

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.

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.

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).

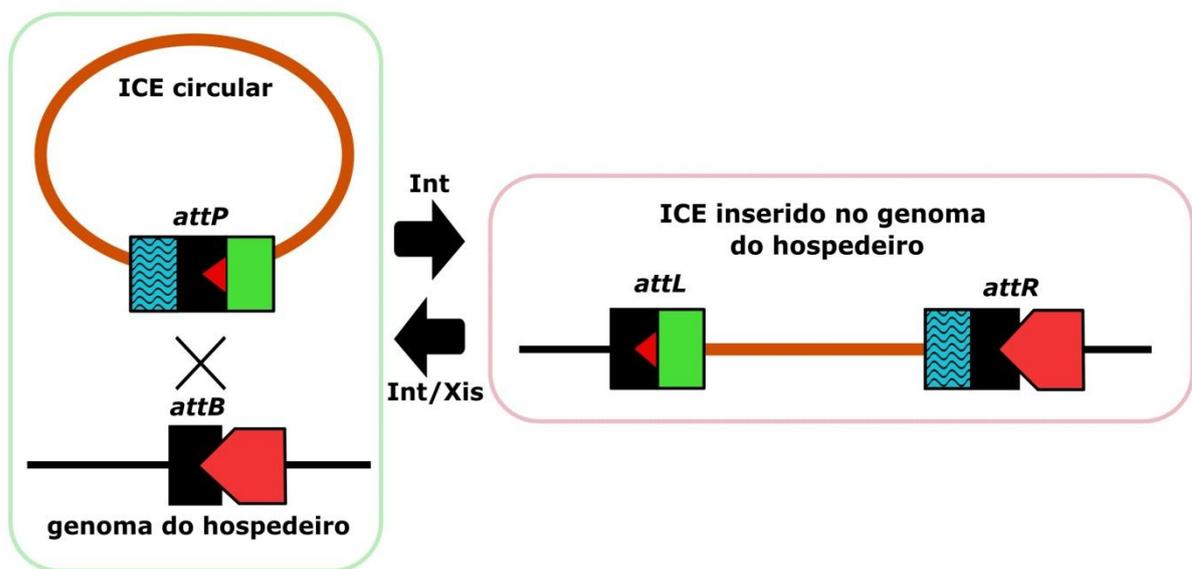


Figura 1 – Inserção sítio-específica de um ICE. As linhas pretas e laranjas representam a sequência do genoma e do ICE, respectivamente. Os sítios de ligação (*attP* e *attB*) estão representados pelos quadrados pretos. Uma integrase (Int) medeia a reação de recombinação entre o sítio *attP* do ICE e 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

Morganellaceae. Os tipos 2, 3 e 4 são todos inseridos na porção 3' do gene *tRNA-Ser*, e até o momento foram encontrados exclusivamente em isolados de *Vibrio sp.* de origem ambiental. Sendo assim, no presente trabalho focamos nos ICEs do tipo 1 desta família (BIOTEAU; DURAND; BURRUS, 2018; BURRUS; MARRERO; WALDOR, 2006; BURRUS; WALDOR, 2003; HOCHHUT; WALDOR, 1999; JOHNSON; GROSSMAN, 2015).

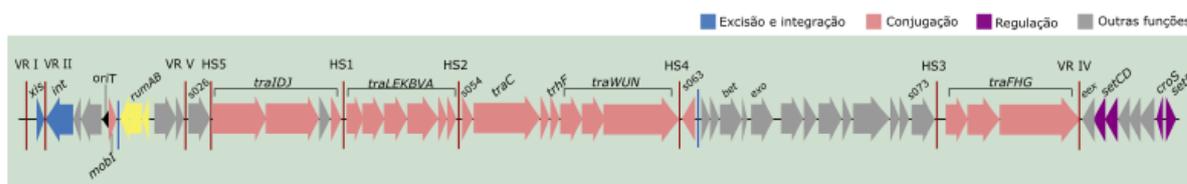


Figura 2 - Esquema da organização de genes encontrados nos ICEs da família SXT/R391 do tipo 1. Os genes envolvidos na excisão e integração estão em azul, os genes envolvidos na conjugação em rosa, os genes de regulação da expressão em roxo e os genes sem função conhecida em cinza. Em amarelo estão representados os genes *rumAB*, investigados neste estudo. As linhas vermelhas indicando as HSs constituem os *hotspots* e as VRs os *variable regions* onde podem ocorrer a inserção de variadas estruturas como, por exemplo, os genes determinantes de resistência a antimicrobianos. (SATO et al., 2020)

Na Figura 2 estão representados o conjunto de genes conservados entre os ICEs do tipo 1 da família SXT/R391. Destes, 43 genes são estritamente conservados, os quais estão listados na Tabela 1, e dentre eles estão os genes que medeiam o processo de transferência do ICE (que envolvem os processos de conjugação, de excisão e integração no genoma do hospedeiro), genes que regulam esse processo, além de outros genes que codificam proteínas de funções não caracterizadas ou não essenciais ao processo de transferência (BIOTEAU; DURAND; BURRUS, 2018; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

O tamanho dos ICEs SXT/R391 varia de acordo com o conteúdo de suas regiões variáveis, denominados *hotspots* (HS) e *Variable regions* (VR), que são as regiões do ICE que permitem a introdução, por exemplo, de cassetes de resistência a antimicrobianos. Os HSs são regiões em que são encontrados DNA variável em todos os ICEs identificados (HS1~HS5), enquanto as VRs são regiões em que podem ter ou não uma sequência inserida. Acredita-se que a ação de recombinases, transposons, e algumas sequências de inserção tenha um papel na introdução destas regiões variáveis, porém o mecanismo exato não está muito bem elucidado (BURRUS; WALDOR, 2004b; WOZNIAK et al., 2009).

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

Função	genes
Replicação por círculo rolante (conjugação)	<i>mobI; tral</i>
Translocação do ICE durante a conjugação	<i>traDJ</i>
Montagem do complexo de transferência (família T4SS)	<i>traLEKB; traVA; dsbC-traC-thrF-traWUN; traFHG;</i>
Módulo de regulação	<i>setCD; setR; 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; s093; s063; s089; s088; s068; s069; s092; s072; s083; 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).

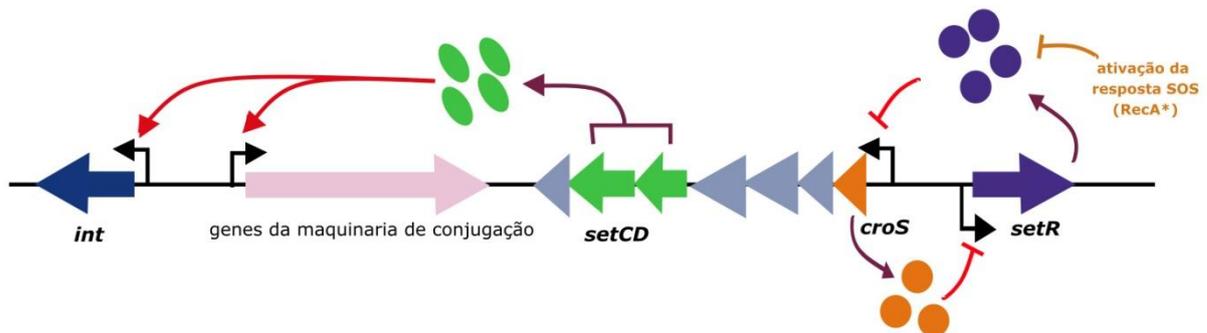


Figura 3 – Regulação da ativação da transferência do ICE. O repressor SetR sofre autoclivagem induzida por RecA* (associada à ativação da resposta SOS), permitindo a expressão dos ativadores SetCD, que por sua vez induzem a expressão dos genes relacionados ao processo de excisão do genoma do hospedeiro (*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 tigeciclina (*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).

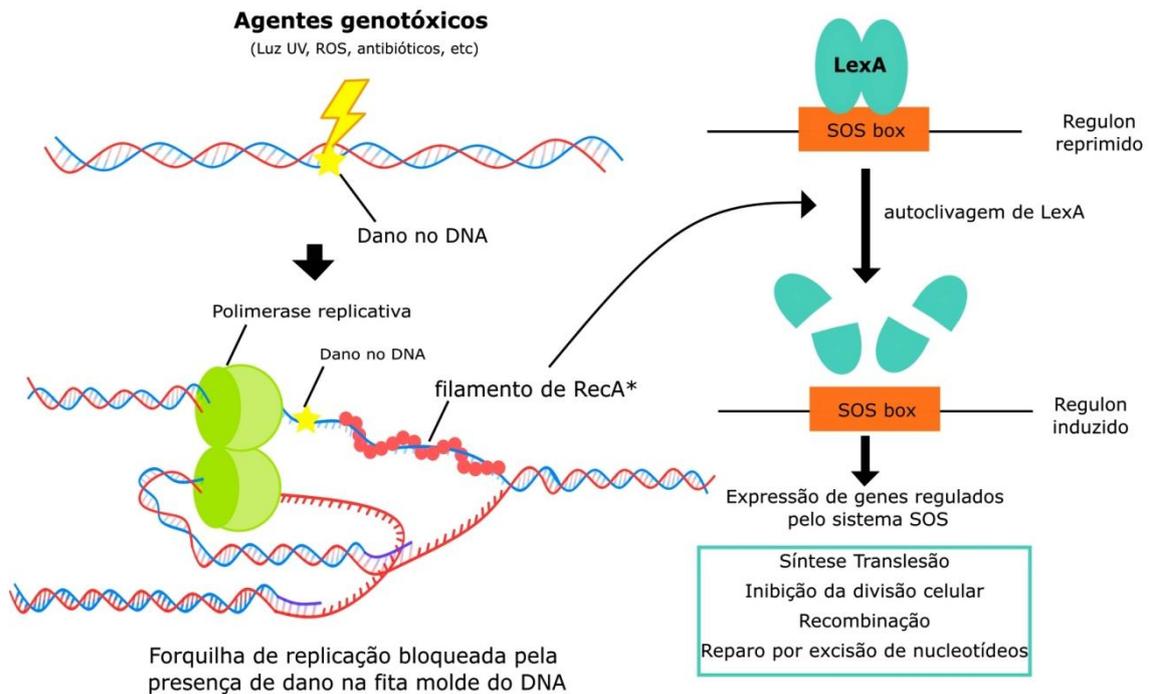


Figura 4 - Ativação do sistema SOS por danos no DNA. Diversos agentes genotóxicos causam danos no DNA, o que que leva à ativação da proteína RecA que se liga à fita simples de DNA que decorre de bloqueio da replicação, uma vez que a polimerase replicativa é incapaz de prosseguir a polimerização na presença 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. Consequentemente, 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).

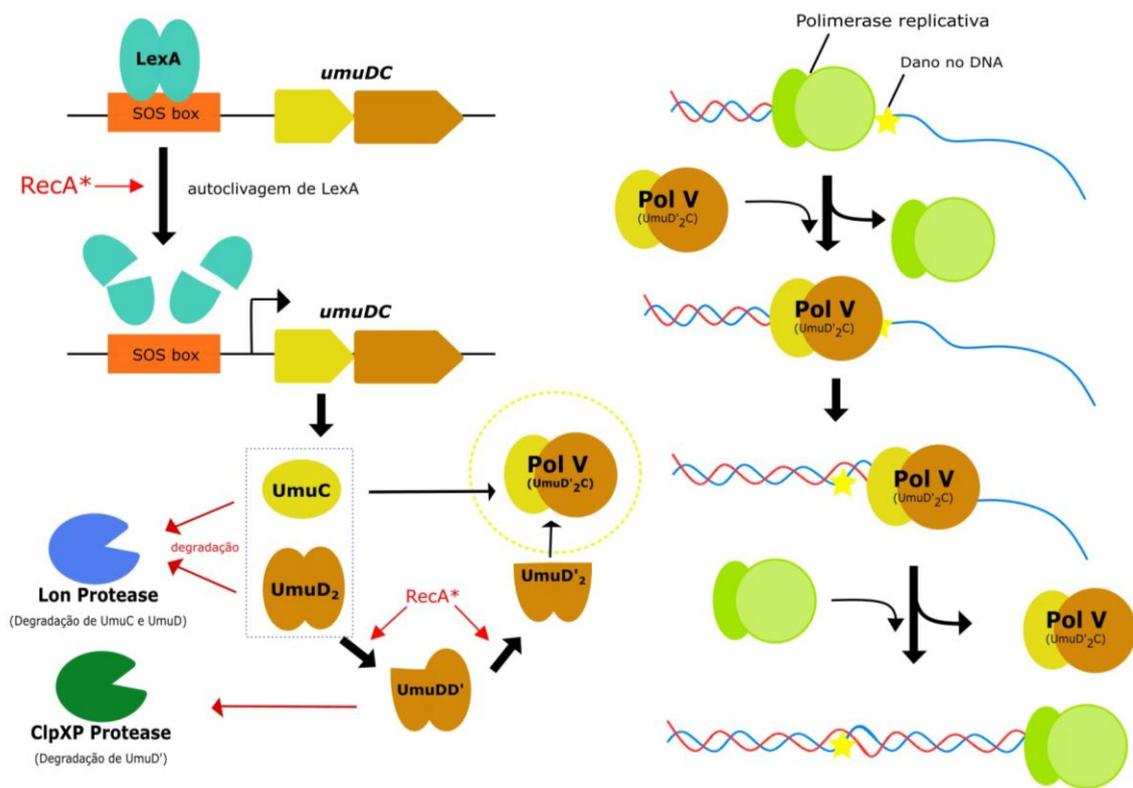


Figura 5 – Resposta SOS, regulação da expressão de Pol V e a síntese translesão. Os genes que codificam a Pol V estão sob repressão de LexA em condições normais, com a indução da resposta SOS, o RecA* induz a autoclivagem do repressor e permite a indução de polimerases translesão (*umuDC*, a Pol V em *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 (UmuD₂C-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.

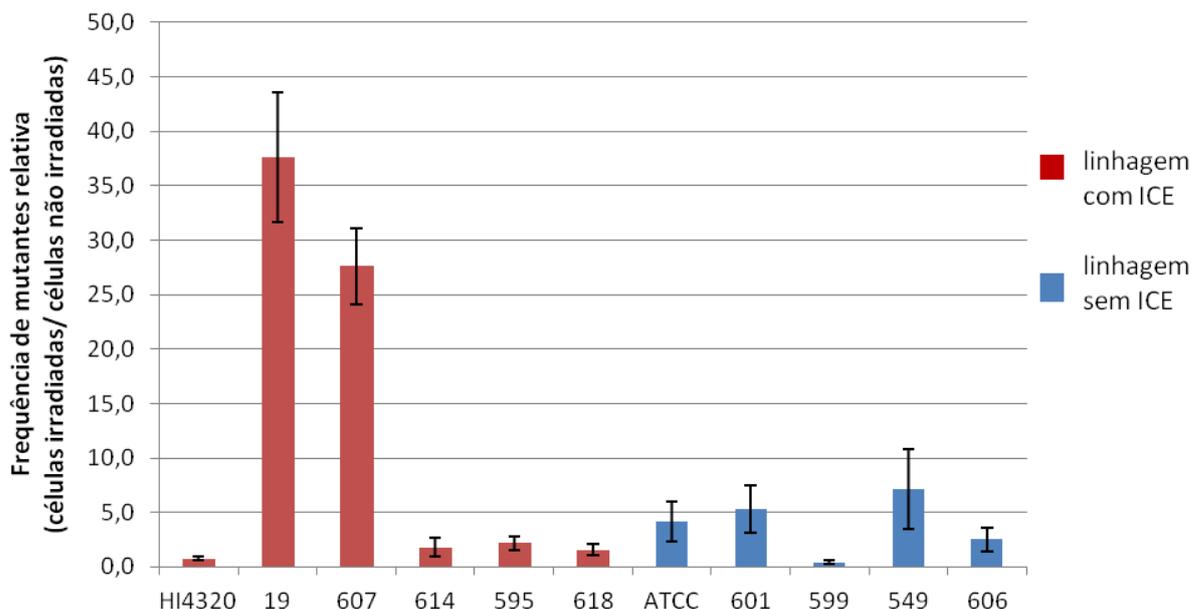


Figura 6 - Aumento relativo de frequência de mutação em diferentes isolados clínicos após irradiação com luz UV em comparação à frequência de mutação espontânea. Os dados representam a média de pelo menos três experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão.

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*.

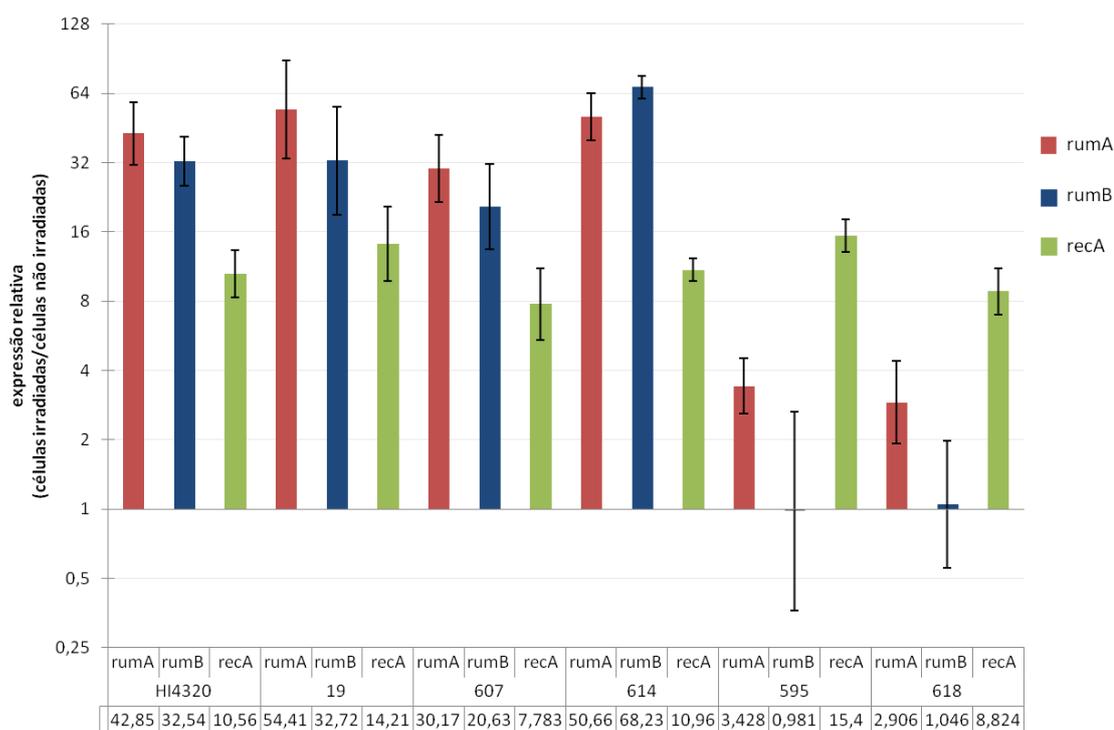


Figura 7 – Indução dos genes *rumAB* e *recA* após exposição à luz UV. Comparação dos níveis de expressão dos genes *rumAB* e *recA* (controle da indução da resposta SOS) de amostras irradiadas com 20 J/m² de UVC em comparação com amostras controle. Os números na parte inferior aos nomes das linhagens 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.

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 ICES_{t1}/ICES_{t3}. **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.

CHAUVEROCHE, 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 tigeicycline 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 blaNDM-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.

TAMBYAH, 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.