11 – Lista de genes reprimidos por ciprofloxacina na linhagem PAO1 e reprimidos durante a super-expressão de PA0922 e suas funções .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-4PP – fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona

Abs – absorvância

BLAST – *Basic local alignment search tool*

BSA - albumina de soro bovino

c-di-GMP – diguanilato cíclico

CPD - dímeros de pirimidina ciclobutano

cDNA – DNA complementar

ChIP-qPCR – PCR quantitativo de amostra de cromatina imunopurificada

CIM – concentração inibitória mínima

DEPC - dietil pirocarbonato

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO<sub>600</sub> – densidade ótica por absorvância de luz 600 nm

DTT - ditioneitol 1,4

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EMSA – ensaio de mudança de mobilidade eletroforética

EROs – espécies reativas de oxigênio

fsDNA – DNA de fita simples

IPTG - isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido

LB – caldo lisogênio (*lysogenic broth*)

MitC – mitomicina C

MH – meio Müller-Hinton

MMS - metanossulfonato de metila

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – quadro aberto de leitura (*open reading frame*)

PCR – reação em cadeia da polimerase

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

qRT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – ácido ribonucleico

RNA-seq – sequenciamento de RNA total

SDS - dodecil sulfato de sódio

TBE – tris-borato-EDTA

TLS – síntese translesão (*translesion synthesis*)

UFC – unidade formadora de colônia

UV – ultravioleta

UV-B – luz ultravioleta do tipo B

UV-C – luz ultravioleta do tipo C

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
1.2 Mutagênese e resposta SOS .....	19
1.3 Repressores do tipo LexA .....	23
1.4 PA0922 .....	28
1.5 Inibição da resposta SOS por amicacina .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 Cultivo e manutenção de <i>P. aeruginosa</i> .....	32
3.2 Técnicas básicas de biologia molecular .....	33
3.3 Obtenção de linhagens derivadas de PAO1 .....	34
3.4 Sequenciamento de DNA .....	37
3.5 Definição da concentração inibitória mínima .....	38
3.6 Definição da condição para análise transcriptômica .....	38
3.7 Extração de RNA por TRIzol .....	38
3.8 Reação quantitativa de PCR em tempo real .....	39
3.9 Transcriptoma .....	40
3.9.1 Extração de RNA total para sequenciamento .....	40
3.9.2 Depleção de rRNA e preparação das bibliotecas de sequenciamento .....	40
3.9.3 Sequenciamento e análises de bioinformática .....	40
3.10 Análises fenotípicas do mutante $\Delta$ PA0922 .....	41
3.10.1 Teste de sensibilidade a agentes genotóxicos .....	41
3.10.2 Mutagênese induzida por ciprofloxacina .....	41
3.10.3 Curva de crescimento e superexpressão .....	41
3.10.4 Microscopia .....	42
3.11 Análises bioquímicas da função de PA0922 .....	43
3.11.1 Purificação por cromatografia de afinidade .....	43
3.11.2 EMSA .....	44
3.12 Estudos sobre a inibição da resposta SOS mediada por amicacina .....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
4.1 Investigação das mudanças na expressão gênica global em resposta à estresses genotóxicos .....	46
4.1.1 Inibição da indução do sistema SOS em presença de amicacina .....	46

4.1.2 Definição das condições para análise de RNA-seq .....	47
4.1.3 Análise transcriptômica – Ciprofloxacina e UV .....	50
4.2 <i>Estudo da função do gene PA0922</i> .....	58
4.2.1 Análise bioinformática .....	58
4.2.2 Construção das linhagens de interesse .....	59
4.2.3 Análise fenotípica da linhagem PAO1 $\Delta$ PA0922 .....	61
4.2.4 Análise da expressão gênica de PAO1 $\Delta$ PA0922 em tratamento com ciprofloxacina .....	67
4.2.5 RNA-seq da superexpressão de PA0922 .....	71
4.2.6 Análise bioquímica de PA0922 .....	76
4.2.7 Perspectivas para a continuação do estudo da função de PA0922 .....	79
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	81
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83
<b>ANEXO 1</b> – Deleção de gene em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	93
<b>ANEXO 2</b> – Determinação da mutagênese induzida por concentrações subinibitórias de ciprofloxacina em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	94
<b>ANEXO 3</b> – Alinhamento de PA0922 proposto pelo programa Phyre2 .....	96

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma espécie de bactéria Gram-negativa, pertencente ao filo Pseudomonadota, classe Gammaproteobacteria e ordem Pseudomonadaceae. Antes da recente definição de filos, essa espécie fazia parte do grupo conhecido como Proteobacteria ao lado de importantes patógenos como *Escherichia* e *Salmonella*. (OREN et al., 2021; PARKER; TINDALL; GARRITY, 2019).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bacilos móveis e com metabolismo versátil. São encontradas em diversos ambientes, como solo e água, além de poder fazer parte da microbiota de seres humanos. Populações de *P. aeruginosa* comumente tem uma capacidade singular de formar biofilmes, dificultando a difusão de antibióticos na área colonizada em tratamentos contra infecções (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; MICHEL-BRIAND; BAYSSE, 2002; MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2015; TAYLOR; YEUNG; HANCOCK, 2014; TURNBULL et al., 2016).

*P. aeruginosa* é um patógeno oportunista de grande importância clínica. Além de estar entre os maiores causadores de infecções nosocomiais, é o principal patógeno causador de infecção crônica em pacientes portadores de fibrose cística (FOLKESSON et al., 2012; GOVAN; DERETIC, 1996; OLIVER et al., 2000; STEFANI et al., 2017).

O pulmão do paciente com fibrose cística é constantemente acometido por processos inflamatórios e se torna um microambiente ideal para proliferação dos biofilmes de *P. aeruginosa*. Nessas condições, as linhagens patogênicas frequentemente sofrem com a pressão de tratamentos antibióticos, favorecendo a seleção de linhagens multirresistentes (DAVIES et al., 2003; JONES et al., 2001; LEE; JONES, 2018; PEDERSEN et al., 1986).

Cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* são encontradas com frequência emergente. *P. aeruginosa* foi classificada no grupo “crítico” de patógenos para os quais novos antibióticos devem ser desenvolvidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (“WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed”, 2017).

A ampla distribuição de *P. aeruginosa* em uma variedade de contextos está principalmente relacionada à sua flexibilidade fenotípica e eficiência regulatória. Esse aspecto demonstra a importância de compreender a natureza e estrutura da variação genética como base para o desenvolvimento de estratégias que impulsionam a diversidade fenotípica e mantenham o sucesso evolutivo da espécie (AKANKSHA RAJPUT et al., 2022; DÖTSCH et al., 2015; KIEWITZ; TÜMMLER, 2000; MATHEE et al., 2008).

A linhagem PAO1, usada no presente trabalho foi isolada a partir de um ferimento, o que faz desta uma linhagem clínica. Seu genoma de tem 6,3 milhões de pares de bases (Mbp) e apresenta 5.570 quadros de leitura aberta (ORFs) projetados (STOVER et al., 2000).

Ao longo das últimas décadas, o cultivo de PAO1 em laboratórios de pesquisa ao redor do mundo gerou uma grande quantidade de dados a cerca desse importante patógeno. No ano de 2010, um estudo identificou uma considerável diversidade genética entre sublinhagens PAO1 de diferentes grupos de pesquisa. Os resultados mostraram que a reprodutibilidade da pesquisa com PAO1 é afetada pela microevolução contínua do patógeno, e aponta a necessidade de novos estudos de sequenciamento genômico para um maior controle de qualidade para as linhagens laboratoriais (KLOCKGETHER et al., 2010).

Uma das mudanças mais significativas entre as cepas laboratoriais de PAO1 acontece no regulador de sistemas de efluxo controlado pelos genes *mexS*, *mexT*, *mexEF-oprN*. Mutações nesse sistema foram descritas em sublinhagens de PAO1 podem interferir na concentração inibitória mínima de antibióticos, desafiando a interpretação e reprodutibilidade de estudos (CHANDLER et al., 2019; KLOCKGETHER et al., 2010; SIDORENKO; JATSENKO; KIVISAAR, 2017; SOBEL; NESHAT; POOLE, 2005).

Genes relacionados ao reparo de DNA também foram afetados pela constante micro-evolução da linhagens laboratoriais de *P. aeruginosa*. Algumas sublinhagens de PAO1 não possuem o cassete de mutagenese *imuABC* e a linhagem MPAO1 exibe reduções nas frequências de mutação espontâneas e induzidas (SIDORENKO; JATSENKO; KIVISAAR, 2017).

## 1.2 Mutagênese e resposta SOS

A compreensão sobre eventos mutagênicos é de extrema importância, uma vez que antibióticos vem se tornando ineficazes no tratamento de diversas infecções, e a mutagênese pode explicar grande parte desses eventos (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; BLAIR et al., 2014; DAVIES; DAVIES, 2010; GARRISS; WALDOR; BURRUS, 2009; SABTU; ENOCH; BROWN, 2015; WOODFORD; ELLINGTON, 2007).

Agentes físicos e químicos podem induzir variação genética em uma população. Como exemplos clássicos no estudo de eventos mutagênicos em bactérias, temos agentes genotóxicos como a luz UV e o antibiótico ciprofloxacina. De maneiras diferentes, estes e outros agentes são capazes de induzir uma via envolvida na mutagênese de bactérias, a resposta SOS (CIRZ et al., 2006; FISHER et al., 1989; GOOSEN; MOOLENAAR, 2008; LEBEL, 1988; MIGLIORINI et al., 2019).

Miroslav Radman introduziu pela primeira vez em 1974 o termo "resposta SOS", com o objetivo de descrever a resposta de *E. coli* ao estresse celular provocado pela exposição à luz ultravioleta (UV) que havia sido reportada anteriormente por seus pares (RADMAN, 1975; SCHLACHER; GOODMAN, 2007).

A resposta SOS é um mecanismo emergencial das células bacterianas, que é ativado quando o DNA é danificado. Sempre que uma lesão no DNA acarretar a formação de DNA de fita simples (DNAfs), a ligação da proteína RecA a esse DNAfs irá promover a autólise do repressor LexA que se encontra ligado ao sítio operador de genes da resposta SOS (Figura 1) (FRIEDBERG; WALKER; SIEDE, 1995; SCHLACHER; GOODMAN, 2007).

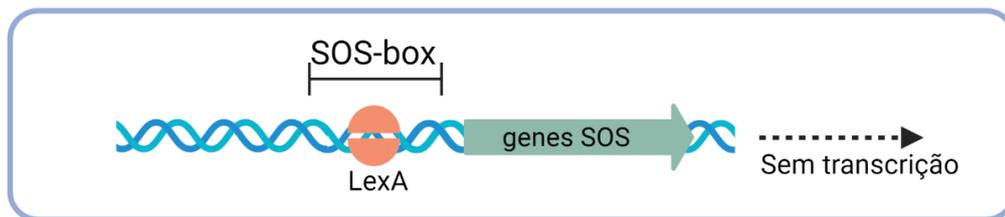
Em *E. coli*, a proteína LexA é considerada essencial, ou seja, não são encontrados mutantes onde não exista um alelo sem a função repressora da proteína, já que estes teriam uma expressão constitutiva de todos os genes resposta SOS. LexA se liga ao seu operador em forma de dímero e a sua autoclivagem ocorre em um sítio serina-lisina, levando à desrepressão dos seus genes-alvo. Substituições no resíduo de serina impedem a autoclivagem de LexA, e foram utilizadas em diversos estudos sobre a resposta SOS (CIRZ et al., 2006; JACOBS et al., 2003; LIBERATI et al., 2006; LUO et al., 2001; SCHLACHER; GOODMAN, 2007).

LexA se liga a operadores que possuem sequências consenso organizadas em palíndromo e com afinidades variadas ao seu operador, o que pode causar a indução

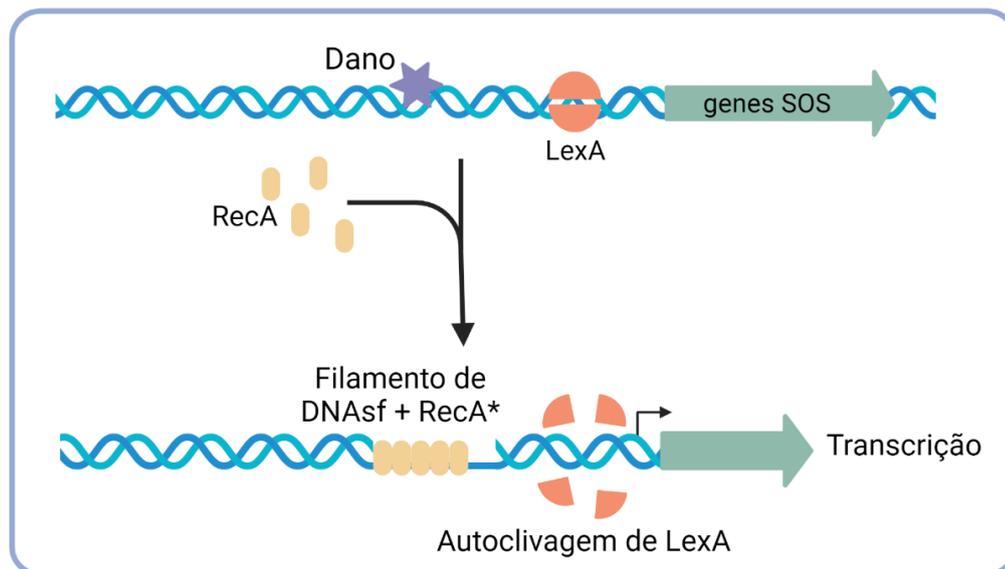
precoce de genes que tenham baixa afinidade para LexA. Sendo assim, cada gene da resposta tem uma expressão basal diferente (FERNÁNDEZ DE HENESTROSA et al., 2000; LITTLE et al., 1980).

Além das quebras de fita simples e fita dupla, qualquer outro dano que cause uma distorção na molécula de DNA é capaz de ativar a resposta SOS, uma vez que, essas distorções são capazes de bloquear a forquilha de replicação. O bloqueio na forquilha de replicação leva à formação de DNAsf e conseqüentemente à ativação da resposta SOS (FRIEDBERG; WALKER; SIEDE, 1995; SCHLACHER; GOODMAN, 2007).

### Condições normais



### Condições de estresse



**Figura 1** - Representação esquemática da ativação da resposta SOS bacteriana. A danificação do DNA leva a uma alteração na regulação de genes que apresentam o promotor conhecido como SOS-box. Em condições normais os genes da resposta SOS são reprimidos pela proteína LexA, que se liga à região promotora. Em caso de danos no DNA a ligação de RecA em DNAsf promove uma ativação de RecA\* que induz a autólise do repressor LexA, liberando o acesso da região promotora do gene para que a RNA polimerase inicie o processo de transcrição. Criado com BioRender.com.

A liberação do repressor LexA possibilita a expressão do *regulon* da resposta SOS, que contém genes para o desempenho de atividades que podem evitar que o bloqueio da forquilha de replicação culmine em morte celular (CIRZ et al., 2006; FRIEDBERG; WALKER; SIEDE, 1995).

O bloqueio na forquilha de replicação não é o único evento que acarreta na formação de DNAfs. Tratamentos com antibióticos como a ciprofloxacina podem ativar a resposta SOS por outros mecanismos. Pertencente à classe das fluoroquinolonas, a ciprofloxacina é um antibiótico que interage com topoisomerases de DNA, como a DNA girase, produzindo quebras duplas na molécula de DNA (BUSH et al., 2020; FISHER et al., 1989; LEBEL, 1988; MILLANAO et al., 2021; YSERN et al., 1990).

A atividade de topoisomerases evita o superenovelamento da dupla-hélice durante a replicação de DNA, impedindo que a separação das fitas na forquilha de replicação cause uma tensão à frente do complexo de replicação. A DNA girase desempenha essa atividade produzindo uma quebra dupla transiente e uma religação das fitas, reduzindo dois giros de tensão à frente da forquilha de replicação. A ciprofloxacina impede a religação do ponto onde houve a quebra dupla mediada pela DNA girase. Danos de quebra da dupla fita de DNA promovem a ativação do sistema SOS através da geração de DNAfs pelo sistema RecBCD durante o reparo desse tipo de dano (BUSH et al., 2020; FISHER et al., 1989; LEBEL, 1988; MILLANAO et al., 2021).

Além das quinolonas, antibióticos de outras classes podem ativar a resposta SOS através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos mostraram que EROs tem uma participação importante na letalidade por diversas classes de antibióticos, inclusive por quinolonas. EROs são uma importante fonte de danos do DNA, sendo mais uma forma de ativação da resposta SOS durante tratamentos contra infecções (BLÁZQUEZ et al., 2006; MANDSBERG et al., 2009; PRIBIS et al., 2019).

A expressão dos genes do *regulon* SOS promovem a inibição de divisão celular, aumento da taxa de recombinação homóloga, reparo de DNA e a expressão de DNA polimerases propensas a erros (processo de síntese translesão - TLS). Estas respostas celulares estão relacionadas à mutagênese e eventual resistência à antibióticos. Em *P. aeruginosa*, a mutagênese pela exposição à ciprofloxacina se mostrou dependente de polimerases TLS em diversas publicações (VALENCIA et al., 2017; GOODMAN; WOODGATE, 2014; JAROSZ et al., 2007; MIGLIORINI, 2017).

A resposta SOS é altamente regulada e a atividade promotora de cada gene apresenta um pico distinto, o que sugere a existência de uma alta precisão temporal na expressão de cada função da resposta (FRIEDMAN et al., 2005; SALLES; DEFAIS, 1984).

Em 2006, o *regulon* SOS em *P. aeruginosa* foi definido a partir de experimentos de microarranjos de DNA. O *regulon* SOS em *P. aeruginosa* conta com 15 genes regulados diretamente por LexA (Tabela 1). Apesar de ser consideravelmente pequeno quando comparado ao de *Escherichia coli*, onde mais de 40 genes são regulados, as funções primordiais do sistema SOS são contempladas em *P. aeruginosa*. Dentre os 15 genes, 4 foram anotados como proteínas hipotéticas, e o gene *yebG*, apesar de conservado no sistema SOS de diversos gêneros bacterianos, até o momento não tem função biológica definida (BLÁZQUEZ et al., 2006; CIRZ et al., 2006).

**Tabela 1** – Lista de genes da resposta SOS de *P. aeruginosa* e a atividade relacionada (Cirz, 2006)

Locus_tag	Nome	Atividade
PA0069	<i>phl</i>	Reparo por fotorreativação
PA0669	<i>imuC</i>	Reparo - TLS
PA0670	<i>imuB</i>	Reparo - TLS
PA0671	<i>imuA</i>	Reparo - TLS
PA0922		Proteína hipotética
PA1044		Proteína hipotética
PA1045	<i>dinG</i>	Helicase
PA2288		Proteína hipotética
PA3007	<i>lexA</i>	Repressor da resposta SOS
PA3008	<i>sulA</i>	Inibição da divisão celular
PA3413	<i>yebG</i>	Proteína hipotética
PA3414		Proteína hipotética
PA3616	<i>recX</i>	Inibição das atividades de RecA
PA3617	<i>recA</i>	Reparo e ativação da resposta SOS
PA4763	<i>recN</i>	Estímulo da atividade de recombinação de RecA

Alguns genes regulados positivamente durante a ativação da resposta SOS em *P. aeruginosa* não apresentam regulação direta por LexA, já que esses genes não apresentam o operador “SOS-box”. Por exemplo, o gene *dinB* que codifica uma DNA polimerase envolvida na síntese translesão, é um gene indiretamente regulado pela ativação da resposta SOS neste organismo, apesar de ser um gene SOS canônico em *E. coli* (BLÁZQUEZ et al., 2006; CIRZ et al., 2006; SANDERS et al., 2006).

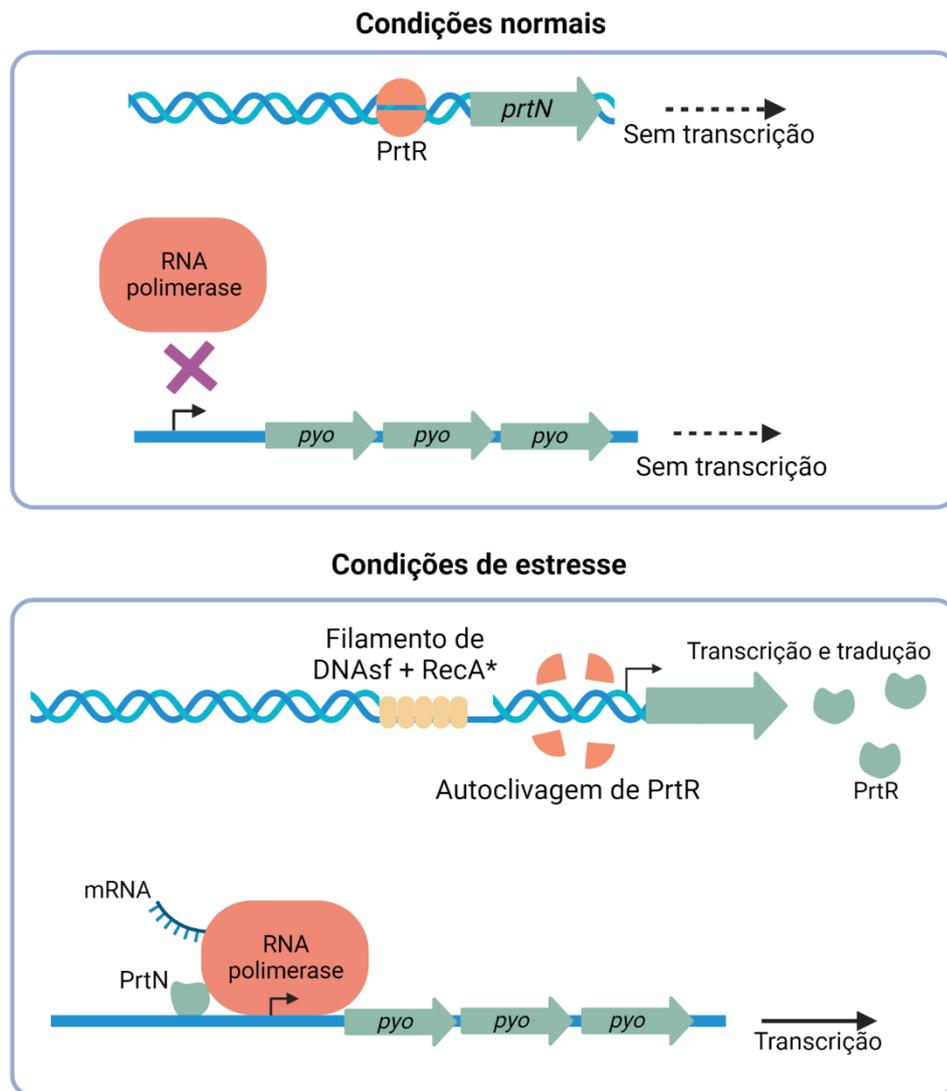
Mesmo sendo um gene crucial para a tolerância a danos no DNA, a via responsável pela regulação de *dinB* em *P. aeruginosa* ainda é desconhecida. Sabe-se que *dinB* é um gene importante para o surgimento de mutações em culturas de *P. aeruginosa* (linhagem PA14) expostas à ciprofloxacina (MIGLIORINI, 2017; SANDERS et al., 2006). Uma exceção foi reportada recentemente, onde a deleção de *dinB* em PAO1 não afetou a mutagênese induzida por ciprofloxacina (MERCOLINO et al., 2022) Os resultados conflitantes podem ser fruto das variações entre linhagens e sublinhagens laboratoriais mencionada anteriormente (SIDORENKO; JATSENKO; KIVISAAR, 2017).

### 1.3 Repressores do tipo LexA

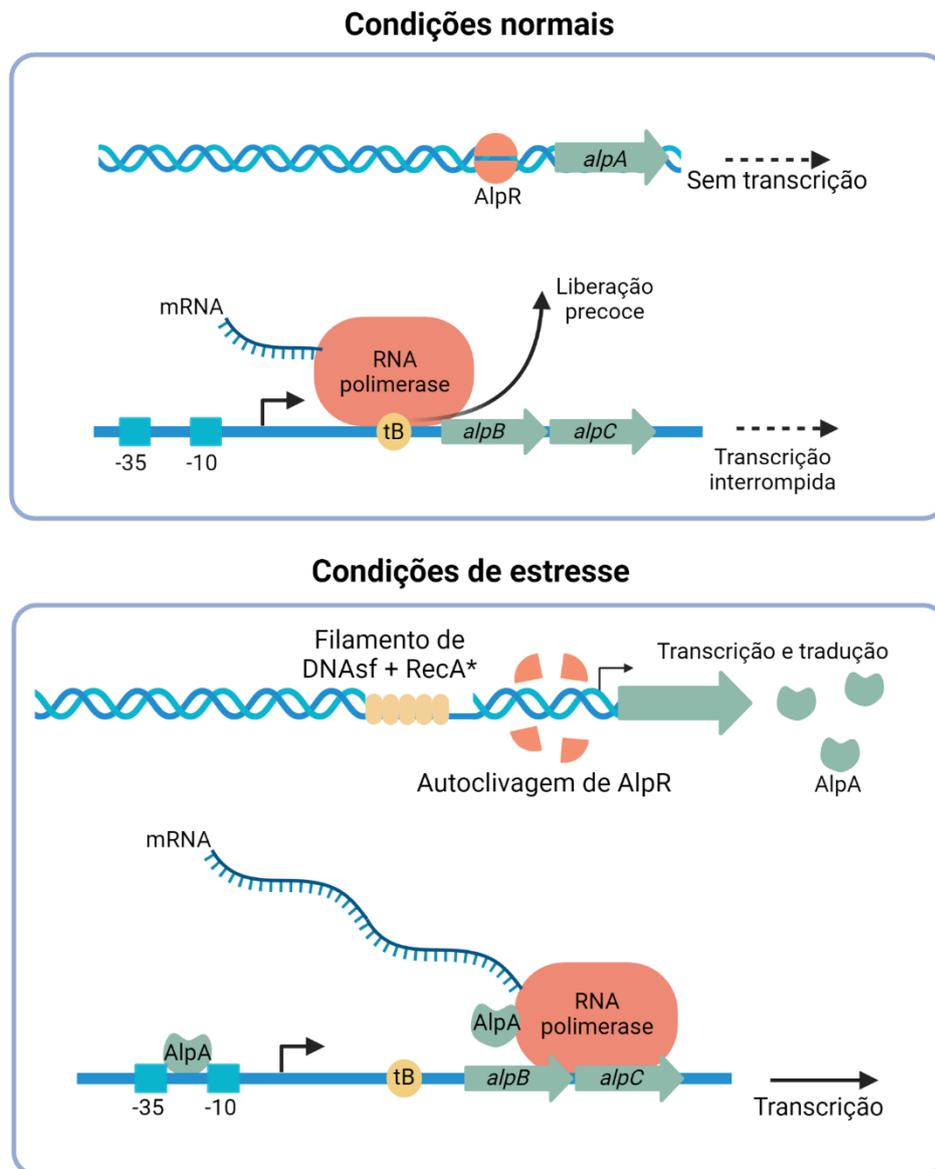
A resposta a danos no DNA em *Pseudomonas* se mostrou ainda mais complexa quando novos repressores similares à proteína LexA foram encontrados. Outros dois grupos de genes são regulados por proteínas do tipo LexA, PrtR, que regula 43 genes de vias de síntese e liberação de piocinas e AlpR (PA0906) que regula 6 genes associados à morte celular através de autólise e 22 genes ainda sem função definida (MATSUI et al., 1993; MCFARLAND et al., 2015; MICHEL-BRIAND; BAYSSE, 2002; PEÑA et al., 2021).

Os reguladores AlpR e PrtR são considerados similares à LexA por também apresentarem o sítio de autoclivagem serina-lisina que responde à ativação de RecA quando este se liga à DNAs, e por serem autorregulados (MATSUI et al., 1993; MCFARLAND et al., 2015).

Diferentes de LexA, os repressores PrtR e AlpR não controlam diretamente a expressão de todos os genes das vias às quais pertencem. PrtR reprime dois genes: O ativador do sistema de produção e liberação de piocinas - *prtN*; E o repressor do sistema de secreção do tipo 3 (TSS3) – *prtB*. Já AlpR, controla o antiterminador *alpA* (MATSUI et al., 1993; MCFARLAND et al., 2015; PEÑA et al., 2021; WU; JIN, 2005).



**Figura 2** - Representação esquemática da ativação da expressão de piocinas. A danificação do DNA leva a uma alteração na expressão dos genes que participam da via de produção e liberação de piocinas. Em condições normais o gene *prtN* é reprimido pela proteína PrtR, que se liga à sua região promotora. Em caso de danos no DNA a ligação de RecA em DNAsf promove uma ativação de RecA\* que induz a autólise do repressor PrtR, liberando o acesso da região promotora de *prtN* para que a RNA polimerase inicie o processo de transcrição. A proteína PrtN, por sua vez, age como um ativador dos genes da via de produção e liberação de piocinas. Criado com BioRender.com.



**Figura 3** - Representação esquemática da ativação da expressão do sistema *alp*. A danificação do DNA leva a uma alteração na expressão dos genes que participam da via autólise. Em condições normais o gene *alpA* é reprimido pela proteína AlpR, que se liga à sua região promotora. Em caso de danos no DNA a ligação de RecA em DNAsf promove uma ativação de RecA\* que induz a autólise do repressor AlpR, liberando o acesso da região promotora de *alpA* para que a RNA polimerase inicie o processo de transcrição e tradução. A proteína AlpA, por sua vez, age como um antiterminador, evitando a liberação precoce da RNA polimerase e permitindo a extensão da transcrição dos genes *alpBCDE* e *PA0807* a *PA0829*. Criado com BioRender.com.

As picinas são bacteriocinas que agem em competição contra diferentes linhagens da mesma espécie e, por vezes em outras espécies além de *P. aeruginosa*, produzidas por mais de 90% das espécies do gênero. A produção de picinas carrega

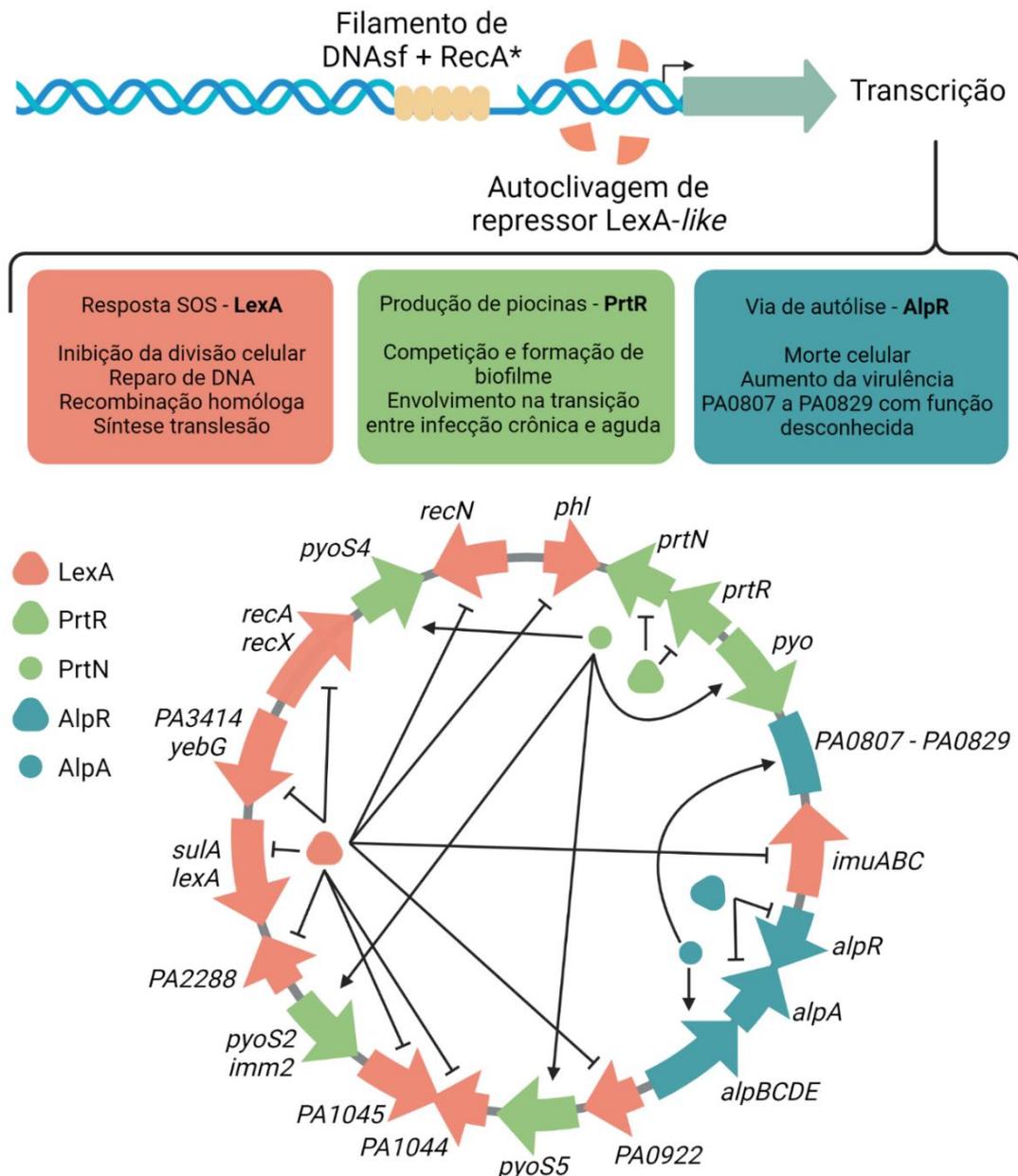
o custo da lise celular que sucede a sua produção (MICHEL-BRIAND; BAYSSE, 2002; PENTERMAN; SINGH; WALKER, 2014).

Além da produção de piocinas, pesquisas adicionais demonstraram que PrtR interage diretamente com um gene (*siaD*) que promove o acúmulo de c-di-GMP nas células. O c-di-GMP, uma molécula mensageira secundária, controla uma variedade de componentes do processo de transição entre estado planctônico e de biofilme, como pili tipo IV, flagelos e exopolissacarídeos. Assim, o conhecimento de como a *P. aeruginosa* regula os níveis de c-di-GMP tem efeitos significativos na virulência e modo de vida desse organismo (CHOU et al., 2020; HA; O'TOOLE, 2015; JIAO et al., 2021; KULASAKARA et al., 2006; VALENTINI; FILLOUX, 2016).

Também foi mostrado que PrtR controla a função do sistema de *quorum sensing* Gac/Rsm, influenciando a expressão do sistema de secreção tipo III (T3SS) e sistema de secreção tipo VI (T6SS). Juntos, os resultados mostram que PrtR é essencial para a capacidade de *P. aeruginosa* de se adaptar a infecções oportunistas (BROWN, 2010; JIAO et al., 2021; LAPOUGE et al., 2008).

Em adição à lise celular para liberação de piocinas e mediada pelo repressor PrtR, o repressor AlpR desempenha papel similar e foi caracterizado como uma via de autólise. Em contradição ao efeito letal para a célula, o *regulon* AlpR demonstrou contribuir com a virulência de PAO1 em modelo animal (MCFARLAND et al., 2015).

Os efeitos opostos das respostas à agentes genotóxicos foram questionados anteriormente nos trabalhos que definiram as funções de PrtR e AlpR. Enquanto a expressão de genes regulados por LexA aumentam a sobrevivência do indivíduo, a expressão de genes regulados por PrtR e AlpR promovem a morte celular, beneficiando a população como um todo (Figura 4). Tais estudos sugerem uma análise mais detalhada da expressão gênica dos três regulons (BAYLES, 2014; JIAO et al., 2021; MCFARLAND et al., 2015; PEÑA et al., 2021).



**Figura 4** - Esquema da regulação da expressão global em resposta ao estresse genotóxico. Em resposta a danos no DNA, *P. aeruginosa* ativa 3 sistemas distintos: A resposta SOS, representada em laranja; O sistema *prt* representado em verde; O sistema *alp*, representado em azul. Os genes organizados em *operon* são representados apenas por uma seta colorida, que mostra a orientação de leitura no genoma. Criado com BioRender.com.

Sabendo que todos os repressores do tipo LexA precisam do sinal de ativação de RecA ligado à DNAsf, a regulação geral dos 3 grupos de genes relacionados aos danos no DNA é consequentemente relacionada à estabilidade dessa ligação. A

estabilidade dos filamentos de RecA, não é importante só para ativação da resposta SOS, mas também para a recombinação de DNA, que ocorre em cooperação com o complexo RecBCD. No entanto, para a continuidade da replicação de DNA, os filamentos de RecA devem ser desmontados, fazendo com que não só o início mas também o término da resposta precise ser bem regulado (BARBOUR; CLARK, 1970; COURCELLE et al., 2015; DILLINGHAM; KOWALCZYKOWSKI, 2008; GHODKE et al., 2019; SMITH, 2012).

A proteína RecX, que faz parte do *regulon* da resposta SOS em *E. coli* e em *P. aeruginosa*, foi descrita como inibidor da extensão dos filamentos de RecA, levando a um desmonte dessa estrutura. Já a proteína RecF, interage diretamente com RecX, mantendo indiretamente a extensão dos filamentos de RecA. Em *P. aeruginosa*, *recA* e *recX* estão organizados em um *operon* regulado pela resposta SOS (CÁRDENAS et al., 2012; LUSETTI et al., 2006; PAGÈS; KOFFEL-SCHWARTZ; FUCHS, 2003; RAGONE et al., 2008).

Ao longo do nosso trabalho, apostamos em estratégias de biologia molecular para esclarecer detalhes sobre o fino processo de ativação da resposta aos danos no DNA em *P. aeruginosa*. Acessamos as diferenças na ativação de acordo com o tipo de dano, e o *timing* de atividade de cada *regulon* da resposta.

Uma reavaliação da regulação da expressão gênica global de *P. aeruginosa* em resposta a danos no DNA fazendo uso de técnicas de sequenciamento de nova geração é interessante, dado que os experimentos anteriores foram realizados com micro-arranjos de DNA. Outra comparação válida é sobre as diferenças de ativação do sistema SOS entre tratamentos genotóxicos distintos. Sendo os danos ao DNA de diferentes naturezas moleculares, a intensidade e cinética de ativação da resposta SOS pode ser variável, e entender estas diferenças pode levar ao maior entendimento dessa via. Os dados já publicados levam em consideração a regulação da resposta SOS ativada principalmente por ciprofloxacina, no entanto, a resposta SOS induzida por luz UV não envolve possíveis efeitos comuns a outros agentes genotóxicos, como a formação de espécies reativas de oxigênio.

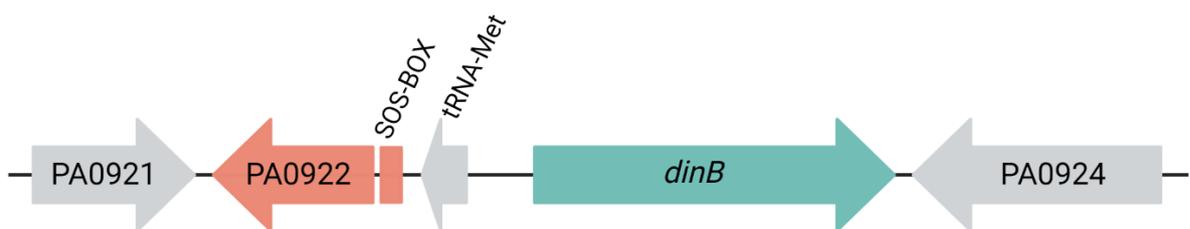
#### 1.4 PA0922

Recentemente foi publicado um estudo definindo o gene homólogo à PA0922 em *Pseudomonas fluorescens* como gene de reparo de DNA, uma vez que sua

deleção sensibiliza esta bactéria aos danos causados pela cisplatina (relacionada aos alquilantes, promove ligações intra e intercadeias de DNA). Este gene faz parte do *regulon* SOS de *P. aeruginosa*, e não foi estudado mais a fundo (HANNAN; ZIMMER; HAZLE, 1984; OVERBECK; KNIGHT; BECK, 1996; PRICE et al., 2018).

Em genomas de *Pseudomonas*, ortólogos de *PA0922* são anotados como reguladores transcricionais putativos. A proteína codificada por esse gene contém 104 aminoácidos e apresenta uma pequena sequência com similaridade a um domínio RPAC (proteína de replicação A) de uma proteína eucariótica que, durante a replicação de DNA se liga em porções de fita simples dessa macromolécula. Além da sensibilidade aos agentes genotóxicos reportada em *P. fluorescens*, uma possível atividade de regulação transcricional mostra que o gene *PA0922* pode apresentar grande relevância durante a resposta a danos no DNA (BIANCO, 2022; BOCHKAREV et al., 1999; LEE; HEO; PARK, 2020; TREUNER et al., 1999).

Como uma hipótese inicial sobre a função do gene *PA0922*, consideramos uma possível relação com o gene *dinB* (*PA0923*) que está a montante do gene *PA0922* (Figura 5). O gene *dinB* é induzido por danos no DNA, mas não é diretamente regulado por LexA em *P. aeruginosa*. Seria possível que o aumento da expressão de *dinB* durante a ativação da resposta SOS seja mediado pela expressão de *PA0922*, caso este realmente tenha função de regulador transcricional (CIRZ et al., 2006; SANDERS et al., 2006).



**Figura 5** – Esquema da organização cromossômica do gene *PA0922* e seus vizinhos. O gene *dinB* se encontra a montante do gene *PA0922*. Criado com BioRender.com.

Pretendemos investigar a função do gene *PA0922* e sua atividade na resposta a danos no DNA.

### 1.5 Inibição da resposta SOS por amicacina

Em um estudo publicado por nosso grupo no ano de 2017, foi observado que o antibiótico amicacina suprime a ativação do sistema SOS em resposta à ciprofloxacina. O estudo mostrou o promotor do gene *recA*, tinha uma expressão reduzida em mais de 2 vezes quando a amicacina era aplicada em associação à ciprofloxacina, em comparação ao tratamento feito apenas com ciprofloxacina (VALENCIA et al., 2017).

Além dos dados de expressão, o estudo mostrou também que a mutagênese induzida por ciprofloxacina era reduzida em tratamento associado à amicacina. Essa observação mostra o potencial terapêutico da amicacina como um coadjuvante que poderia diminuir as chances do surgimento de linhagens resistentes em tratamentos com antibióticos (LANYON-HOGG, 2021; VALENCIA et al., 2017).

Não foi possível entender as bases moleculares do mecanismo de repressão da expressão de *recA* no estudo, ou identificar se o fenômeno é reproduzido em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Inibidores da resposta SOS podem agir como coadjuvantes em tratamento com antibióticos, diminuindo a chance do surgimento de mutantes resistentes. Identificar a prevalência do fenômeno em uma coleção de isolados clínicos pode evidenciar a eficácia dessa combinação de antibióticos em tratamentos contra infecções por *P. aeruginosa*.

## 2 OBJETIVOS

No presente trabalho buscaremos uma melhor compreensão da indução da resposta SOS por ciprofloxacina e luz UV em *P. aeruginosa*, e dos mecanismos por trás da inibição deste fenômeno por amicacina. Dividimos este projeto em dois grandes objetivos específicos, a saber:

a) Análise transcriptômica, para investigar a expressão gênica global de *P. aeruginosa* em resposta à ciprofloxacina, e investigação dos mecanismos moleculares por trás da interferência na indução do sistema SOS quando se adiciona amicacina. A expressão gênica global também será avaliada em *P. aeruginosa* tratada com luz UV, como comparativo entre diferentes condições de estresse genotóxico.

b) Investigação da função do gene *PA0922*, em particular seu potencial papel na regulação do gene *dinB*, tendo em vista que o último se trata de um gene recorrentemente regulado por danos no DNA em espécies bacterianas, mas sem regulação direta pelo SOS em *P. aeruginosa*.