

JULIANA LUMI SATO

**Elementos Conjugativos Integrativos da família SXT/R391 em
isolados clínicos de *Proteus mirabilis* e a sua relação com
resistência, mutagênese e conjugação**

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

São Paulo

2021

JULIANA LUMI SATO

**Elementos Conjugativos Integrativos da família SXT/R391 em
isolados clínicos de *Proteus mirabilis* e a sua relação com
resistência, mutagênese e conjugação**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

Versão original

São Paulo

2021

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)

Sato, Juliana Lumi

Elementos Conjugativos Integrativos da família
SXT/R391 em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* e
a sua relação com resistência, mutagênese e
conjugação / Juliana Lumi Sato; orientador Rodrigo
da Silva Galhardo. -- São Paulo, 2021.
80 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Genética bacteriana. 2. Mutagênese. 3. ICES
SXT/R391. 4. Resistência à antimicrobianos. 5.
Conjugação. I. da Silva Galhardo, Rodrigo,
orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): Juliana Lumi Sato

Título da Dissertação/Tese: Elementos conjugativos integrativos da família SXT/R391 em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* e a sua relação com resistência, mutagênese e conjugação

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 Sales 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 **1020/2019** referente ao projeto intitulado: "**Elementos conjugativos integrativos da família SXT/R391**" sob a responsabilidade de **Juliana Lumi Sato** 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 466/2012.

São Paulo, 11 de março de 2019.

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

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

Aos meus pais, Tiemi e Yoshinori

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Rodrigo da Silva Galhardo, pela orientação, paciência, dedicação e apoio desde à minha iniciação científica e durante todo o meu mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (Processo FAPESP 2018/2872-7).

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), por toda a dedicação e suporte.

Ao Prof. Dr. Nilton Lincopan e à Louise Teixeira pela colaboração no sequenciamento e montagem dos genomas.

Ao mestrando Douglas Lyra, amigo e companheiro de *Proteus* no laboratório, pela grande ajuda com os experimentos de conjugação.

Aos professores da banca da minha qualificação, Prof. Dr. Gabriel Padilla, Prof. Dr. Beny Spira, e Prof. Dr. Henrique Ferreira, pela disponibilidade, sugestões, e conselhos referentes ao projeto.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana Marina, Marco, Douglas, Renatta, e Rúbia, e também aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Genética Bacteriana, Naara e Hugo, e além de muitos outros que passaram por estes laboratórios, pela colaboração, amizade e companheirismo em todos os momentos dentro e fora do laboratório.

À minha família, em especial aos meus pais, Tiemi e Yoshinori, à quem devo toda a minha conquista, pelo apoio, incentivo, por todo o carinho, e acreditar em mim mesmo tão longe, e também ao meu irmão Hideyuki, por estar presente, me ajudar e escutar sempre.

E à todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para tornar a realização deste projeto possível. Muito obrigada!

RESUMO

SATO, J. L. **Elementos conjugativos integrativos da família SXT/R391 em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* e a sua relação com resistências, mutagênese e conjugação.** 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Proteus mirabilis é uma bactéria causadora de infecções urinárias associadas ao uso prolongado de cateteres, que frequentemente tem elementos conjugativos integrativos (ICEs) da família SXT/R391 inseridos em seu genoma. Estes ICEs podem carregar genes de resistência aos antimicrobianos em suas regiões variáveis e possuem genes conservados que regulam o próprio mecanismo de transferência, além de outros genes conservados de funções desconhecidas ou não essenciais para conjugação. Dentre os genes conservados se encontra o operon *rumAB* que codifica uma polimerase da família Y, que possui atividade translesão caracterizada pela elevada taxa de erro. A expressão desses genes dentro do ICE (tanto os do processo de conjugação como também o *rumAB*) está sob controle de elementos regulados pela resposta SOS. Essa resposta é induzida por danos no DNA, causados por diversos agentes genotóxicos como, por exemplo, exposição aos antibióticos ou luz ultravioleta. Por induzir as polimerases translesão, a resposta SOS leva ao aumento transiente da taxa de mutação, o que pode levar ao surgimento de resistência a certos antimicrobianos. No genoma de *P. mirabilis*, não há homólogos dos genes que codificam a principal polimerase translesão (Pol V), a não ser em linhagens que carregam o ICE SXT/R391 que tem consigo o *rumAB*. Sendo assim, neste projeto, além de realizar uma caracterização genômica destes elementos em isolados clínicos brasileiros, realizamos análises funcionais da polimerase translesão *rumAB*, nos processos de mutagênese e na conjugação do próprio ICE. Os genomas das linhagens portadoras do ICE SXT/R391 da nossa coleção de isolados clínicos foram sequenciados para analisar a estrutura dos ICEs, identificando possíveis genes de resistência e os demais fatores associados, além de realizar análises filogenéticas comparando com outros ICEs e linhagens do banco de dados. Além disso, o operon *rumAB* de cada linhagem foi clonado em um vetor de *E. coli* para avaliar o efeito na mutagênese em linhagens de *E. coli* desprovida de *umuDC*, e observamos que há complementação do efeito na mutagênese induzida. Quando avaliamos o efeito do mesmo ICE na mutagênese por UV em diferentes pares de linhagens isogênicas de *P. mirabilis*, observamos que o efeito é discrepante entre algumas linhagens, o que sugere que o *background* genético de cada linhagem tem influência na atividade mutagênica. Quanto ao papel do *rumAB* na conjugação, observamos que o operon parece ter influência no sucesso da conjugação principalmente quando há exposição à luz UV, o que reforça a ideia de que a conservação de genes de Pol V em elementos genéticos móveis têm papel considerável na disseminação destes além de conferir a capacidade de mutagênese via resposta SOS.

Palavras-chave: Genética bacteriana. Mutagênese. ICEs SXT/R391. Resistência à antimicrobianos. Conjugação.

ABSTRACT

SATO, J. L. **Integrative and Conjugative Elements of SXT/R391 family in *Proteus mirabilis* clinical isolates and its relationship with resistance, mutagenesis and conjugation.** 2021. 80 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Proteus mirabilis is a bacterium that causes catheter-associated urinary-tract infections that frequently carries integrative and conjugative elements (ICEs) of the SXT/R391 family integrated in its chromosome. These elements can carry resistance genes in its variable regions, and encode for its own conjugative transfer complex, and other putative genes with uncharacterized functions or not essential for the transfer mechanism. Among conserved genes there is *rumAB* that encode a family Y polymerase, which has translesion activity characterized by high error rates. The regulation of those genes encoded by ICEs (genes related to the conjugative process, and also *rumAB*) is under control of SOS response. The SOS response is activated by damaged DNA caused by multiple genotoxic agents such as UV light and some antimicrobial agents. Due to the induction of translesion polymerases, the SOS response leads to a transiently increased mutation rate that can result in resistance to some antibiotics. In the *P. mirabilis* genome there is no other homologs of the main bacterial translesion polymerase (PolV), unless when an SXT/R391 family ICE that bears *rumAB* is present. In this project, in addition to the genomic characterization of these elements in Brazilian clinical isolates of *P. mirabilis*, we did a functional analysis of the translesion polymerase *rumAB* in processes such as mutagenesis and conjugative transfer. The isolates bearing an ICE SXT/R391 had their whole genome sequenced to be analyzed in terms of resistance genes carried by those ICEs, and other features carried by them, and to perform phylogenetic analysis comparing them to the other ICEs and genomes in database. Furthermore, the *rumAB* operon of each isolate was cloned in a plasmid to evaluate the complementation capacity of an *E. coli* strain devoid of *umuDC*, and we observed a full complementation of the induced mutagenesis. We also evaluated the same ICE in different isogenic lineages, and we observed different effects in the induced mutagenesis among different lineages, suggesting that the genetic background has some impact on the mutagenic activity. Regarding the role of *rumAB* in the conjugative transfer, we observed that the operon has influence on the conjugation efficiency, especially when donor cells are exposed to UV light, reinforcing the idea that conserved Pol V in mobile genetic elements has a considerable role in dissemination of these elements in addition to conferring mutagenic capacities through SOS response.

Keywords: Bacterial genetics. Mutagenesis. ICEs SXT/R391. Antimicrobial resistance. Conjugative transfer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp^R – Resistência a ampicilina

ARA – Arabinose

ARBD – *Antibiotic resistance genes database*

ATPases – adenosinatrifosfatases

BLASTn – (nucleotide) *Basic Local Alignment Search Tool*

CARD – *Comprehensive antibiotic resistance database*

CAUTIs – Infecções no trato urinário associados à cateteres (*Catheter-associated urinary-tract infections*)

c-di-GMP – bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico

Cm^R – Resistência à cloranfenicol

CSI Phylogeny – *Call SNPs and Infer Phylogeny*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO₆₀₀ – Densidade ótica a 600 nm

EUA – Estados Unidos da América

GIs – Ilhas genômicas (*Genomic islands*)

HGT – Transferência horizontal de genes (*Horizontal gene transfer*)

HSs – *hotspots*

ICEs – Elementos conjugativos integrativos (*Integrative and conjugative elements*)

IMEs – Elementos integrativos mobilizáveis (*Integrative and mobilizable elements*)

IPTG – Isopropil-Beta-D-galactopiranosídeo

J – Joule

Kan^R – Resistência à Canamicina

Lac+(ou -) – Presença (ou ausência) da atividade de fermentação da lactose

LB – (meio) Luria-Bertani

MC – (meio) MacConkey

MGEs – Elementos genéticos móveis (*Mobile genetic elements*)

Min – Minutos

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

oriT – Origem de transferência

PCR – Reação em cadeia da Polimerase (*Polymerase chain reaction*)

Pol – Polimerase

(p)ppGpp – guanosina tetra (ou penta) -fosfato

RecA* - Filamento nucleoproteico de RecA

Rif^R – Resistência a rifampicina

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

rpm – rotações por minuto

SNPs – Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-nucleotide polymorphism*)

ssDNA – DNA fita-simples (*single-stranded DNA*)

T.A. – Temperatura ambiente

T4SS – Sistema de secreção do tipo IV (*Type IV secretion system*)

TLS – Síntese translesão (*Translesion synthesis*)

UTIs – Infecções no trato urinário (*Urinary-tract infections*)

UV – Luz ultravioleta

VRs – Regiões variáveis (*Variable Regions*)

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo, análogo à lactose

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Inserção sítio-específica de um ICE..... | 18 |
| Figura 2 – Esquema da organização de genes encontrados nos ICEs da família SXT/R391 do tipo 1..... | 21 |
| Figura 3 – Regulação da ativação da transferência do ICE..... | 23 |
| Figura 4 – Ativação do sistema SOS por danos no DNA..... | 28 |
| Figura 5 – Resposta SOS, regulação da expressão de Pol V e a síntese translesão..... | 30 |
| Figura 6 – Aumento relativo de frequência de mutação em diferentes isolados clínicos após irradiação com luz UV em comparação à frequência de mutação espontânea...33 | 33 |
| Figura 7 – Indução dos genes <i>rumAB</i> e <i>recA</i> após exposição à luz UV..... | 34 |
| Figura 8 – Esquema do sequenciamento de Sanger feita para fechamento do <i>gap</i> entre os <i>contigs</i> que contém a sequência do ICE <i>PmiJpn1</i> (PmBR19)..... | 41 |
| Figura 9 – ICEs SXT/R391 dos isolados brasileiros em comparação com o ICE <i>PmiUSA1</i> (da linhagem HI4320) | 52 |
| Figura 10 – Análise do grupo de exclusão dos ICEs..... | 55 |
| Figura 11 – Árvore filogenética dos ICEs SXT/R391..... | 58 |
| Figura 12 – Árvore filogenética de diversas linhagens de <i>Proteus sp.</i> descritos na literatura com os ICEs identificados no presente estudo..... | 59 |
| Figura 13 – Mutagênese em pares de linhagens isogênicas com ou sem ICE da linhagem PmBR19 (ICE <i>PmiJpn1</i>) | 61 |
| Figura 14 – Sobrevivência à irradiação com UV das linhagens isogênicas com ou sem ICE da linhagem PmBR19 (ICE <i>PmiJpn1</i>)..... | 62 |
| Figura 15 - Mutagênese em pares de linhagens isogênicas contendo o ICE <i>PmiJpn1</i> ou ICE <i>PmiJpn1</i> Δ <i>rumAB</i> | 63 |
| Figura 16 – Sobrevivência à irradiação com UV das linhagens isogênicas contendo o ICE <i>PmiJpn1</i> ou ICE <i>PmiJpn1</i> Δ <i>rumAB</i> | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 17 – Mutagênese com complementação heteróloga de <i>rumAB</i> em linhagens de <i>E. coli</i> $\Delta umuDC$ | 65 |
| Figura 18 – Sobrevivência à irradiação com UV no experimento de mutagênese com <i>rumAB</i> clonado no plasmídeo pWSK129..... | 66 |
| Figura 19 – Influência dos genes <i>rumAB</i> na frequência de conjugação dos ICEs..... | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Lista dos 43 genes estritamente conservados nos ICEs da família SXT/R391..... | 22 |
| Tabela 2 – Linhagens de <i>P. mirabilis</i> utilizados no presente estudo..... | 37 |
| Tabela 3 – Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas no estudo..... | 38 |
| Tabela 4 – Iniciadores utilizados para fechamento do <i>gap</i> do ICEPmiJpn1 (PmBR19) | 40 |
| Tabela 5 – Sequência de iniciadores utilizados para deleção dos genes <i>rumAB</i> | 44 |
| Tabela 6 – Pares de linhagens isogênicas de <i>P. mirabilis</i> construídas no presente estudo..... | 45 |
| Tabela 7 – Sequência de iniciadores utilizados para clonagem do <i>rumAB</i> no vetor pWSK129..... | 47 |
| Tabela 8 – Sequência de iniciadores utilizados para sequenciamento do <i>rumAB</i> (Sanger).... | 49 |
| Tabela 9 – Linhagens de <i>E. coli</i> e vetores clonados utilizados para a complementação heteróloga de <i>rumAB</i> | 50 |
| Tabela 10 – Genes de resistência a antimicrobianos identificados nos genomas sequenciados e o perfil de resistência de cada linhagem..... | 53 |
| Tabela 11 – Porcentagem de identidade entre os 5 ICEs SXT/R391 identificados no estudo..... | 54 |
| Tabela 12 – BLASTn dos ICEs desse estudo contra o banco de dados..... | 56 |
| Tabela 13 – BLASTn das regiões variáveis dos ICEs desse estudo contra o banco de dados..... | 57 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 1.1 <i>Proteus mirabilis</i> | 16 |
| 1.2 Elementos conjugativos integrativos (ICEs) da família SXT/R391 | 17 |
| 1.2.1 Definição dos ICEs..... | 17 |
| 1.2.2 ICEs da família SXT/R391 | 20 |
| 1.2.3 Ciclo de vida dos ICEs SXT/R391..... | 22 |
| 1.2.4 ICEs SXT/R391 em <i>P. mirabilis</i> | 24 |
| 1.2.5 Importância dos ICEs SXT/R391..... | 25 |
| 1.2.6 Diversidade e evolução dos ICEs SXT/R391..... | 26 |
| 1.3 Resposta SOS | 27 |
| 1.3.1 Síntese translesão (TLS) e Mutagênese..... | 29 |
| 1.3.2 Síntese translesão (TLS) e Mutagênese em <i>Proteus mirabilis</i> | 31 |
| 1.4 Resposta SOS, Mutagênese e resistência a antimicrobianos | 32 |
| 1.5 Dados Prévios e Justificativa | 32 |
| 2 OBJETIVOS | 36 |
| 2.1 Objetivo geral | 36 |
| 2.2 Objetivos específicos | 36 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 3.1 Cepas utilizadas e condições de crescimento | 37 |
| 3.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das linhagens portadoras do ICE | 39 |
| 3.3 Sequenciamento do genoma | 39 |
| 3.3.1 Extração e preparação dos DNAs genômicos | 39 |
| 3.3.2 Sequenciamento dos genomas de <i>P. mirabilis</i> portadores do ICE..... | 39 |
| 3.4 Genômica comparativa dos ICEs | 41 |
| 3.4.1 Grupos de exclusão dos ICEs sequenciados..... | 42 |
| 3.4.2 BLASTn dos ICEs e das regiões variáveis dos ICEs | 42 |
| 3.4.3 Filogenia dos ICEs e dos genomas de <i>Proteus sp.</i> | 42 |
| 3.5 Deleção dos genes <i>rumAB</i> e Construção de linhagens isogênicas de <i>P. mirabilis</i> com ICE parental ou ICEΔ<i>rumAB</i> | 43 |
| 3.5.1 Preparo do fragmento para eletroporação | 43 |
| 3.5.2 Construção da linhagem com Sistema lambda-Red | 44 |
| 3.5.3 Indução de lambda-Red, preparo de célula competente e eletroporação | 44 |
| 3.5.4 Construção das linhagens isogênicas | 45 |
| 3.5.5 Ensaios de mutagênese em linhagens isogênicas | 46 |
| 3.6 Complementação heteróloga de <i>rumAB</i> em <i>E. coli</i> | 47 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.6.1 | Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e purificação dos insertos..... | 47 |
| 3.6.2 | Digestão e ligação dos insertos no plasmídeo pWSK129 | 47 |
| 3.6.3 | Transformação por choque térmico..... | 48 |
| 3.6.4 | Confirmação por sequenciamento dos insertos | 48 |
| 3.6.5 | Sobrevivência da linhagem <i>E. coli</i> AB1157 à luz UV | 49 |
| 3.6.6 | Construção das linhagens e ensaio de complementação heteróloga | 49 |
| 3.7 | Ensaio de conjugação | 50 |
| 3.7.1 | Frequência de conjugação de ICE <i>PmiJpn1</i> da linhagem PmBR19 para a linhagem de <i>E. coli</i> MG1655 | 50 |
| 3.7.2 | Papel dos genes <i>rumAB</i> na conjugação do ICE <i>PmiJpn1</i> para a linhagem de <i>E. coli</i> desprovida dos genes <i>umuDC</i> | 51 |
| 4 | RESULTADOS | 52 |
| 4.1 | Genômica Comparativa dos ICEs | 52 |
| 4.1.1 | Grupos de exclusão dos ICEs sequenciados..... | 54 |
| 4.1.2 | BLASTn dos ICEs sequenciados | 55 |
| 4.1.3 | Análises filogenéticas dos ICEs e dos genomas de <i>Proteus sp.</i> | 57 |
| 4.2 | Mutagênese induzida por UV em linhagens isogênicas | 60 |
| 4.3 | Complementação heteróloga de <i>rumAB</i> em <i>E. coli</i> Δ<i>umuDC</i> | 64 |
| 4.4 | Papel dos genes <i>rumAB</i> na conjugação dos ICEs | 66 |
| 5 | DISCUSSÃO | 68 |
| 6 | CONCLUSÕES | 71 |
| | REFERÊNCIAS* | 72 |

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Proteus mirabilis*

O gênero *Proteus* é representado pelas gamaproteobactérias gram-negativas da família *Morganellaceae*. Inicialmente descrito por Gustav Hauser em 1885, que nomeou as bactérias identificadas ao associar a capacidade de alterar a forma, entre um bacilo “nadador” e uma célula alongada com centenas de flagelos, com um deus da mitologia grega que possuía capacidade de transformação. Essas bactérias originalmente classificadas como *Proteus sp.* por Hauser, foram posteriormente divididas em 2 gêneros: *Proteus* e *Bacterium* (ADEOLU et al., 2016; WENNER; RETTGER, 1919).

Atualmente, o gênero *Proteus* é dividido em: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. hauseri*, e 3 *genomospecies* 4, 5 e 6. O principal reservatório destas bactérias é o trato gastrointestinal de diversos mamíferos, mas também são naturalmente encontradas em ambientes como água e solo (como indicativos de poluição fecal). São patógenos oportunistas frequentemente isolados de amostras clínicas de urina, feridas, queimaduras, dentre outras. (DRZEWIECKA, 2016).

Dentre estas espécies, *Proteus mirabilis* representa cerca de <0,005% da microbiota intestinal de um indivíduo saudável e possui uma alta relevância clínica associada aos casos de pielonefrite, urolitíase e infecções no trato urinário associado a cateteres (CAUTIs, do inglês *catheter-associated urinary-tract infections*). Apesar de CAUTIs serem polimicrobianas na maioria dos casos, *P. mirabilis* é um dos microrganismos mais frequentemente encontrados e representa 3% das infecções hospitalares e até 44% dos casos de CAUTIs nos Estados Unidos (EUA). Possui a motilidade do tipo swarming e produção da enzima urease como algumas de suas principais características (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012; JACOBSEN et al., 2008; WARREN et al., 1982; YATSUNENKO et al., 2012).

O uso desnecessário de cateteres urinários leva à maior incidência de CAUTIs (1 milhão de casos/ano nos EUA), o que implica não somente em maiores custos hospitalares, mas também em maiores chances de resultar em sequelas, e aumenta em até 3 vezes o risco e a duração da hospitalização e necessidade de tratamento com antibióticos quando comparados aos pacientes não-cateterizados (JAIN et al., 1995; KUNLN et al., 1992; LAAN et al., 2020; TAMBYAH; MAKI, 2000).

Proteus mirabilis é normalmente suscetível aos antibióticos utilizados para o tratamento de UTIs (do inglês *urinary-tract infections*) como: beta-lactâmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, e carbapenêmicos. Porém, fatores como a produção de biofilmes dificultam a erradicação da infecção protegendo as bactérias contra o tratamento com antibióticos, sendo correlacionado ao desenvolvimento de incrustação e bloqueio do cateter que promove a ascensão da infecção, o que pode levar até ao acometimento do rim do paciente. Entre os fatores de virulência que são expressos comumente pelo *P. mirabilis* para promover a formação de biofilmes estão as proteínas de adesão, lipopolisacarídeos, moléculas de *quorum sensing*, enzima urease, e etc. (JACOBSEN et al., 2008).

Alguns elementos genéticos móveis (MGEs, do inglês *mobile genetic elements*) têm um papel importante por conferir resistência aos diversos antimicrobianos de tratamento de UTIs, ou também por conferir outras vantagens que contribuem para a sobrevivência da bactéria nos diversos nichos, como serão citados nos tópicos seguintes.

1.2 Elementos conjugativos integrativos (ICEs) da família SXT/R391

1.2.1 Definição dos ICEs

Os Elementos Conjugativos Integrativos (ICEs, do inglês *Integrative Conjugative Elements*) são MGEs que se encontram integrados em sítios específicos do genoma do hospedeiro e são replicados juntamente com o cromossomo, considerados como um tipo de ilha genômica (GI, do inglês *genomic islands*). Podem se excisar para formar uma molécula intermediária circular que serve de substrato para transferência por conjugação, através da maquinaria que é codificada na sua estrutura. Já foram definidos também como transposons conjugativos, plasmídeos integrativos, etc. por possuir características similares à outras MGEs como plasmídeos (semelhança dos genes *tra*, capacidade de conjugação e circularização da molécula) e fagos (integração sítio-específica, replicação com o genoma do hospedeiro e via de regulação similar) (BURRUS et al., 2002; WOZNIK; WALDOR, 2010).

Estruturalmente, os ICEs são compostos de 3 módulos funcionais: de manutenção, de disseminação e de regulação. O módulo de manutenção é aquele responsável pela integração no genoma do hospedeiro que garante que o elemento seja transmitido verticalmente, e é na

sua maioria composto por uma integrase (Int), que é uma recombinase que promove a recombinação entre sequências específicas da estrutura do ICE (sítio de ligação *attP*) e do cromossomo do hospedeiro (sítio de ligação *attB*), que resulta na formação das sequências híbridas *attL* e *attR* (Figura 1). A especificidade da recombinase para a sequência *attB* pode variar para cada tipo de ICE, algumas com maior e outras com menor especificidade para o sítio de inserção. São bastante frequentes os ICEs que se integram na região 3' de genes de RNA transportador (tRNA), porém este não é sempre o caso. Além do gene *int* e da sequência *attP*, alguns ICEs codificam um outro fator denominado excisase (Xis) que medeia o processo de excisão facilitando a recombinação entre os sítios *attL* e *attR* que flanqueiam o ICE integrado no genoma (Figura 1) (BURRUS; WALDOR, 2004b; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

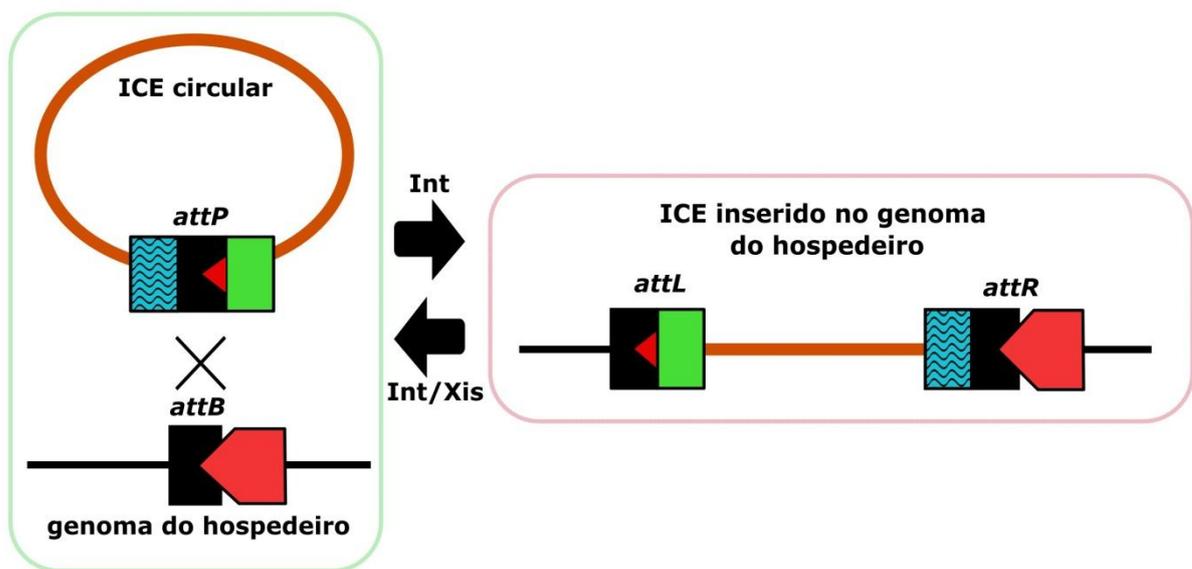


Figura 1 – Inserção sítio-específica de um ICE. As linhas pretas e laranjas representam a sequência do genoma e do ICE, respectivamente. Os sítios de ligação (*attP* e *attB*) estão representados pelos quadrados pretos. Uma integrase (Int) medeia a reação de recombinação entre o sítio *attP* do ICE e o sítio *attB* do genoma do hospedeiro que leva à integração do ICE e conseqüentemente à formação das sequências híbridas *attL* e *attR*. A seta vermelha representa o gene que contém o *attB* no genoma do hospedeiro, e a sequência correspondente no ICE está representada pelo triângulo vermelho. O gene se mantém intacto após a inserção do ICE como mostra a figura do ICE integrado. A excisase é um cofator capaz de induzir a integrase a catalisar a reação de excisão do ICE.

O módulo de disseminação é composto pelos genes que codificam a maquinaria de transferência dos ICEs, que promovem a conjugação do ICE de uma célula doadora para uma

receptora. A maquinaria de conjugação faz parte do sistema de secreção do tipo IV (T4SS) que promove a transferência de uma única fita do ICE para a célula receptora, enquanto a outra fita permanece na doadora. O que se sabe sobre o mecanismo de transferência vem de estudos com genes homólogos codificados por plasmídeos conjugativos (plasmídeos IncA/C, plasmídeos F, etc.) (BURRUS; WALDOR, 2004b; HOCHHUT; MARRERO; WALDOR, 2000).

Por fim, o módulo de regulação, também bastante diversificado, é composto por genes que regulam os genes codificados nos ICEs que promovem o processo de transferência dos ICEs. Estes que em condições normais se mantêm reprimidos até que algum sinal promova a indução da sua expressão (BEABER et al., 2002; BURRUS; WALDOR, 2004b).

Muitos ICEs são mosaicos de diversas estruturas genéticas e a classificação pode ser feita através de características como o sistema de conjugação codificado (módulo de disseminação), ou na integrase e seu respectivo sítio de integração (módulo de integração). Na base de dados da plataforma ICEBerg (<https://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg2/>) podemos consultar vários exemplos das diversas famílias de ICEs já descritos (GUGLIELMINI et al., 2014; LIU et al., 2019).

Os ICEs servem de arcabouço para mobilizar diversos genes em sua estrutura e/ou para mobilizar outros elementos genéticos coexistentes chamados elementos integrativos mobilizáveis (IMEs, do inglês *integrative and mobilizable elements*), que não têm capacidade de auto transferência (exemplo: plasmídeo RSF1010) mas que possuem uma *oriT* funcional que permite a sua transferência por uma maquinaria de conjugação. Isso torna os ICEs importantes mediadores de transferência horizontal de genes (HGT, do inglês *horizontal gene transfer*) em procariotos, que é um dos importantes e mais rápidos mecanismos de evolução dos genomas bacterianos (BURRUS et al., 2002; DACCORD; CECCARELLI; BURRUS, 2010; POULIN-LAPRADE; CARRARO; BURRUS, 2015; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

Assim, os ICEs como um dos elementos genéticos importantes que medeiam a HGT podem propagar fatores que conferem vantagens adaptativas aos hospedeiros e conferir capacidade de colonizar diferentes nichos. Como exemplo de vantagens adaptativas adquiridas por meio dos ICEs já descritas na literatura podemos citar os genes de resistência aos antimicrobianos, aos metais pesados e/ou aos fagos, genes de fatores de virulência, novas vias de degradação de compostos orgânicos, genes de reparo de DNA, regulação da formação de biofilmes e entre outros (BÖLTNER et al., 2002; BOTELHO; SCHULENBURG, 2020;

DAVIES et al., 2009; RICE, 1998; WALDOR; TSCHÄPE; MEKALANOS, 1996; ZAMARRO; MARTÍN-MOLDES; DÍAZ, 2016).

1.2.2 ICEs da família SXT/R391

A família SXT/R391 dos ICEs foi definida a partir da semelhança estrutural e funcional entre os primeiros ICEs desta família que foram reportados e sequenciados: o ICE SXT (99,5 kb), descrito originalmente em uma linhagem epidêmica de *Vibrio cholerae* MO10 (O139), que confere resistência à cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e trimetoprim, isolado na Índia; e o elemento R391 (89 kb) que era considerado um elemento IncJ, que confere resistência à mercúrio e canamicina, derivado de uma linhagem de *Providencia rettgeri* isolada na África. Estes ICEs prototípicos desta família compartilham aproximadamente 65 kb da estrutura que incluem os genes essenciais para a conjugação, os módulos de integração e de regulação. (BEABER et al., 2002; BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2002; BÖLTNER et al., 2002; COETZEE; DATTA; HEDGES, 1972; WALDOR; TSCHÄPE; MEKALANOS, 1996).

Os ICEs da família SXT/R391 estavam presentes em linhagens pandêmicas de *Vibrio cholerae* (O1 e O139) como elementos responsáveis pela dispersão de cassetes com genes de resistência à antimicrobianos como sulfametoxazol, trimetoprim e estreptomicina (WALDOR; TSCHÄPE; MEKALANOS, 1996). A prevalência dos ICEs e o seu papel na disseminação de genes de resistência observada nas últimas décadas têm chamado a atenção da comunidade científica embora os plasmídeos tenham um destaque maior quanto ao seu papel na HGT.

Os ICEs da família SXT/R391 são encontrados em diversos gêneros de gamaproteobactérias como *Vibrio spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Alteromonas spp.*, *Shewanella spp.*, dentre outros. Os elementos genéticos desta família foram agrupados baseado na presença dos genes conservados e a integração específica na porção 5' do gene *prfC* (fator de liberação de cadeia de peptídeo 3). No entanto, nos estudos recentes foram identificados alguns ICEs atípicos que possuem alta similaridade com os ICEs SXT/R391 até então descritos, mas com diferenças na organização dos genes conservados e especificidade de integração. Assim, foi sugerida a existência de 4 tipos de ICEs na família SXT/R391 baseado nas variações de sítio de inserção, organização estrutural, e prevalência nas espécies bacterianas. Os do tipo 1, os mais abundantes, são todos os ICEs integrados na porção 5' do gene *prfC*, e são encontrados em diversas espécies de *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* e

Tabela 1 – Lista dos 43 genes estritamente conservados nos ICEs da família SXT/R391

| Função | genes |
|--|---|
| Replicação por círculo rolante (conjugação) | <i>mobI</i> ; <i>tral</i> |
| Translocação do ICE durante a conjugação | <i>traDJ</i> |
| Montagem do complexo de transferência (família T4SS) | <i>traLEKB</i> ; <i>traVA</i> ; <i>dsbC-traC-thrF-traWUN</i> ; <i>traFHG</i> ; |
| Módulo de regulação | <i>setCD</i> ; <i>setR</i> ; <i>croS</i> |
| Sistema de exclusão de entrada | <i>eex</i> |
| Recombinação de DNA | <i>ssb-bet-exo</i> |
| Reparo de DNA | <i>radC</i> |
| Sistema de partição | <i>srpMR</i> |
| Outras funções | <i>cobS</i> (cobalamina sinterase putativo); <i>s082</i> (transglicoase lítica putativo) |
| Genes de funções desconhecidas | <i>s91</i> ; <i>s093</i> ; <i>s063</i> ; <i>s089</i> ; <i>s088</i> ; <i>s068</i> ; <i>s069</i> ; <i>s092</i> ; <i>s072</i> ; <i>s083</i> ; <i>s084</i> |

1.2.3 Ciclo de vida dos ICEs SXT/R391

Os ICEs integrados no genoma do hospedeiro podem se excisar diante de alguns estímulos que levam ao aumento da expressão dos seus genes da maquinaria de conjugação e formar uma molécula intermediária circular que serve de substrato para o processo de transferência. Curiosamente, a regulação do processo de conjugação dos ICEs SXT/R391 está intimamente relacionada à resposta a danos no DNA. Em procariotos, muitas espécies codificam as proteínas LexA e RecA no seu genoma, que são reguladores-chave do protótipo de resposta a danos no DNA denominado resposta SOS (tópico 1.3), e a proteína SetR codificada pelos ICEs é um repressor homólogo de LexA, que reprime a expressão dos genes *setCD* (Figura 3). Quando a resposta SOS é induzida, o repressor sofre uma autoclivagem induzida pelo RecA ativado (RecA*), permitindo a expressão de SetCD que são ativadores de transcrição que induzem a expressão dos genes da maquinaria de conjugação e dos genes *Int/Xis* que promove a excisão do ICE para tomar a forma circular, que será substrato para a maquinaria de conjugação. Além disso, um outro repressor codificado no mesmo operon que o SetCD denominado CroS, quando induzido com a ativação da resposta SOS, se associa primeiro no operador da região promotora do gene *setR* para prevenir a expressão deste e,

mais tarde, se associa também na região promotora do próprio operon para evitar superexpressão dos genes *setCD*. Com isso, esse repressor permite que ocorra uma indução suficiente dos genes da maquinaria de conjugação para que ocorra a transferência dos ICEs durante a indução da resposta SOS, impedindo que o SetR reprima a expressão dos genes de conjugação precocemente (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; BURRUS; WALDOR, 2003; POULIN-LAPRADE; BURRUS, 2015).

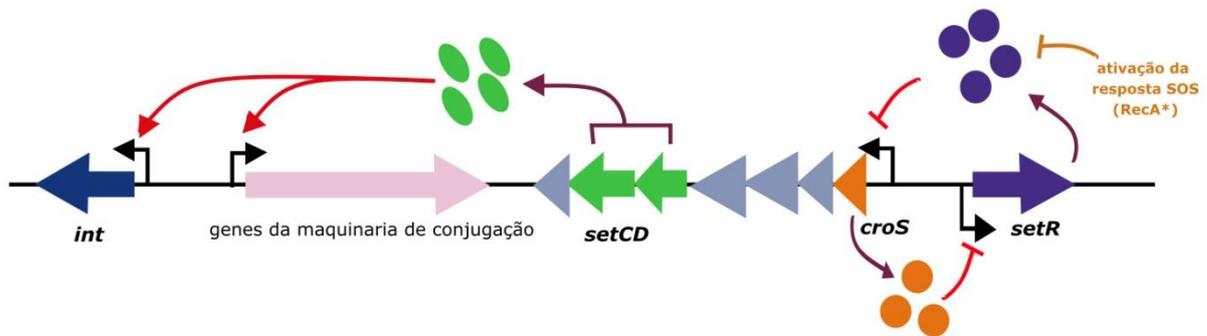


Figura 3 – Regulação da ativação da transferência do ICE. O repressor SetR sofre autoclivagem induzida por RecA* (associada à ativação da resposta SOS), permitindo a expressão dos ativadores SetCD, que por sua vez induzem a expressão dos genes relacionados ao processo de excisão do genoma do hospedeiro (*int/xis*) e da maquinaria de conjugação (genes *tra*). CroS é induzido juntamente com SetCD e promove a repressão do SetR para que este não desligue a transcrição do SetCD e assim permitindo a indução da conjugação.

A maquinaria de conjugação dos ICEs faz parte de uma grande família dos sistemas de secreção do tipo IV (T4SS), que medeia a transferência de DNA ou até proteínas entre as células bacterianas que requer um contato direto entre a doadora e a receptora. Nos ICEs SXT/R391, a maquinaria é codificada por quatro operons denominados *traLEKB*, *traVA*, *dsbC-traC-trhF-traWUN* e *traFHG*, que possuem alta homologia com genes codificados pelos plasmídeos IncA/C (POULIN-LAPRADE; CARRARO; BURRUS, 2015; WOZNIAK et al., 2009). Para que ocorra a transferência a proteína relaxase TraI se associa à *oriT* para a formação do relaxossomo, cliva a fita que será transferida (*nick*) e se liga covalentemente à porção 5' dessa fita (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2002; CECCARELLI et al., 2008). O pilus e o canal de transferência são codificados pelos genes *tra*, e uma célula pode conter de 2 a 3 pili conjugativos fazendo o contato com a célula receptora. Uma proteína acopladora reconhece o complexo nucleoproteico relaxase-DNA e o direciona ao canal de transferência, onde a proteína ligada ao DNA a ser transportado é reconhecida pelas proteínas do canal e é

transferida para a célula receptora levando consigo a fita de DNA associada, em um processo similar à replicação por círculo rolante. Ao chegar na receptora, a relaxase associa as pontas do DNA transferido permitindo a recircularização do elemento, e a fita complementar é sintetizada pela bactéria receptora. Ao final deste processo, as células envolvidas no processo ficam cada uma com uma cópia do ICE e, assim, não ocorre a perda do elemento na célula doadora (CARRARO; BURRUS, 2014; LLOSA et al., 2002).

Acreditava-se que a forma circular dos ICEs não eram replicativas, porém foi demonstrado que os ICEs da família SXT/R391 possuem um mecanismo de replicação condicional que utiliza o *oriT* como origem de replicação, prevenindo a perda do elemento principalmente nas bactérias com tempo de geração rápida em que ocorrem múltiplas forquilhas de replicação. Assim, mesmo se o ICE se excisa antes da replicação junto ao cromossomo do hospedeiro, a replicação condicional previne a perda do elemento em uma das células-filhas. Além disso, os genes *srpMR* (de *SXT/R391 partition*) conservados nos ICEs SXT/R391 codificam para um sistema ativo de partição que também está sobre controle do SetCD, que contribui para que ambas as células-filhas recebam o ICE quando este está excisado do genoma (BURRUS; WALDOR, 2003; CARRARO; BURRUS, 2015; CARRARO; POULIN; BURRUS, 2015; HOCHHUT; WALDOR, 1999; WALDOR; TSCHÄPE; MEKALANOS, 1996; WOZNIAK; WALDOR, 2009).

1.2.4 ICEs SXT/R391 em *P. mirabilis*

Os isolados de *P. mirabilis* são normalmente desprovidos de genes de resistência aos beta-lactâmicos no seu genoma, porém o surgimento de isolados clínicos resistentes a esses antimicrobianos mostrou que esta bactéria possui capacidade de adquirir tal resistência por transferência horizontal de genes. O mais comum AmpC adquirido é o CMY-2, e apesar da suspeita inicial de que em *P. mirabilis* a transmissão ocorria por meio de plasmídeos, identificaram a presença dos ICEs da família SXT/R391 com tais genes na sua estrutura (HARADA et al., 2010; MATA et al., 2011). Tem sido observada uma alta prevalência destes elementos em *P. mirabilis* em vários estudos recentes (ABERKANE et al., 2016; LEI et al., 2016; MAC AOGÁIN; ROGERS; CROWLEY, 2016; MATA et al., 2011).

1.2.5 Importância dos ICEs SXT/R391

Muitos genes de resistência aos antimicrobianos de grande importância clínica foram encontrados em ICEs desta família, como genes de resistência à fosfomicina (*fosA3*), à beta-lactâmicos (*bla* CMY-2, *bla* NDM-1, *bla* CTX-M-65), às fluoroquinolonas (*aac(6')-Ib-cr*) à tigeclina (*tet(X6)*), dentre outros. Além dos cassetes de resistência a antimicrobianos, os ICEs podem carregar outros fatores que podem conferir vantagens ao hospedeiro como por exemplo os genes *dgcKL* carregados por alguns ICEs já sequenciados, que pode influenciar a formação de biofilmes e a motilidade do hospedeiro ao interferir na produção do mensageiro secundário c-di-GMP (ABERKANE et al., 2016; BORDELEAU et al., 2010; BURRUS; MARRERO; WALDOR, 2006; GOLDFARB et al., 2015; HE et al., 2020; KONG et al., 2020; LEI et al., 2016, 2018; LI et al., 2016; MAC AOGÁIN; ROGERS; CROWLEY, 2016; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

Podemos citar também a frequente presença de sistemas toxina-antitoxina nas regiões variáveis, como os genes *hipAB* (de *high-persistence*) e o *mosAT* (de *maintenance of SXT*), que, além de evitar a perda do elemento genético no hospedeiro, podem estar associados também à formação de células persistentes como forma de lidar com estresses como durante um tratamento com antimicrobianos. Acredita-se que as células persistentes estão associadas com a reincidência de infecções crônicas, e são caracterizadas por um estado fisiológico no qual as células estão dormentes, e conseqüentemente se tornam resistentes aos diversos antimicrobianos que possuem o mecanismo de ação relacionados a inibir processos celulares ativos durante o crescimento bacteriano. Os sistemas toxina-antitoxina são encontrados ubiquamente nos genomas bacterianos e também estão frequentemente associados aos MGEs. São compostos por uma toxina, uma proteína estável que induz o estado de persistência por diversos mecanismos, e uma antitoxina, que pode ser uma proteína ou um RNA, que atua contra a ação das toxinas seja por inibição da tradução ou transcrição, ou até mesmo inativando a toxina diretamente. Como exemplo, a toxina HipA de *Escherichia coli* fosforila a Glu-tRNA sintetase GltX inibindo a aminoacilação, gerando acúmulo de tRNA vazios, que inibe a tradução quando inserido no sítio A do ribossomo, o que leva à ativação de RelA, causando o aumento do nível de (p)ppGpp, que inibe diversos processos celulares como transcrição, tradução, replicação e síntese de parede celular, que propiciam o estado de persistência (GERMAIN et al., 2013; HAURYLIUK et al., 2015; LEWIS, 2010; VAN MELDEREN, 2010).

Não podemos esquecer também do seu papel na mobilização de outras MGE não auto transferíveis como citado anteriormente no **tópico 1.2.1** (BURRUS et al., 2002; DACCORD; CECCARELLI; BURRUS, 2010; POULIN-LAPRADE; CARRARO; BURRUS, 2015; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

Assim, evidências mostram que os ICEs tem um papel importante na disseminação de diversos fatores que conferem novas funções seja conferindo capacidade de adaptação a diversas condições ambientais para colonizar novos nichos, como também os fatores de virulência e genes de resistência a antimicrobianos entre diferentes gêneros bacterianos. Além disso, considerando presença de vários genes conservados na estrutura dos ICEs SXT/R391 que não possuem uma função atribuída, abre-se uma possibilidade de que algum dos fatores conservados codificados na sua estrutura que ainda não foi caracterizado possa interferir na fisiologia do hospedeiro portador.

1.2.6 Diversidade e evolução dos ICEs SXT/R391

Os ICEs SXT/R391 podem se inserir em tandem, ou seja, após um ICE se integrar no genoma do hospedeiro e gerar os sítios *attL* e *attR*, estes podem também ser sítios de integração de um outro ICE e, assim, dois ICEs coexistirem numa mesma célula. Quando isso acontece possibilita eventos de recombinação mediados pelos genes *bet*, *exo* (codificado nos próprios ICE) e *recA* (do hospedeiro), e assim gerar um novo ICE. Porém a configuração em tandem é bastante instável na célula, frequentemente levando à perda de um dos elementos, seja um dos ICEs inseridos ou um dos ICEs resultantes da recombinação dos dois ICEs (BURRUS; WALDOR, 2004a; GARRISS; WALDOR; BURRUS, 2009; HOCHHUT et al., 2001).

Para que dois ICEs possam coexistir na mesma célula, cada um deve pertencer a um grupo de exclusão diferente do outro, no caso, o grupo R (R391) ou o grupo S (SXT). Tais grupos de exclusão são definidos por duas proteínas de membrana codificadas pelos ICEs, TraG e Eex, uma atua na célula doadora e a outra na célula receptora, respectivamente, inibindo a entrada de um novo ICE que seja do mesmo grupo de exclusão do ICE que já está no hospedeiro. Foi mostrado que uma célula que já possui uma cópia de um ICE diminuía a eficiência de conjugação de um segundo ICE do mesmo grupo em 30 vezes. Foi sugerido também que a exclusão de entrada tenha função em evitar a morte da célula receptora

resultante de maior permeabilidade celular conferida por múltiplos doadores. O mecanismo exato pelo qual essa exclusão ocorre não está esclarecido, porém pelo fato da porção das proteínas TraG e Eex envolvida na especificidade da exclusão de entrada ser citoplasmática sugere-se um modelo no qual a porção citoplasmática de TraG da célula doadora é translocada para o citoplasma da célula doadora para permitir a interação entre as duas proteínas (MARRERO; WALDOR, 2005, 2007).

1.3 Resposta SOS

As células estão constantemente lidando com diversos agentes genotóxicos, endógenos ou exógenos, que ameaçam a integridade do genoma. Como exemplo, há as espécies reativas de oxigênio (ROS), luz ultravioleta (UV), raios X, compostos químicos, inclusive alguns antimicrobianos (exemplo: quinolonas), entre outros. Em bactérias, o ROS produzido através do metabolismo aeróbico contribui para o surgimento de mutantes espontâneos, e as concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos além de promover estresse oxidativo nas células gerando ROS, promove a seleção das células resistentes ao antimicrobiano (FOSTER et al., 2015; KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010; KÜMMERER, 2009a, 2009b).

Quando o nível de danos no DNA atinge um certo nível, leva à indução da resposta SOS que é ativada quando há formação de regiões fita-simples de DNA (ssDNA, do inglês *single-stranded DNA*) decorrente de bloqueios na forquilha de replicação ou outras situações, como a HGT via conjugação em que há presença transiente de ssDNA durante o processo de transferência (BAHAROGLU; BIKARD; MAZEL, 2010; MASLOWSKA; MAKIELA-DZBENSKA; FIJALKOWSKA, 2019; MICHEL, 2005). Na ocorrência dessas fitas simples de DNA, a proteína RecA se associa à região ssDNA, formando um filamento nucleoproteico (RecA*) que por sua vez leva à autoclivagem do repressor LexA, e assim induz a expressão de diversos genes do regulon SOS. O conjunto de genes regulados pelo sistema é variável de espécie para espécie, no entanto alguns processos comuns envolvem a inibição da divisão celular, o reparo por excisão de nucleotídeos, o reparo por recombinação, e a expressão de polimerases translesão (BAHAROGLU; MAZEL, 2014; BELL et al., 2012; COURCELLE et al., 2001; KREUZER, 2013).

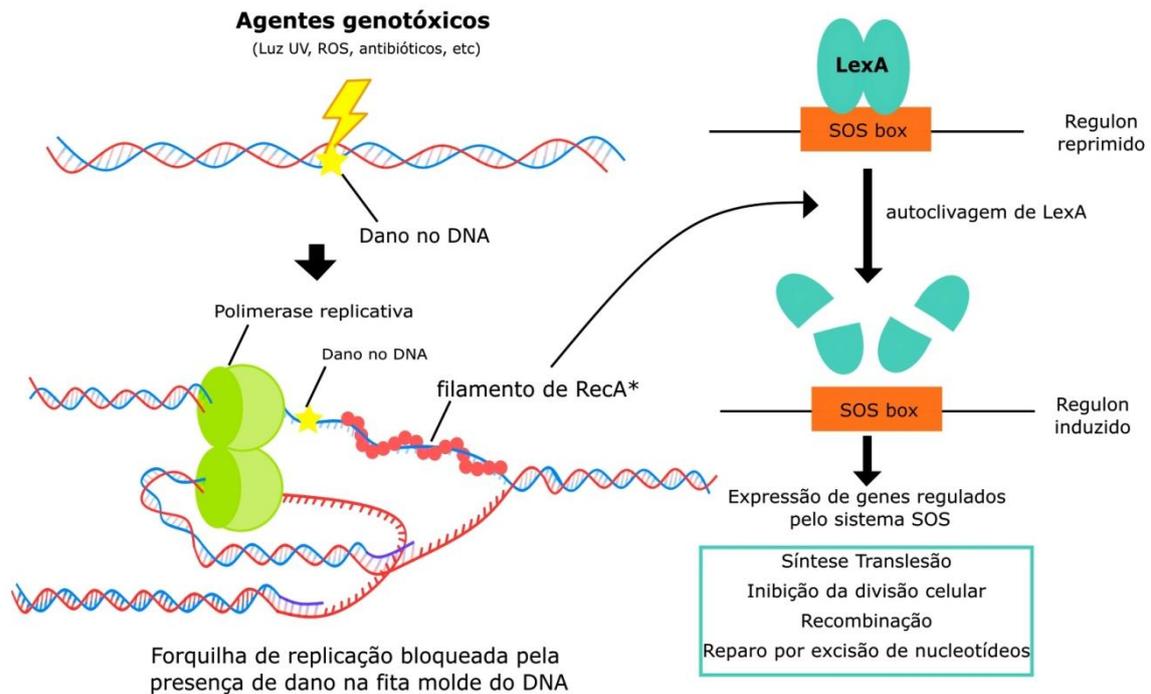


Figura 4 - Ativação do sistema SOS por danos no DNA. Diversos agentes genotóxicos causam danos no DNA, o que que leva à ativação da proteína RecA que se liga à fita simples de DNA que decorre de bloqueio da replicação, uma vez que a polimerase replicativa é incapaz de prosseguir a polimerização na presença de dano na fita molde. O filamento nucleoproteico de RecA (RecA*) induz a autoclivagem da proteína LexA, repressor da expressão dos genes do regulon SOS, e assim leva à indução dos mesmos.

LexA só é sensível à autoclivagem quando está dissociada do operador. Assim, a afinidade do repressor LexA pelos operadores e o número de operadores na região promotora dos genes do regulon SOS definem o momento em que esses genes começam a se expressar. Quanto mais numeroso o operador na região promotora e quanto maior a afinidade o operador tem com a proteína LexA, mais tardiamente o respectivo gene é expresso durante a indução da resposta SOS, e vice-versa. Uma vez que a resposta SOS estará ativa somente quando há presença das regiões de ssDNA, quando essa região é reparada, a resposta é desligada. Conseqüentemente, se a resposta é desligada rapidamente, os genes que seriam induzidos mais tardiamente não serão induzidos, como por exemplo, os genes da polimerase translesão Pol V (*umuDC*) somente são expressos aproximadamente 40 à 50 minutos após a indução da resposta SOS por irradiação com luz UV. O LexA é induzido tardiamente e pode desligar a resposta SOS quando o sinal genotóxico não estiver mais presente e, assim, não induzir mais a autoclivagem do repressor (BUTALA et al., 2011; CULYBA et al., 2018; FRIEDMAN et al., 2005; MICHEL, 2005).

1.3.1 Síntese translesão (TLS) e Mutagênese

A síntese translesão (TLS) é uma via existente em praticamente todos os organismos que é caracterizada como um mecanismo de tolerância aos danos no DNA, mediados pelas polimerases translesão que são induzidas na resposta SOS (Figura 2). Bactérias como *E. coli* possuem 5 DNA polimerases (I a V), classificadas filogeneticamente em família A (Pol I), B (Pol II), C (Pol III), e Y (Pol IV e V), sendo que as principais polimerases translesão são da família Y de DNA polimerases. As Pol I, II e III possuem atividade revisora 3'-5' que contribui para maior acurácia durante a síntese de DNA, e nelas foi demonstrado alguma atividade de tolerância a danos em certas condições, porém com contribuição limitada (FUCHS; FUJII, 2013; FUJII; FUCHS, 2020; NAPOLITANO et al., 2000).

As polimerases translesão podem substituir a polimerase replicativa (Pol III) bloqueada pela presença de dano na fita molde, e por possuir o sítio catalítico mais espaçoso podem acomodar o dano na fita molde para dar continuidade ao processo de replicação. São caracterizadas também pela baixa fidelidade e ausência da atividade revisora 3' - 5', o que inerentemente permite a introdução de bases pareadas erroneamente na fita complementar (FUCHS; FUJII, 2013; LING et al., 2001; OHMORI et al., 2001; SALE; LEHMANN; WOODGATE, 2012; ZHAO; TODD WASHINGTON, 2017). Eventualmente, tais erros de pareamento que não são reparados se tornam mutações, o que caracteriza a TLS como um processo ativo de mutagênese dependente da resposta SOS, tendo em vista também que essas polimerases podem inserir erros de pareamento mesmo na ausência de lesões na fita molde do DNA (NOHMI, 2006).

Quando a resposta SOS é ativada, as 3 polimerases Pol II, Pol IV e Pol V são induzidas. As Pol II e IV são expressas em níveis basais e são induzidas em até 7 vezes (Pol II) e 10 vezes (Pol IV), já a Pol V é expressa somente durante a resposta SOS. A Pol II não é essencial na replicação do DNA e tem seu papel fisiológico pouco conhecido, mas foi demonstrada a sua capacidade de passar por adutos AAF (N-2-acetilaminofluoreno) e desde então considera-se que tenha um importante papel em promover TLS em condições de estresse (NAPOLITANO et al., 2000).

Em *E. coli*, a principal polimerase translesão é codificada pelos genes *umuDC*, que é DNA Pol V, e também há o gene *dinB* que codifica uma polimerase propensa a erro, a DNA Pol IV, porém com papel mais restrito. Ambos são regulados pela resposta SOS e requerem

interação com o grampo (*beta clamp*) para exercer a atividade de síntese translesão (BECHEREL; FUCHS; WAGNER, 2002; JAROSZ et al., 2006; KATO; SHINOURA, 1977; WAGNER et al., 1999). A Pol V é a principal polimerase envolvida na mutagênese induzida por agentes genotóxicos como luz ultravioleta (UV) e nitrosoguanidina, enquanto que a Pol IV apesar de ter o papel mais restrito, possui uma regulação adicional de indução por beta-lactâmicos, pela entrada na fase estacionária de crescimento e também está envolvida na mutagênese induzida por estresse (BAGG; KENYON; WALKER, 1981; GALHARDO et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2013; LAYTON; FOSTER, 2003; MCKENZIE et al., 2001; PÉREZ-CAPILLA et al., 2005; YEISER et al., 2002).

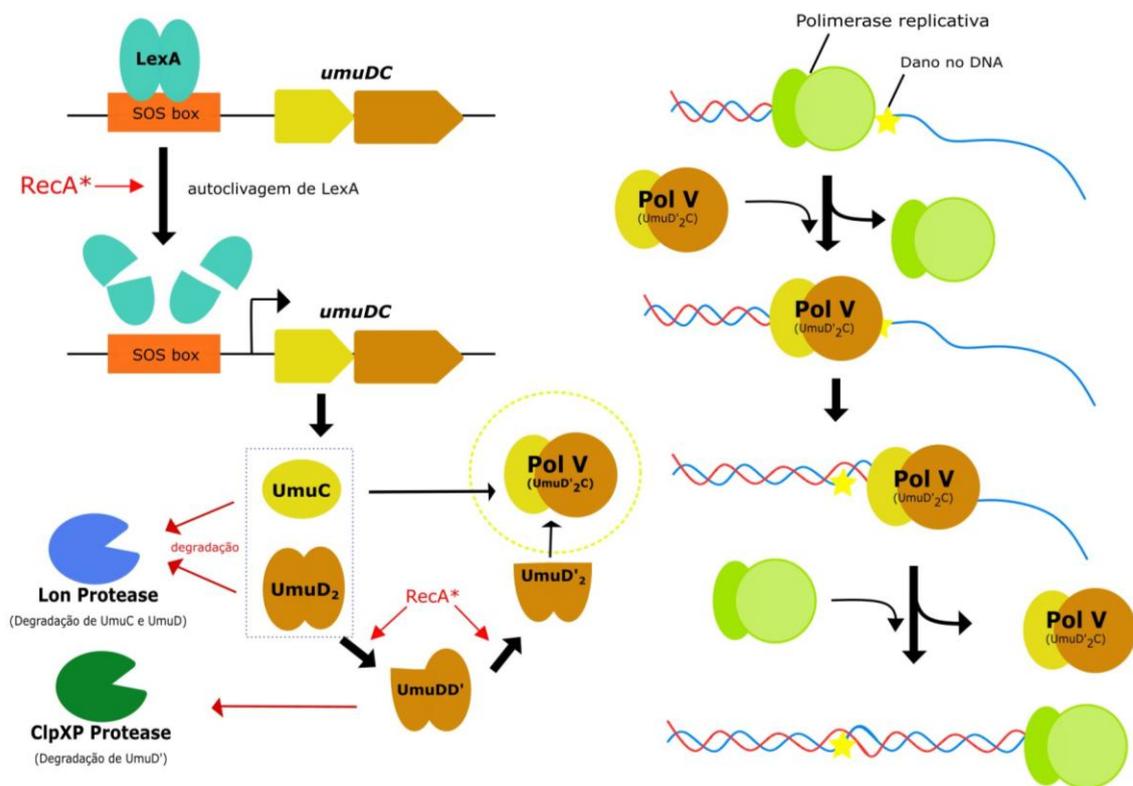


Figura 5 – Resposta SOS, regulação da expressão de Pol V e a síntese translesão. Os genes que codificam a Pol V estão sob repressão de LexA em condições normais, com a indução da resposta SOS, o RecA* induz a autoclivagem do repressor e permite a indução de polimerases translesão (*umuDC*, a Pol V em *E. coli*). O precursor UmuD₂ precisa sofrer autoclivagem das duas subunidades do homodímero (UmuD'₂) para que a polimerase seja ativa, em um processo também dependente de RecA*. Caso contrário, é levado para degradação pela Lon protease e ClpXP protease. A PolV ativa (UmuD'₂C) pode então substituir a polimerase replicativa bloqueada na forquilha de replicação pela presença de danos na fita molde para dar continuidade ao processo de replicação e, posteriormente ser substituída de volta pela polimerase replicativa.

A DNA Pol V é formada pelo dímero da subunidade UmuD e uma subunidade UmuC que formam o complexo UmuD₂C. A subunidade auxiliar UmuD precisa ser autoclivada para a forma UmuD' (clivagem de 24 aminoácidos do N-terminal), em um processo dependente de RecA*, o que caracteriza um papel regulatório dessa subunidade. Além disso, a Pol V é ativada pela transferência de um 3'-RecA-ATP do filamento RecA* para que o complexo seja ativo (UmuD'₂C-RecA-ATP) como uma polimerase (Pol V Mut). A expressão de *umuDC* nos níveis basais é essencialmente inexistente e a sua indução é altamente regulada nos diversos níveis de regulação (Figura 5). O promotor é fortemente reprimido pelo LexA, e o processamento pós-transcricional de indução da autoclivagem de UmuD pela RecA* é de baixa eficiência (menos eficiente que a indução da clivagem de LexA), podendo resultar em nenhuma ou somente uma das subunidades do homodímero clivado (UmuD'D), formas que estão sujeitas à degradação pelas proteases (Lon e ClpXP proteases). Consequentemente, a síntese translesão depende de uma resposta SOS consistente que fornece RecA* em quantidade e tempo suficiente para indução da autoclivagem do UmuD (GOODMAN et al., 2016; JIANG et al., 2009; MAOR-SHOSHANI et al., 2000).

1.3.2 Síntese translesão (TLS) e Mutagênese em *Proteus mirabilis*

A taxa de mutação pode ser elevada de forma transiente quando a resposta SOS é ativada nas diversas espécies bacterianas, porém essa capacidade mutagênica não está presente em todas as espécies, como é o caso de *P. mirabilis* que curiosamente somente possui os homólogos de *umuDC*, chamados *rumAB*, quando carrega consigo o elemento genético da família SXT/R391, como foi observado no genoma de diversas linhagens como HI4320 (portadora do ICE*Pmi*USA1) e BB200 (não portadora), ou quando carrega um plasmídeo que codifica homólogos de Pol V (PEARSON et al., 2008; SULLIVAN et al., 2013). Portanto, as linhagens não portadoras do ICE são desprovidas de genes de polimerase translesão codificadas no cromossomo, que concorda com estudos antigos em que se mostra a ausência de mutagênese induzida por danos nessa espécie (SEDGWICK; HO; WOODGATE, 1991). Além disso, estudos mostraram que a polimerase codificada pelo operon *rumAB* promove maior frequência de mutagênese em comparação aos homólogos UmuDC e MucAB quando expressa em vetores plasmidiais em *E. coli* (MEAD et al., 2007).

1.4 Resposta SOS, Mutagênese e resistência a antimicrobianos

A mutagênese pode levar à resistência aos antibióticos por mecanismos como: alteração de alvo, ativação de bombas de efluxo, alteração na permeabilidade às drogas, e alteração na expressão de genes codificadores de enzimas, tudo isso por alterações no cromossomo (WOODFORD; ELLINGTON, 2007). Mutações são processos normais que ocorrem em taxas relativamente baixas, no entanto, a presença de isolados clínicos de diferentes espécies com fenótipo mutador têm chamado a atenção da comunidade científica nas últimas décadas (DENAMUR et al., 2002; DRAKE, 1991; LECLERC et al., 1996; OLIVER et al., 2000; WANG et al., 2013). Esse fenômeno decorre da presença de defeitos genéticos em mecanismos de reparo de DNA, como no sistema de reparo de bases mal emparelhadas (Mismatch repair, MMR) que se caracteriza por taxas de mutação constantemente elevadas, contribuindo para o surgimento de novas resistências e a disseminação delas (MILLER, 2005).

Como dito anteriormente, a resposta SOS é uma via que aumenta transientemente a taxa de mutagênese em bactérias, o que caracteriza uma importante via a ser explorada, uma vez que é ativada em diversas condições de estresse como durante um tratamento com antibióticos. Muitas vezes esses antimicrobianos são encontrados em concentrações subinibitórias seja pelo mal uso ou até mesmo em forma de resíduos no ambiente, o que contribui com a indução da resposta SOS e também para selecionar as linhagens mais resistentes já existentes no meio. Além disso, em um estudo recente foi mostrado o papel da indução da resposta SOS para o surgimento de resistência à antimicrobianos *in vivo* (CRANE; ALVARADO; SUTTON, 2021; GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007; KÜMMERER, 2003).

1.5 Dados Prévios e Justificativa

Nosso grupo de pesquisa avaliou a prevalência do ICE SXT/R391 em 76 isolados clínicos de *P. mirabilis* de hospitais brasileiros, dentre os quais constatou a presença de 5 linhagens portadoras do elemento: PmBR19, PmBR595, PmBR607, PmBR614 e PmBR618 (FONSECA, 2016; SATO et al., 2020). Estas linhagens e outras desprovidas de elementos SXT/R391 foram avaliadas quanto a capacidade mutagênica por indução com a luz UV

(Figura 6), e apenas nas linhagens PmBR19 e PmBR607 foi observado um perfil de mutagênese esperada pela presença de ICE (e dos genes *rumAB*), considerando o parâmetro de outras enterobactérias como *E. coli*, nas quais a atividade de TLS conferida pela polimerase UmuDC (Pol V) promove um aumento de dezenas a centenas de vezes na frequência de mutantes quando expostas à luz UV. As demais linhagens portadoras de ICEs SXT/R391 não apresentaram a indução da mutagênese esperada.

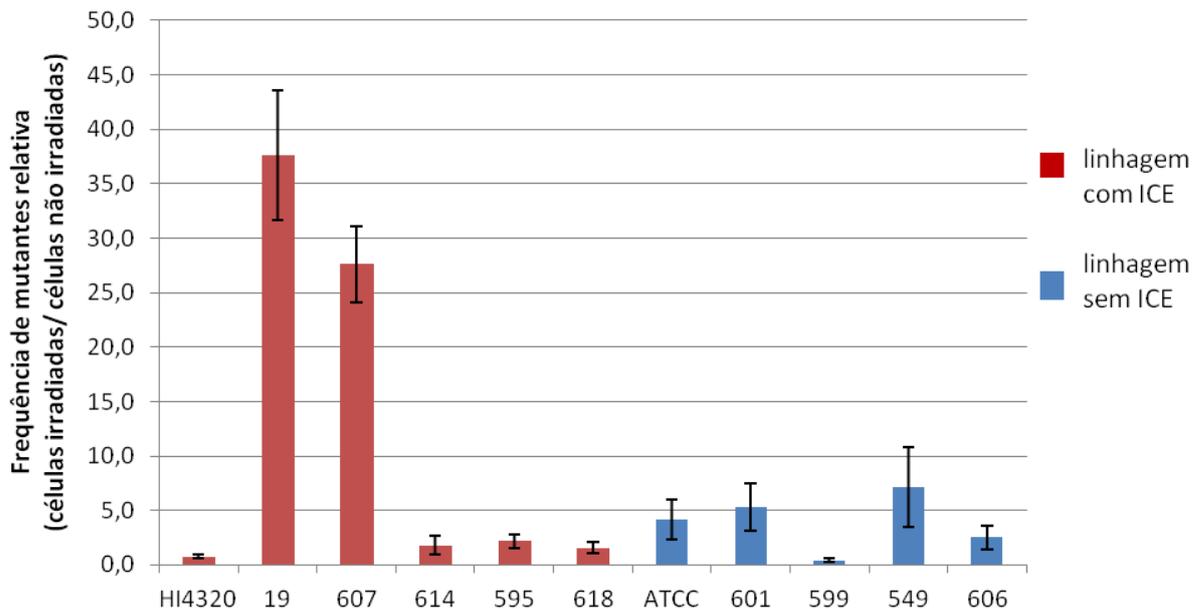


Figura 6 - Aumento relativo de frequência de mutação em diferentes isolados clínicos após irradiação com luz UV em comparação à frequência de mutação espontânea. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão.

A análise da expressão dos genes *rumAB* das linhagens portadoras do ICE SXT/R391 foi realizada a fim de investigar se o fenômeno observado na mutagênese induzida por UV estava associado ao nível de expressão dos genes *rumAB* (com uso do gene *recA* como controle da indução da resposta SOS). Como consta na Figura 7, foram observadas 3 situações distintas: a primeira, das linhagens PmBR19 e PmBR607, em que há indução de *rumAB* e que também há aumento de mutagênese induzida por luz UV; o segundo, das linhagens PmBR595 e PmBR618, em que há ausência de indução dos genes *rumAB*, e também há ausência do aumento da mutagênese; e por último, das linhagens HI4320 e PmBR614, que são os mais intrigantes, em que há indução dos genes *rumAB* (assim como nas

linhagens PmBR19 e PmBR607), porém não se observou aumento esperado na mutagênese, o que sugere a presença de fatores pós-transcricionais que influenciam a atividade da polimerase translesão. Além disso, podemos constatar que todas as linhagens são proficientes na ativação da resposta SOS, vide a indução da expressão do gene *recA*.

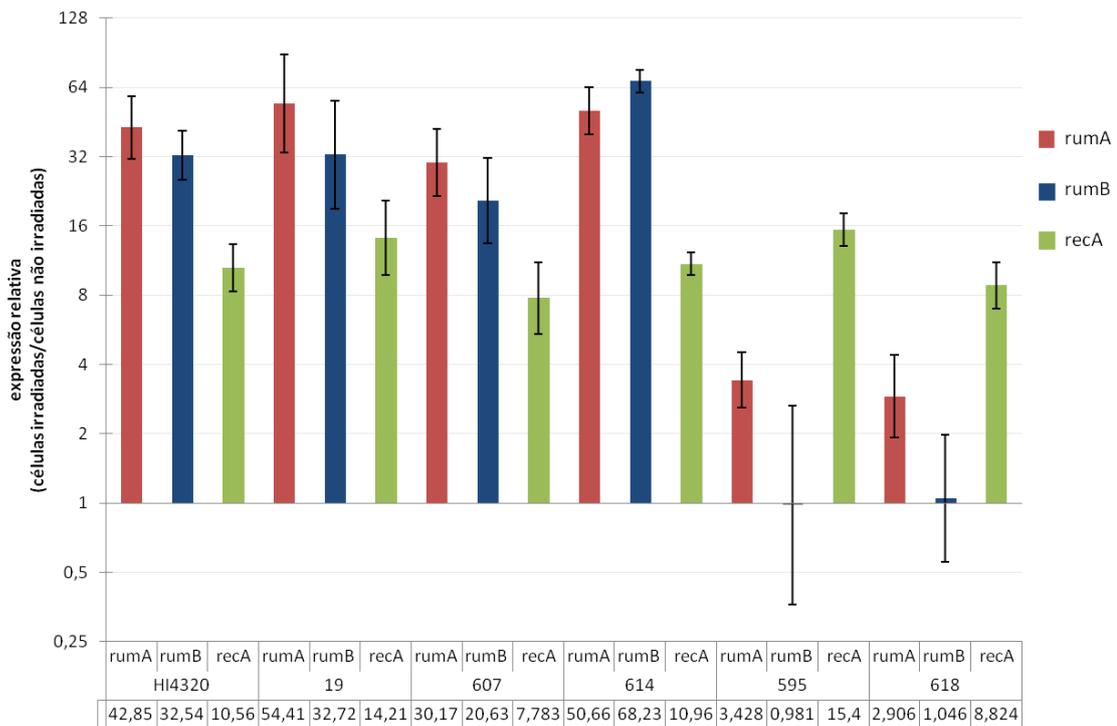


Figura 7 – Indução dos genes *rumAB* e *recA* após exposição à luz UV. Comparação dos níveis de expressão dos genes *rumAB* e *recA* (controle da indução da resposta SOS) de amostras irradiadas com 20 J/m² de UVC em comparação com amostras controle. Os números na parte inferior aos nomes das linhagens são os valores exatos do aumento relativo da expressão dos genes avaliados. Genes *dnaQ* e *rpoB* foram utilizados como controles endógenos. Média de duas réplicas biológicas analisadas em duplicata. As barras pretas representam o erro das amostras.

Estas linhagens tiveram o seu genoma sequenciado, e no presente trabalho realizamos a análise comparativa dos genomas. Na análise preliminar, constatamos que algumas linhagens desprovidas de mutagênese induzida por UV possuem alterações no gene *rumB* que afetam a funcionalidade da polimerase, justificando o fenótipo observado. Na linhagem PmBR595 foi constatada deleção do gene *rumB* e uma inserção de um outro gene na região. E na linhagem PmBR618 foi encontrado um *frameshift* no gene *rumB* causado pela deleção de um nucleotídeo, o que resulta em uma proteína truncada e possível desestabilização do mRNA, o que levaria à ausência de expressão deste gene na análise de RT-PCR realizada anteriormente. No entanto, a linhagem PmBR614 e a linhagem tipo HI4320, possuem o gene

rumAB intactos, porém não apresentam mutagênese induzida por luz UV, provavelmente essa observação se deve à presença de possíveis fatores pós-transcricionais que conferem a capacidade de síntese translesão à Pol V. De uma certa forma, podemos inferir que a integridade do gene *rumAB* tem influência na mutagênese induzida pela resposta SOS, hipótese abordada no presente projeto.

A frequente associação dessas polimerases com elementos genéticos como plasmídeos conjugativos, bacteriófagos e ICEs (PERMINA; MIRONOV; GELFAND, 2002) sugere um possível papel na manutenção e transferência desses elementos. Como o processo de transferência do ICE é induzido em uma situação em que há danos no DNA, é possível que estas polimerases tenham um papel importante para garantir que a conjugação ocorra, até mesmo no processo de reconstituição da dupla fita do ICE após o processo de transferência, uma vez que estas podem conter lesões que necessitem da atividade de TLS. Essa questão é ainda mais interessante se considerar o fato de linhagens de *P. mirabilis* não possuírem Pol V normalmente no seu genoma quando desprovida do ICE SXT/R391.

Constatamos também que o ICE da linhagem PmBR19 é muito similar ao ICE*PmiJpn1*, que foi descrito primeiramente no Japão e está presente em várias linhagens descritas em outros continentes, que carrega uma beta-lactamase CMY-2 em sua estrutura (ABERKANE et al., 2016; HARADA et al., 2010; LEI et al., 2016; MAC AOGÁIN; ROGERS; CROWLEY, 2016; MATA et al., 2011). Este ICE foi conjugado para uma *E. coli* em nosso laboratório para realização de estudos envolvendo a manipulação genética deste elemento genético no presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Análise da estrutura genômica dos ICEs da família SXT/R391 de isolados clínicos de *P. mirabilis*, e o estudo da relação dos genes *rumAB* com a resposta SOS, a mutagênese e a capacidade de conjugação deste elemento genético.

2.2 Objetivos específicos

- a) Obter as sequências dos ICEs SXT/R391 das linhagens portadoras, e realizar estudos de genômica comparativa;
- b) Confirmação da funcionalidade dos genes *rumAB* na mutagênese induzida por danos no DNA;
- c) Avaliar o papel dos genes *rumAB* na conjugação dos ICEs;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas utilizadas e condições de crescimento

Os isolados clínicos de *Proteus mirabilis* utilizados neste trabalho e nas análises prévias estão listados na Tabela 2. Estas linhagens foram obtidas de hospitais e laboratórios de análises clínicas de São Paulo (SP) e Maringá (PR) de diversas fontes de isolamento, como urina, sangue, escarra, sonda traqueal, entre outras (Número SisGen A9D703D).

Tabela 2 – Linhagens de *P. mirabilis* utilizadas no presente estudo.

| Linhagem | Amostra de origem | Local de origem | Presença de ICE SXT/R391 |
|-----------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| HI4320 | Urina | EUA – (Pearson et al., 2008) | ICEPmiUSA1 |
| ATCC 25933 | Vagina | EUA – ATCC® | não |
| PmBR19 | Urina | Maringá (PR) | ICEPmiJpn1 |
| PmBR28 | Aspirado traqueal | Maringá (PR) | não |
| PmBR51 | Urina | Maringá (PR) | não |
| PmBR549 | Urina | São Paulo (SP) | não |
| PmBR574 | Sangue | H.U. (USP) | não |
| PmBR595 | Urina | CEAC-SUL (SP) | ICEPmiBra595 |
| PmBR599 | Escarra | CEAC-SUL (SP) | não |
| PmBR601 | Sonda traqueal | CEAC-SUL (SP) | não |
| PmBR606 | Sangue | CEAC-SUL (SP) | não |
| PmBR607 | Urina | CEAC-SUL (SP) | ICEPmiBra607 |
| PmBR614 | Urina | São Paulo (SP) | ICEPmiBra614 |
| PmBR618 | Urina | São Paulo (SP) | ICEPmiBra618 |
| PmBR622 | Sangue | São Paulo (SP) | não |

Além dos isolados clínicos, contamos também com duas linhagens-tipo como referência para os experimentos realizados: a linhagem ATCC 25933 e a linhagem HI4320. A

ATCC 25933 foi isolada de amostras vaginais e é desprovida de um ICE da família SXT/R391. A linhagem HI4320 foi originada de amostras de infecção urinária (Michigan, Estados Unidos) e possui o genoma sequenciado, sendo portadora do ICE*PmiUSA1* (PEARSON et al., 2008).

Na Tabela 3 estão listadas as linhagens de *E.coli* utilizadas e/ou construídas neste trabalho para os ensaios de conjugação, deleção dos genes *rumAB*, e experimentos com clonagens dos genes *rumAB* em vetor de expressão.

Tabela 3 – Linhagens de *E. coli* utilizadas no estudo.

| Linhagem | Genótipo |
|----------|--|
| MG1655 | Selvagem |
| RSG875 | MG1655 Rif ^R |
| RSG878 | MG1655 Rif ^R ICE <i>PmiJpn1</i> (Amp ^R) |
| RSG879 | MG1655 Rif ^R ICE <i>PmiJpn1</i> (Amp ^R) pKOBEG (Cm ^R) |
| RSG880 | MG1655 Rif ^R ICE <i>PmiJpn1</i> $\Delta rumAB$ (Amp ^R ; Kan ^R) |
| AB1157 | Selvagem |
| AB1157 | $\Delta(umuDC)595::cat$ (Cm ^R) |

As linhagens bacterianas neste estudo foram cultivadas à 37°C sob agitação em meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L) e, quando necessário, suplementados com antibióticos ou com ureia à 3%, este último no caso de *P. mirabilis* para inibição da motilidade do tipo swarming.

No caso da linhagem portando o plasmídeo pKOBEG (Cm^R) (CHAVEROCHE; GHIGO; D'ENFERT, 2000; WEI et al., 2017), utilizado para ensaio de deleção dos genes *rumAB*, o crescimento foi feito à 30°C pela característica termosensível do plasmídeo e o meio de cultura foi suplementado com cloranfenicol (34 µg/mL) para manutenção do plasmídeo.

3.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das linhagens portadoras do ICE

O perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados clínicos portadores de um ICE SXT/R391 foi determinado pelo método de disco-difusão em ágar Müller-Hinton, seguindo as normas determinadas pelo CLSI (CLSI, 2016), com a cepa *E. coli* ATCC 25922 utilizada como controle. Os antimicrobianos testados foram: amoxicilina-clavulanato (AMC) 20 µg/10 µg; ampicilina (AMP) 10 µg; cefalotina (CFL) 30 µg; ciprofloxacina (CIP) 5 µg; cefepime (CPM) 30 µg; ceftriaxona (CRO) 30 µg; cefotaxima (CXT) 30 µg; gentamicina (GEN) 10 µg; levofloxacina (LVX) 5 µg; ácido nalidixico (NAL) 30 µg; norfloxacina (NOR) 10 µg; sulfametoxazol/trimetoprim (SUT) 1,25 µg/23,75 µg; tobramicina (TOB) 10 µg.

3.3 Sequenciamento do genoma

3.3.1 Extração e preparação dos DNAs genômicos

Os DNAs genômicos das linhagens portadoras do ICE SXT/R391 foram extraídos com o kit de extração (Wizard Genomic DNA Kit, Promega) de acordo com o protocolo indicado com a eluição feita em 10mM Tris-HCL (pH 8,5). As amostras foram diluídas igualmente para a concentração de 20 ng/µL para enviar ao sequenciamento.

3.3.2 Sequenciamento dos genomas de *P. mirabilis* portadores do ICE

Os genomas das linhagens portadoras do ICE foram sequenciados na plataforma Illumina HiSeq com protocolo de sequenciamento de ambas as extremidades (*paired-end*), pela empresa *MicrobesNG* (Inglaterra). Foram obtidos *reads* de 250 pb e cobertura variando entre 78 e 200 vezes.

A montagem dos genomas foi melhorada em colaboração com o Prof. Dr. Nilton Lincopan (Instituto de Ciências Biomédicas - USP), para possibilitar melhores análises, para a linhagem PmBR607 foi realizado um sequenciamento adicional no *ONT-MinION*. Para essa

finalidade o DNA da linhagem PmBR607 foi extraído com o kit de extração (Purelink genomic DNA mini kit, Invitrogen) e a biblioteca foi preparada com o Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004), seguido do sequenciamento com o FLO-MIN106D flowcell. Os dados obtidos foram filtrados utilizando o software Guppy (versão 2.1.3) e foi realizada uma montagem híbrida com os dados do Hiseq e do Nanopore utilizando o Unicycler (WICK et al., 2017) para obter a sequência completa do seu genoma e, conseqüentemente, do ICE carregado por esta cepa.

No caso da cepa PmBR19, foi realizado um sequenciamento Sanger pelo Serviço de sequenciamento de DNA (ssDNA) (Central Analítica – Instituto de Química, USP) para fechar o *gap* entre dois *contigs* que contêm a sequência do ICE similar ao ICEPmiJpn1 (Figura 8).

Os iniciadores utilizados para o fechamento do *gap* foram obtidos baseados na sequência do ICEPmiJpn1 do banco de dados (KY437729; KT894734) e estão listados na Tabela 4. O fragmento foi amplificado por PCR com os iniciadores Tn10F e Tn10R, e após corrigir em gel de agarose 0,8%, foram purificados com o kit de extração (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel). Em seguida, as amostras foram quantificadas no Nanodrop e as amostras para sequenciamento foram preparadas utilizando o BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) com todos os iniciadores listados na Tabela 4, de acordo com o protocolo indicado. Foi realizada uma montagem *de novo* com SPAdes v.3.11 (BANKEVICH et al., 2012) incluindo a sequência consenso gerada com Sanger para assim obter a sequência completa do ICE da linhagem PmBR19 (Figura 8).

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para fechamento do *gap* do ICEPmiJpn1 (PmBR19).

| Iniciador | Sequência (5'-3') |
|-----------|-----------------------------|
| Tn10F | TTCGTTGCTTGTGAGGTGAG |
| Tn10R | AAACAACGGCTGGAATGTGC |
| Tn10.1 | GCCACGAGTAAGTCTTCCCT |
| Tn10.2 | GTCAGCCTCTTATAGCCTAAAGT |
| Tn10.3 | GCCACGCATTACTIONTACTTGACTGT |

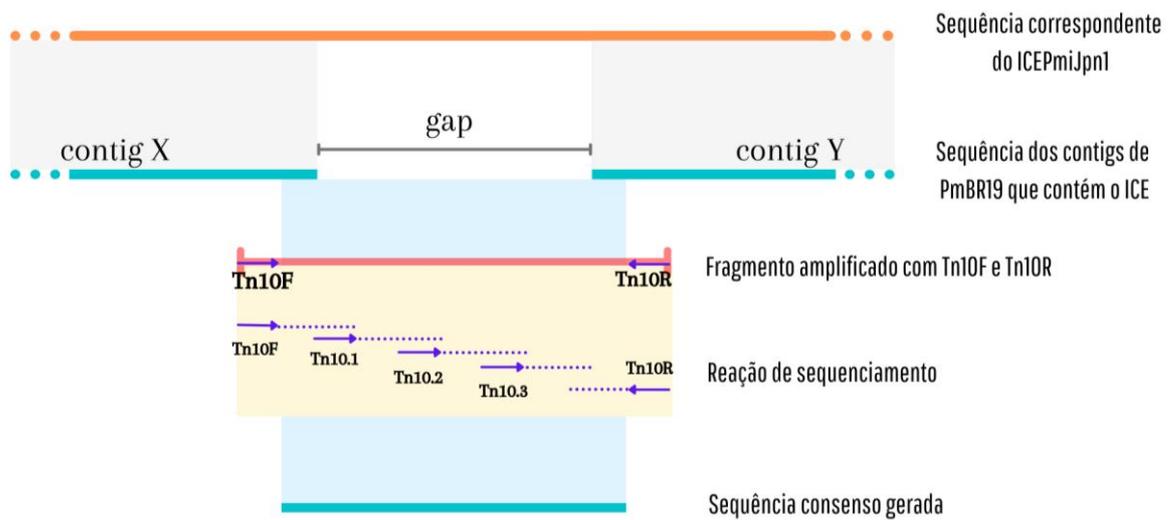


Figura 8 – Esquema do sequenciamento de Sanger feita para fechamento do *gap* entre os *contigs* que contém a sequência do ICEPmiJpn1 (PmBR19). Dois contigs (X e Y) continham a sequência do ICEPmiJpn1 da linhagem PmBR19, e a sequência correspondente do ICEPmiJpn1 está mostrado logo acima, o qual foi utilizado como base para os iniciadores indicados pelas setas roxas (Tn10F, Tn10R, Tn10.1, Tn10.2 e Tn10.3). O fragmento amplificado com iniciadores Tn10F e Tn10R foi purificado e utilizado de molde para a reação de sequenciamento, e a sequência consenso gerada foi utilizada na montagem *de novo* para obter a sequência completa do ICEPmiJpn1 da PmBR19.

Os genomas obtidos foram depositados no banco de dados (NCBI) sob o código de acesso (BioProject) PRJNA576511, e a anotação foi obtida pelo *pipeline* de anotação de genoma de procariotos do NCBI (PGAP) (TATUSOVA et al., 2016).

3.4 Genômica comparativa dos ICEs

Os genes de resistência foram identificados pela análise dos genomas na plataforma CARD e ARBD. Em seguida, realizamos análises de genômica comparativa de todos os elementos sequenciados a fim de caracterizar quanto aos genes presentes, as diferenças e as semelhanças, inclusive comparando aos ICEs já descritos na literatura, como na análise filogenética detalhada no **tópico 3.4.3**.

Construímos uma figura para representação da estrutura dos ICEs identificados em comparação ao ICEPmiUSA1 (da linhagem HI4320). Além disso, comparamos todos os ICEs sequenciados entre eles por meio do alinhamento *Mauve* (DARLING et al., 2004), para obter a porcentagem de similaridade entre os ICEs.

3.4.1 Grupos de exclusão dos ICEs sequenciados

A identificação do grupo de exclusão dos ICEs foi realizada baseada na comparação das sequências de aminoácidos da região específica das proteínas TraG e Eex realizando um alinhamento com ClustalW com as sequências das proteínas representantes de cada grupo: os ICEs R391 (grupoR) e SXT (grupoS) (MARRERO; WALDOR, 2007).

3.4.2 BLASTn dos ICEs e das regiões variáveis dos ICEs

Sequências completas de todos os ICEs SXT/R391 dos genomas sequenciados foram submetidos à análise no BLASTn a fim de identificar se existem ICEs similares no banco de dados ou se são sequências completamente novas. Além disso, realizamos análises de cada uma das regiões variáveis dos ICEs separadamente do restante da estrutura do ICE para realizar uma comparação entre essas.

3.4.3 Filogenia dos ICEs e dos genomas de *Proteus sp.*

Realizamos a análise de filogenia dos ICEs no CSI Phylogeny 1.4 (*Call SNPs & Infer Phylogeny*) (KAAS et al., 2014), que consiste em uma plataforma que compara as sequências e infere a filogenia baseada nos SNPs das regiões conservadas. A seleção de outros ICEs no banco de dados para a comparação foi feita baseada nos resultados de análises de BLASTn dos ICEs dos genomas sequenciados, e também consultamos os ICEs representativos de diversas espécies em artigos que realizaram análises de filogenia, incluindo principalmente todos os ICEs já descritos de *Proteus sp.*, que resultou em um total de 75 ICEs, incluindo os 5 ICEs sequenciados nesse estudo (BIE et al., 2017; BIOTEAU; DURAND; BURRUS, 2018; HARADA et al., 2010; HE et al., 2020; KONG et al., 2020; LEI et al., 2016, 2018; LI et al., 2016; MAC AOGÁIN; ROGERS; CROWLEY, 2016; RYAN; SLATTERY; PEMBROKE, 2019; SIEBOR; DE CURRAIZE; NEUWIRTH, 2018).

As sequências dos ICEs foram obtidas manualmente pela análise dos genomas no *software* Geneious (R11.1.5) (KEARSE et al., 2012). Ao submeter as sequências completas dos ICEs selecionados, a árvore é gerada automaticamente pela plataforma com o FastTree (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010).

A filogenia das linhagens de *Proteus sp.* foi realizada utilizando vários genomas sequenciados disponíveis no banco de dados, incluindo principalmente os portadores do ICE que possui também o genoma completo, e também incluímos alguns genomas de linhagens desprovidas de um ICE SXT/R391 escolhidos aleatoriamente. No total foram 32 linhagens selecionadas, que resulta no total de 37 genomas com os 5 genomas sequenciados neste trabalho, e utilizamos o mesmo *pipeline* da plataforma do CSI Phylogeny 1.4 para gerar a árvore filogenética das linhagens.

3.5 Deleção dos genes *rumAB* e Construção de linhagens isogênicas de *P. mirabilis* com ICE parental ou ICE Δ *rumAB*

Para avaliar o papel dos genes *rumAB* na mutagênese e na conjugação em diversas linhagens isogênicas, deletamos estes genes no ICE*PmiJpn1* previamente conjugado para uma *E. coli* MG1655, utilizando o sistema λ Red do plasmídeo pKOBEG (Cm^R) (CHAVEROCHE; GHIGO; D'ENFERT, 2000; DATSENKO; WANNER, 2000) que está sob controle de um promotor induzido por arabinose.

3.5.1 Preparo do fragmento para eletroporação

O fragmento com a marca de resistência que foi recombinada com o *rumAB* foi amplificado com os iniciadores mostrados na Tabela 5. Os iniciadores possuem na porção 5' uma sequência de homologia com as regiões que flanqueiam o gene *rumAB* e na sua porção 3' possuem sequências para amplificação do cassete de resistência.

O fragmento foi amplificado por PCR utilizando o plasmídeo pKD4 (DATSENKO; WANNER, 2000) como molde, que possui a marca de resistência à canamicina (Kan^R). O produto de PCR foi submetido à corrida em gel de agarose ultrapura 0,8% (Thermo) para a extração da banda de interesse com kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel) e quantificado em Nanodrop para utilizar na eletroporação.

Tabela 5 - Sequência de iniciadores utilizados para deleção dos genes *rumAB*.

| Iniciador | Sequência (5'-3')* |
|-----------|--------------------|
|-----------|--------------------|

| | |
|-------------|---|
| rumAB_H1_P1 | TAGATACTGTATAAAACAAACAGTATTAATTCTATTTTTTCGAGGT TCGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC |
| rumAB_H2_P2 | TAAGCTCAACATGCTGCGTCGCAGAGTGAATGCCTACTGAGTTAA CTGCGCATATGAATATCCTCCTTAG |

*A sequência de homologia com a região flanquadora do gene *rumAB* no ICE está em cor preta e a região de amplificação do cassete de resistência (Kan^R) do pKD4 está em vermelho

3.5.2 Construção da linhagem com Sistema lambda-Red

O plasmídeo pKOBEG (Cm^R) foi extraído com o Kit de extração (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen) e foi transformado na linhagem de *E. coli* MG1655 possuindo ICE*PmiJpn1* da linhagem PmBR19 para a deleção dos genes *rumAB*. O plasmídeo pKOBEG possui o sistema λRed, na qual a deleção de genes pode ser feita pela sua troca por cassetes de resistência, que são removíveis com a utilização de recombinases (CHAVEROCHE; GHIGO; D'ENFERT, 2000; DATSENKO; WANNER, 2000; DERBISE et al., 2003; HAMANN et al., 2005). Esta linhagem deve ser cultivada à 30°C com suplementação de cloranfenicol (34 µg/mL) no meio de cultura.

3.5.3 Indução de lambda-Red, preparo de célula competente e eletroporação

Um volume de 3 mL da cultura saturada da linhagem de *E. coli* MG1655 ICE*PmiJpn1* pKOBEG, foi submetido à centrifugação (12000 rpm, 3 min, T.A.) e ressuspensão em 1 mL de LB+L-ARA (arabinose) 0,2%, e foi incubado em agitação por 2 horas à 37°C. Em seguida, foi centrifugado (12000 rpm, 3 min, T.A.) e ressuspendido em 100 µL de glicerol 10% estéril gelado. Alíquota de 50 µL foi misturado com 1 µg do fragmento no gelo, e a mistura foi eletroporada com 1,8 kV (Electroporator 2510, Eppendorf) e imediatamente ressuspendida em 1 mL de LB para recuperar por 2 horas à 30°C. A suspensão foi plaqueada em placa de LB + Kan (50 µg/mL) para seleção de recombinantes que trocaram o gene *rumAB* pelo cassete de resistência Kan^R. As colônias obtidas foram repassadas em placas de LB + Kan (50 µg/mL) para isolar e confirmar a deleção dos genes *rumAB* por PCR (*int+*; *rumAB-*) (FONSECA, 2016). Os recombinantes foram crescidos à 42°C para induzir a perda do plasmídeo

pKOBEG, que foi confirmado posteriormente ao repassar em placas que contém cloranfenicol (34 µg/mL).

3.5.4 Construção das linhagens isogênicas

Tanto o ICE*PmiJpn1* parental como o ICE*PmiJpn1* $\Delta rumAB$ foram transferidos por conjugação em filtro (**tópico 3.7**) para as linhagens não portadoras: ATCC 25933, PmBR574, PmBR622, PmBR28 e PmBR51 (Tabela 6). A seleção de transconjugantes foi feita com ampicilina (100 µg/mL) (ICE*PmiJpn1*) e tetraciclina (12,5 µg/mL), este último ao qual *P. mirabilis* naturalmente possui resistência, e foi realizado confirmação por PCR (*int+*) (FONSECA, 2016). Assim, a mesma linhagem com diferentes ICEs puderam ser analisadas quanto à indução da mutagênese por luz UV e a frequência de conjugação para avaliar o papel dos genes *rumAB* em tais processos.

Tabela 6 – Pares de linhagens isogênicas de *P. mirabilis* construídas no presente estudo.

| Linhagem | ICE |
|------------|-----------------------------------|
| ATCC 25933 | ICE <i>PmiJpn1</i> parental |
| ATCC 25933 | ICE <i>PmiJpn1</i> $\Delta rumAB$ |
| PmBR28 | ICE <i>PmiJpn1</i> parental |
| PmBR28 | ICE <i>PmiJpn1</i> $\Delta rumAB$ |
| PmBR51 | ICE <i>PmiJpn1</i> parental |
| PmBR51 | ICE <i>PmiJpn1</i> $\Delta rumAB$ |
| PmBR574 | ICE <i>PmiJpn1</i> parental |
| PmBR574 | ICE <i>PmiJpn1</i> $\Delta rumAB$ |
| PmBR622 | ICE <i>PmiJpn1</i> parental |
| PmBR622 | ICE <i>PmiJpn1</i> $\Delta rumAB$ |

3.5.5 Ensaios de mutagênese em linhagens isogênicas

Os testes de mutagênese induzida por luz UV foram realizados de acordo com a metodologia previamente estabelecida pelo nosso grupo em estudos com *Caulobacter crescentus* e já utilizada em etapa anterior deste trabalho. As células em fase exponencial de crescimento (DO_{600} 0,5) foram expostas a doses de UV que deixam, em média, 10% de sobreviventes (para *P. mirabilis*, 20 J/m^2), e uma alíquota de 200 μL antes e depois da irradiação com luz UV é inoculada em 1mL de LB em duplicata para recuperar até a saturação. Também é feito uma diluição seriada de uma alíquota de 10 μL de antes e depois da irradiação para a contagem da sobrevivência. O inóculo saturado é semeado em ágar com antibiótico em duplicata para contagem de mutantes, seguida de diluição seriada para semear em meio sem antibiótico para contagem das células viáveis (ALVES et al., 2017).

O antibiótico utilizado para contagem dos mutantes foi a rifampicina, para o qual a resistência é conferida por mutações cromossômicas (no gene *rpoB*). Para selecionar mutantes Rif^R, 200 μL da cultura não diluída foram semeados em placas de MacConkey com rifampicina (100 $\mu\text{g/mL}$). As diluições para a contagem das células viáveis foram semeadas em meio LB suplementado com Ureia (que inibe o swarming de *P. mirabilis*). Após a incubação por 16 horas, foram feitas as contagens das células viáveis e dos números de mutantes Rif^R, e calculamos o aumento da frequência de mutação comparando a amostra tratada com o agente genotóxico (mutações induzidas) e a amostra controle (mutações espontâneas). Realizamos cada experimento com pelo menos quatro réplicas biológicas para a análise dos dados, e utilizamos o teste estatístico de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum) que é um teste baseado na mediana, caracterizando um teste robusto para presença de *outliers* no conjunto da dados, além de ser mais adequado para conjunto pequeno de dados.

Realizamos os ensaios de mutagênese fazendo as seguintes comparações:

- a) Pares de linhagens isogênicas, contendo ou não o ICEPmiJpn1 proveniente de PmBr19;
- b) Pares de linhagens isogênicas contendo o ICEPmiJpn1 ou ICEPmiJpn1 $\Delta rumAB$.

3.6 Complementação heteróloga de *rumAB* em *E. coli*

O gene *rumAB* das linhagens PmBr19, PmBR607 (com mutagênese por UV), PmBR614 e da linhagem tipo HI4320 (sem mutagênese por UV) foram clonados em um vetor de baixo número de cópias de *E. coli* pWSK129 (Kan^R) para transformar na linhagem de *E. coli* AB1157 Δ *umuDC* para avaliar a mutagênese induzida por luz UV.

3.6.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e purificação dos insertos

O gene *rumAB* e a região à montante com o promotor de cada linhagem foram amplificados com polimerase de alta fidelidade (PhusionTM High-Fidelity, Thermo) utilizando o par de iniciadores listados na Tabela 7, que foram desenhados com os sítios de restrição XbaI e BamHI (Thermo). O Produto de PCR foi submetido à corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% ultrapura (Thermo), e a banda de interesse foi cortado do gel para ser purificado com o kit de purificação (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel), e os produtos foram quantificadas no Nanodrop.

Tabela 7 - Sequência de iniciadores utilizados para clonagem do *rumAB* no vetor pWSK129.

| Iniciador | Sequência (5'-3') * |
|-----------------|--------------------------------|
| Forward (BamHI) | CTAGGATCCTGACTTCGCTTTAAGCCAGT |
| Reverse (XbaI) | ATCTCTAGATGATAAGCTCAACATGCTGCG |

* As regiões vermelhas representam os sítios de restrição.

3.6.2 Digestão e ligação dos insertos no plasmídeo pWSK129

Foi realizada uma reação de dupla digestão do vetor (pWSK129) e dos insertos com *rumAB* utilizando as enzimas de restrição XbaI e BamHI, com o buffer 1X Tango (Thermo) à 37°C por 1 hora, seguido de inativação da reação à 80°C por 20 minutos. Em seguida foi realizada uma reação de ligação para cada inserto com T4 DNA ligase (Thermo) de acordo com o protocolo indicado.

3.6.3 Transformação por choque térmico

a) Preparação de células quimiocompetentes

As células competentes foram preparadas com a linhagem *E. coli* Stellar. Uma colônia isolada foi repicada em 3 mL do meio LB, foi incubado sob agitação por 2 horas à 37°C. Em seguida foi adicionado 25 mL do meio LB (pré-aquecido à 37°C) e agitado por mais 2 a 3 horas (até atingir DO₅₅₀ 0,5-0,6). Após a incubação, foi adicionado 250 µL de MgCl₂ a 1M e a cultura foi transferido para um Falcon colocado em gelo. Após um repouso de 15 minutos no gelo, a cultura foi centrifugada (3000 rpm, 12 min, 4°C) e o *pellet* foi ressuspendido em 5 mL da solução RFI (Acetato de potássio 30 mM pH 6.9, MnCl₂ 50 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10mM e glicerol 15%). As células ficaram de repouso por mais 15 minutos no gelo, foram centrifugadas (3000 rpm, 12 min, 4°C) e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL da solução RF II (MOPS 10 mM pH 7.0, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM e glicerol 15%). As células competentes foram distribuídas em volumes de aproximadamente 400 µL nos tubos para estocar à -80°C até o momento de uso.

b) Transformação

As alíquotas da ligação foram transformadas por choque térmico na linhagem de *E. coli* Stellar previamente competentes. As bactérias competentes foram descongeladas no gelo por cerca de 15 minutos e foram distribuídas em um volume de 50 µL em cada tubo. As bactérias foram misturadas com uma alíquota do plasmídeo (1-5 µg), e após repouso de 30 min no gelo, foram submetidos à choque térmico à 42°C por 2 minutos, seguido de gelo por 2 a 5 min, para em seguida adicionar 500 µL de LB e recuperar por 1 hora à 37°C em agitação por 60 a 90 minutos. Foram semeados em placas de LB X-gal (50 µg/mL) + IPTG (1mM) + Kan (50 µg/mL), e as colônias brancas obtidas foram testadas por PCR para a presença dos genes *rumAB* e foram estocadas para posterior confirmação por sequenciamento para garantir ausência de mutações.

3.6.4 Confirmação por sequenciamento dos insertos

As construções obtidas foram analisadas por sequenciamento de Sanger num processo similar para o fechamento do gap do ICEPmiJpn1 (Figura 8, **tópico 3.3.2**), para confirmar que

continham com a sequência de *rumAB* correta e sem mutações. Para isso, os insertos foram amplificados com o mesmo iniciador utilizado anteriormente listado na Tabela 7, foram purificados a partir da corrida em gel de agarose 0,8% com kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel). Utilizamos os iniciadores já utilizados em etapas anteriores a este trabalho listados na Tabela 8 e o iniciador reverse (XbaI) para as reações de sequenciamento com o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Tabela 8 - Sequência de iniciadores utilizados para sequenciamento de *rumAB* (Sanger).

| Iniciador | Sequência (5'-3') |
|-----------|--------------------------|
| rumAB_Fw1 | AGCGATCCCCCACATCTAGT |
| rumAB_Fw2 | CGCCTTCGTATTCCATTGTT |
| rumAB_Fw3 | ACTGCAACAAC TTTTACGCTAGT |
| rumAB_Fw4 | CGCATTAGTCCCGGTTGATG |

3.6.5 Sobrevivência da linhagem *E. coli* AB1157 à luz UV

Foram realizados ensaios de sobrevivência das linhagens AB1157 selvagem e $\Delta umuDC$ para determinar a dose de UV e determinamos a dose de 60 J/m² que deixa, em média, 80% e 10% de sobreviventes, respectivamente na ausência do plasmídeo.

3.6.6 Construção das linhagens e ensaio de complementação heteróloga

As linhagens construídas estão listadas na Tabela 9. Os plasmídeos construídos foram extraídos com o kit de extração (Thermo) e foram transformados por choque térmico (**tópico 3.6.3**) na linhagem de *E. coli* AB1157 $\Delta umuDC$, com a seleção de transformantes feita em LB + Kan (50 µg/mL).

O plasmídeo pWSK129 vazio foi transformado na linhagem selvagem (AB1157) e também na linhagem $\Delta umuDC$ como controle dos experimentos. Os ensaios de mutagênese

foram realizados como descrito no **tópico 3.5.5** com pelo menos 4 réplicas no total. Utilizamos teste estatístico de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum) para comparar as frequências de mutantes.

Tabela 9 – Linhagens de *E. coli* e vetores clonados utilizados para a complementação heteróloga de *rumAB*.

| Linhagem | plasmídeo |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| <i>E. coli</i> AB1157 selvagem | pWSK129 vazio |
| <i>E. coli</i> AB1157 $\Delta umuDC$ | pWSK129 vazio |
| | pWSK129 <i>rumAB</i> (HI4320) |
| | pWSK129 <i>rumAB</i> (PmBR19) |
| | pWSK129 <i>rumAB</i> (PmBR607) |
| | pWSK129 <i>rumAB</i> (PmBR614) |

3.7 Ensaio de conjugação

3.7.1 Frequência de conjugação de ICE*PmiJpn1* da linhagem PmBR19 para a linhagem de *E. coli* MG1655

Realizamos ensaios de conjugação quantitativa do ICE da linhagem PmBR19, que é a única da nossa coleção que carrega um elemento SXT/R391 com gene de resistência selecionável (*bla_{CMY-2}*), utilizando como receptora a linhagem de *E. coli* MG1655 Rif^R. Utilizamos o método de conjugação em filtro, já bem-sucedido anteriormente no laboratório.

Um volume de 10 mL de cultura em fase estacionária de cada linhagem (doadora e receptora) foi centrifugado e ressuspendido em 500 μ L de LB. A seguir, 250 μ L de cada linhagem foram misturados e estas foram colocados sobre um filtro de 0,22 μ M (Millipore) disposto sobre uma placa de MacConkey (MC), com posterior incubação a 37°C por 24 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com 5 mL de meio LB para ressuspensão das células. Uma alíquota (200 μ L) sem diluição foi semeada em placas com com rifampicina (100 μ g/mL) e ampicilina (100 μ g/mL) para selecionar os transconjugantes (Rif^R Amp^R Lac+) e uma diluição seriada foi realizada para serem semeadas no meio seletivo (rifampicina 100

$\mu\text{g/mL}$) para contagem do número de células receptoras (Rif^{R}). Após incubação por 24h a 37°C foi realizada a contagem para determinar a frequência de conjugação definida pelo número de células transconjugantes por células receptoras. Foram realizados 4 experimentos independentes para o cálculo da média.

3.7.2 Papel dos genes *rumAB* na conjugação do ICE*PmiJpn1* para a linhagem de *E. coli* desprovida dos genes *umuDC*

Selecionamos linhagens isogênicas de *P. mirabilis* (PmBR574 e ATCC 25933) com as versões dos ICEs com e sem os genes *rumAB* para avaliar o efeito destes genes na conjugação do ICE para a linhagem de *E. coli* desprovida dos homólogos *umuDC* no cromossomo (*E. coli* AB1157 ΔumuDC). Testamos a conjugação em culturas de *P. mirabilis* (doadores) irradiadas com luz UVC, bem como em controles não irradiados.

Os inóculos de linhagens de *P. mirabilis* (com ICE wt ou ICE ΔrumAB) e *E. coli* ΔumuDC foram diluídos e crescidos até a fase exponencial de crescimento, em seguida, 10 mL das culturas de *P. mirabilis* foram expostas à luz UV (20 J/m^2) e depois recuperados em LB líquido por 30 minutos. Tanto a amostra não irradiada como a amostra irradiada foram misturadas separadamente com a cultura de *E. coli*, e foram incubadas em filtro com o mesmo método descrito no **tópico 3.7**. Após 24 horas de incubação, os filtros foram lavados com LB para ressuspensão das células e alíquotas sem diluição, e diluições de 10^{-1} , e 10^{-2} foram semeadas em placas de LB contendo cloranfenicol ($34 \mu\text{g/mL}$) e ampicilina ($100 \mu\text{g/mL}$) para seleção de transconjugantes. Diluições seriadas foram realizadas para semear em placas de LB contendo cloranfenicol ($34 \mu\text{g/mL}$) para contagem das células receptoras. As placas foram incubadas por 24h a 37°C e foi realizada a contagem para determinar a frequência de conjugação definida pelo número de transconjugantes por células receptoras para comparar o aumento da frequência de conjugação induzido por luz UV na presença ou ausência dos genes *rumAB*.

Foram realizados, no mínimo, 4 experimentos independentes para o cálculo da média e a estatística foi realizada com o teste estatístico de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum).

4 RESULTADOS

4.1 Genômica Comparativa dos ICEs

A análise genômica dos ICEs identificados nos genomas sequenciados dos isolados de *P. mirabilis* foi publicada (SATO et al., 2020). Resumiremos a seguir os dados mais relevantes desta parte do trabalho.

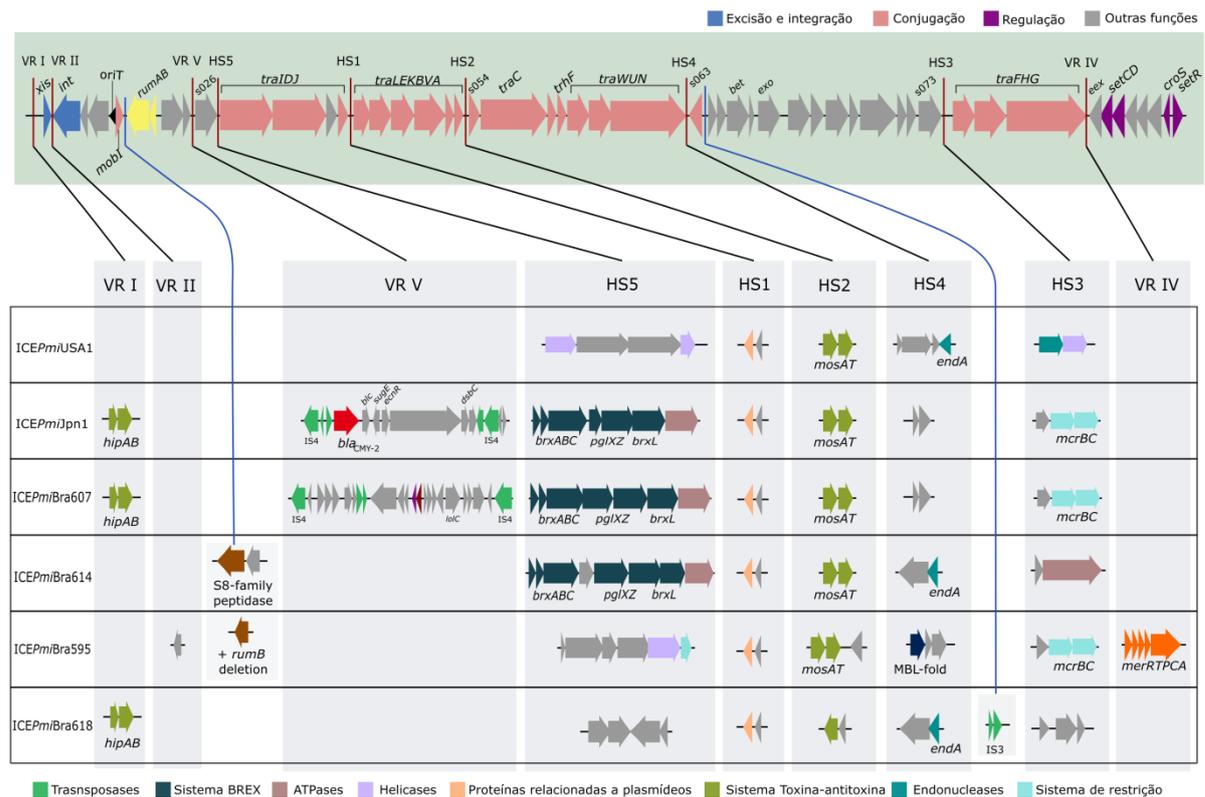


Figura 9 - ICEs SXT/R391 dos isolados brasileiros em comparação com o ICEPmiUSA1 (da linhagem HI4320). Na caixa sombreada superior estão representados os genes conservados nos ICEs do tipo 1 desta família. Os genes representados em azul estão associados à excisão e integração no genoma do hospedeiro, os em rosa estão os genes associados à maquinaria de conjugação, e em roxo os fatores associados à regulação da expressão dos genes. Os genes com a função desconhecida ou não associada ao processo de transferência estão representados em cinza, e o operon *rumAB* está assinalado na cor amarela. As linhas vermelhas representam os *hotspots* (HS) e as regiões variáveis (VR), e as estruturas associadas à essas regiões para cada ICE estão representados no quadro logo abaixo. As estruturas similares ou genes com funções similares foram coloridas nas mesmas cores para melhor visualização (SATO et al., 2020).

Com base na análise comparativa dos ICEs sequenciados, elaboramos o esquema representado na Figura 9 que mostra a estrutura da região conservada e o que está inserido em cada região variável nos ICEs das respectivas linhagens, incluindo o ICE da linhagem HI4320

(ICE*PmiUSA1*). Observamos que somente o ICE da linhagem PmBR19 carrega na VR V um gene de resistência (*bla_{CMY-2}*) que codifica uma beta-lactamase, localizada dentro de um transposon composto, e como havíamos observado nas análises preliminares, a estrutura é idêntica (mais de 99% de identidade) ao ICE*PmiJpn1* (HARADA et al., 2010). Assim, no restante deste trabalho, o ICE da linhagem PmBR19 será referido com ICE*PmiJpn1*.

O ICE da linhagem PmBR607 (ICE*PmiBra607*) também é similar ao ICE*PmiJpn1*, porém difere justamente na região do gene de resistência (VR V), sendo que nesta região há um transposon composto diferente que codifica várias proteínas hipotéticas. Os outros genes de resistência identificados na análise com CARD e ARBD, listados na Tabela 10, estão localizados em outras regiões dos genomas sequenciados, e condizem com o perfil de resistência obtidos no antibiograma.

Tabela 10 – Genes de resistência a antimicrobianos identificados nos genomas sequenciados e o perfil de resistência de cada linhagem.

| Linhagem | Genes de resistência | Perfil de resistência |
|-----------------|--|--|
| PmBR19 | CMY-2, APH-(6)Id, APH(3'')-Ib, APH(3')-Ia, Sul2, DfrA1, Sat-1, AadA2 | AMC, AMP, CFL, NAL, SUT |
| PmBR595 | Nenhum | Nenhum |
| PmBR607 | DfrA1, Sat-1, AadA2, Sul 1, CTX-M-2, ANT(2'')-Ia, AadA, LnuG, QnrD1, QnrD2 | AMP, CFL, CTX, CRO, CPM, NAL, CIP, LVX, NOR, GEN, TOB, SUT |
| PmBR614 | Nenhum | Nenhum |
| PmBR618 | DfrA1, Sat-1, AadA2, Sul 1, CTX-M-2, ANT(2'')-Ia, AadA, LnuG | AMP, CFL, CTX, CRO, CPM, NAL, CIP, GEN, TOB, SUT |

siglas: AMC – amoxicilina-clavulanato; AMP – ampicilina; CFL - cefalotina; CIP – ciprofloxacina; CPM - cefepime; CRO - ceftriaxona; CXT - cefotaxima; GEN - gentamicina; LVX - levofloxacina; NAL – ácido nalidixico; NOR - norfloxacina; SUT – sulfametoxazol/trimetoprim; TOB – tobramicina.

Apesar de não haver outro gene de resistência nos ICEs identificados, o ICE da PmBR595 (ICE*PmiBra595*) possui o operon *merRTPCA*, de resistência a mercúrio, também presente nos ICEs R391 e ICEpMERPH (BÖLTNER et al., 2002; RYAN; SLATTERY; PEMBROKE, 2019). Nos outros pontos de inserção, são frequentes genes relacionados a sistemas de restrição, sistemas toxina-antitoxina (*mosAT* e *hipAB*), endonucleases, ATPases,

etc, mostrando que nem sempre os ICEs SXT/R391 carregam genes de resistência aos antibióticos.

Na comparação entre os ICEs identificados no nosso estudo por alinhamento *Mauve*, obtivemos as porcentagens mostradas na Tabela 11. Assim como observamos pela análise comparativa, os ICEs da PmBR19 (*ICEPmiJpn1*) e da PmBR607 (*ICEPmiBra607*) são os mais similares entre si (73,1%), sendo a diferença principalmente na região do transposon inserido no VR V de cada ICE (Figura 9).

Tabela 11 - Porcentagem de identidade entre os 5 ICEs SXT/R391 identificados no estudo.

| | PmBR19 | PmBR607 | PmBR595 | PmBR614 |
|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| PmBR607 | 73,1% | | | |
| PmBR595 | 49,7% | 47,6% | | |
| PmBR614 | 61,6% | 61,6% | 48,1% | |
| PmBR618 | 51,4% | 48,8% | 54,4% | 54,6% |

4.1.1 Grupos de exclusão dos ICEs sequenciados

Quanto a identificação dos grupos de exclusão baseado na sequência de aminoácidos de TraG e Eex, como mostra a Figura 10, identificamos que os ICEs das linhagens PmBR19 (*ICEPmiJpn1*), PmBR607 (*ICEPmiBra607*) e PmBR614 (*ICEPmiBra614*) são do grupo S (SXT), e das linhagens PmBR618 (*ICEPmiBra618*) e PmBR595 (*ICEPmiBra595*) são do grupo R (R391). O sistema de exclusão funciona por um mecanismo no qual a célula recipiente inibe a entrada do ICE de um doador que tenha um ICE do mesmo grupo de exclusão do qual já possui integrado no genoma. Esse mecanismo é importante pela possibilidade de dois ICEs coexistirem no mesmo hospedeiro, evitando redundância e promovendo a diversidade por meio de eventos de recombinação entre os ICEs inseridos em sequência, um evento regulado por fatores codificados nos próprios ICEs (Bet-Exo) (BURRUS; WALDOR, 2004a; GARRISS; WALDOR; BURRUS, 2009).

A.

| | | | |
|----------|-----|--|-----|
| eex_SXT | 61 | FSYLGFKAT CN PIGLI A ITTMFLAIAYWQASWTI VGL GLFFL LA ICTGIRFLSN Q VKDSGR | 120 |
| eex_19 | 54 | FSYLGFKAT AS PIGLI T ITTMFLAIAYWQASWTI VGL GLFFL LA ICTGIRFLIS Q VKDSGR | 113 |
| eex_607 | 54 | FSYLGFKAT AS PIGLI T ITTMFLAIAYWQASWTI VGL GLFFL LA ICTGIRFLIS Q VKDSGR | 113 |
| eex_614 | 54 | FSYLGFKAT CN PIGLI A ITTMFLAIAYWQASWTI VGL GLFFI LA ICTGIRFLSS Q VKDSGR | 113 |
| eex_R391 | 54 | FSYLGFKAI AS PIGLI T ITTMLVAIAYWQASWTI LCV GLAFL GLSGLIHLFQRQL KDTGR | 113 |
| eex_618 | 54 | FSYLGFKAT AS PIGLI T ITTMFLAIAYWQASWAI LCV GLAFL GLSGLIHLFQRQL KDTGR | 113 |
| eex_595 | 54 | FSYLGFKAT CN PIGLI A ITTMLVAIAYWQASWTI LCV GLAFL GLSGLIHLFQRQL KDTGR | 113 |
| | | | |
| eex_SXT | 121 | TL SIEEK WY WY KLHS FFDG FYPRY PKKPKK | 150 |
| eex_19 | 114 | TL SIEEK WY WY KLHS FFDG FYPKY PKKPKK | 143 |
| eex_607 | 114 | TL SIEEK WY WY KLHS FFDG FYPKY PKKPKK | 143 |
| eex_614 | 114 | N L SIEEK WY WY KLHS FFDG FYPRY PKKPKK | 143 |
| eex_R391 | 114 | EL S LSEK KY WY WVNE FAD GRSSIL PKKTRS | 143 |
| eex_618 | 114 | EL S LSEK KY WY WVNE FAD GRSSIL PKRPKK | 143 |
| eex_595 | 114 | EL S LSEK KY WY WVNE FAD GRSSIL PKKTRS | 143 |

B.

| | | | |
|-----------|-----|------------------------|-----|
| TraG_SXT | 601 | GTITN PGE KEVAD | 613 |
| TraG_19 | 601 | GTITN PGE KEVAD | 613 |
| TraG_607 | 601 | GTITN PGE KEVAD | 613 |
| TraG_614 | 601 | GTITN PGE KEVAD | 613 |
| TraG_R391 | 601 | GTITN TDD KEVAD | 613 |
| TraG_618 | 601 | GTITN TDD KEVAD | 613 |
| TraG_595 | 600 | GTITN TDD KEVAD | 612 |

Figura 10 - Análise do grupo de exclusão dos ICEs. Estão representados os alinhamentos das seqüências de aminoácidos das proteínas Eex (A) e TraG (B). Os resíduos relevantes para identificação do grupo pertencente estão coloridos em azul para os relacionados com o ICE SXT (grupo S), ou em vermelho para os relacionados com o ICE R391 (grupo R). (SATO et al., 2020)

4.1.2 BLASTn dos ICEs sequenciados

Os três melhores *hits* na análise de BLASTn dos respectivos ICEs estão representados na Tabela 12. Como podemos observar na coluna da cobertura do alinhamento, o ICE da linhagem PmBR19 tem alta similaridade (100% de cobertura e 99,99% de identidade) com ICEPmiJpn1(KY437729) como já observado anteriormente, e a linhagem PmBR607 teve praticamente os mesmos resultados da PmBR19, porém com a cobertura menor (84%) com o ICEPmiJpn1 (KY437729), o que condiz com as nossas análises anteriores, no qual a diferença seria justamente na região do transposon composto inserido no HS5.

Além disso, ambos os ICEs obtiveram alta similaridade com 2 linhagens de *P. mirabilis*, HN2p e L90-1, ambas isoladas na China. Estas linhagens da China aparentemente não são oriundas de estudos com ICEs, e não possuem os ICEs anotados no genoma. Porém, curiosamente, observamos pela análise da sua seqüência que a linhagem HN2p possui tanto o transposon contendo o *bla*_{CMY-2} igual da ICEPmiJpn1 (PmBR19) como também possui o transposon composto semelhante à do ICEPmiBra607 (PmBR607) inseridos no mesmo *hotspot* em seqüência.

Tabela 12 - BLASTn dos ICEs desse estudo contra o banco de dados.

| ICE | Description | Max score | Total Score | Query cover | Identity | Accession |
|---------------------------------|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|
| ICE <i>Pmi</i> Jpn1 (PmBR19) | Proteus mirabilis strain HN2p | 1,046E+08 | 1,847E+08 | 100% | 100,00% | CP046048.1 |
| | Proteus mirabilis strain L90-1 | 1,046E+08 | 1,539E+08 | 86% | 100,00% | CP045257.1 |
| | Proteus mirabilis ICE <i>Pmi</i> Jpn1 | 1,046E+08 | 1,67E+08 | 100,00% | 99,99% | KY437729.1 |
| ICE <i>Pmi</i> Bra607 | Proteus mirabilis strain HN2p | 1,06E+08 | 1,92E+08 | 98% | 99,62% | CP046048.1 |
| | Proteus mirabilis strain L90-1 | 1,06E+08 | 1,84E+08 | 98,00% | 99,62% | CP045257.1 |
| | Proteus mirabilis ICE <i>Pmi</i> Jpn1 | 1,06E+08 | 1,47E+08 | 84% | 99,61% | KY437729.1 |
| ICE <i>Pmi</i> Bra614 | Actinobacillus pleuropneumoniae ICE <i>ApI</i> Chn1 | 53825 | 92752 | 65% | 97,66% | KX196444.1 |
| | Shewanella upenei strain 110003 ICESupCHN110003 | 51568 | 96835 | 67% | 98,48% | MG014393.1 |
| | Proteus mirabilis strain MPE0734 | 45055 | 1,14E+08 | 81% | 96,88% | CP053615.1 |
| ICE <i>Pmi</i> Bra595 | Providencia stuartii strain ATCC 33672 | 1,39E+08 | 1,43E+08 | 100% | 99,98% | CP008920.1 |
| | Proteus mirabilis strain AR_0155 | 86705 | 1,06E+08 | 77% | 99,53% | CP021694.1 |
| | Klebsiella michiganensis strain RHBSTW-00409 | 45434 | 9,72E+04 | 77% | 97,56% | CP055325.1 |
| ICE <i>Pmi</i> Bra618 | Citrobacter sp. RHBSTW-00696 | 35907 | 90863 | 84% | 96,25% | CP056341.1 |
| | Vibrio rotiferianus AM7 | 35809 | 8,56E+04 | 80% | 96,30% | AP019798.1 |
| | Providencia sp. WCHPHu000369 strain | 32945 | 5,02E+04 | 45% | 97,62% | CP031123.1 |

O ICE*Pmi*Bra595 (PmBR595) apresentou alta similaridade (100% de cobertura e 99,98% identidade) com o ICE de *Providencia stuartii* ATCC 33672, que inclusive carrega consigo o gene de resistência ao mercúrio (*merRTPCA*), mostrando mais um indício de que os ICEs são capazes de se transferir entre diferentes espécies bacterianas.

Para o ICE*Pmi*Bra618 (PmBR618), o mais similar encontrado com 84% de cobertura foi de uma linhagem de *Citrobacter sp.*, seguido por um ICE de *Vibrio rotiferianus* com cobertura de 80%. Já o ICE*Pmi*Bra614 (PmBR614) obteve resultados com cobertura e similaridade relativamente baixa, com o melhor *hit* sendo o ICE*ApI*Chn1 com 65% de cobertura (predominantemente da região conservada), o que indica ser um ICE novo sequenciado.

Uma outra análise feita comparando os ICEs das linhagens sequenciadas foi de BLASTn de cada uma das regiões variáveis dos ICEs (com exceção do ICE*Pmi*Jpn1), a qual está representada na Tabela 13. Podemos observar que os ICEs das linhagens PmBR607 (ICE*Pmi*Bra607) e PmBR595 (ICE*Pmi*Bra595) obtiveram resultados relativamente similares entre as diferentes regiões variáveis que corrobora com a alta similaridade observada com o ICE*Pmi*Jpn1 e ICE*Pst*33672, respectivamente. Enquanto isso, os ICEs das linhagens

PmBR614 e PmBR618 tiveram resultados bastante divergentes entre as diferentes regiões variáveis, o que concorda com a ideia de serem ICEs novos. Além disso, reforça também a ideia de que estes e outros ICEs são resultados de recombinações entre diferentes ICEs de diversas origens.

Tabela 13 - BLASTn das regiões variáveis dos ICEs desse estudo contra o banco de dados.

| ICE | VRI | VRV | HS5 | HS2 | HS4 | HS3 | VRIV |
|--------------|---|------|---|--|---|---|---|
| ICEPmiBra607 | ICEPmiJpn1 (100/100) ICEPvuZN3 (100/100) ICEPmiVAC (100/100) | novo | ICEPvuZN3 (92/98) ICEPmiVAC (92/98) ICEPmiJpn1 (94/98) | ICEPmiJpn1* (100/99.9) | ICEPmiJpn1 (100/100) ICEVflInd1 (100/100) R391 <i>P. rettgeri</i> (100/100) | ICEPmiJpn1 (100/100) ICEPciZN2 (100/99.9) ICEPvuZN3 (100/99.9) | - |
| ICEPmiBra614 | - | - | ICEPmiChn2 (91/98) ICEPmiCHN 3300 (91/98) ICEVchBan9 (91/97.98) | ICEAplChn1 (100/98.7) ICEPvuZN3 (100/98.6) ICEPmiVAC (100/98.6) | ICEAplChn1 (100/99.9) | ICESupCHN1 10003 (100/99.9) ICEPmiChn2 (100/97.3) | - |
| ICEPmiBra595 | - | - | ICEPst33672 (100/99.9) ICEPmiK817 (90/97.8) ICEPmiAR379 (90/97.8) | ICEPst33672 (100/100) ICEPmiK817 (100/100) ICEVchMZ03 (100/98.5) | ICEPst33672 (100/100) ICEPmiAR01 55 (100/99.9) ICEPmiBC11 23 (100/92.9) | ICEPst33672 (100/100) ICEPmiAR01 55 (100/99.9) ICEPvuZN3 (100/99.9) | ICEPst33672 (100/100) ICEWCHPHu 000369 (100/99.9) ICEPmiCHN 2407 (100/99.9) |
| ICEPmiBra618 | ICEPmiJpn1 (100/99.8) ICEPvuZN3 (100/99.8) ICEPmiVAC (100/99.8) | - | Codifica 4 proteínas hipotéticas sem nenhuma similaridade à nível de DNA no banco de dados. | ICEVspPor1 (99/99.4) ICEVscSpa3 (99/99.4) ICEVspSpa3 (99/99.4) | ICEAplChn1 (100/99.5) | ICE WCHPHu369 (100/99.7) | - |

Para cada região variável ou *hotspot* estão representados três dos melhores hits de BLASTn com cobertura > 90% e similaridade \geq 90%. Nos parênteses estão representados a “cobertura/identidade” de cada *hit*. Cada célula está colorida de acordo com o melhor resultado de cada região variável, sendo coloridas da mesma cor as sequências provenientes do mesmo genoma. (*ICEPmiJpn1 de 3 linhagens diferentes). Material suplementar do artigo (SATO et al., 2020).

4.1.3 Análises filogenéticas dos ICEs e dos genomas de *Proteus sp.*

A árvore filogenética dos ICEs construída a partir da análise no CSI Phylogeny está representada na Figura 11. Olhando com atenção na região demarcada com um retângulo vermelho na figura, podemos observar que, como esperado, o ICEPmiJpn1 (da PmBR19) e

o ICE*PmiBra607* (PmBR607) ficaram próximos do ICE*PmiJpn1* da linhagem de *P. mirabilis* TUM4660, no qual originalmente esse ICE foi descrito.

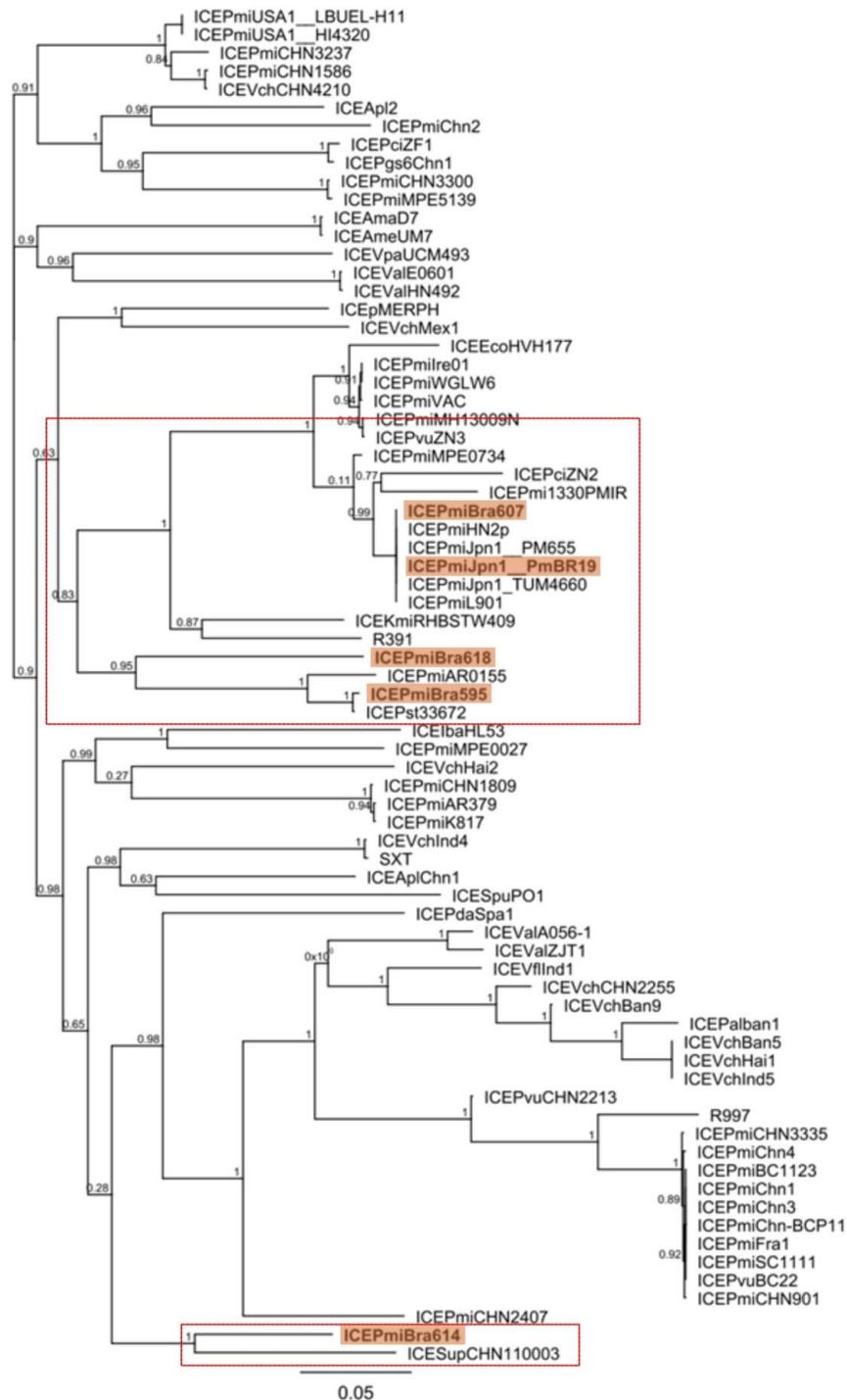


Figura 11 - Árvore filogenética dos ICEs SXT/R391. Análise realizada no CSI Phylogeny. Os retângulos delimitam a área com os ICEs SXT/R391 sequenciados no presente estudo que estão assinalados com cor. A barra representa 0.05 substituição por posição do nucleotídeo. (SATO et al., 2020)

Além disso, assim como a análise no BLASTn (Tabela 12) havia mostrado, o ICE da linhagem PmBR595 (ICE*PmiBra595*) ficou próximo do ICE da *P. stuartii* ATCC 33672,

(ICEPst33672) confirmando a observação feita anteriormente. Nessa análise foi possível observar também uma proximidade do ICEPmiBra618 (PmBR618) com ICEPmiBra595 (PmBR595), o que mostrou o ICEPmiBra614 (PmBR614) como o mais distante dentre os ICEs sequenciados, com o ICE mais próximo filogeneticamente sendo um ICE de *Shewanella upenei* isolado na China (ICESupCHN110003).

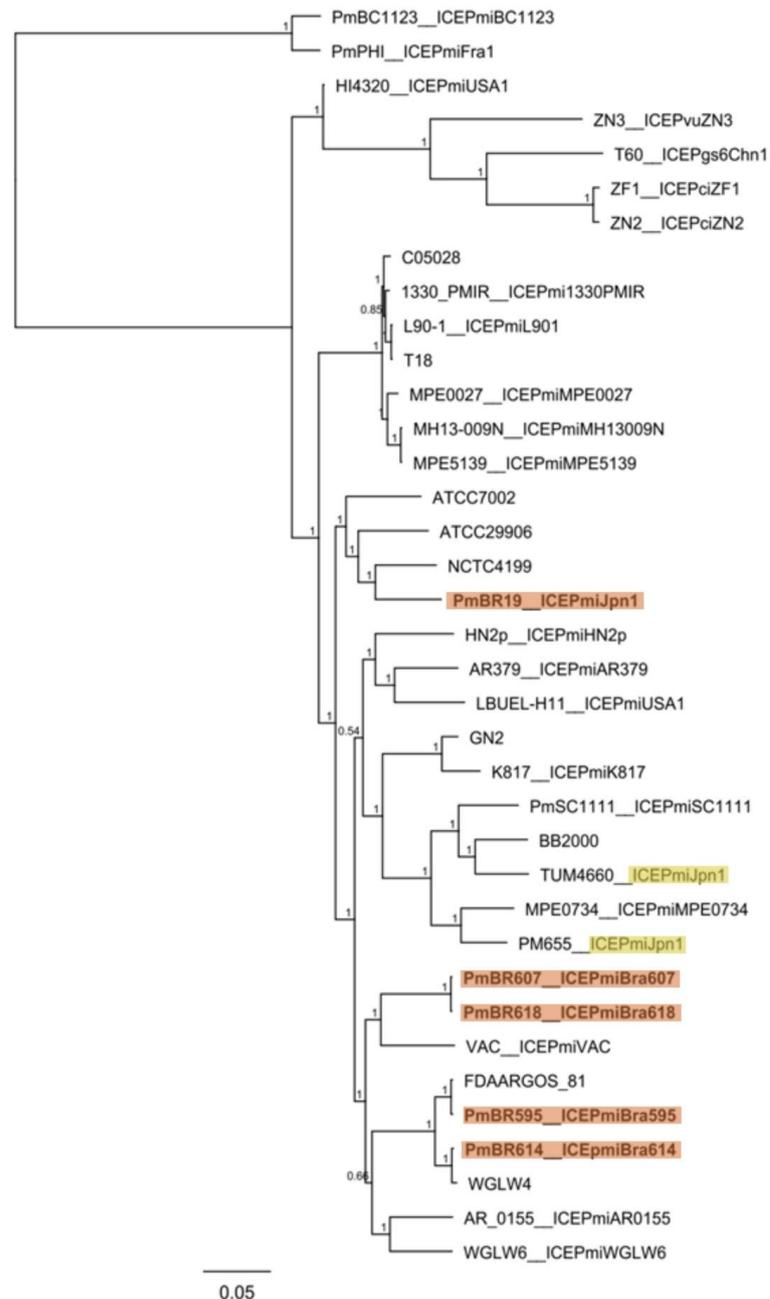


Figura 12 - Árvore filogenética de diversas linhagens de *Proteus sp.* descritos na literatura com os ICEs identificados no presente estudo. Análise baseada nos SNPs realizada na plataforma CSI Phylogeny. Linhagens portadoras de ICEs estão indicadas com a respectiva identificação do ICE após o nome da linhagem. As linhagens sequenciadas neste trabalho estão assinaladas na cor laranja. Os ICEPmiJpn1 de outras linhagens estão assinalados em amarelo para facilitar a visualização. A barra representa 0.05 substituição por posição do nucleotídeo (SATO et al., 2020).

A árvore filogenética com genomas de diversas linhagens de *Proteus sp.* já descritas na literatura, inclusive algumas portadoras do ICE SXT/R391, está representada na Figura 12. Observamos que a linhagem PmBR19 que possui o ICE similar ao ICE*PmiJpn1* ficou distante da linhagem TUM4660, na qual originalmente foi descrito esse mesmo ICE, mostrando que são linhagens diferentes que carregam o mesmo ICE.

Observamos que os genomas das linhagens PmBR607 e PmBR618 são praticamente idênticos, porém estas linhagens carregam ICEs bastante divergentes, como foi observado na composição das regiões variáveis e também na análise filogenética dos ICEs. As linhagens PmBR595 e PmBR614 são geneticamente muito próximas a FDAARGOS_81 e WGLW4, respectivamente, porém sendo estas últimas desprovidas de ICE. Todas estas análises também sugerem um cenário onde estes elementos estão sendo frequentemente perdidos e readquiridos em *Proteus sp.*.

4.2 Mutagênese induzida por UV em linhagens isogênicas

Para avaliar o papel deste elemento móvel em conferir a capacidade de mutagênese SOS, construímos pares isogênicos de linhagens albergando ou não o ICE*PmiJpn1* proveniente da linhagem PmBR19. Selecionamos isolados de *P. mirabilis* da nossa coleção que não albergam nenhum ICE em seu genoma, conforme previamente identificado (FONSECA, 2016). A mutagênese induzida por UV em cada linhagem em que o ICE*PmiJpn1* foi conjugado, com seu respectivo par isogênico desprovido deste elemento, resultou nos dados mostrados na Figura 13.

Como podemos observar na figura, a introdução do ICE*PmiJpn1* nas linhagens de *P. mirabilis* tem efeito positivo na mutagênese induzida por luz UV, apresentando aumento da frequência de mutantes, que não é observada na linhagem parental desprovida do elemento. Porém, observamos também que para as linhagens ATCC e PmBR28 contendo o ICE, o aumento da frequência de mutantes foi menor comparado com o aumento nas linhagens PmBR574, PmBR622 e PmBR51. Isso mostrou que há sim um efeito positivo do ICE na mutagênese, mas que o mesmo ICE pode ter efeitos diferentes dependendo da linhagem que o hospeda, sugerindo que existem fatores que diferem entre as linhagens que alteram o a manifestação da mutagênese SOS.

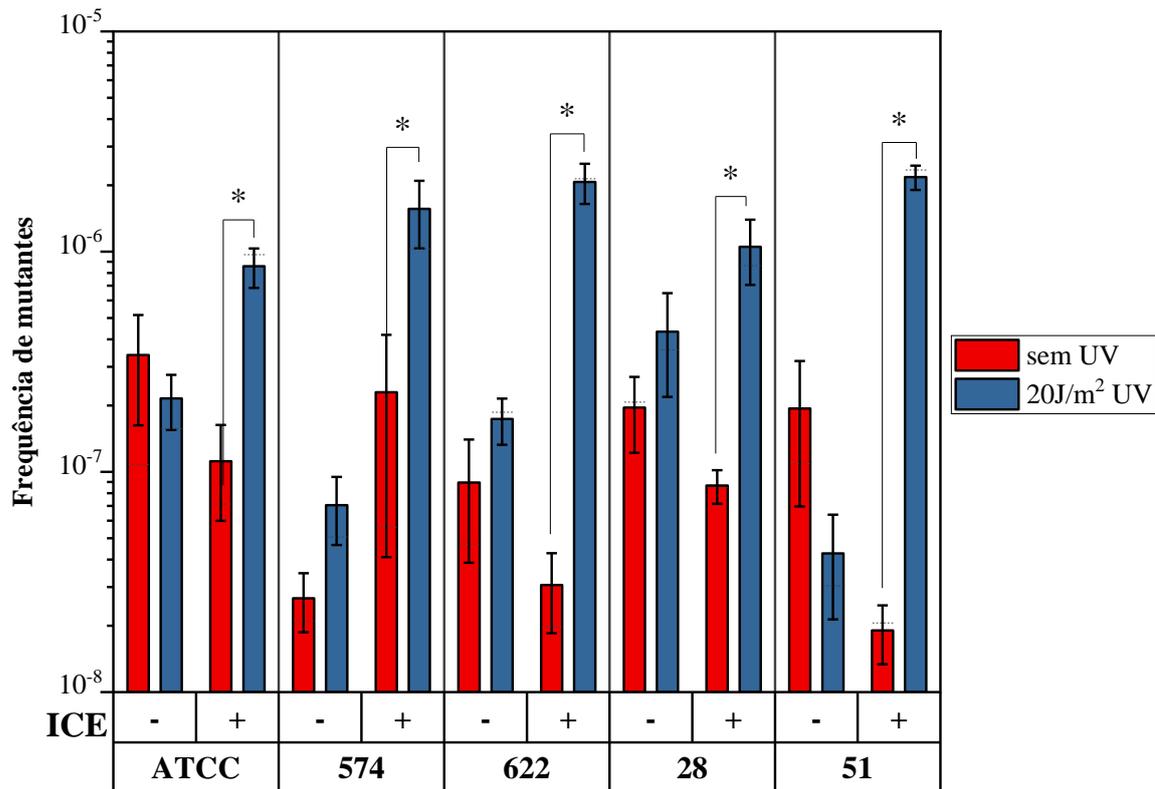


Figura 13 - Mutagênese em pares de linhagens isogênicas com ou sem ICE da linhagem PmBR19 (ICEPmiJpn1). As barras vermelhas representam as médias das frequências espontâneas (sem irradiação com luz UV), e as barras azuis as frequências em culturas irradiadas com luz UV (20 J/m²). Houve aumento significativo das frequências somente na presença do ICEPmiJpn1. A estatística foi realizada com teste não paramétrico de Mann-Whitney (* = significativo com $p < 0,05$). As barras representam a média, as linhas pretas representam o erro padrão e as linhas pontilhadas as medianas. Os dados representam a média de pelo menos 4 réplicas biológicas ($n \geq 4$).

Além disso, para todos os experimentos de mutagênese realizados com as linhagens isogênicas, avaliamos também a sobrevivência à irradiação com a luz UV. Como mostra a figura 14, a presença do ICEPmiJpn1 aumenta a fração de células sobreviventes em todas as linhagens avaliadas, o que possivelmente é resultado da atividade da polimerase translesão codificada pelos genes *rumAB*.

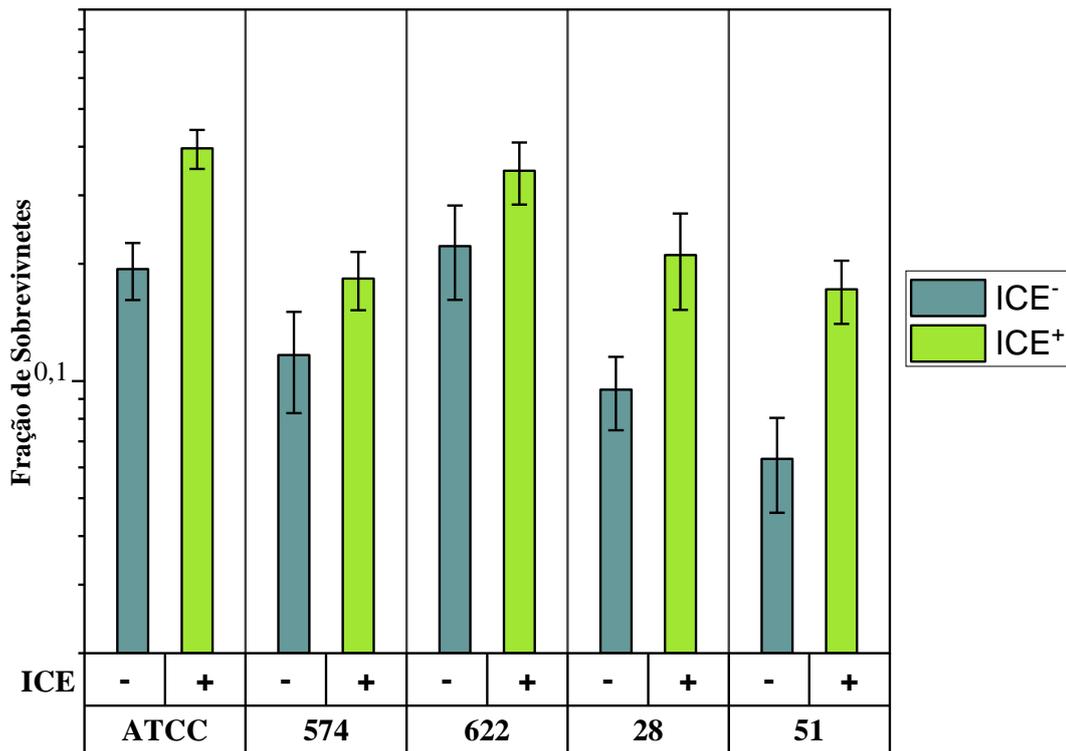


Figura 14 – Sobrevivência à irradiação com UV das linhagens isogênicas com ou sem ICE da linhagem PmBR19 (ICE*PmiJpn1*). Todas as linhagens foram irradiadas com a mesma dose de luz ultravioleta ($20\text{J}/\text{m}^2$). As barras escuras representam as linhagens sem ICE, e as barras claras as linhagens com o ICE. As barras representam a média e as linhas pretas representam o erro padrão., e os dados foram obtidos da média de pelo menos 4 réplicas biológicas ($n \geq 4$).

Para confirmar que o efeito da mutagênese conferida pelos ICEs é resultado da polimerase codificada pelos genes *rumAB*, selecionamos algumas das linhagens estudadas anteriormente, nas quais foi introduzido o ICE*PmiJpn1* $\Delta rumAB$, para comparação com a linhagem isogênica que contém o ICE com o operon *rumAB* intacto. Como podemos observar na Figura 15, a ausência dos genes *rumAB* aboliu o aumento da mutagênese observada na linhagem isogênica com a versão do ICE com o *rumAB* intacto, mostrando que o aumento da mutagênese observada é decorrente da atividade da polimerase TLS codificada pelo *rumAB*.

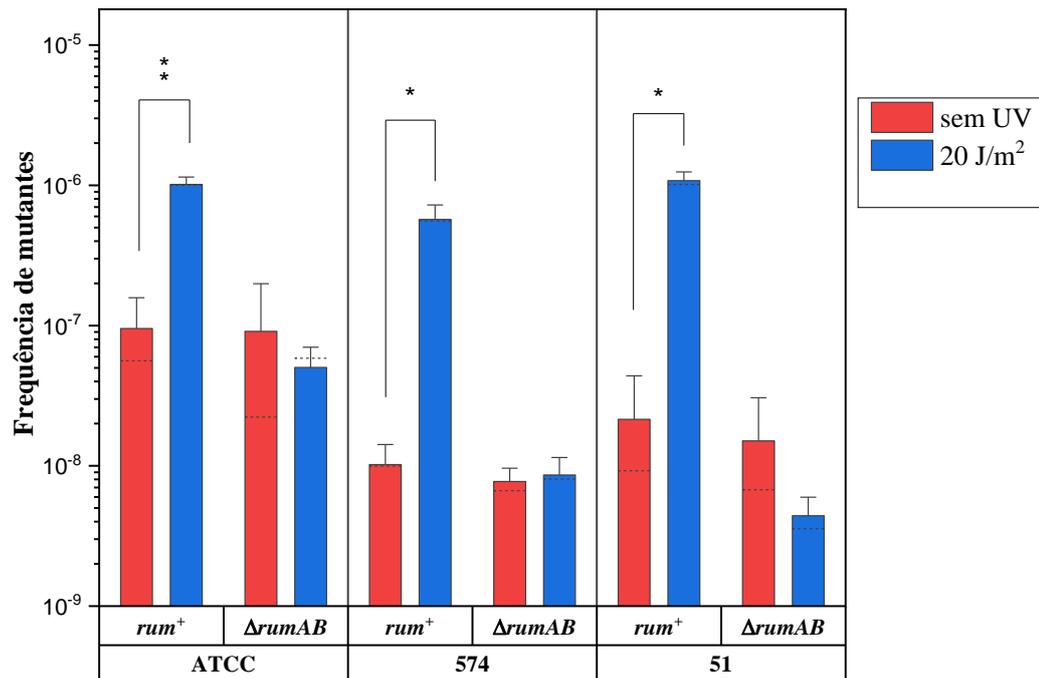


Figura 15 - Mutagênese em pares de linhagens isogênicas contendo o ICEPmiJpn1 ou ICEPmiJpn1 $\Delta rumAB$. As barras vermelhas representam as frequências de mutagênese espontânea, e as barras azuis as frequências de mutantes induzidas com luz UV (20 J/m²). O aumento da frequência de mutantes foi significativo somente na presença dos genes *rumAB*, e na ausência a frequência não apresentou diferença significativa entre amostras irradiadas e não-irradiadas. A estatística foi realizada com teste de Mann-Whitney (* = significativo com $p < 0,05$). As barras representam a média, as linhas pretas representam o erro padrão e as linhas pontilhadas as medianas. Os dados representam a média de pelo menos 4 réplicas biológicas ($n \geq 4$).

Na sobrevivência à luz UV destas linhagens (Figura 16), observamos que na presença do *rumAB* há uma fração maior de sobreviventes, o que confirma a observação feita na Figura 14 de que na presença da polimerase translesão codificada pelos genes *rumAB* resulta em uma maior sobrevivência à irradiação por luz UV.

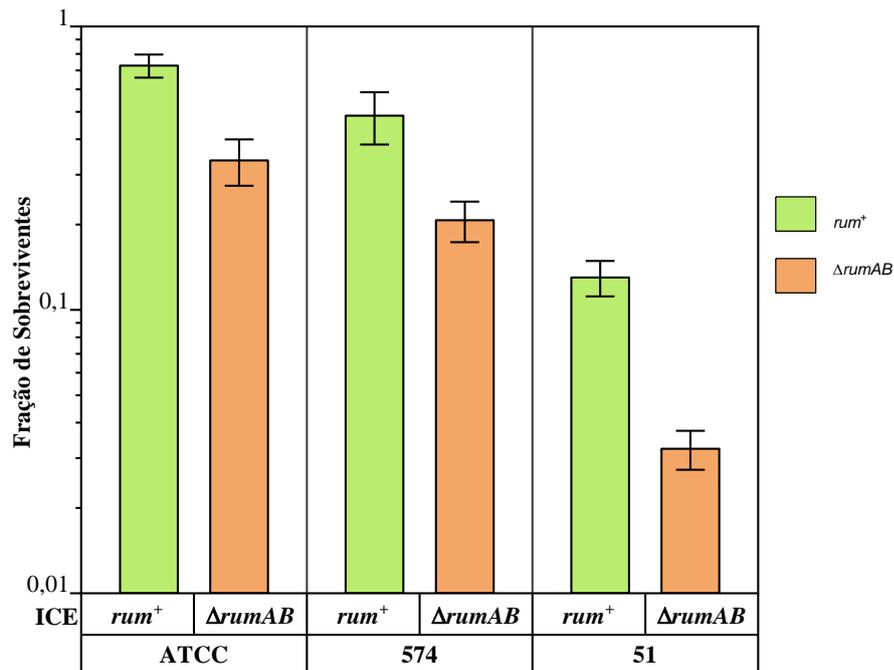


Figura 16 – Sobrevivência à irradiação com UV das linhagens isogênicas contendo o ICE*PmiJpn1* ou ICE*PmiJpn1* $\Delta rumAB$. Todas as linhagens foram irradiadas com a mesma dose de luz ultravioleta ($20J/m^2$). As barras verdes representam as linhagens com *rumAB* intacto, e as barras laranjas as linhagens com *rumAB* deletado. As linhas pretas representam o erro padrão, e os dados foram obtidos da média de pelo menos 4 réplicas biológicas ($n \geq 4$).

4.3 Complementação heteróloga de *rumAB* em *E. coli* $\Delta umuDC$.

A fim de avaliar especificamente a capacidade mutagênica da polimerase codificada pelos genes *rumAB*, realizamos a clonagem das diferentes variantes deste operon provenientes dos ICEs identificados na nossa coleção, excluindo aqueles contendo deleções e inserções dentro de *rumB*. Além dos ICEs provenientes das linhagens brasileiras PmBR19, PmBR607 e PmBR614, também clonamos o operon da linhagem-tipo HI4230. Todas as construções, assim como o plasmídeo vazio foram transformados na linhagem de *E. coli* AB1157 $\Delta umuDC$ para avaliar a sua capacidade de complementar a mutagênese induzida por UV.

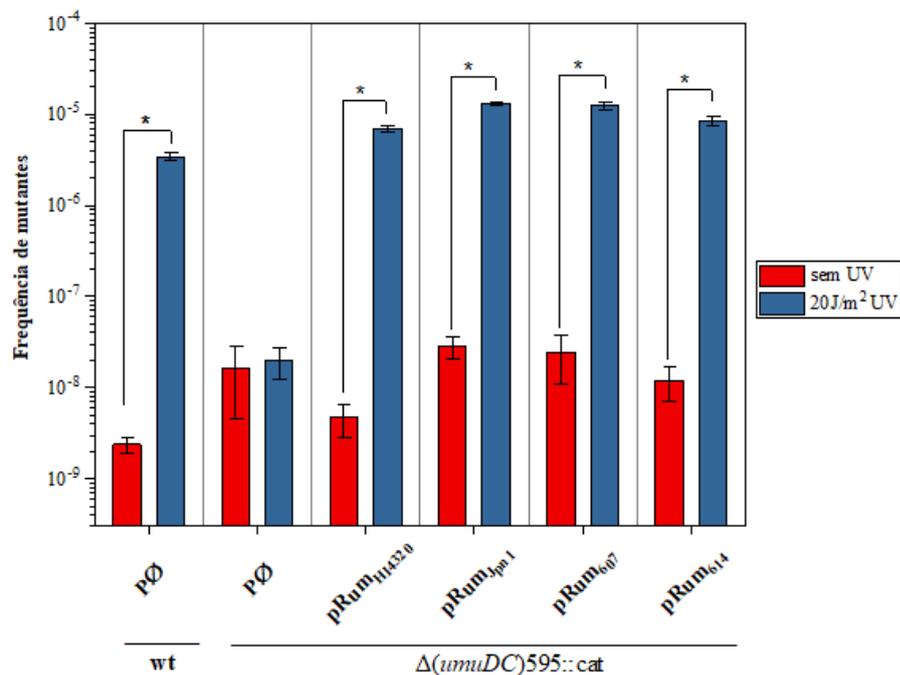


Figura 17 – Mutagênese com complementação heteróloga de *rumAB* em linhagens de *E. coli* $\Delta umuDC$. Em vermelho está representada a frequência de mutantes espontânea (sem irradiação com luz UV) e em azul está representada a frequência de mutantes quando irradiada com luz UV ($60J/m^2$). Todos os *rumAB* testados mostraram ser capazes de complementar a capacidade mutagênica. A estatística foi realizada com teste de Mann-Whitney (* = significativo com $p < 0,05$). As barras pretas representam o erro padrão, e os dados foram obtidos a partir da média de 4 réplicas biológicas de cada linhagem ($n \geq 4$).

Como mostra a Figura 17, a ausência dos genes *umuDC* na *E. coli* AB1157 diminuiu drasticamente a mutagênese induzida por UV. Quando esta linhagem é transformada com plasmídeos contendo os genes *rumAB* provenientes dos diferentes ICEs, a mutagênese é recuperada em todos os casos, mostrando que o *rumAB* é capaz de promover mutagênese com a indução da resposta SOS. Além disso, podemos observar que o *rumAB* de todos os 4 ICEs tiveram um efeito similar entre eles, sugerindo que a ausência de mutagênese em algumas das linhagens de *P. mirabilis* como a HI4320 e a PmBR614 que foi observada nos experimentos anteriores (Figura 6) seja decorrente de particularidades de cada linhagem portadora, ou consequência da ação de outros genes presentes no ICE daquelas linhagens. Além disso, observamos também que a presença dos plasmídeos que albergam as diferentes versões de *rumAB* aumenta a sobrevivência da linhagem *E. coli* $\Delta umuDC$, como mostra a Figura 18.

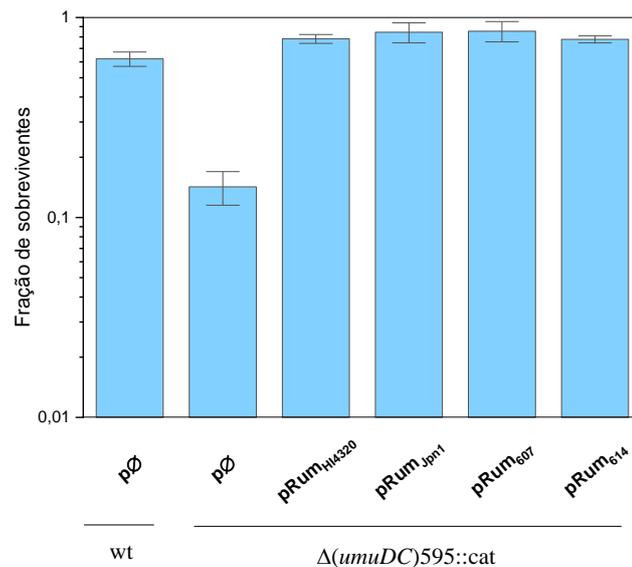


Figura 18 – Sobrevivência à irradiação com UV no experimento de mutagênese com *rumAB* clonado no plasmídeo pWSK129. Todas as linhagens foram irradiadas com a mesma dose de luz ultravioleta ($60\text{J}/\text{m}^2$). As barras pretas representam o erro padrão. Os dados foram obtidos da média de pelo menos 4 réplicas biológicas ($n \geq 4$).

4.4 Papel dos genes *rumAB* na conjugação dos ICEs

A frequência de conjugação do ICE*PmiJpn1* da linhagem original PmBR19 para a linhagem de *E. coli* MG1655 foi de $2,067 \times 10^{-8}$ transconjugantes por célula receptora, valor comparável aos dados da literatura (ABERKANE et al., 2016; FANG et al., 2018; LEI et al., 2016; SATO et al., 2020). Como próximo passo, investigamos se os genes *rumAB* teriam influência no processo conjugativo, tanto em condições normais quanto em condição onde as células doadoras foram irradiadas com luz UV. Nesta última condição, a conjugação é estimulada, porém a célula tem que lidar com os danos no DNA.

Para tal, o mesmo ICE parental e a sua versão com os genes *rumAB* deletados foram avaliados quanto à capacidade de conjugar para uma linhagem de *E. coli* desprovida de *umuDC*, utilizando como células doadoras os pares de linhagens isogênicas de ATCC 25933 e PmBR574 (contendo ICE*PmiJpn1* ou ICE*PmiJpn1* Δ *rumAB*). As frequências de conjugação em culturas irradiadas com luz UV e em controles não irradiados está mostrada na Figura 19.

Como podemos observar, os ICEs apresentaram aumento significativo da frequência de conjugação após irradiação com a luz UV como seria esperado pela natureza dos ICEs (os danos no DNA causados pela luz UV levam ao aumento da expressão dos genes que

promovem o processo de transferência dos ICEs). Quanto ao papel dos genes *rumAB* no sucesso da conjugação, apesar de o gráfico mostrar uma aparente queda na média da frequência de transconjugantes na ausência de *rumAB*, houve diferença significativa somente na linhagem PmBR574, mas não na linhagem ATCC, quando comparada a frequência de conjugação em cada linhagem com e sem os genes *rumAB*. No entanto, os dados indicam que provavelmente esse resultado foi decorrente de variações entre os experimentos individuais, portanto requerem mais repetições para confirmar tal fenótipo. Uma observação interessante a se fazer é de que o aumento da frequência de conjugação parece estar associado também ao nível de indução da mutagênese observada em experimentos anteriores (Figura 13), a linhagem PmBR574 que teve indução da mutagênese maior apresentou maior aumento também na frequência de conjugação em comparação à linhagem ATCC. De qualquer modo, o efeito dos genes *rumAB* na conjugação é pequeno, promovendo um aumento de aproximadamente 3 vezes na frequência de transconjugantes na linhagem PmBR574 irradiada com luz UV.

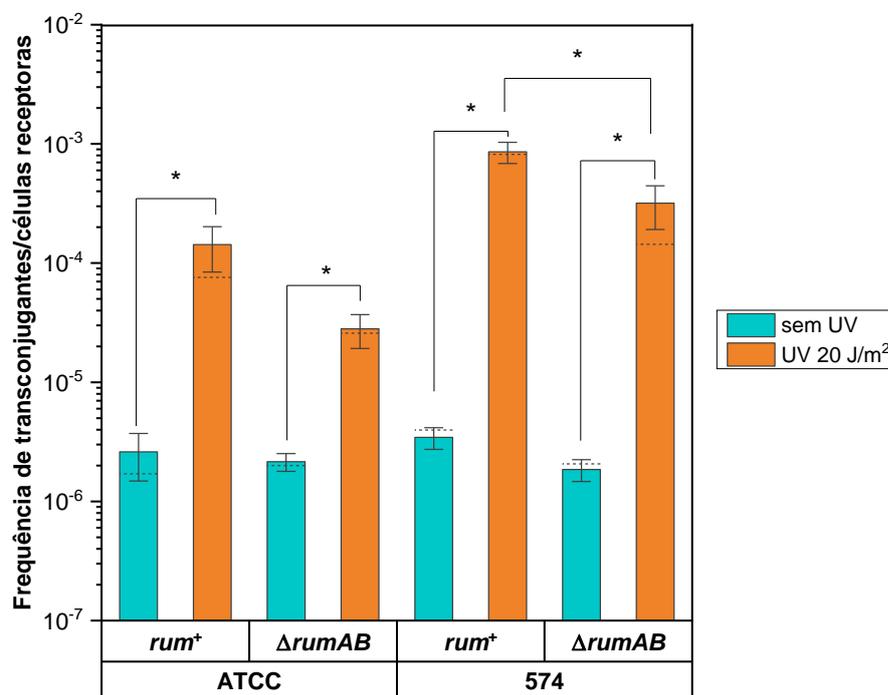


Figura 19 – Influência dos genes *rumAB* na frequência de conjugação dos ICEs. O gráfico mostra as frequências de transconjugantes por células receptoras (AB1157 Δ *umuDC*) comparando a média da frequência de conjugação de amostras irradiadas com UV (20 J/m²) em relação à média da frequência de conjugação de amostras controle (0 J/m²) na presença ou ausência dos genes *rumAB*. A estatística foi realizada com teste de Mann-Whitney (* = significativo com $p < 0,05$). As barras representam a média, as linhas pretas representam o erro padrão e a linha pontilhada a mediana. Foram realizadas 5 e 6 réplicas para obtenção das médias, para ATCC e PmBR574, respectivamente (Experimento realizado com ajuda do mestrando Douglas Lyra de Holanda Fonseca).

5 DISCUSSÃO

A Genômica comparativa dos ICEs provenientes de isolados brasileiros de *P. mirabilis* indicou que os ICEs da família SXT/R391 não estão necessariamente relacionados à disseminação de genes de resistência a antibióticos, uma vez que somente o ICE*PmiJpn1* da linhagem PmBR19 carrega uma beta-lactamase CMY-2. No entanto, o ICE da linhagem PmBR595 tem consigo os genes de resistência à mercúrio (*merRTPCA*), o mesmo operon encontrado em ICEs como R391 e ICEpMERPH (BÖLTNER et al., 2002; RYAN; SLATTERY; PEMBROKE, 2019), que é interessante também considerando a presença de metais pesados no meio ambiente e em desinfetantes, e a sua toxicidade. A alta similaridade do ICE da PmBR19 com ICE*PmiJpn1* e do ICE da PmBR595 com o ICE da *P. stuartii* ATCC 33672 nos dá forte indício de que este elemento genético está se disseminando entre diferentes linhagens e espécies. O ICE da PmBR607 mostrou ser muito similar também ao ICE*PmiJpn1*, porém com a diferença justamente na região da beta-lactamase, carregando uma estrutura nova no lugar, com muitos genes de função desconhecida. Curiosamente, encontramos na base de dados um genoma de *P. mirabilis* (linhagem HN2p) da China, que carrega um ICE semelhante ao ICE*PmiJpn1*, mas que além da inserção contendo a beta-lactamase CMY-2, tem inserido o mesmo transposon da ICE*PmiBra607* nessa mesma região variável em tandem. Enquanto isso, os ICEs das linhagens PmBR614 e PmBR618, aparentam ser ICEs novos, visto que não foi encontrado nenhum ICE com alta similaridade na base de dados, o que também pode ser resultado da ausência de genes determinantes de resistência à antimicrobianos, uma vez que a grande maioria dos estudos com ICEs SXT/R391 não foram resultado de abordagens diretas para detecção do ICE, mas sim de estudos com linhagens portadoras de múltiplas resistências (ABERKANE et al., 2016; HARADA et al., 2010; HE et al., 2020; KONG et al., 2020; LEI et al., 2018; MAC AOGÁIN; ROGERS; CROWLEY, 2016; MATA et al., 2011; SIEBOR; DE CURRAIZE; NEUWIRTH, 2018).

A aparente ausência de elementos que conferem vantagens óbvias ao hospedeiro em boa parte dos ICEs identificados (principalmente em relação à resistência a antimicrobianos), deixa em questão o papel exercido por estes elementos. Considerando que são elementos que regulam o próprio mecanismo de transferência, levando em conta também a presença de sistemas de toxina-antitoxina, por exemplo, podemos citar a função de se manter e propagar na população como elementos “egoístas”. Entretanto, também permanece a possibilidade de que genes de função não caracterizada conservados nos ICEs confirmam outras vantagens ainda

não compreendidas às células portadoras, uma vez que existe um custo para a célula manter uma estrutura grande no seu genoma.

Quanto à função do operon *rumAB*, observamos que frequentemente o gene está alterado (em 2 das 6 linhagens desse estudo apresentaram alterações no gene *rumB*), seja por mutações ou pelos possíveis eventos de inserção de DNA na região variável (VR III) localizado no gene. Quando o SOS é induzido nas linhagens que possuem o *rumAB* intacto, somente metade delas mostrou o aumento da mutagênese que seria esperado pela indução da polimerase propensa a erros. Mas o mesmo ICE (da linhagem PmBR19) quando transferido para linhagens diferentes de *P. mirabilis*, apresentou perfil de indução de mutagênese totalmente diferentes, sugerindo que o genótipo das bactérias tem influência no efeito mutagênico da polimerase. Os ensaios de mutagênese em *E. coli* Δ *umuDC* portando vetor de expressão com *rumAB* de diferentes linhagens reforça essa ideia, uma vez que mostrou que todas as versões do *rumAB* são capazes de promover a mutagênese induzida na mesma linhagem de *E. coli*.

Além disso, visto a íntima relação da resposta SOS com a indução da maquinaria de transferência do ICE e também na indução do *rumAB*, é importante a avaliação do papel dessa polimerase na transferência dos ICEs. Como mostram os resultados referentes, a ausência do operon *rumAB* parece ter efeito negativo no sucesso da conjugação quando comparado com a versão do ICE com o *rumAB* intacto quando a conjugação é induzida com a luz UV. Seria interessante fazer a mesma comparação com as outras linhagens isogênicas construídas para avaliar se esse efeito se repete. Caso esse fenótipo se confirme, nos sugere a possibilidade de que a atividade da polimerase translesão tenha um papel consideravelmente importante na reconstituição da fita complementar após o ICE ser transferido para uma célula receptora. Já foi descrito que o ssDNA presente transientemente durante a conjugação é indutor de resposta SOS, mas se a polimerase TLS é levada junto durante a conjugação ou se é transcrita *de novo* na célula receptora é um possível tópico a ser abordada futuramente (BAHAROGLU; KRIN; MAZEL, 2012). Em *P. mirabilis*, levando em consideração o fato de a resposta SOS, que induz a conjugação, ser decorrente de danos no DNA, a função das polimerases TLS pode ser crucial para o sucesso da conjugação e manutenção do ICE na espécie uma vez que são espécies desprovidas de Pol V no genoma quando não carregam um ICE SXT/R391.

Ademais, com a observação de que a linhagem com maior indução da mutagênese apresentou também uma maior indução do aumento na frequência de conjugação induzida por

luz UV, implica no questionamento de se há uma possibilidade de os fenótipos observados nas linhagens isogênicas serem provenientes de diferença na indução da resposta SOS em cada linhagem. Neste caso, uma possibilidade para abordar esta questão é avaliar o nível de indução dos genes da resposta SOS (como por exemplo o gene *recA*) e dos genes induzido via SOS codificada nos ICEs (como por exemplo o operon *rumAB*), nas diferentes linhagens isogênicas construídas. Uma outra possibilidade é de que tenha diferença nas regulações pós-transcricionais como, por exemplo, na autoclivagem do RumA que esteja de alguma forma influenciando os fenótipos observados.

Os resultados mostram que ainda há muito para se investigar sobre a funcionalidade dos ICEs da família SXT/R391, e podemos dizer que a frequente presença de genes homólogos de polimerases translesão em elementos genéticos móveis incluindo os ICEs podem ter um papel importante na disseminação e manutenção dos ICEs em diversas espécies bacterianas, além de conferir capacidade de mutagênese induzida para algumas espécies que são desprovidas deste mecanismo de tolerância a danos no DNA como a *P. mirabilis*.

6 CONCLUSÕES

- a) ICE carregado pela linhagem PmBR19 é idêntico ao ICE*PmiJpn1* descrito na literatura e é o único isolado de *P. mirabilis* da nossa coleção que carrega um gene de resistência à um antimicrobiano (*bla_{CMY-2}*);
- b) O ICE carregado pela linhagem PmBR595 é idêntico a outro previamente identificado em linhagem ATCC 33672 de *Providencia stuartii*;
- c) O ICE da linhagem PmBR607 é semelhante ao ICE*PmiJpn1*, porém com uma diferença importante na VR V. Outros ICEs semelhantes a este foram identificados em genomas depositados no banco de dados concomitantemente à realização deste trabalho;
- d) Os ICEs das linhagens PmBR614 e PmBR618 são novos, e parecem ser mosaicos resultantes de recombinação entre diferentes ICEs da família SXT/R391;
- e) Todas as linhagens de *P. mirabilis* que receberam o ICE*PmiJpn1* (PmBR19) apresentaram aumento da frequência de mutação induzida por luz UV;
- f) A deleção do operon *rumAB* no ICE*PmiJpn1* aboliu a capacidade mutagênica nas diferentes linhagens isogênicas de *P. mirabilis* construídas, mostrando o papel destes genes na mutagênese;
- g) Os genes *rumAB* apresentam um efeito pequeno sobre a conjugação em células irradiadas com luz UV.

REFERÊNCIAS*

- ABERKANE, S. et al. High Prevalence of SXT / R391-Related Integrative and Conjugative Elements Carrying *bla* CMY-2 in *Proteus mirabilis* Isolates from Gulls in the South of France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 1148–1152, 2016.
- ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., (...). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 1 dez. 2016.
- ALVES, I. R. et al. Effect of SOS-induced levels of *imuABC* on spontaneous and damage-induced mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. **DNA Repair (Amst.)**, v. 59, p. 20–26, 2017.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 743–754, 8 out. 2012.
- BAGG, A.; KENYON, C. J.; WALKER, G. C. Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 9, p. 5749–53, set. 1981.
- BAHAROGLU, Z.; BIKARD, D.; MAZEL, D. Conjugative DNA Transfer Induces the Bacterial SOS Response and Promotes Antibiotic Resistance Development through Integron Activation. **PLoS Genet**, v. 6, n. 10, p. e1001165, 2010.
- BAHAROGLU, Z.; KRIN, E.; MAZEL, D. Connecting Environment and Genome Plasticity in the Characterization of Transformation-Induced SOS Regulation and Carbon Catabolite Control of the *Vibrio cholerae* Integron Integrase. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 7, p. 1659–67, 2012.
- BAHAROGLU, Z.; MAZEL, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1126–45, 2014.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BEABER, J. W. et al. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: Definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 12, p. 2065–2070, 2002.
- BEABER, J. W.; HOCHHUT, B.; WALDOR, M. K. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 15, p. 4259–4269, 2002.
- BEABER, J. W.; HOCHHUT, B.; WALDOR, M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. **Nature**, v. 427, n. 6969, p. 72–74, 1 jan. 2004.
- BECHEREL, O. J.; FUCHS, R. P. P.; WAGNER, J. Pivotal role of the beta-clamp in translesion DNA synthesis and mutagenesis in *E. coli* cells. **DNA repair**, v. 1, n. 9, p. 703–708, 4 set. 2002.
- BELL, J. C. et al. Direct imaging of RecA nucleation and growth on single molecules of SSB-

coated ssDNA. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 274–278, 8 nov. 2012.

BIE, L. et al. Identification and characterization of new members of the SXT/R391 family of integrative and conjugative elements (ICEs) in *Proteus mirabilis*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 2, p. 242–246, 8 jun. 2017.

BIOTEAU, A.; DURAND, R.; BURRUS, V. Redefinition and Unification of the SXT/R391 Family of Integrative and Conjugative Elements. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 13, p. e00485-18, 2018.

BÖLTNER, D. et al. R391: A conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 18, p. 5158–5169, set. 2002.

BORDELEAU, E. et al. Beyond antibiotic resistance: Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 510–523, 2010.

BOTELHO, J.; SCHULENBURG, H. The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 8–18, jun. 2020.

BURRUS, V. et al. Conjugative transposons: The tip of the iceberg. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 601–610, 2002.

BURRUS, V.; MARRERO, J.; WALDOR, M. K. The current ICE age: Biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. **Plasmid**, v. 55, n. 3, p. 173–183, maio 2006.

BURRUS, V.; WALDOR, M. K. Control of SXT integration and excision. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 17, p. 5045–5054, set. 2003.

BURRUS, V.; WALDOR, M. K. Formation of SXT Tandem Arrays and SXT-R391 Hybrids. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2636–2645, 2004a.

BURRUS, V.; WALDOR, M. K. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 376–386, 1 jun. 2004b.

BUTALA, M. et al. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 15, p. 6546–57, 2011.

CARRARO, N.; BURRUS, V. Biology of Three ICE Families: SXT/R391, ICEBs1, and ICESt1/ICESt3. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, 10 dez. 2014.

CARRARO, N.; BURRUS, V. The dualistic nature of integrative and conjugative elements. **Mobile Genetic Elements**, v. 5, n. 6, p. 98–102, 2015.

CARRARO, N.; POULIN, D.; BURRUS, V. Replication and Active Partition of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 Family: The Line between ICEs and Conjugative Plasmids Is Getting Thinner. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 6, p. e1005298, 2015.

CECCARELLI, D. et al. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5328–5338, ago. 2008.

CHAVEROUCHE, M.-K.; GHIGO, J.-M.; D'ENFERT, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 22, p. E97, 2000.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 26th ed. CLSI supplement M100S**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

COETZEE, J. N.; DATTA, N.; HEDGES, R. W. R factors from *Proteus rettgeri*. **Journal of general microbiology**, v. 72, n. 3, p. 543–552, 1972.

COURCELLE, J. et al. Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 158, n. 1, p. 41–64, 1 maio 2001.

CRANE, J. K.; ALVARADO, C. L.; SUTTON, M. D. Role of the SOS Response in the Generation of Antibiotic Resistance In Vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 7, p. e0001321, 17 jun. 2021.

CULYBA, M. J. et al. Non-equilibrium repressor binding kinetics link DNA damage dose to transcriptional timing within the SOS gene network. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 6, p. 1–29, 2018.

DACCORD, A.; CECCARELLI, D.; BURRUS, V. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 576–588, 2010.

DARLING, A. C. E. et al. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394–1403, jul. 2004.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 12, p. 6640–5, 2000.

DAVIES, M. R. et al. A Novel Integrative Conjugative Element Mediates Genetic Transfer from Group G *Streptococcus* to Other-Hemolytic *Streptococci*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2257–2265, 2009.

DENAMUR, E. et al. High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 2, p. 605–609, 15 fev. 2002.

DERBISE, A. et al. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 113–116, 22 set. 2003.

DRAKE, J. W. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 16, p. 7160–4, 15 ago. 1991.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of *Proteus spp.* Bacteria in Natural Environments. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p. 741–758, nov. 2016.

FANG, Y. et al. Distribution and Genetic Characteristics of SXT/R391 Integrative Conjugative Elements in *Shewanella spp.* From China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 920, 11 maio 2018.

FONSECA, M. B. **Caracterização do fenótipo mutador de isolados de *P. mirabilis***. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

FOSTER, P. L. et al. Determinants of spontaneous mutation in the bacterium *Escherichia coli* as revealed by whole-genome sequencing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 112, n. 44, p. E5990–9, 2015.

- FRIEDMAN, N. et al. Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. **PLoS Biology**, v. 3, n. 7, p. e238, 2005.
- FUCHS, R. P.; FUJII, S. Translesion DNA synthesis and mutagenesis in prokaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 12, p. a012682, 2013.
- FUJII, S.; FUCHS, R. A Comprehensive View of Translesion Synthesis in *Escherichia coli*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 84, n. 3, p. e00002-20, 19 ago. 2020.
- GALHARDO, R. S. et al. DinB upregulation is the sole role of the SOS response in stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 182, n. 1, p. 55–68, 1 maio 2009.
- GALHARDO, R. S.; HASTINGS, P. J.; ROSENBERG, S. M. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p. 399–435, 11 jan. 2007.
- GARRISS, G.; WALDOR, M. K.; BURRUS, V. Mobile Antibiotic Resistance Encoding Elements Promote Their Own Diversity. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000775, 18 dez. 2009.
- GERMAIN, E. et al. Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA. **Molecular Cell**, v. 52, n. 2, p. 248–254, 2013.
- GOLDFARB, T. et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 2, p. 169–183, 2015.
- GOODMAN, M. F. et al. Insights into the complex levels of regulation imposed on *Escherichia coli* DNA polymerase V. **DNA Repair**, v. 44, p. 42–50, 1 ago. 2016.
- GUGLIELMINI, J. et al. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 9, p. 5715–5727, 2014.
- GUTIERREZ, A. et al. β -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. **Nature communications**, v. 4, p. 1610, 19 dez. 2013.
- HAMANN, A. et al. A two-step protocol for efficient deletion of genes in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. **Current Genetics**, v. 48, n. 4, p. 270–275, 14 out. 2005.
- HARADA, S. et al. Chromosomally encoded *bla*CMY-2 located on a novel SXT/R391-related integrating conjugative element in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3545–3550, 1 set. 2010.
- HAURYLIUK, V. et al. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 298–309, 24 maio 2015.
- HE, D. et al. A novel tetracycline resistance gene, *tet(X6)*, on an SXT/R391 integrative and conjugative element in a *Proteus* genomospecies 6 isolate of retail meat origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 5, p. 1159–1164, 2020.
- HOCHHUT, B. et al. Formation of Chromosomal Tandem Arrays of the SXT Element and R391, Two Conjugative Chromosomally Integrating Elements That Share an Attachment Site. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1124–1132, 15 fev. 2001.
- HOCHHUT, B.; MARRERO, J.; WALDOR, M. K. Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a *constin* found in *Vibrio cholerae* O139.

Journal of Bacteriology, v. 182, n. 7, p. 2043–2047, abr. 2000.

HOCHHUT, B.; WALDOR, M. K. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 99–110, 1999.

JACOBSEN, S. M. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 1, p. 26–59, 1 jan. 2008.

JAIN, P. et al. Overuse of the Indwelling Urinary Tract Catheter in Hospitalized Medical Patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 13, p. 1425–1429, 10 jul. 1995.

JAROSZ, D. F. et al. A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 225–228, 2006.

JIANG, Q. et al. The active form of DNA polymerase V is UmuD'2C–RecA–ATP. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 359–363, 16 jul. 2009.

JOHNSON, C. M.; GROSSMAN, A. D. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. **Annual Review of Genetics**, v. 49, n. 1, p. 577–601, 2015.

KAAS, R. S. et al. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104984, 11 ago. 2014.

KATO, T.; SHINOURA, Y. Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 156, n. 2, p. 121–31, 14 nov. 1977.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, jun. 2012.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Molecular cell**, v. 37, n. 3, p. 311–20, 12 fev. 2010.

KONG, L. H. et al. Integration of the bla_{NDM-1} carbapenemase gene into a novel SXT/R391 integrative and conjugative element in *Proteus vulgaris*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 75, n. 6, p. 1439–1442, 1 jun. 2020.

KREUZER, K. N. DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 11, p. a012674, 1 nov. 2013.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 5–7, 1 jul. 2003.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435–441, abr. 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 1 abr. 2009b.

KUNLN, C. M. et al. The association between the use of urinary catheters and morbidity and mortality among elderly patients in nursing homes. **American Journal of Epidemiology**, v. 135, n. 3, p. 291–301, 1 fev. 1992.

- LAAN, B. J. et al. Prevalence and risk factors of inappropriate use of intravenous and urinary catheters in surgical and medical patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 105, n. 4, p. 698–704, 1 ago. 2020.
- LAYTON, J. C.; FOSTER, P. L. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 50, n. 2, p. 549–61, out. 2003.
- LECLERC, J. E. et al. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. **Science**, v. 274, n. 5290, p. 1208–11, 15 nov. 1996.
- LEI, C.-W. et al. Characterization of SXT/R391 Integrative and Conjugative Elements in *Proteus mirabilis* Isolates from Food-Producing Animals in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1935–1938, 11 mar. 2016.
- LEI, C.-W. et al. Characterization of a Novel SXT/R391 Integrative and Conjugative Element Carrying *cfr*, *bla* CTX-M-65, *fosA3*, and *aac(6')-Ib-cr* in *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. e00849-18, 2018.
- LEWIS, K. Persister Cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 357–372, 2010.
- LI, X. et al. SXT/R391 integrative and conjugative elements in *Proteus* species reveal abundant genetic diversity and multidrug resistance. **Scientific reports**, v. 6, p. 37372, 28 nov. 2016.
- LING, H. et al. Crystal Structure of a Y-Family DNA Polymerase in Action: A Mechanism for Error-Prone and Lesion-Bypass Replication fidelity polymerase (Woodgate). **Cell**, v. 107, n. 1, p. 91–102, 2001.
- LIU, M. et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D660–D665, 2019.
- LLOSA, M. et al. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 1–8, 2002.
- MAC AOGÁIN, M.; ROGERS, T. R.; CROWLEY, B. Identification of emergent *bla* CMY-2-carrying *Proteus mirabilis* lineages by whole-genome sequencing. **New microbes and new infections**, v. 9, n. November 2013, p. 58–62, 2016.
- MAOR-SHOSHANI, A et al. Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 2, p. 565–570, 2000.
- MARRERO, J.; WALDOR, M. K. Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer. **Developmental Cell**, v. 8, n. 6, p. 963–970, 1 jun. 2005.
- MARRERO, J.; WALDOR, M. K. The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3302–3305, 2007.
- MASŁOWSKA, K. H.; MAKIELA-DZBENSKA, K.; FIJALKOWSKA, I. J. The SOS System: A Complex and Tightly Regulated Response to DNA Damage. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 60, p. 368–384, 2019.
- MATA, C. et al. Prevalence of SXT/R391-like integrative and conjugative elements carrying *bla* CMY-2 in *Proteus mirabilis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 10, p.

2266–2270, 1 out. 2011.

MCKENZIE, G. J. et al. SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. **Molecular Cell**, v. 7, n. 3, p. 571–579, 2001.

MEAD, S. et al. Characterization of polVR391: A Y-family polymerase encoded by *rumA*'B from the IncJ conjugative transposon, R391. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 797–810, fev. 2007.

MICHEL, B. After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. **Plos Biol**, v. 3, n. 7, p. e255, 2005.

MILLER, J. H. Perspective on Mutagenesis and Repair: The Standard Model and Alternate Modes of Mutagenesis. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 155–179, 11 jan. 2005.

NAPOLITANO, R. et al. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. **The EMBO journal**, v. 19, n. 22, p. 6259–65, 15 jun. 2000.

NOHMI, T. Environmental Stress and Lesion-Bypass DNA Polymerases. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 231–253, 2006.

OHMORI, H. et al. The Y-family of DNA Polymerases. **Molecular Cell**, v. 8, n. 1, p. 7–8, 2001.

OLIVER, A. et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. **Science**, v. 288, n. 5469, p. 1251–1253, 2000.

PEARSON, M. M. et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 4027–4037, 2008.

PÉREZ-CAPILLA, T. et al. SOS-independent induction of *dinB* transcription by beta-lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 4, p. 1515–8, fev. 2005.

PERMINA, E. A.; MIRONOV, A. A.; GELFAND, M. S. Damage-repair error-prone polymerases of eubacteria: association with mobile genome elements. **Gene**, v. 293, n. 1–2, p. 133–140, 26 jun. 2002.

POULIN-LAPRADE, D.; BURRUS, V. A λ Cro-Like Repressor Is Essential for the Induction of Conjugative Transfer of SXT/R391 Elements in Response to DNA Damage. **Journal of bacteriology**, v. 197, n. 24, p. 3822–33, dez. 2015.

POULIN-LAPRADE, D.; CARRARO, N.; BURRUS, V. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 837, 2015.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 - Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.

RICE, L. B. Tn916 Family Conjugative Transposons and Dissemination of Antimicrobial Resistance Determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 1871–7, 1998.

RYAN, M. P.; SLATTERY, S.; PEMBROKE, J. T. A novel arsenate-resistant determinant

associated with ICEpMERPH, a member of the SXT/R391 group of mobile genetic elements. **Genes (Basel)**, v. 10, n. 12, p. 1048, 1 dez. 2019.

SALE, J. E.; LEHMANN, A. R.; WOODGATE, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 3, p. 141–52, 2012.

SATO, J. L. et al. Genomic Analysis of SXT/R391 Integrative Conjugative Elements From *Proteus mirabilis* Isolated in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 571472, 20 out. 2020.

SEDGWICK, S. G.; HO, C.; WOODGATE, R. Mutagenic DNA repair in enterobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 18, p. 5604–5611, set. 1991.

SIEBOR, E.; DE CURRAIZE, C.; NEUWIRTH, C. Genomic context of resistance genes within a French clinical MDR *Proteus mirabilis*: Identification of the novel genomic resistance island GIPmi1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1808–1811, 1 jul. 2018.

SULLIVAN, N. L. et al. The Complete Genome Sequence of *Proteus mirabilis* Strain BB2000 Reveals Differences from the *P. mirabilis* Reference Strain. **Genome announcements**, v. 1, n. 5, p. e00024-13, 5 set. 2013.

TAMBAYAH, P. A.; MAKI, D. G. Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic: A prospective study of 1497 catheterized patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 5, p. 678–682, 13 mar. 2000.

TATUSOVA, T. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 14, p. 6614–6624, 19 ago. 2016.

VAN MELDEREN, L. Toxin-antitoxin systems: Why so many, what for? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 781–785, 1 dez. 2010.

WAGNER, J. et al. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 4, n. 2, p. 281–286, 1999.

WALDOR, M. K.; TSCHÄPE, H.; MEKALANOS, J. J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4157–4165, 1996.

WANG, S. et al. Polymorphic mutation frequencies in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: the role of weak mutators in the development of fluoroquinolone resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 1, p. 13–7, 1 abr. 2013.

WARREN, J. W. et al. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. **Journal of Infectious Diseases**, v. 146, n. 6, p. 719–723, 1982.

WEI, Y. et al. An electroporation-free method based on Red recombineering for markerless deletion and genomic replacement in the *Escherichia coli* DH1 genome. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0186891, 1 out. 2017.

WENNER, J. J.; RETTGER, L. F. A Systematic Study of the *Proteus* Group of Bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 4, n. 4, p. 331–53, jul. 1919.

WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 1 jun. 2017.

- WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clinical microbiology and infection**, v. 13, n. 1, p. 5–18, 1 jan. 2007.
- WOZNIAK, R. A. F. et al. Comparative ICE Genomics: Insights into the Evolution of the SXT/R391 Family of ICEs. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000786, 24 dez. 2009.
- WOZNIAK, R. A. F. F.; WALDOR, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 552–563, 5 ago. 2010.
- WOZNIAK, R. A. F.; WALDOR, M. K. A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 3, p. e1000439, 27 mar. 2009.
- YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–227, 14 jun. 2012.
- YEISER, B. et al. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 13, p. 8737–41, 2002.
- ZAMARRO, M.; MARTÍN-MOLDES, Z.; DÍAZ, E. The ICE XTD of *Azoarcus sp.* CIB, an integrative and conjugative element with aerobic and anaerobic catabolic properties. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 12, p. 5018–5031, 1 dez. 2016.
- ZHAO, L.; TODD WASHINGTON, M. Translesion Synthesis: Insights into the Selection and Switching of DNA Polymerases. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 1, p. 24, 2017.