

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**MARCO ANTONIO DE LIMA NORONHA**

**Estudos da indução da resposta SOS por ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa***

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

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**MARCO ANTONIO DE LIMA NORONHA**

**Estudos da indução da resposta SOS por ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa***

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

Versão original.

São Paulo

2023

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)

de Lima Noronha, Marco Antonio  
Estudos da indução da resposta SOS por  
ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa* / Marco  
Antonio de Lima Noronha; orientador Rodrigo da  
Silva Galhardo. -- São Paulo, 2023.  
119 p.

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

1. Microbiologia. 2. Resposta SOS. 3.  
Mutagênese. 4. Resistência bacteriana a  
antimicrobianos. 5. Ciprofloxacina. I. da Silva  
Galhardo, Rodrigo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Marco Antonio de Lima Noronha

Título da Dissertação/Tese: Estudos da indução da resposta SOS por ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa*

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

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

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

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

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

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

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



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

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **877/2017** referente ao projeto intitulado: "**Estudos da indução da resposta SOS por ciprofloxacina em Pseudomonas aeruginosa**" sob a responsabilidade de **Marco Antonio de Lima Noronha** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Rodrigo da Silva Galhardo**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 18 de abril de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**  
Coordenador CEPSH ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo ao Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo, a quem eu devo toda minha jornada científica até aqui. Foram mais de 10 anos de muito aprendizado e ensinamentos que foram fundamentais para a minha formação e capacitação, e me sinto lisonjeado de ter sido através de um cientista tão competente e ético. Me sinto muito grato por poder trilhado esse caminho ao lado de alguém que prioriza a empatia e deseja somente o sucesso aos seus alunos.

Às agências de fomento federais, CAPES e CNPq, que financiam milhares de estudantes de pós-graduação no Brasil e contribuem imensamente com a produção científica no país. Ambas as agências apoiaram diretamente a produção deste trabalho pelo fornecimento de bolsa de pesquisa, sob o processo de número 140476/2020-2.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo.

Aos professores parceiros, Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilis Marques, Prof. Dr. Carlos Menck, Prof. Dr. Frederico Gueiros Filho e Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, pelas colaborações que foram essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e do Instituto de Ciências Biomédicas, que garantiram o bom funcionamento do nosso ambiente de trabalho. Em especial à Gisele e Renato, funcionários da secretaria de pós-graduação em Microbiologia, pela proatividade e disposição de auxiliar os alunos do programa em qualquer situação.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer e compartilhar a rotina do laboratório durante tantos anos. Os momentos de apoio incondicional que compartilhamos juntos serão levados comigo para sempre.

À toda a minha família por todo apoio e acolhimento, independente da situação. Mas em especial aos meus pais que me ensinaram valores inestimáveis, que sempre se esforçaram além do que podiam para prover tudo que seus filhos necessitavam e por terem sempre priorizado e valorizado a educação. A eles todo meu amor e apreciação.

Por último, à minha esposa, a pessoa mais importante em minha vida e que me mostrou que juntos podemos superar e conquistar tudo. Sem o seu auxílio e amor, eu nunca conseguiria chegar até aqui. Por ela meu amor é incondicional.

## RESUMO

LIMA-NORONHA, M. A. Estudos da indução da resposta SOS por ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa*. 2023. 119 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista considerado um grave problema de saúde pública devido à alta incidência de isolados clínicos que apresentam multirresistência. Diversos fatores podem favorecer o aparecimento de resistência em uma população bacteriana, porém a resposta SOS vem se destacando dentre estes mecanismos. Esta é uma resposta que controla genes diretamente envolvidos com a mutagênese e que podem ter sua atividade aumentada na presença de antimicrobianos, o que contribui para o surgimento de mutações que poderão ser selecionadas favorecendo o microrganismo em situações de estresse. Além disso, essa resposta está envolvida no controle de vários mecanismos de fundamental importância para a fisiologia bacteriana, tais como: reparo de DNA, recombinação homóloga, mecanismos de tolerância à danos e controle da divisão celular. Neste trabalho, realizamos uma varredura genética para identificação de genes que influenciam a indução da resposta SOS em *Pseudomonas aeruginosa*, analisando o comportamento de linhagens mutantes na presença da ciprofloxacina, um antimicrobiano capaz de ativar a resposta SOS eficientemente. A varredura foi realizada em uma biblioteca de mutantes por transposição com cerca de 9000 mutantes, dos quais 16 apresentaram alteração do fenótipo quanto a indução da resposta SOS e fomos capazes de identificar seu sítio de inserção identificando os genes interrompidos. Além disso, a fim de identificar o papel fisiológico de genes de função pouco estudada regulados pela resposta SOS, construímos linhagens mutantes dos genes PA2288, PA3008 (*sulA*) e PA3413 (*yebG*) e realizamos experimentos de análise fenotípica relacionadas a resposta SOS. O mutante  $\Delta$ PA2288 não apresentou alterações dos fenótipos de sensibilidade a agentes genotóxicos, enquanto o mutante  $\Delta$ PA3413 apresentou maior sensibilidade ao tratamento com agentes genotóxicos e ensaios de complementação confirmam a participação deste gene na geração desse fenótipo. O mutante  $\Delta$ *sulA* apresentou fenótipo de resistência a agentes genotóxicos em condições de exposição crônica, mas não apresentou diferença de fenótipo em um crescimento agudo provavelmente devido a um artefato de células serem incapazes de filamentar neste mutante. Além disso, em *P.*

*aeruginosa* o mutante  $\Delta sulA$  não apresenta diferenças nas taxas de mutação, diferente do observado em *E. coli*. Também foi realizado um sequenciamento de próxima geração para determinação de padrões de mutação do mutante  $\Delta sulA$ , que não fomos capazes de definir, porém encontramos três novos genes envolvidos na geração de resistência a fosfomicina que não haviam sido implicados nesse processo em *P. aeruginosa*, são eles: *glpR*, *yibO* e PA3001. Por fim, realizamos ensaios de visualização no microscópio para caracterizar o processo de filamentação celular promovido pelo gene *sulA*.

Palavras-chave: Microbiologia. Resposta SOS. Mutagênese. Resistência bacteriana a antimicrobianos. Ciprofloxacina.



## ABSTRACT

LIMA-NORONHA, M. A. Studies of SOS response induction by ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. 2023. 119 p. Thesis (Ph. D. thesis in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen considered a serious public health problem due to its high incidence of clinical isolates that presents multidrug resistance. Several factors may favor the emergence of resistance in a bacterial population, but the SOS response has been highlighted among these mechanisms. This is a response that controls genes directly involved in mutagenesis and that can have their activity increased in the presence of antimicrobials, which contributes to the emergence of mutations that can be selected favoring the microorganism in stress situations. In addition, this response is involved in the control of several mechanisms of fundamental importance for bacterial physiology, such as: DNA repair, homologous recombination, damage tolerance mechanisms and control of cell division. In this work, we carried out a genetic screening to identify genes that influence the induction of the SOS response in *Pseudomonas aeruginosa*, analyzing the behavior of mutant strains in the presence of ciprofloxacin, an antimicrobial capable of efficiently activate the SOS response. The screening was carried out in a library of transposition mutants with about 9000 mutants, 16 of which showed a phenotype change regarding the induction of the SOS response and we were able to identify their insertion site by identifying the interrupted genes. Furthermore, in order to identify the physiological role of poorly studied genes regulated by the SOS response, we constructed mutant strains of the PA2288, PA3008 (*sulA*) and PA3413 (*yebG*) genes and performed phenotypic analysis experiments related to the SOS response. The  $\Delta$ PA2288 mutant did not show changes in the sensitivity phenotypes to genotoxic agents, while the  $\Delta$ PA3413 mutant showed greater sensitivity to treatment with genotoxic agents and complementation assays confirm the participation of this gene in the generation of this phenotype. The  $\Delta$ *sulA* mutant showed resistance phenotype to genotoxic agents under conditions of chronic exposure but did not show phenotype differences in an acute growth, probably due to an artifact of cells being incapable of undergo filamentation in this mutant. Furthermore, in *P. aeruginosa*, the  $\Delta$ *sulA* mutant does not show differences in mutation rates, unlike what was observed in *E. coli*. Next-generation sequencing was also performed to determine the mutation patterns of the  $\Delta$ *sulA* mutant, which we were not able to define,

but we found three new genes involved in the generation of fosfomycin resistance that had not been previously implicated in this process in *P. aeruginosa*, they are: *glpR*, *yibO* and PA3001. Finally, we performed microscopic visualization assays to characterize the cellular filamentation process promoted by the *sulA* gene.

Keywords: Microbiology. SOS response. Mutagenesis. Antimicrobial bacterial resistance. Ciprofloxacin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de ativação da resposta SOS .....	21
Figura 2 – Efeito de concentrações subinibitórias de antimicrobianos .....	33
Figura 3 – Representação esquemática da varredura de biblioteca de transposon .....	40
Figura 4 – Confirmação fenotípica de mutantes pré-selecionados de uma biblioteca de mutantes por transposição .....	51
Figura 5 – Dinâmica da indução da resposta SOS com os promotores dos genes <i>recA</i> e <i>lexA</i> .....	53
Figura 6 – Esquema de um ensaio utilizado para o cálculo do valor de Z' .....	56
Figura 7 – Confirmação fenotípica dos mutantes da biblioteca de transposon .....	61
Figura 8 – Padronização dos níveis de indução da resposta SOS de acordo com a CIM .....	64
Figura 9 – Deleção dos genes PA2288, PA3008 ( <i>sulA</i> ) e PA3413 ( <i>yebG</i> ) .....	70
Figura 10 – Ensaio de sensibilidade à agentes genotóxicos .....	72
Figura 11 – Análise da expressão de <i>recA</i> e <i>lexA</i> em células não expostas a agentes genotóxicos .....	74
Figura 12 – Ensaio de sensibilidade à MMS durante tratamento agudo .....	75
Figura 13 – Ensaio de sobrevivência à ciprofloxacina .....	77
Figura 14 – Ensaio de complementação da linhagem $\Delta$ PA3413 .....	78
Figura 15 – Ensaio de mutagênese induzida por ciprofloxacina .....	79
Figura 16 – Ensaio de mutagênese induzida por ciprofloxacina .....	80
Figura 17 – Microscopia de contraste de fase mostrando a filamentação em células tratadas com 0,5 x MIC de ciprofloxacina por 2 horas .....	85
Figura 18 – Microscopia de fluorescência mostrando a filamentação em células tratadas com 0,5 x MIC de ciprofloxacina por 2 horas .....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de genes da resposta SOS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e sua função na célula bacteriana .....	27
Tabela 2 – Lista de cepas utilizadas neste trabalho .....	36
Tabela 3 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho .....	41
Tabela 4 – Lista de vetores utilizados para a realização deste trabalho e suas características .....	42
Tabela 5 – Definição da concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacina .....	51
Tabela 6 – Lista dos mutantes pré-selecionados a partir da varredura genética da biblioteca de mutantes por transposon .....	58
Tabela 7 – Lista dos 20 mutantes selecionados pela varredura genética .....	62
Tabela 8 – Lista dos 16 mutantes finais selecionados pela varredura genética .....	65
Tabela 9 – Lista de genes que conferem resistência a fosfomicina em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – adenosina difosfato
- AIR – 5-aminoimidazol
- ATCase – aspartato carbamoiltransferase
- ATP – adenosina trifosfato
- BER – reparo por excisão de bases (*base excision repair*)
- CAIR – 5'-fosforribosil-4-carboxi-5-aminoimidazol
- cAMP-CRP – proteína receptora de AMP cíclico
- c-di-GMP – diguanilato cíclico
- CTD – domínio carboxi-terminal (*carboxy-terminal domain*)
- cDNA – DNA complementar
- Carb – carbenicilina
- CIM – concentração inibitória mínima
- Cis – cisplatina
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
- DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol
- DEPC – dietil pirocarbonato
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DNAfs – DNA de fita simples
- DNAfd – DNA de fita dupla
- DO<sub>600</sub> – densidade ótica por absorbância de luz 600 nm
- dTMP – deoxitimidina monofosfato
- EROs – espécies reativas de oxigênio
- Fos – fosfomicina
- Gm – gentamicina
- HI – índice de heterologia (do inglês *heterology index*)
- ICE – elemento conjugativo e integrativo (*integrative and conjugative elements*)
- IPTG - isopropil β-d-1-tiogalactopiranósido
- LB – caldo lisogêncio (*lysogenic broth*)
- MH – meio Müller-Hinton
- MMR – reparo de bases mal pareadas (*mismatch repair*)

MMS – metanossulfonato de metila  
NDT – domínio amino-terminal (*N-terminal domain*)  
NGS – sequenciamento de próxima geração (*next-generation sequencing*)  
NER – reparo por excisão de nucleotídeo (*nucleotide excision repair*)  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ORF – quadro aberto de leitura (*open reading frame*)  
PABA – 4-aminobenzoato  
PAL – fenilpropanóide  
PBS – tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline*)  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
Pol – polimerase  
qRT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real  
Rif – rifampicina  
RNA – ácido ribonucleico  
RBS – sítio de ligação do ribossomo (*ribosome-binding site*)  
Sac – sacarose  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
sub-CIM – concentração subinibitória  
TLS – síntese translesão (*translesion synthesis*)  
Tet – tetraciclina  
T3SS – sistema de secreção tipo III (*type III secretion system*)  
T6SS – sistema de secreção tipo VI (*type VI secretion system*)  
UFC – unidade formadora de colônia  
UV – luz ultravioleta  
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
1.2 A resposta SOS e os mecanismos de mutagênese .....	18
1.3 O regulon SOS em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
1.4 Repressores da superfamília de LexA .....	30
1.5 A mutagênese e o surgimento de resistência a antimicrobianos .....	31
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1 Cultivo e manutenção de bactérias .....	36
3.2 Determinação da concentração inibitória mínima .....	37
3.3 Teste de sensibilidade a agentes genotóxicos .....	37
3.4 Mutagênese induzida por ciprofloxacina .....	38
3.5 Varredura de biblioteca de transposons .....	39
3.6 Técnicas de biologia molecular .....	40
3.7 Construção de linhagens mutantes .....	40
3.8 Complementação de linhagens mutantes .....	43
3.9 Identificação de mutantes da biblioteca de transposons .....	43
3.10 Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger .....	44
3.11 Sequenciamento de nova geração e análise bioinformática .....	44
3.12 Extração de RNA por Trizol .....	45
3.13 Conversão de RNA em cDNA .....	45
3.14 qRT-PCR .....	46
3.15 Microscopia .....	46
<b>4 RESULTADOS</b> .....	48
4.1 Estabelecimento de varredura genética para identificação de genes que alteram a indução da resposta SOS .....	48
4.1.1 Metodologias previamente estabelecidas .....	48
4.1.2 Estabelecimento de metodologia utilizando o parâmetro Z' .....	55
4.1.3 Varredura genética em biblioteca de mutantes por transposição .....	57
4.2 Caracterização funcional de genes regulados pela resposta SOS .....	66
4.2.1 Construção de linhagens mutantes .....	66
4.2.2 Análise fenotípica das linhagens mutantes .....	71
4.2.3 Mutagênese induzida por ciprofloxacina .....	79
4.2.4 Caracterização do padrão de mutações na linhagem $\Delta$ suIA .....	81
4.2.5 Análise da filamentação em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	83
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	88
5.1 Estabelecimento de varredura genética para identificação de genes que alteram a indução da resposta SOS .....	88
5.2 Caracterização funcional de genes regulados pela resposta SOS .....	96
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	100
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa encontrada em diversos ambientes, como o solo, água e matéria orgânica, sendo assim considerada uma espécie ubíqua (HARDALO; EDBERG, 1997).

É uma espécie que pertence ao filo Pseudomonadota, que antes da recente reclassificação de filos fazia parte do grupo das Proteobacteria, ao lado de importantes patógenos como *Escherichia* e *Salmonella*. Essa espécie faz parte da classe Gammaproteobacteria, o táxon de procariotos mais diversificado em gêneros, contando com cerca de 250 gêneros (GARRITY; BELL; LILBURN, 2015; OREN et al., 2021; PARKER; TINDALL; GARRITY, 2019).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bacilos móveis com exigência nutricional simples, uma grande variabilidade metabólica e que combinadas à presença de resistência intrínseca a diversos antimicrobianos e antissépticos garantem a sua ampla distribuição ambiental. Tal resistência intrínseca se dá ao fato de populações de *P. aeruginosa* possuírem a capacidade de formação de biofilmes, tanto em superfícies abióticas quanto bióticas, dificultando a difusão de antibióticos na área colonizada e contribuindo para a sua fixação no ambiente (ABDALLAH et al., 2014; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; MICHEL-BRIAND; BAYSSE, 2002; MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2015; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; RYBTKE et al., 2015; TAYLOR; YEUNG; HANCOCK, 2014; TURNBULL et al., 2016).

É uma espécie bacteriana conhecida por ser um patógeno oportunista de grande importância clínica, comumente encontrada em ambientes hospitalares, e é uma das principais causas de infecções nosocomiais. Este importante patógeno acomete principalmente indivíduos que estão sob tratamento prolongado com antimicrobianos de amplo espectro que suprimem a microbiota normal ou indivíduos imunocomprometidos, que possuem maior susceptibilidade à patógenos. Por esta razão, esse patógeno é frequentemente associado a infecções de pacientes que se encontram nas Unidades de Tratamento Intensivo. Certas condições aumentam a predisposição dos pacientes de contrair a infecção, como é o caso da fibrose cística. Além disso, pode estar associado a infecções do trato urinário, infecções gastrointestinais, dermatites, endocardites e infecções sistêmicas (FOLKESSON et



al., 2012; GOVAN; DERETIC, 1996; LYCZAK; CANNON; PIER, 2002; OLIVER et al., 2000a; STEFANI et al., 2017; VINCENT, 2003).

Os indivíduos acometidos com fibrose cística apresentam um quadro em que seus pulmões são frequentemente acometidos por processos inflamatórios, o que contribui para a geração de um ambiente propício para a propagação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Esses pacientes fazem uso prolongado de antimicrobianos, o que faz com que as cepas patogênicas estejam sob constante pressão seletiva, favorecendo assim o surgimento de linhagens multirresistentes (DAVIES et al., 2003; JONES et al., 2001; LEE; JONES, 2018; PEDERSEN et al., 1986).

As cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* vem sendo cada vez mais frequentemente isoladas, tornando-as um importante problema de saúde pública. O surgimento de tais cepas tem origem no uso inadequado de antimicrobianos que acabam por selecionar linhagens que contenham características que favoreçam a resistência. O mecanismo de obtenção de resistência pode estar associado à seleção de cepas que contêm uma mutação em genes cromossômicos, que são originadas de processos de mutagênese, o que é exemplificado pela grande incidência de cepas com fenótipo mutador em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de pacientes com fibrose cística. Tais cepas possuem defeitos nos sistemas de reparo de DNA, o que contribui para o surgimento de mutações em seu cromossomo que favorecem a seleção de mutações que promovem resistência (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; MAGIORAKOS et al., 2012; OLIVER et al., 2000a).

Além do fenótipo mutador decorrente de defeitos em mecanismos de reparo de DNA, tem sido observado que as células bacterianas possuem mecanismos genéticos capazes de elevar transientemente as taxas de mutação. A resposta SOS vem recebendo cada vez mais atenção como um destes mecanismos genéticos, por conter um componente mutagênico dependente de DNA polimerases de baixa fidelidade, o que contribuiu para geração mutações e, assim, o surgimento de resistência microbiana (GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de prioridade para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos contra patógenos humanos, um catálogo com 12 famílias bacterianas que apresentam maior risco para a saúde humana na atualidade. Essa lista destaca particularmente a ameaça de bactérias Gram-negativas que são resistentes a múltiplos antibióticos,

incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, que são os melhores antibióticos para o tratamento de bactérias multirresistentes atualmente. Essas bactérias têm uma capacidade intrínseca de encontrar novas maneiras de resistir ao tratamento antimicrobiano e podem transmitir material genético para propagar a resistência a outras bactérias. Esse grupo, considerado crítico, é composto por diversas famílias como: *Acinetobacter*, várias *Enterobacteriaceae* (incluindo *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* e *Proteus*) e *Pseudomonas* (TACCONELLI et al., 2018; “WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed”, 2017).

A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada neste trabalho, denominada PAO1, é um isolado clínico de uma infecção causada em um ferimento de pele. Essa linhagem possui um genoma de 6,3 milhões de pares de base, contendo 5570 quadros de leitura aberta (ORF, do inglês *open read frame*). Essa linhagem vem sendo utilizada por décadas em diferentes grupos de pesquisa ao redor do globo, o que contribuiu para que uma grande quantidade de dados fosse gerada a partir de estudos desse organismo. É importante salientar que um estudo realizado em 2010 encontrou uma grande diversidade genética entre diferentes cepas de PAO1 de diferentes grupos de pesquisa, o que indicou que esse patógeno continua em constante evolução, mesmo em ambientes controlados de um laboratório de pesquisa (KLOCKGETHER et al., 2010; STOVER et al., 2000).

Dentre as principais variações no genótipo de linhagens de PAO1 é importante destacar as mutações encontradas nos genes *mexS*, *mexT* e *mexEF-oprN*, que estão relacionados a reguladores de sistemas de efluxo e podem interferir na concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos, evidenciando que cuidados extras devem ser adotados para certificar-se de obter dados reprodutíveis. Além disso, alterações em genes relacionados ao reparo de DNA também foram identificadas em algumas linhagens, como no cassete de mutagênese *imuABC*, o que levou a uma redução na frequência de mutação espontânea e induzida da linhagem (CHANDLER et al., 2019; KLOCKGETHER et al., 2010; SIDORENKO; JATSENKO; KIVISAAR, 2017).

## 1.2 A resposta SOS e os mecanismos de mutagênese

A resposta SOS, um mecanismo celular desencadeado por agentes que perturbam a integridade do DNA em procariotos, ajuda as células a sobreviverem a situações estressantes porque danos não reparados no DNA podem levar a mutações deletérias e até mesmo à morte celular. O ambiente em que as bactérias se encontram contém compostos químicos e agentes físicos que poderão causar danos a molécula de DNA destes organismos. Como exemplo de compostos químicos podemos citar os agentes alquilantes, já para os agentes físicos, a luz ultravioleta (UV) e a radiação ionizante se encontram entre os principais causadores de danos no DNA. Contudo, as ameaças que uma célula precisa lidar também podem ser endógenas, uma vez que danos no DNA também podem ser gerados por subprodutos metabólicos e espécies reativas de oxigênio (EROs) (FRIEDBERG et al., 2005).

O estudo de Miroslav Radman sobre danos no DNA e interrupção da replicação em *Escherichia coli* usou o sinal de perigo "SOS" para definir como as células bacterianas percebem a instabilidade genômica. Esse fenômeno desencadeia uma via de resposta fisiológica a condições adversas, culminando principalmente em vias de reparo de DNA, tolerância a danos e mutagênese. Dentre as vias de reparo de DNA, destacam-se os mecanismos de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*), fotorreativação e recombinação homóloga. Já a via de tolerância a danos conta com a síntese translesão (TLS, do inglês *translesion synthesis*). Apesar da indução de vias que promovem a integridade do DNA de maneira livre de erros, também estão envolvidos nessa resposta elementos propensos a erros que são responsáveis pelo aumento da sobrevivência celular em detrimento de apresentar taxas de mutação elevadas na presença de danos graves. Como a resposta SOS possui a habilidade de promover mutações, sua regulação é bastante estrita e é realizada pelas proteínas LexA e RecA (ERILL et al., 2006; HENRIKUS; VAN OIJEN; ROBINSON, 2018; LIMA-NORONHA et al., 2022; RADMAN, 1975).

A resposta SOS é induzida por DNA de fita simples (DNAs) que estão presentes na célula devido aos eventos de replicação ou reparo do DNA contendo lesões. De maneira resumida essa resposta é regulada pelas proteínas LexA e RecA, na qual a primeira desempenha um papel de repressor transcricional ao se ligar na região promotora dos genes regulados por esse regulon, e o último funciona como um

regulador positivo do sistema (AKSENOV, 1999; LITTLE, 1991; LITTLE et al., 1980; LITTLE; GELLERT, 1983; SASSANFAR; ROBERTS, 1990).

Os genes da resposta SOS são controlados através da regulação transcricional promovida pela proteína LexA, que se liga a sequência operadora presente no promotor desses genes, conhecida como *SOS box*, e impede a ligação da RNA polimerase e a transcrição gênica. LexA é uma proteína repressora na forma de dímero, apresentando dois domínios associados por um conector peptídico: o domínio que é capaz de se ligar ao DNA e que está localizado na região amino-terminal (NTD); e o domínio serina-protease presente na região carboxi-terminal (CTD). O domínio CTD é quem exerce a função da homodimerização de LexA (BERG, 1988; WALKER, 1984; ZHANG; PIGLI; RICE, 2010).

O repressor LexA se auto-cliva sob condições que induzem a resposta SOS. Em *E. coli*, LexA perde sua função repressora ao se clivar na ligação peptídica entre Ala84-Gly85 próximo a região central da proteína, que é promovida por um domínio catalítico serina-lisina conservado. Estudos estruturais em *E. coli* mostraram que o domínio CTD pode ser encontrado com duas conformações distintas: uma conformação basal que não é capaz de realizar a auto-clivagem e uma conformação ativa que é capaz de promover essa clivagem. A interação da proteína RecA ativada (RecA\*), *in vivo*, com LexA irá estimular sua auto-clivagem (LITTLE, 1991; LITTLE et al., 1980; LUO et al., 2001; SLILATY; RUPLEY; LITTLE, 1986).

A proteína RecA é uma peça central no reparo de DNA, já que participa na indução da resposta SOS, recombinação homóloga e a síntese translesão. Na ausência de ATP, RecA é encontrada como monômeros capazes de se associar ao DNAs, desempenhando assim um papel de proteção da fita de DNA contra a degradação, mas permanecendo em uma conformação funcionalmente inativa. Na presença de moléculas de ATP, o complexo RecA-DNAs assume a sua conformação funcionalmente ativa: o filamento de nucleoproteína RecA\*, um arranjo que atua como uma co-protease capaz de induzir a auto-clivagem de LexA (COX, 2007; YU; EGELMAN, 1992).

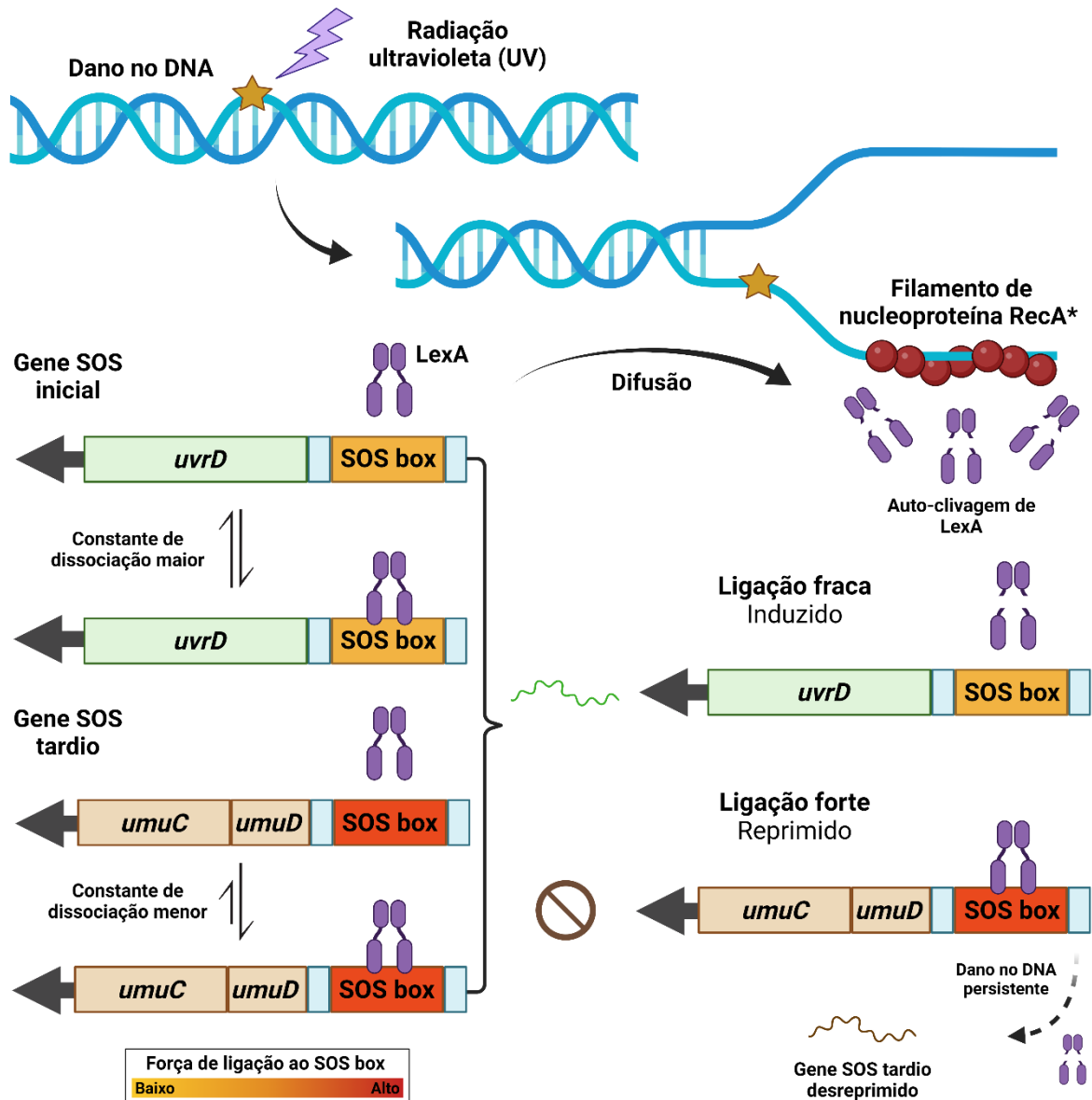
Dentre as funções dessa estrutura, está a promoção de recombinação homóloga ao realizar a busca por DNA de fita dupla (DNAsd) homólogo. A indução da auto-clivagem de LexA promovida por RecA\* expõe resíduos previamente inacessíveis, facilitando a degradação proteolítica de ambos fragmentos. Uma vez que os níveis da proteína LexA começam a diminuir, a expressão de genes da resposta

SOS é acionada (LITTLE; MOUNT, 1982; NEHER et al., 2003; TSANG; CHOW; RADDING, 1985).

A maioria dos achados relacionados a regulação e dinâmica da resposta SOS foram feitos utilizando o organismo modelo *E. coli*. Quando ocorrem quebras na fita de DNA ou outros tipos de danos surgem na célula, monômeros de RecA rapidamente se associam com DNAs assumindo sua forma ativa (RecA\*), induzindo a auto-clivagem de LexA que leva a sua dissociação dos promotores regulados pela resposta SOS, deste modo aliviando a repressão do regulon SOS (Figura 1). Um aspecto importante da dinâmica da resposta SOS é que o próprio gene *lexA* pertence a aqueles regulados pela resposta SOS, assim gerando uma alça de *feedback* negativo para reestabelecer a repressão após cessar o sinal indutor. Além disso, LexA é constantemente expresso durante a fase tardia da resposta SOS para garantir que a indução da resposta SOS seja interrompida quando o sinal de perigo terminar e a degradação de LexA não for mais favorecida (WALKER, 1984).

A dinâmica da resposta SOS pode ser modificada pela interação dos filamentos de RecA com proteínas que irão regular o tempo de indução e recuperação da resposta. O inibidor de RecA é a proteína RecX, que em baixas concentrações pode suprimir várias funções de RecA e bloquear a sua polimerização, levando ao desmantelamento do filamento (DREES et al., 2004; LUSETTI et al., 2004; RAGONE et al., 2008; STOHL et al., 2003).

A resposta é orquestrada de acordo com várias variáveis, incluindo a extensão dos danos causados a molécula de DNA e o tempo que passou após o dano ter sido identificado. A regulação ocorre de maneira que diferentes genes regulados pelo SOS apresentam diferentes tempos e níveis de indução. Genes de reparo livres de erro e genes de manutenção compõem a fase inicial da resposta, como genes de recombinação homóloga e reparo do tipo NER. O inibidor da divisão celular, chamado SulA, permite que a célula bacteriana complete o reparo de DNA antes de finalizar a sua divisão. Finalmente, se o dano foi severo e permanece sem reparo, polimerases de síntese translesão são expressas levando a uma elevação da mutagênese, mas permitindo que a replicação se resolva, aumentando assim a sobrevivência celular. É importante destacar que a auto-clivagem de LexA mediada por RecA ocorre quando LexA está livre e não quando está ligada ao seu DNA alvo (BUTALA et al., 2011; COURCELLE et al., 2001a; HENRIKUS; VAN OIJEN; ROBINSON, 2018; KOVAČIČ et al., 2013; QUILLARDET; ROUFFAUD; BOUIGE, 2003).



**Figura 1** - Modelo de ativação da resposta SOS. Danos no DNA persistentes irão causar um bloqueio na replicação do DNA, o que irá expor DNAs na célula. A associação de DNAs com a proteína RecA, irá promover a formação de sua forma ativa: o filamento de nucleoproteína RecA\*. Tal estrutura promove a indução da auto-clivagem de LexA, liberando a transcrição de genes regulados pela resposta SOS. O repressor LexA apresenta uma dinâmica de ligação/dissociação com sequência em que se liga, e sua clivagem só ocorre quando não está ligada ao DNA. Note que uma SOS box mais forte gera uma constante de dissociação de LexA mais baixa, implicando que nessas condições, LexA provavelmente estará associado ao DNA e reprimindo seu alvo. Assim sendo, a expressão de determinado gene é controlada pela força da SOS box: quanto menor a força do operador, mais cedo um gene será expresso. Criado com BioRender.com, adaptado de Lima-Noronha 2022 (LIMA-NORONHA et al., 2022).

Em *E. coli*, a força de diferentes SOS boxes altera a cinética da indução dos genes SOS (Figura 1). É comum que a sequência consenso demonstre uma maior afinidade para ligação de LexA, já que sua sequência é um palíndromo e ideal para a

associação de LexA: TACTG(TA)<sub>5</sub>CAGTA. Modificações em sua sequência irão alterar a afinidade de LexA para determinado promotor. Como demonstrado em *Escherichia coli* e em *Salmonella entérica*, existe um parâmetro que quantifica a diferença de uma SOS box para a sequência consenso, este é chamado de índice de heterologia (HI, do inglês *heterology index*). Quanto maior o valor de HI, menor a afinidade de LexA para dado promotor. Tal característica reforça o pensamento de que a afinidade de LexA é fator determinante na dinâmica da resposta, já que uma menor afinidade implica em uma expressão gênica antecipada, conseqüentemente modulando a dinâmica de expressão de genes que são expressos mais cedo ou mais tardiamente na resposta SOS (FERNÁNDEZ DE HENESTROSA et al., 2000; LEWIS et al., 1994; MÉRIDA-FLORIANO; ROWE; CASADESÚS, 2021).

A resposta SOS tem papel fundamental na mutagênese dos procariontes, podendo ser considerada como um fator de evolução entre os organismos, já que mutações são a matéria prima da evolução. O fator mutagênico da resposta é altamente dependente de DNA polimerases que tem sua atividade aumentada quando a resposta SOS é ativada. Essas são as polimerases de síntese translesão (TLS), que são recrutadas quando há danos no DNA. Em resumo, essa via de tolerância a danos no DNA recruta DNA polimerases especializadas para sítios de bloqueio da replicação causados por lesões no DNA, onde irá promover o *bypass* das lesões evitando a morte celular. Entretanto, a síntese translesão é frequentemente mutagênica, dada a natureza propensa a erro desta classe de DNA polimerases (FUCHS; FUJII, 2013; OHMORI et al., 2001).

Todos os organismos vivos são dependentes de DNA polimerases para replicar eficientemente o seu material genético, entretanto danos no DNA podem causar bloqueios na forquilha de replicação e a indução da resposta SOS, uma situação que pode ser contornada pelas polimerases TLS. Essas polimerases não possuem atividade de exonuclease 5' – 3' revisora e por isso são propensas à erro, levando a incorporação de nucleotídeos incorretos. Entretanto, a presença de um sítio ativo flexível e um domínio *little finger* adicional nessas enzimas as permitem realizar a TLS utilizando DNA danificado como molde, o que permite a resolução da replicação. Esse é um mecanismo essencial para a sobrevivência de bactérias em condições de estresse, porém é potencialmente prejudicial devido a geração de mutações deletérias, mostrando a necessidade de uma regulação robusta para a indução dessa via. Em contrapartida, este mecanismo pode promover a evolução bacteriana e gerar

diversidade em decorrência do seu componente mutagênico. Inclusive, novos estudos indicam que células de *E. coli* podem se valer da via de TLS como a principal alternativa para lidar com bloqueios da forquilha de replicação no lugar de vias de reparo de DNA livres de erro, favorecendo a geração de variabilidade genética (BOUDSOCQ et al., 2004; FRIEDBERG et al., 2005; GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007; GOODMAN; WOODGATE, 2014; NAIMAN et al., 2014; ZHANG, 2020).

São três as polimerases reguladas por LexA envolvidas no processo de mutagênese em *E. coli*: Pol II (*polB*), Pol IV (*dinB*) e Pol V (*umuDC*). A indução de *polB* e *dinB* ocorre na fase inicial da resposta SOS, que está relacionada a uma fraca ligação de LexA nos seus promotores. Essas polimerases são responsáveis pela via de TLS para danos no DNA específicos, ao contrário de *umuDC* que é a polimerase mais propensa a inserir erros, porém com maior capacidade de passar por um conjunto mais diverso de lesões no DNA, sendo utilizada como um último recurso e estando sob rigorosa regulação gênica (FERNÁNDEZ DE HENESTROSA et al., 2000; NAPOLITANO, 2000; SOMMER; BAILONE; DEVORET, 1993).

Pol II (*polB*) é uma enzima da família B de DNA polimerases, que teve sua função TLS revelada anos após sua primeira caracterização por Knippers (1970), sendo a principal enzima que passa por lesões abásicas e com baixo envolvimento na mutagênese. UmuC e DinB são membros da família Y de DNA polimerases, que inclui várias enzimas de bactérias, arqueias e eucariotos (BONNER et al., 1988; JAROSZ et al., 2007; KNIPPERS, 1970; OHMORI et al., 2001).

Apesar de uma função para DinB na tolerância a danos no DNA não ter sido identificada com base nos fenótipos de uma cepa mutante de *dinB*, a função dessa proteína vem sendo atribuída na tolerância a alguns tipos de danos, especialmente adutos na posição N<sub>2</sub> de guaninas e lesões causadas por agentes alquilantes. A superexpressão de *dinB* é fortemente mutagênica para *E. coli*, introduzindo principalmente mudanças no quadro de leitura por deleções de uma base em sequências G:C. O mesmo é observado *in vitro* com ensaios de *gap filling* utilizando o gene *lacZ* como alvo (BJEDOV et al., 2007; JAROSZ et al., 2006; KIM et al., 1997, 2001; KOBAYASHI et al., 2002).

DinB de *E. coli* promove a TLS através adutos na posição N<sub>2</sub> de guaninas com uma alta eficiência e precisão. Dados genéticos indicam que em cepas deficientes em reparo e que acumulam dano alquilante endógeno, ocorre TLS livre de erro promovido



por DinB. Por último, *dinB* desempenha um papel no processo de mutagênese induzida por estresse em células que não estão em crescimento (BJEDOV et al., 2007; GALHARDO et al., 2009; JAROSZ et al., 2007; MCKENZIE et al., 2001).

A Pol V (*umuDC*) apresenta altas taxas de mutação, e é considerada a polimerase TLS mais relevante devido a sua capacidade de promover o *bypass* de diversos tipos de lesões no DNA. Talvez por isso, esta é a polimerase TLS mais estudada, com ortólogos identificados em diversos procariotos e elementos genéticos móveis, como os homólogos *mucAB* descritos em plasmídeos e *rumAB* em elementos integrativos e conjugativos (ICEs) (GOODMAN; WOODGATE, 2014; KULAEVA et al., 1995; PERRY; WALKER, 1982; VAISMAN; MCDONALD; WOODGATE, 2012).

A proteína RecA também participa da complexa regulação de Pol V, uma que é requerida para o mecanismo de processamento de UmuD, de forma parecida ao que ocorre com LexA. RecA\* irá induzir a auto-clivagem de UmuD em UmuD', levando a formação de um complexo proteico composto por UmuC – UmuD'2C que é chamado de Pol V. RecA parece ainda exercer mais uma função na mutagênese SOS dependente da Pol V, como demonstrado por estudos genéticos recentes. Experimentos *in vitro* têm mostrado que RecA ligado ao DNAfs é necessário para a mutagênese, com modelos mais recentes sugerindo que o complexo mutassomo, que atua na via da TLS, é um conjunto molecular formado de UmuD'2CRecA-ATP (BLANCO et al., 1982; DUTREIX et al., 1989; FUJII; FUCHS, 2020; JASZCZUR et al., 2016; JIANG et al., 2009; NOHMI et al., 1988; SIKAND et al., 2021; SWEASY et al., 1990).

Bactérias que não possuem Pol V, aproximadamente dois terços das bactérias com genomas conhecidos, podem possuir um operon de genes SOS composto por *imuABC* (*imuAB* e *dnaE2*), responsáveis por promover a via de mutagênese TLS em condições estressantes, distribuídas principalmente entre Proteobacteria. Todavia, é necessário destacar que a composição de genes e o arranjo deste operon é flexível entre espécies bacterianas, em alguns casos sem o gene *imuA* ou com genes diferentes contribuindo para a atividade de DnaE2 (BLANCHARD; DE GROOT, 2021; ERILL et al., 2006; GALHARDO et al., 2005; MCHENRY, 2011; SHENG et al., 2021; TIMINSKAS; VENCLOVAS, 2019).

Evidências apontam que o gene *imuC* é cotranscrito com *imuA* e *imuB* em *C. crescentus*, e a deleção de qualquer um desses três genes leva a uma redução das taxas de mutagênese induzida por dano. Posteriormente, uma função para operons

com estrutura *imuABC* na mutagênese induzida por dano e tolerância a danos no DNA foi comprovado em outras espécies bacterianas. Em contraste com seu papel na TLS, o envolvimento de ImuC na mutagênese espontânea em *C. crescentus* é pequeno, e não é aumentado por uma transcrição constitutiva operon *imuABC* (ALVES et al., 2017; BLANCHARD; DE GROOT, 2021; GALHARDO et al., 2005; KOORITS et al., 2007; SHENG et al., 2021; VALENCIA et al., 2020; ZENG et al., 2011).

ImuA é uma proteína distantemente relacionada a SulA e RecA, ImuB é uma polimerase da família Y com o domínio catalítico sem atividade, enquanto ImuC (DnaE2) é um parálogo da subunidade alfa da Pol III sem a atividade de exonuclease revisora, conseqüentemente propensa a erros e mutagênica. Em *M. tuberculosis*, a atividade mutagênica de ImuC está sujeita a atividade das proteínas ImuA e ImuB, sendo ImuB que promove a conexão de ImuC com o *beta-clamp* na forquilha replicativa, permitindo que ImuC exerça sua atividade. Ao contrário da mutagênese SOS em *E. coli*, a função de ImuABC em *C. crescentus* não depende da proteína RecA, o que levanta a possibilidade de que ImuA exerça uma função similar a RecA no mecanismo de TLS (ALVES et al., 2017; GALHARDO et al., 2005; TIMINSKAS et al., 2014; WARNER et al., 2010).

As DNA polimerases TLS podem ter sua atividade no processo de mutagênese separada em duas categorias: não direcionado (DNA não danificado) ou direcionado (DNA danificado). Esses eventos são constantemente verificados pelo sistema de reparo de bases mal pareadas (MMR, do inglês *mismatch repair*), como uma forma de prevenir incorporações erradas e a geração de mutações após a replicação. A ação de polimerases TLS no processo geração de mutações induzidas por antimicrobianos, é uma das conseqüências mais curiosas deste mecanismo. Agentes antimicrobianos de diferentes classes e de uso clínico estão envolvidos na indução da resposta SOS através da geração de EROs, desencadeando o fenótipo hipermutador e a evolução bacteriana potencializadas pelas polimerases TLS, incluindo mutações que levam a aquisição de mecanismos adaptativos e resistência a antibióticos. A contribuição de EROs para morte celular bacteriana por ação de antibióticos ainda está em debate, mas tornou-se cada vez mais claro que os antibióticos, pelo menos em parte através da geração de EROs, induzem um aumento na mutagênese dependente da resposta SOS (CRANE; ALVARADO; SUTTON, 2021; DWYER et al., 2014; GOODMAN, 2016; KEREN et al., 2013; KOHANSKI et al., 2007; LEWIS et al., 2021; LIU; IMLAY, 2013; MEMAR et al., 2018, 2020; PRIBIS et al., 2019; RODRÍGUEZ-ROSADO et al., 2019).

É importante destacar que a resposta SOS é um mecanismo extremamente variável em diferentes grupos de bactérias, possuindo modificações nos genes que pertencem ao regulon e até mesmo mudanças no sítio de ligação da proteína reguladora do sistema, LexA. Em *E. coli*, organismo no qual a resposta foi mais bem estudada e caracterizada, sabe-se que LexA regula diretamente 43 genes. Dentre esses genes, podemos destacar suas principais funções como a recombinação homóloga, reparo de excisão de nucleotídeos (NER), síntese translesão e filamentação celular. Nosso grupo caracterizou a resposta SOS de *Caulobacter crescentus* onde foi demonstrada a presença de 37 genes regulados por LexA, dos quais apenas uma pequena porção é também encontrada como pertencente ao regulon SOS de *E. coli*. Desta maneira, mesmo devido à grande importância da resposta SOS para os mecanismos de mutagenese e evolução de bactérias, ainda é necessário maior conhecimento sobre as respostas fisiológicas controladas por este mecanismo em diferentes bactérias (COURCELLE et al., 2001b; DA ROCHA et al., 2008; ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007).

### 1.3 O regulon SOS em *Pseudomonas aeruginosa*

Estudos anteriores em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 identificaram os genes regulados em resposta à ciprofloxacina (capaz de induzir a resposta SOS) e regulados por LexA, através de ensaios de microarranjos de DNA. No estudo em questão, foram comparados os padrões de expressão gênica em células selvagens de *P. aeruginosa* expostas à ciprofloxacina com os padrões de expressão gênica de células de *P. aeruginosa* que expressavam um alelo não clivável de *lexA* e, por conseguinte, não são capazes de induzir a resposta SOS. Dessa maneira, foram determinados 15 genes regulados diretamente por LexA em *P. aeruginosa* PAO1, como mostrado na Tabela 1 (CIRZ et al., 2006).

**Tabela 1** – Lista de genes da resposta SOS de *Pseudomonas aeruginosa* e sua função na célula bacteriana.

ORF	Gene	Atividade
PA0069	<i>phl</i>	Reparo (Fotorreativação)
PA0669	<i>imuC</i>	Tolerância a danos (TLS)
PA0670	<i>imuB</i>	Tolerância a danos (TLS)
PA0671	<i>imuA</i>	Tolerância a danos (TLS)
PA0922		Proteína hipotética
PA1044		Proteína hipotética
PA1045	<i>dinG</i>	Recombinação homóloga (Helicase)
PA2288		Proteína hipotética
PA3007	<i>lexA</i>	Repressor da resposta SOS
PA3008	<i>sulA</i>	Inibição da divisão celular
PA3413	<i>yebG</i>	Proteína hipotética
PA3414		Proteína hipotética
PA3616	<i>recX</i>	Recombinação homóloga (Inibição de RecA)
PA3617	<i>recA</i>	Ativação da resposta SOS
PA4763	<i>recN</i>	Recombinação homóloga (Estímulo da atividade de RecA)

Apesar de apresentar um regulon SOS consideravelmente reduzido quando comparado ao de *Escherichia coli*, no qual mais de 40 genes são regulados por LexA, as funções primordiais do sistema SOS são contempladas em *P. aeruginosa*. Dentre os quinze genes identificados, cinco estão anotados como proteínas hipotéticas sem função conhecida, quatro estão envolvidos com vias de reparo de DNA e recombinação homóloga, três fazem parte de vias de tolerância a danos, dois deles são os reguladores do sistema e um é o inibidor da divisão celular (BLÁZQUEZ et al., 2006; CIRZ et al., 2006).

Alguns genes expressos durante a indução da resposta SOS em *P. aeruginosa* não apresentam regulação direta por LexA, uma vez que esses genes não apresentam a sequência operadora SOS box. Como descrito anteriormente, o gene *dinB* que codifica a DNA polimerase IV envolvida na TLS de *E. coli* é um gene SOS canônico nesse organismo, enquanto em *P. aeruginosa* é um gene indiretamente regulado pela ativação da resposta SOS (BLÁZQUEZ et al., 2006; CIRZ et al., 2006; SANDERS et al., 2006).

Mesmo sendo um gene chave para a síntese translesão, a regulação de *dinB* em *P. aeruginosa* ainda é desconhecida. Sabe-se que *dinB* é um gene importante para a mutagênese de culturas de *P. aeruginosa* (linhagem PA14) expostas à ciprofloxacina, embora recentemente tenha sido reportado que a deleção de *dinB* em

PAO1 não afetou a mutagênese induzida por ciprofloxacina. Os resultados conflitantes podem se dar devido as variações entre linhagens e sublinhagens laboratoriais mencionada anteriormente (MERCOLINO et al., 2022; MIGLIORINI, 2017; SANDERS et al., 2006; SIDORENKO; JATSENKO; KIVISAAR, 2017).

Em nosso laboratório estamos especialmente interessados nos genes PA2288, PA3008 e PA3413, uma vez que tais genes ainda possuem função desconhecida ou foram pouco estudados no contexto da resposta SOS. Através da análise da estrutura secundária predita para proteína codificada pelo gene PA2288, encontramos similaridade com proteínas de bacteriófagos que pertencem a família da subunidade theta da DNA Polimerase III. Em *E. coli*, esta proteína parece aumentar a atividade da subunidade épsilon, a qual apresenta atividade de revisão 5' – 3'. Mutantes no gene que codifica a subunidade theta são viáveis e apresentam taxas de replicação e de mutagênese similares a de células selvagens. Entretanto, homólogos de theta codificados por bacteriófagos podem conferir um fenótipo mutador leve a estas bactérias quando superexpressos, provavelmente interferindo com a atividade revisora do complexo DNA Polimerase III (KIRBY et al., 2006; SLATER et al., 1994).

O gene PA3413 (*yebG*) é um gene conservado em diversos gêneros bacterianos, sendo regulado também pela resposta SOS em *E. coli* onde é chamado de *yebG*, mas até o momento não tem função biológica definida. Neste organismo, a proteína foi caracterizada por possuir atividade de ligação a DNA independente de sequência, embora não esteja claro o papel fisiológico desta proteína. Apesar de esta ser uma proteína capaz de se ligar a DNA e ser regulada por um mecanismo de resposta a danos, não há nenhum relato na literatura sobre fenótipos associados a esse gene (LOMBA et al., 2006; URANGA et al., 2011).

O gene PA3008, conhecido como *sulA*, codifica uma proteína que promove o processo de filamentação celular característico da indução de resposta SOS. A proteína SulA age evitando a formação do septo divisional ao interagir com a proteína FtsZ, permitindo que haja tempo suficiente para que o DNA seja completamente reparado e replicado, uma vez que a interrupção desses processos pode culminar tanto com a perpetuação de mutações em células filhas quanto na geração de quebras duplas de DNA, por isso este fenômeno é tido como protetor da estabilidade genética (TRUSCA et al., 1998a).

A divisão celular em *E. coli* é interrompida quando existe a presença de danos no DNA, uma vez que SulA interage com FtsZ e inibe sua atividade de GTPase. FtsZ

é uma proteína que pode se ligar a GTP, presente em abundância durante o início da divisão celular e é capaz de polimerizar um arranjo em formato de anel na porção central da célula, o anel Z, onde a divisão celular se resolve em condições normais. Em *P. aeruginosa* a proteína SulA foi demonstrada por interagir com FtsZ, porém, a sua habilidade de promover a inibição da divisão celular ainda não foi comprovada (CORDELL; ROBINSON; LÖWE, 2003; DE BOER; CROSSLEY; ROTHFIELD, 1992; TRUSCA et al., 1998a).

Em condições indutoras da resposta SOS, *C. crescentus* regula positivamente o gene *imuA* que mostra baixa similaridade, mas suficiente para ser confundida com *sulA* em algumas anotações de genomas bacterianos como em *Pseudomonas putida*, por exemplo. Inclusive, em *C. crescentus* é conhecido que a filamentação causada pela indução da resposta SOS ocorre através da inibição do desfecho da divisão celular através da influência da proteína SidA com FtsZ. Em *B. subtilis* a inibição da divisão celular ocorre através da função de YneA, que é uma proteína de membrana capaz de promover o alongamento celular e que é expressa em condições capazes de induzir a resposta SOS. Porém, nessas condições o anel Z está polimerizado e, portanto, YneA deve atuar via interação proteína-proteína com proteínas que não sejam FtsZ mas fazem parte do divisossoma. Já em *S. aureus* o mecanismo é bastante similar ao de *B. subtilis*, no qual a proteína SsaA inibe a formação do septo de divisão, provavelmente por interação com proteínas que participam de uma fase posterior da divisão e levando à filamentação (BOJER et al., 2019; ERILL et al., 2006; KAWAI; MORIYA; OGASAWARA, 2003; MO; BURKHOLDER, 2010; MODELL; HOPKINS; LAUB, 2011).

Recentemente a filamentação também vem sendo implicada no surgimento de mutantes em populações bacterianas, uma vez que foi demonstrado que a extremidade de células filamentosas contendo múltiplos cromossomos são responsáveis pela liberação de pequenas células mutantes que se propagam na população, em um evento denominado de *budding*. Além disso, a mutagênese induzida por ciprofloxacina em *E. coli* é dependente da presença do gene *sulA* (BOS et al., 2015; PRIBIS et al., 2019).

#### 1.4 Repressores da superfamília de LexA

Em *Pseudomonas aeruginosa*, porém, é interessante destacar que além do regulon sob controle de LexA existem outros dois regulons induzidos por danos no DNA e que, portanto, fazem parte da resposta SOS. Tais regulons são controlados por repressores pertencentes à superfamília de LexA, que também apresentam auto-clivagem serina-lisina na presença da proteína RecA\* e por serem autorregulados, estes repressores são AlpR e PrtR (MATSUI et al., 1993; MCFARLAND et al., 2015; MICHEL-BRIAND; BAYSSE, 2002).

PrtR regula 43 genes de vias de síntese e liberação de piocinas, que são bacteriocinas que atuam na competição contra diferentes linhagens de *P. aeruginosa* e, por vezes, até mesmo outras espécies. Apesar dessas moléculas serem produzidas pela grande maioria das espécies do gênero *Pseudomonas*, a sua produção traz consigo o custo da lise celular para sua liberação. Essa proteína não controla diretamente a expressão de todos os genes das vias pertencentes ao seu regulon, diferentemente de LexA. A proteína PrtR reprime dois genes: *prtN*, que é o ativador do sistema de produção e liberação de piocinas e *prtB*, que realiza a repressão do sistema de secreção do tipo III (TSS3, do inglês *type III secretion system*) (MATSUI et al., 1993; MCFARLAND et al., 2015; MICHEL-BRIAND; BAYSSE, 2002; PENTERMAN; SINGH; WALKER, 2014; WU; JIN, 2005).

A proteína PrtR vem sendo também implicada no acúmulo de c-di-GMP na célula, que controla componentes do processo de transição entre estado planctônico e de biofilme, e na regulação da função do sistema de *quorum sensing* Gac/Rsm, uma vez que influencia a expressão do sistema de secreção tipo III (T3SS) e sistema de secreção tipo VI (T6SS, do inglês *type VI secretion system*). Juntos, esses achados demonstram que esse regulon tem efeitos significativos na virulência e modo de vida desse organismo para se adaptar a infecções oportunistas (BROWN, 2010; HA; O'TOOLE, 2015; JIAO et al., 2021; KULASAKARA et al., 2006; LAPOUGE et al., 2008; VALENTINI; FILLOUX, 2016).

AlpR regula 6 genes associados à morte celular através de autólise e 22 genes ainda sem função definida. Assim como PrtR, a proteína AlpR não controla todos os genes de seu regulon como LexA o faz, mas exerce uma repressão indireta através do controle do antiterminador *alpA*. Em contradição ao efeito letal para a célula, o

regulon AlpR contribui para a virulência de PAO1 em modelo animal (MCFARLAND et al., 2015; PEÑA et al., 2021).

Enquanto a expressão de genes regulados por LexA aumentam a sobrevivência do indivíduo, a expressão de genes regulados por PrtR e AlpR promovem a morte celular, de alguma forma beneficiando a população como um todo. Seus papéis parecem controversos e contraintuitivos quando observados em um primeiro momento, se fazendo necessárias análises mais detalhadas da expressão gênica dos três regulons para melhor entendimento de sua dinâmica e interação (BAYLES, 2014; JIAO et al., 2021; MCFARLAND et al., 2015; PEÑA et al., 2021).

### 1.5 *A mutagênese e o surgimento de resistência a antimicrobianos*

Mutações espontâneas surgem em taxas relativamente baixas no DNA bacteriano. Grande parte das bactérias apresenta taxas de mutação da ordem de  $10^{-9}$  –  $10^{-10}$  por par de base por geração. Essas mutações decorrem da ação de subprodutos do metabolismo (como EROs), da interação do DNA com o ambiente celular (como a desaminação de bases nitrogenadas) e de erros nos processos de replicação do DNA. Tais mutações podem levar à resistência aos antimicrobianos de diversas classes por diferentes mecanismos, e esses mutantes espontâneos raros são selecionados positivamente quando as bactérias são expostas aos antimicrobianos. Um exemplo em que esse fenômeno é potencializado, é o caso de linhagens clínicas de *P. aeruginosa* com fenótipo mutador (defeitos no sistema GO ou MMR) que são frequentemente recuperadas em pacientes acometidos por fibrose cística, que fazem tratamento constante com antimicrobianos (BOYCE, 2022; LYNCH et al., 2016; MAKI, 2002; MILLER, 2005; OLIVER et al., 2000b).

Entretanto, desde a descoberta da penicilina o surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos nunca foi tão amplamente debatido. O principal mecanismo que leva a essa ameaça crescente é explicado pela grande quantidade e uso inadequado de antimicrobianos. Os antibióticos são naturalmente produzidos e liberados no ambiente por bactérias e fungos há milhões de anos. Porém, durante as últimas décadas os seres humanos têm produzido e utilizado os antibióticos em grandes quantidades, tanto para fins medicinais quanto para propósitos agropecuários. Assim, tanto o uso humano quanto a síntese natural de antibióticos geram um gradiente de antimicrobianos no meio-ambiente como um todo (BLÁZQUEZ



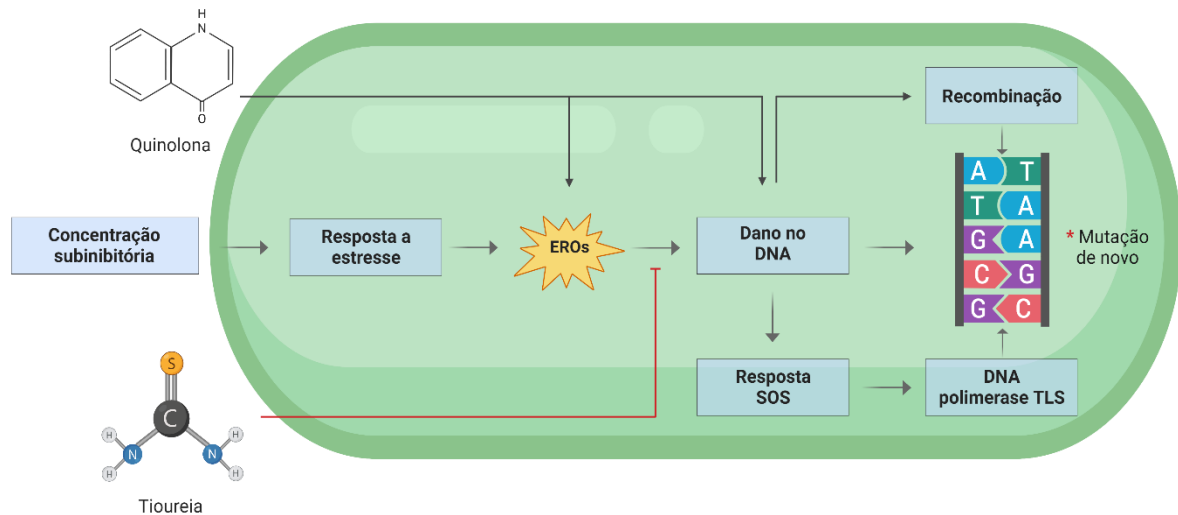
et al., 2012; MANN et al., 2021; SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013).

É importante destacar que esse gradiente não ocorre somente no meio ambiente, mas também no organismo de seres humanos ou animais que estão sob exposição a estas drogas. Isto implica que bactérias estarão frequentemente expostas a concentrações subinibitórias, ou seja, que são incapazes de interromper o crescimento do organismo. A menor concentração de um antimicrobiano suficiente para impedir o crescimento de microrganismos é chamado de concentração inibitória mínima (CIM). Concentrações acima da CIM são suficientes para que o antibiótico tenha uma atividade bactericida/bacteriostática. Porém, concentrações subinibitórias (sub-CIM) não só são insuficientes para interromper o crescimento bacteriano, como também podem selecionar linhagens resistentes pré-existentes quando estimulam respostas celulares ao estresse, como a resposta SOS (ANDERSSON; HUGHES, 2014; BLÁZQUEZ et al., 2012; MANN et al., 2021; THI et al., 2011).

Nos últimos anos a resposta SOS vem sendo associada com a geração de resistência a antibióticos, por controlar diversos mecanismos que auxiliam nestes processos. A resposta SOS aumenta as taxas de mutação da célula pela regulação positiva de polimerases TLS e estimula a transferência horizontal de genes, formação de biofilme, recombinação homóloga e o aparecimento de pequenas colônias variantes. Todos esses mecanismos apresentam potencial para aumentar a tolerância contra antibióticos (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; BOSHOFF et al., 2003; CRANE et al., 2018; GOTOH et al., 2010; LÓPEZ; BLÁZQUEZ, 2009; MEMAR et al., 2020; PODLESEK; ŽGUR BERTOK, 2020; VALENCIA et al., 2017; ZHANG et al., 2000).

Além disso, recentemente tem sido proposto que antibióticos de diferentes classes induzem estresse oxidativo intracelular, o que também culmina com um aumento nas taxas de mutação da célula, seja por mecanismos dependentes das polimerases TLS ou pela formação de lesões oxidativas no DNA (Figura 2). Certas classes de antimicrobianos já foram demonstradas por serem capazes de produzir EROs em bactérias, que podem causar danos diretamente a membrana celular, proteínas e ao DNA. As principais classes de antibióticos envolvidos nesse mecanismo são os aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e quinolonas. É interessante destacar que o uso de antioxidantes em conjunto ao tratamento com ciprofloxacina reduz significativamente a indução de mutagênese por este antimicrobiano (DWYER

et al., 2014; DWYER; KOHANSKI; COLLINS, 2009; KOHANSKI et al., 2007; KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010; PRIBIS et al., 2019; RODRÍGUEZ-ROSADO et al., 2019).



**Figura 2** – Efeito de concentrações subinibitórias de antimicrobianos. A figura mostra como concentrações subinibitórias de um antibiótico podem culminar com o surgimento de mutações, seja por mecanismos dependentes da resposta SOS, ou por dano direto causado pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A figura também destaca que a classe de antimicrobianos das quinolonas podem causar danos diretos ao DNA, além daqueles dependentes de EROs. Outro aspecto importante é que a geração de novas mutações pode ser suprimida pelo tratamento com agente antioxidantes, como a tiouréia. Criado com BioRender.com.

Nosso trabalho irá se concentrar no antibiótico ciprofloxacina, uma droga de segunda geração da classe das quinolonas que possui a capacidade de induzir a resposta SOS em concentrações subinibitórias. Tal classe de antibióticos foi primeiramente introduzida na clínica para o tratamento de doenças do trato urinário causadas por bactérias entéricas, porém com o desenvolvimento das fluoroquinolonas foi possível aumentar as possibilidades de tratamento em que elas eram utilizadas. Essa nova geração de drogas apresentava maior atividade contra seu alvo, maior penetração em organismos Gram-positivos e elevadas taxas de farmacocinética e farmacodinâmica. A ciprofloxacina foi, na realidade, a primeira quinolona que apresentou atividade significativa fora do trato urinário e após 20 anos de uso clínico permanece como um dos antibióticos mais comumente prescritos no mundo todo (ANDRIOLE, 2005; EMMERSON, 2003).

Diversas bactérias possuem duas topoisomerasas do tipo II distintas, mas que são homólogas: a girase e a topoisomerase IV. Essas enzimas têm uma função essencial na maioria dos processos envolvendo ácidos nucleicos, auxiliando no controle do nível de condensação do DNA. A girase e a topoisomerase IV modulam o estado topológico do DNA transformando uma dupla hélice de DNA intacta em um estado transiente de quebra dupla para remoção ou adição de tensões na fita de DNA. As quinolonas se aproveitam dessa característica potencialmente letal das topoisomerasas do tipo II, ligando-se a estas enzimas e produzindo complexos de enzima associadas ao DNA clivado, sendo chamadas de venenos de topoisomerase. É justamente essa quebra dupla de DNA gerada durante a atividade dessas enzimas que é um forte sinal para indução da resposta SOS, uma vez que o complexo proteico RecBCD irá reconhecer tais regiões e degradá-las até encontrar um sítio chi no DNA, onde irá finalmente promover o surgimento de regiões de simples fita de DNA (através de uma atividade de exonuclease) que pode ser prontamente reconhecida pela proteína RecA e ativar a resposta SOS (BUSH et al., 2020; FISHER et al., 1989; KREUZER; COZZARELLI, 1979; LEBEL, 1988; MILLANAO et al., 2021; PHILLIPS et al., 1987; YSERN et al., 1990).

A indução da resposta SOS por concentrações subinibitórias de fluoroquinolonas já foi extensamente estudada. Nestes experimentos foi mostrado que a indução da resposta SOS por esse antibiótico resulta em mutações que levam a altos níveis de resistência a ciprofloxacina, mediante a expressão de polimerases TLS reguladas por esse sistema. Inclusive a indução da resposta SOS por ciprofloxacina, já foi bem documentada em *Pseudomonas aeruginosa* (BLÁZQUEZ et al., 2006; CIRZ et al., 2005, 2006; CIRZ; ROMESBERG, 2006; LONG et al., 2016; PRIBIS et al., 2019).

As evidências levantadas acima mostram que antimicrobianos podem promover a variabilidade genética em bactérias, através da indução da resposta SOS e danos oxidativos ao DNA. Isso torna a indução da resposta SOS por antibióticos um mecanismo multifatorial e complexo que pode ser modificado de diferentes maneiras dependendo dos vários efeitos causados nas células bacterianas. Assim, a inibição da resposta SOS tem sido proposta para reduzir o surgimento de resistência bacteriana durante o tratamento com antimicrobianos (BLÁZQUEZ; RODRÍGUEZ-BELTRÁN; MATIC, 2018).

## 2 OBJETIVOS

O primeiro objetivo deste trabalho é identificar genes que podem afetar a ativação resposta SOS induzida por ciprofloxacina em *P. aeruginosa*. Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que governam essa importante resposta à estresse celular, podem conduzir a um melhor entendimento sobre suas implicações funcionais e fisiológicas para a célula.

O segundo objetivo do trabalho é caracterizar o papel fisiológico de genes de função desconhecida regulados pela resposta SOS. O gene de enfoque deste trabalho será o gene *suIA*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado no trabalho aqui apresentado foi adquirido mediante o financiamento das agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). As metodologias para obtenção dos resultados pertinentes ao trabalho serão descritas a seguir.

#### 3.1 Cultivo e manutenção de bactérias

A bactéria de interesse deste estudo é a *Pseudomonas aeruginosa*, porém linhagens de *Escherichia coli* também foram utilizadas para procedimentos de clonagem. A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada nesse trabalho foi a PAO1, e mutantes foram construídos a partir desse *background* genético. Na Tabela 2 é possível encontrar a lista de cepas utilizadas ao longo do trabalho.

O cultivo rotineiro das cepas foi realizado no meio LB (1% triptona, 1% NaCl, 0,5% extrato de levedura). O meio era suplementado com antibióticos (Sigma Aldrich, EUA) quando a seleção de linhagens resistentes se fazia necessário. Para experimentos que requeriam a determinação da CIM, o meio Müeller Hinton (Difco, EUA) foi utilizado. Os estoques das cepas de interesse do projeto são mantidos em glicerol 20% a uma temperatura de -80°C.

**Tabela 2:** Lista de cepas utilizadas neste trabalho.

Espécie	Linhagem	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i>	DH5α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ-</i>	Invitrogen
	S17	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	
	SM10 λpir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km pITII (ISlacZ/hah)</i>	Jacobs, 2003
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	Linhagem parental	Stover, 2000
	PAO1:: <i>lux</i>	<i>attTn7::PrecA::luxCDBAE</i>	Valencia, 2017
	PAO1 <i>recA</i> <sup>-</sup>	<i>recA::pKNOCK</i>	Este estudo
	B3-G8	<i>attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::luxE</i>	Este estudo
	B7-A6	<i>attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::purK</i>	Este estudo
	B9-B12	<i>attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::luxC</i>	Este estudo

Espécie	Linhagem	Genótipo	Referência
<i>P. aeruginosa</i>	B10-D8	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::fleQ	Este estudo
	B13-F3	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::pyrB	Este estudo
	B14-G1	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA3024	Este estudo
	B16-H6	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::napA	Este estudo
	B19-D4	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::fliR	Este estudo
	B21-F7	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA1914	Este estudo
	B28-H4	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA1760	Este estudo
	B32-F3	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::pmrB	Este estudo
	B40-F3	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::pabC	Este estudo
	B40-H5	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::ctpH	Este estudo
	B41-F8	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA5093	Este estudo
	B44-D1	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA0401	Este estudo
	B52-B5	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::pauA	Este estudo
	B53-D3	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA1631	Este estudo
	B63-A2	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA4012	Este estudo
	15-10D	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::PA5362	Este estudo
	115-11H	attTn7::PrecA::luxCDBAE ISlacZ/hah::luxD	Este estudo
	PAO1 Ø	PAO1 pJN105 Ø	Este estudo
	PAO1 2288	PAO1 pJN105 [PA2288]	Este estudo
	PAO1 3413	PAO1 pJN105 [PA3413]	Este estudo
	$\Delta$ sulA	PAO1 $\Delta$ sulA	Este estudo
	$\Delta$ PA2288	PAO1 $\Delta$ PA2288	Este estudo
	$\Delta$ PA2288 Ø	PAO1 $\Delta$ PA2288 pJN105 Ø	Este estudo
	$\Delta$ PA2288 C	PAO1 $\Delta$ PA2288 pJN105 [PA2288]	Este estudo
	$\Delta$ PA3413	PAO1 $\Delta$ PA3413	Este estudo
	$\Delta$ PA3413 Ø	PAO1 $\Delta$ PA3413 pJN105 Ø	Este estudo
	$\Delta$ PA3413 C	PAO1 $\Delta$ PA3413 pJN105 [PA3413]	Este estudo

### 3.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) das linhagens foi definida de acordo com as diretrizes do Manual do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), em meio líquido Müller-Hinton por diluição em placa de 96 poços (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

### 3.3 Teste de sensibilidade a agentes genotóxicos

Para avaliar a sensibilidade a agentes genotóxicos dos mutantes, cultivos da fase estacionária das linhagens de interesse passaram por diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  e foram semeados em placas de meio LB sólido acrescidos de diferentes

concentrações de metanosulfonato de metila (MMS) e cisplatina (Cis). Após cultivo de 16h, a formação de UFC em cada diluição foi quantificada. Todos os tratamentos foram comparados com a formação de UFC em placas contendo apenas meio LB.

#### 3.4 *Mutagênese induzida por ciprofloxacina*

Analizamos o efeito das diferentes deleções gênicas sobre a mutagênese induzida por ciprofloxacina. Dois protocolos para obtenção desses dados foram empregados nesse trabalho.

No primeiro protocolo, mutações cromossômicas que conferem resistência aos antibióticos rifampicina e fosfomicina foram analisadas como marcadores de mutagênese global no genoma. Culturas saturadas das linhagens de interesse foram diluídas em meio LB e acompanhadas até atingirem o início da fase exponencial ( $DO_{600} = 0,3$ ), quando então receberam tratamento com 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina e posteriormente incubadas por 4 horas à 37°C sob agitação constante. Essas culturas foram centrifugadas e ressuspendidas em meio LB duas vezes, para que o antibiótico seja retirado do meio de cultura líquido. As culturas são então diluídas em LB, em uma proporção 1:1 e incubadas à 37°C por até 20 horas.

Para a medição de mutações Rif<sup>R</sup>, 500 µL de cada cultura foram concentrados em 100 µL por centrifugação, e então semeados em placas de LB com rifampicina (300 µg/mL). Para os testes de mutagênese Fos<sup>R</sup>, 100 µL de cultura diluída 100 vezes em solução salina foram semeados em meio LB com fosfomicina (128 µg/mL). Após contagem de UFC, o cálculo das taxas de mutagênese foi realizado utilizando o método de Maximum Likelihood, segundo o programa Flucalc. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três réplicas biológicas e a análise estatística dos dados foi realizada com o teste de Mann-Whitney (RADCHENKO et al., 2018).

No segundo protocolo, apenas mutações cromossômicas que conferem resistência a fosfomicina foram avaliadas. Culturas saturadas das linhagens de interesse foram diluídas em 1:4 e depois em 10<sup>-6</sup> e então incubadas por 3 horas à 37°C sob agitação constante. Após esse período, as células foram diluídas em 1:3 em meio LB fresco e meio LB contendo 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina e incubadas por 24 horas à 37°C. No dia seguinte, 100 µL de cultura diluída 100 vezes em solução salina foram semeados em meio LB com fosfomicina (128 µg/mL). Após a contagem de UFC, os cálculos foram feitos conforme descrito acima (PRIBIS et al., 2019).

### 3.5 Varredura de biblioteca de transposons

Para análise do efeito das diferentes interrupções gênicas sobre a indução da resposta SOS, utilizamos um repórter previamente construído por nosso grupo. Este consiste na fusão transcricional do promotor do gene *recA* com os genes do operon *lux*, no vetor pUC18T-mini-Tn7T-*lux*-Gm. Este repórter está inserido no cromossomo de *P. aeruginosa* no sítio *att* do transposon Tn7 (CHOI et al., 2005; VALENCIA et al., 2017).

A linhagem PAO1 *PrecA::luxBCDAE* (chamada daqui em diante de PAO1::*lux* para simplificação) recebeu por conjugação da linhagem doadora *E. coli* SM10pir/pITII, o plasmídeo suicida pITII que contém o transposon IS/*lacZ*/hah. Tal transposon (Tet<sup>R</sup>) se insere de maneira aleatória no genoma da PAO1 de forma a obtermos uma biblioteca contendo diversos mutantes para diferentes genes dessa bactéria (JACOBS et al., 2003).

Após a conjugação e integração aleatória de IS/*lacZ*/hah em seu genoma, as bactérias que cresceram em meio seletivo contendo tetraciclina foram inoculadas em placas de 96 poços. Depois de saturação de crescimento, as bactérias foram diluídas 1:50 em uma nova placa de 96 poços onde foram cultivadas por 2 horas. Após isso, todas as bactérias foram tratadas com 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina e incubadas a 37°C. Medidas de DO<sub>600</sub> e luminescência foram obtidas três horas após o tratamento.

A avaliação de variações da indução da resposta SOS foi feita utilizando a razão Lux/DO<sub>600</sub> da cepa mutante em relação à cepa parental. Se os valores de indução estiverem, no mínimo, duas vezes aumentados/reduzidos em relação a cepa parental, esse mutante seguiu para estudos posteriores de identificação e caracterização funcional (Figura 3). Todas as medidas foram realizadas com o aparelho GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader (Promega).





**Figura 3** - Representação esquemática da varredura de biblioteca de transposon para identificação de linhagens mutantes com alterações na indução da resposta SOS. A identificação de mutantes selecionados é feita através da divisão entre a razão Lux/ $DO_{600}$  do mutante sobre a razão Lux/ $DO_{600}$  do controle positivo. Controle positivo: PA01::*lux* e controle negativo: *recA*::pKNOCK.. Criado com BioRender.com.

### 3.6 Técnicas de biologia molecular

Isolamento de DNA plasmidial e transformações em *E. coli*, reações em cadeia da polimerase (PCR), digestões de DNA, e outras técnicas básicas de biologia molecular foram feitas de acordo com os protocolos padrões publicados em manuais de referência (AUSUBEL et al., 1996; SAMBROOK; GREEN, 1989).

A preparação de linhagens eletrocompetentes de *P. aeruginosa* para transformações de DNA foi feita através de lavagens em solução de sacarose (300 mM) (CHOI; SCHWEIZER, 2006).

### 3.7 Construção de linhagens mutantes

Para a construção de linhagens mutantes utilizamos as linhagens de *E. coli* apropriadas para a facilitação de processos como clonagem (linhagem DH5 $\alpha$ ) e conjugação (linhagem S17) (AUSUBEL et al., 1996; SAMBROOK; GREEN, 1989; SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983).

Neste trabalho realizamos a deleção dos genes PA2288, PA3008 (*sulA*) e do gene PA3413 (*yebG*). Para a construção dos mutantes, clonamos a regiões flangeadoras do gene com cerca de 1000 pb cada uma, no vetor pEX18Ap com o auxílio do kit In-Fusion Cloning Kit Clontech (Takara Bio, EUA). As construções foram realizadas de tal forma que as regiões adjacentes dos genes estevam presentes, de forma a servirem de substrato para recombinação homóloga, mas a região central do

gene seja perdida durante esse evento. Os iniciadores usados nestas clonagens estão descritos na Tabela 3. Os dois fragmentos, contendo as regiões *upstream* e *dowstream* de cada gene, foram amplificados por PCR e purificados com o Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machrey-Nagel, Germany) (HOANG et al., 1998b).

Em todas as construções o vetor pEX18Ap foi digerido com a enzima HindIII e purificado com o Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machrey-Nagel, Germany). A clonagem dessa construção foi transformada em uma linhagem de células competentes que fazem parte do Kit In-Fusion. Selecionamos os clones obtidos em meio contendo ampicilina (100 µg/mL), X-Gal e IPTG. Uma vez que confirmamos a presença do inserto por PCR e digestão com a enzima HindIII, realizamos a transformação do plasmídeo na linhagem S17-1 de *E. coli*.

Em seguida realizamos a conjugação da cepa S17 com PAO1, seleção das células receptoras do plasmídeo com carbenicilina (300 µg/mL) e eliminando a cepa S17 com ácido nalidíxico (20 µg/mL). Quando o plasmídeo se integra no cromossomo da cepa PAO1, por um evento de recombinação homóloga, é gerada uma duplicação temporária dos genes que se deseja deletar. O primeiro evento de recombinação foi selecionado através de colônias Carb<sup>R</sup> (carbenicilina) e Sac<sup>S</sup> (sacarose). Em um segundo evento de recombinação, o plasmídeo pode restituir o gene na sua forma parental ou deletada ao sair do genoma bacteriano, assim foi necessário realizar uma varredura de colônias Carb<sup>S</sup> e Sac<sup>R</sup> por PCR para checar as colônias que apresentam a versão deletada dos genes.

Todos os oligonucleotídeos utilizados para condução desse trabalho estão descritos na Tabela 3, bem como os vetores utilizados no trabalho que estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 3** – A sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho, bem como sua aplicação estão listados nesta tabela a seguir.

Oligonucleotídeo	Aplicação	Sequência
PA2288-A	Deleção gênica	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTACCAGCCTCGA TCCCTACC
PA2288-B	Deleção gênica	GCCAGTCCACCAGCGGCAGTTCGGCAAG
PA2288-C	Deleção gênica	ACTGCCGCTGGTGGACTGGCAACGCCAG
PA2288-D	Deleção gênica	GACCTGCAGGCATGCAAGCTTGACGCCATCCA CGTCTACCTG
PA3008-A	Deleção gênica	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTACGCACCAGTC AGGAAAATTACAG
PA3008-B	Deleção gênica	GGCCCAGTTGCTGGAACAGTGGCAACTGG

Oligonucleotídeo	Aplicação	Sequência
PA3008-C	Deleção gênica	ACTGTTCCAGCAACTGGGCCAAGCACAGA
PA3008-D	Deleção gênica	GACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCATTCTTCCA GTTTTAATCGGGA
PA3413-A	Deleção gênica	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGAGAAACAGTG CCTTGAGATCCT
PA3413-B	Deleção gênica	CGTTGAGGGCACGCTCCTGATCCCGGCT
PA3413-C	Deleção gênica	TCAGGAGCGTGCCCTCAACGAACTGTTTCA GACCTGCAGGCATGCAAGCTTCTGGAGAATTG CCAATGCAGTTGC
PA2288-E	Sequenciamento	GCTATCCGCCACCTACGATT
PA3008-E	Sequenciamento	CGGTGATCGGACGGGTTCGC
PA3413-E	Sequenciamento	TTGTAICTCGACGGTATGCCG
PA2288C Fwd	Complementação	GGCGAATTCAAGGAGCACCGATCATGAGC
PA2288C Rev	Complementação	ATATCTAGACGAGCAACGCTCAGGCTGCG
PA3008C Fwd	Complementação	GGAGAATTCAGGAGATACCATGCAGACCT
PA3008C Rev	Complementação	CGCTCTAGACGTTTTTTCAACCCAGACGA
PA3413C Fwd	Complementação	GCGGAATTCCACAGAGGTGATGAATGGCC
PA3413C Rev	Complementação	TTATCTAGATTGCAGCGGCGGCTCATTCC
LacZ-211	Identificação varredura	TGCGGGCCTCTTCGCTATTA
CEKG2A	Identificação varredura	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNAGA G
CEKG2B	Identificação varredura	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACG CC
CEKG3C	Identificação varredura	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGAT AT
LacZ-148	Identificação varredura	GGGTAACGCCAGGGTTTTTCC
CEKG4	Identificação varredura	GGCCACGCGTCGACTAGTAG
LacZ-124L	Identificação varredura	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACC
glpR Fwd	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	CGGCAGCACGAGAACAACCC
glpR Rev	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	GCCGTGGCAGGGGAAATGCC
glpT Fwd	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	AACAACAAGCGGAGCTCGCG
glpT Seq 1	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	TGGAACGTGCCCCACAATGT
glpT Seq 2	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	GTTTATGATCCTGGTGACC
glpT Rev	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	GCGCCGAGCCGCCGCGTCA
PA3001 Fwd	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	GTGAAGCCATCGCGGAAGCC
PA3001 Seq	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	CTGCGTCGGGACTCGGTGCA
PA3001 Rev	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	TTTCTCTACGCCTTGCGCA
PA5131 Fwd	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	GCGGAAATAGAGCCGGACAT
PA5131 Seq	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	AGCGCGCAGCCGTGCTGGA
PA5131 Rev	Sequenciamento Fos <sup>R</sup>	GGGAGTTCGTGCTTCGCGG
lexA Fwd	RT-PCR	ATGCCGCCAACGACGATGAGG
lexA Rev	RT-PCR	TCGCCGTGAGGATGCCGATG
recA Fwd	RT-PCR	AACGCACTGAAGTTCTACGCC
recA Rev	RT-PCR	TGTTCTTACCACCTTGACGC
dnaQ Fwd	RT-PCR	CGTTTCGATATCGGCTTCATC
dnaQ Rev	RT-PCR	ATCAGCAGGGTATCCAGCAC

**Tabela 4** – Lista de vetores utilizados para a realização deste trabalho e suas características.

Plasmídeo	Características	Referência
pEX18Ap	Vetor suicida utilizado para deleção gênica em <i>P. aeruginosa</i> . Contra-seleção por <i>sacB</i> . Resistência à ampicilina.	Hoang and Schweizer, 1998
pJN105	Vetor de expressão contendo o promotor <i>araBAD</i> indutível por L-arabinose e o regulador <i>araC</i> . Resistência à gentamicina.	Newman and Fuqua, 1999

Plasmídeo	Características	Referência
pUC18T-miniTn7T-Gm	Vetor suicida com recombinação no sítio <i>att</i> de <i>P. aeruginosa</i> . Resistência à ampicilina e gentamicina.	Choi, 2006
pFLP2	Vetor expressando flipase, utilizado para retirar a resistência a gentamicina inserida juntamente à sequência-alvo em transformações com o miniTn7T.	Choi, 2005
pKNOCK-Tc	Vetor suicida que realiza o <i>knockout</i> gênico através da inserção do vetor na sequência do gene alvo. Resistência à tetraciclina.	Alexeyev, 1999
pITII	Vetor suicida contendo o transposon IS <i>lacZ</i> /hah de inserção aleatória no genoma. Resistência à tetraciclina.	Jacobs, 2003

### 3.8 Complementação de linhagens mutantes

A construção das linhagens complementadas foi realizada com a amplificação dos genes de interesse contendo seus respectivos RBS (do inglês *ribosome-binding site*) e clonagem no vetor pJN105. Tal vetor confere resistência a gentamicina (concentração de seleção 10 µg/mL) e possui um promotor regulado por L-arabinose, o que permite que os níveis de expressão do gene sejam controlados com concentrações crescentes do açúcar. Tal característica permitiu não somente a construção de linhagens complementadas, mas também de linhagens com a super-expressão dos genes de interesse. O plasmídeo pJN105 adicionado sem insertos em seu sítio múltiplo de clonagem foi usado como controle nos experimentos de complementação e super-expressão (NEWMAN; FUQUA, 1999).

### 3.9 Identificação de mutantes da biblioteca de transposons

A fim de precisamente identificar os genes interrompidos pela inserção do transposon para geração dos mutantes da biblioteca, uma PCR semi-degenerada de duas etapas e um sequenciamento foram realizados. Na primeira etapa do PCR, o *primer* LacZ-211 que é específico para a sequência do transposon é pareado com um *primer* semi-degenerado que contém uma cauda de sequência conhecida (CEKG 2A, 2B e 2C), e o DNA molde utilizado é uma alíquota do estoque em glicerol da bactéria. Na segunda da etapa PCR, é utilizado o *primer* LacZ-148 que se associa a uma sequência mais interna do transposon e é pareado com o *primer* CEEKG 4 que tem como alvo a cauda do *primer* semi-degenerado, e o DNA molde é uma alíquota do produto da primeira reação. O produto de PCR da segunda reação é então submetido

a uma limpeza em uma reação com a enzima Exonuclease I e FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, USA), e utilizado como molde para o sequenciamento de Sanger (JACOBS et al., 2003).

### 3.10 Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger

O sequenciamento de DNA pelo método de Sanger foi utilizado para a confirmação das construções descritas anteriormente e para a identificação de sítio de inserção de transposon. Para a realização do sequenciamento, foram usados primers específicos para cada DNA-alvo e os componentes do kit Big Dye Terminator Sequencing (Applied Biosystems, EUA). As condições da reação foram 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

O produto do sequenciamento foi submetido a um processo de precipitação com glicogênio, etanol e acetato de sódio. O material seguiu para uma centrifugação por 15 min a 4000 rpm e então foram feitas duas lavagens com etanol 70%. Por fim, as amostras secaram por 1 hora na estufa à 37°C protegidas da luz.

As amostras precipitadas foram encaminhadas para a unidade de sequenciamento do CEFAP-USP (Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa). Os resultados obtidos foram avaliados no *software* SnapGene Viewer (SnapGene By Dotmatics, Reino Unido).

### 3.11 Sequenciamento de nova geração e análise bioinformática

O DNA das cepas de interesse foi extraído com o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), utilizando culturas saturadas de bactérias e realizando a incubação de 1 hora para o tratamento com RNase. Após a extração, o material teve sua pureza avaliada por mensuração das razões DO260/DO280 e DO260/DO230 que devem ter valores entre 1.8 – 2.0 e 2.0 – 2.2 respectivamente. Para amostras que apresentaram índice de pureza apropriados, o DNA foi quantificado utilizando-se o método fluorimétrico do Qubit Assays (Invitrogen, USA) que é capaz de quantificar a concentração de DNA dupla-fira presente na amostra. As amostras foram então encaminhadas para a unidade de sequenciamento do CEFAP-USP (Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa), onde foi realizado o preparo da

biblioteca com o kit Illumina DNA Prep (Illumina, EUA) e o sequenciamento feito com cartucho NextSeq 500 System High-Output Kit (Illumina, EUA) utilizando os parâmetros de 2 x 75 pb *paired-end*. O equipamento utilizado para o sequenciamento completo do genoma foi o Illumina NextSeq 500 para sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*).

Os dados obtidos após o sequenciamento foram analisados no *software* Geneious (Biomatters Limited®). O filtro de qualidade e eliminação dos adaptadores foram feitos através do algoritmo BBDuk presente no Geneious. Já o alinhamento dos *reads* e a identificação de SNPs (single nucleotide polymorphism) foi feito com o algoritmo próprio do *software* Geneious.

### 3.12 Extração de RNA por Trizol

As extrações de RNA para análises de expressão por qRT-PCR foram feitas com o reagente TRIzol™ (Invitrogen, EUA). Após submetidas às condições de interesse, de 1 a 10 mL das amostras foram centrifugados e homogeneizado com 1 mL da solução de TRIzol™, que mantém a integridade do RNA através da inibição a atividade de nucleases enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, e por centrifugação a solução foi separada em uma camada aquosa superior clara (contendo RNA), e camadas orgânicas inferiores em interfase e rosa (contendo o DNA e proteínas). Após a coleta da camada aquosa, o RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol e passou por lavagem com 1 mL de etanol 70% gelado. Após a retirada total do etanol, o sedimento contendo RNA foi homogeneizado em até 50 µL de água DEPC.

### 3.13 Conversão de RNA em cDNA

Após a extração do RNA total, 5 µg de cada uma das amostras passaram por um tratamento com 5 µl DNase I (Promega, EUA) para livrá-las de resquícios de DNA que possam interferir durante a reação de transcrição reversa. Esse RNA foi submetido a uma reação de PCR para verificar a presença de DNA, é esperado que não ocorra amplificação. Do produto desse tratamento, 12 µl da reação (1,2 µg de RNA) foi então submetido a conversão em cDNA com o uso de hexâmeros randômicos e 50 U de transcriptase reversa usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription

kit (Applied Biosystems, EUA). Novamente uma reação de PCR foi realizada, dessa vez para confirmação da conversão em cDNA, é esperado que ocorra amplificação.

### 3.14 qRT-PCR

Experimentos quantitativos de PCR em tempo real foram realizados em triplicata a partir de três experimentos independentes usando *dnaQ* como controle de referência. Os primers (Tabela 3) foram desenhados com o *software* Primer3 (UNTERGASSER et al., 2007).

As reações de qRT-PCR foram realizadas em um volume final de 12  $\mu\text{L}$ , que continham 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (5 ng/ $\mu\text{L}$ ), 4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 6  $\mu\text{L}$  Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de reação foram de um ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Ao final de cada ciclo de PCR foram geradas curvas de dissociação a fim de checar a amplificação de um produto único. Para o cálculo da mudança relativa na expressão gênica dos genes avaliados, o método de quantificação de expressão relativa  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  foi empregado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

### 3.15 Microscopia

As linhagens foram observadas em microscópio de contraste de fase durante tratamento com antimicrobianos a fim de avaliar a filamentação das células como consequência da ativação da resposta SOS. A fim de melhor visualizar melhor as bordas celulares, bem como o septo divisional e o material genético (nucleóides), as células foram coradas com DAPI ou 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma Alderich, EUA) e FM™ 1-43FX (Invitrogen, EUA). O DAPI é um corante fluorescente azul que se liga ao DNA, enquanto o FM 1-43FX é um corante fluorescente verde se associa à membrana celular.

A preparação das amostras foi feita a partir de um inóculo saturado da linhagem de interesse que foi diluída para uma  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0,1 e então encubada sob agitação constante à 37°C. Após atingir o início da fase exponencial ( $\text{DO}_{600}$  em cerca de 0,3), a célula recebe o tratamento com 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina e então volta a ser incubada à 37°C. Diferentes tempos de tratamento são avaliados no

experimento, no qual alíquotas são separadas para preparação de lâminas e coloração quando necessário.

A coloração foi realizada em 1 mL de cultura bacteriana, onde são acrescentados 1  $\mu$ L de DAPI (1 mg/mL) e 1,5  $\mu$ L de FM 1-43FX. A amostra fica sob agitação em vórtex por 2 minutos, e então foi encubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Uma quantidade de 5  $\mu$ L da amostra (estando ela com corante ou não) foi aplicado sobre uma lamínula e então coberto com um *pad* de agarose com PBS 1x. A amostra foi visualizada em microscópio invertido.

O microscópio utilizado para obtenção das imagens foi o AxioVert.A1 da Carl Zeiss. O microscópio de fluorescência conta com objetivas de 10X, 20X, 40X, 63X e 100X. Possui filtros para DAPI, FITC, Rhodamine, Texas Red e Cy5/AF633 e está equipado com câmera AxioCam Icm1.



## 4 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir foram produzidos durante a elaboração da presente tese de doutorado, durante o período de 2017 e 2022.

### 4.1 *Estabelecimento de varredura genética para identificação de genes que alteram a indução da resposta SOS*

Os resultados a seguir englobarão os dados resultados gerados para elucidar o primeiro objetivo estabelecido para a tese, que é a identificação de genes que alteram a fisiologia da resposta SOS à ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa*.

Para isso, utilizamos uma linhagem previamente construída no laboratório que contém a fusão do promotor do gene *recA* com o operon *luxCDABE* (linhagem PAO1::*lux*) de forma que a bioluminescência da célula passa a ser um repórter da indução da resposta SOS e pode, portanto, ser quantificada. A varredura genética foi feita a partir da geração de uma biblioteca de mutantes da linhagem PAO1::*lux* com inserção do transposon IS*lacZ*/hah, e identificação daqueles mutantes que apresentam alteração da indução da resposta SOS após tratamento com ciprofloxacina (VALENCIA et al., 2017).

#### 4.1.1 *Metodologias previamente estabelecidas*

Cerca de 2000 mutantes foram analisados utilizando uma estratégia previamente estabelecida no laboratório. Essa metodologia consiste primeiramente na geração dos mutantes que irão compor a bibliotecas de mutantes por inserção de transposon. Culturas saturadas das linhagem PAO1::*lux* foram concentradas de um volume inicial de 10 mL para um volume final de 500  $\mu$ L utilizando-se LB fresco, e o mesmo procedimento era realizado para a linhagem SM10  $\lambda$ pir. Essas duas culturas concentradas foram misturadas, totalizando um volume de 1 mL, e então foram aplicadas sobre uma membrana filtrante de policarbonato apoiadas sobre uma placa de LB sólido contendo tetraciclina. Neste passo, ocorreu a conjugação entre a linhagem receptora (PAO1::*lux*) e a linhagem doadora (SM10  $\lambda$ pir) a fim de transmitir o plasmídeo pTII que contém o transposon IS*lacZ*/hah, de inserção aleatória no genoma de *Pseudomonas aeruginosa* e que foi responsável por criar o conjunto de

mutantes em diferentes genes que compõe a biblioteca de transposons. O transposon utilizado apresenta marca de seleção à tetraciclina e por isso este antibiótico se faz necessário na placa em que a conjugação ocorreu.

Após incubação até 24 horas à 37°C, a membrana de filtrante de policarbonato foi retirada do meio sólido e passou por uma lavagem em 1 mL de LB fresco para ressuspensão das bactérias, que se acrescidas de glicerol 20% podem ser armazenadas para utilização posterior. Essas bactérias foram plaqueadas em meio sólido contendo ácido nalidíxico para contra-seleção da linhagem doadora e tetraciclina para selecionar a linhagem receptora que integrou devidamente o transposon em seu genoma. Cada colônia proveniente deste plaqueamento é um mutante em um gene aleatório e que compõe a biblioteca de mutantes de transposons.

A segunda parte desta metodologia consiste na varredura genética em si, a fim de identificar mutantes que tiveram interrupções gênicas que levaram a um fenótipo de alteração da indução da resposta SOS. Partindo da placa de meio sólido que obtivemos após plaqueamento da conjugação bacteriana, cada uma das colônias ali presente foi inoculada primeiro em uma placa de 96 poços contendo meio LB fresco, e cultivada até saturação. No dia seguinte, elas são transferidas para uma nova placa contendo meio LB e depois em uma placa de 96 poços contendo meio LB com 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina (previamente determinada como 0,06250 µg/mL para a linhagem PAO1::*lux*). A primeira placa serviu como controle do experimento de medição da bioluminescência dos mutantes e também como um estoque que podemos voltar para resgatar mutantes com fenótipos interessantes, já a placa que contém o antimicrobiano que é um forte indutor da resposta SOS em concentrações subinibitórias e serviu para avaliarmos o aumento na bioluminescência dos mutantes em decorrência da ativação da resposta SOS.

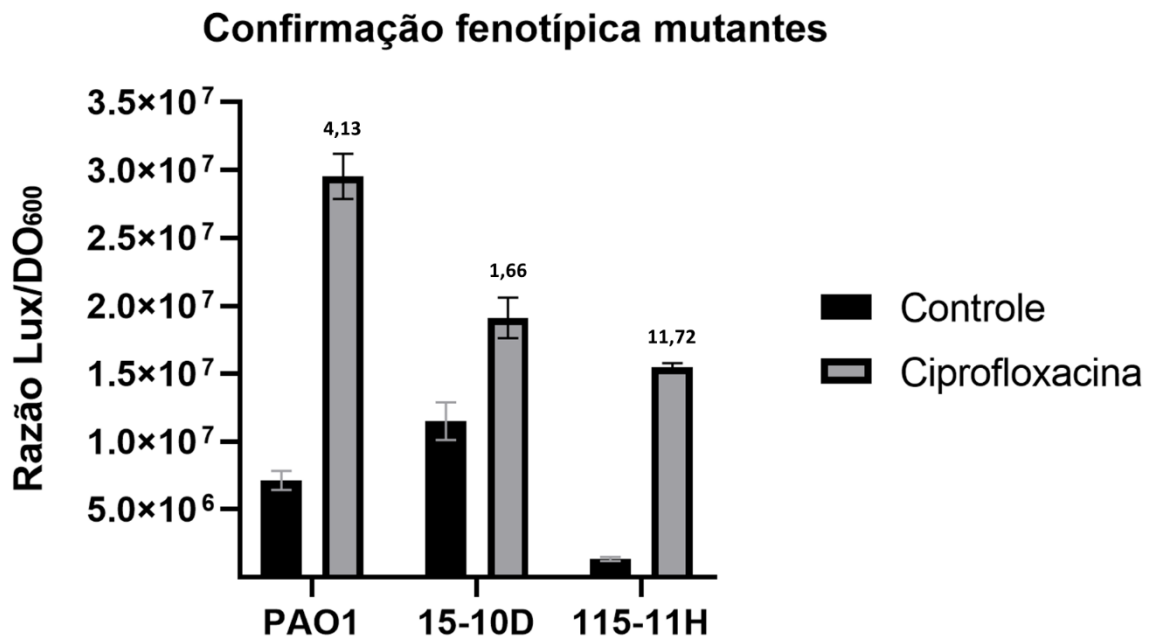
Uma vez inoculadas, as placas de 96 poços foram incubadas sob agitação constante à 37°C e após 4 horas foram levadas a um aparelho capaz de quantificar a DO<sub>600</sub> e a luminescência emitida por cada poço. É importante destacar que as placas utilizadas nos experimentos são pretas para evitar medidas imprecisas proveniente da luminescência emitida por poços adjacentes, tendo somente o seu fundo transparente para permitir a passagem de luz e a devida quantificação dos parâmetros. Tendo obtidos os dados indicados acima, foi realizada uma normalização da luminescência emitida por cada mutante pela sua DO<sub>600</sub> obtendo-se uma razão Lux/DO<sub>600</sub>. Essa normalização é importante uma vez que o crescimento não é

uniforme ao longo de todos os mutantes contidos na placa, e quão mais saturada a cultura bacteriana está, maior será sua emissão de luminescência.

A razão Lux/DO<sub>600</sub> da condição que recebeu tratamento com ciprofloxacina foi dividida pela razão Lux/DO<sub>600</sub> da condição controle, gerando o *fold change* ou expressão relativa da resposta SOS para dado mutante. A expressão relativa do mutante foi comparada com aquela obtida pela linhagem PAO1::*lux* presente na placa de 96 poços que o mutante se encontra, e caso o mutante em questão apresente uma diferença duas vezes maior ou duas vezes menos àquela apresentada pelo controle positivo, ele foi estocado para estudos posteriores.

Até esta etapa, os dados gerados pela varredura genética são apenas preliminares e são utilizados para fazer uma discriminação inicial dos mutantes que apresentam fenótipos potencialmente relevantes daqueles que não são de interesse para esse estudo. Por isso, após a seleção inicial, todo mutante selecionado foi submetido a uma confirmação do fenótipo identificado, no qual foram realizados três experimentos independentes contendo três réplicas em cultura líquida do mutante. As medidas dos parâmetros de interesse foram quantificadas da mesma forma, e os cálculos da expressão relativa realizados como descrito anteriormente. O mutante tem seu fenótipo de maior ou menor indução da resposta SOS confirmado, após passar por este processo.

No início do trabalho desenvolvido na presente tese, cerca de 2000 mutantes haviam sido gerados pela pós-doutoranda Estela Ynes Valencia, dos quais 56 candidatos foram selecionados por exibirem maior ou menor expressão de *PrecA* em resposta à ciprofloxacina. Esses mutantes foram submetidos aos testes de confirmação e apenas duas linhagens confirmaram o fenótipo de indução diferencial em ensaios quantitativos realizados em múltiplas réplicas: a linhagem 15-10D, que apresentou uma indução da resposta SOS reduzida na presença de ciprofloxacina; e a linhagem 115-11H, que apresentou uma indução da resposta SOS aumentada na presença de ciprofloxacina (Figura 4).



**Figura 4** – Confirmação fenotípica de mutantes pré-selecionados de uma biblioteca de mutantes por transposição. Dentre 56 mutantes previamente selecionados, apenas dois confirmaram o fenótipo de indução diferencial em ensaios quantitativos realizados em múltiplas réplicas, são estes os mutantes 15-10D e 115-11H. Valores acima das barras são referentes ao *fold change* para cada mutante. O primeiro apresenta um *fold change* menor do que duas vezes, já o último apresenta um *fold change* superior a onze vezes. O *fold change* para a linhagem controle é de cerca de quatro vezes. Os dados mostram a média de três experimentos independentes, medindo-se da atividade de luciferase normalizada pelo DO<sub>600</sub> (células tratadas com ciprofloxacina/células não tratadas). As barras de erro indicam o erro padrão.

A seguir nós realizamos a quantificação da CIM dos mutantes descritos acima (Tabela 5), já que o fenótipo observado para cada um deles pode ser uma consequência da diferença da CIM entre a linhagem de interesse e a cepa parental, o que implicaria em um tratamento desigual entre as linhagens uma vez que o tratamento com o antimicrobiano é feito baseando-se em 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina da linhagem parental, que é de 0,03125 µg/mL.

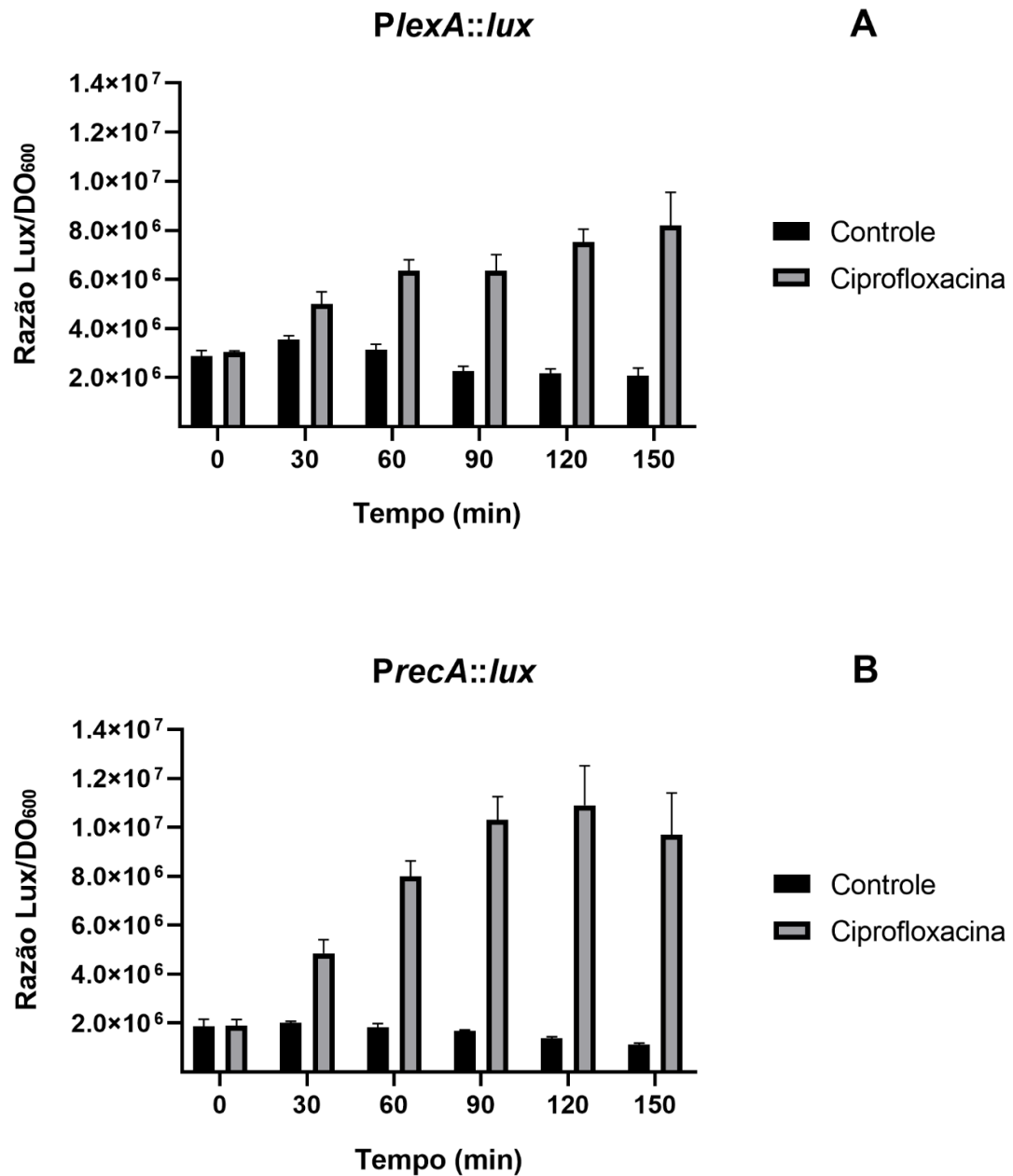
**Tabela 5** – Definição da concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacina para os mutantes selecionados na varredura genética, segundo o protocolo estabelecido pelo CLSI.

Linhagem	Concentração inibitória mínima - Ciprofloxacina
PAO1	0,0625 µg/mL
15-10D	0,125 µg/mL
115-11H	0,0625 µg/mL

Podemos observar que não houve uma alteração da CIM para a linhagem 115-11H, o que torna o seu tratamento eficaz e o resultado obtido através da varredura genética mais preciso e confiável. Houve, porém, uma alteração da CIM para a linhagem 15-10D, que duplicou o seu nível de resistência à ciprofloxacina. Isso implica que para o valor de 0,03125 µg/mL de ciprofloxacina (correspondente a 0,5 vezes a CIM da linhagem controle), a linhagem 15-10D está recebendo um tratamento de apenas 0,25 vezes a sua CIM de ciprofloxacina, o que poderia justificar a menor indução da resposta SOS desse mutante, já que menores concentrações de ciprofloxacina irão induzir a resposta SOS de maneira menos eficiente. Portanto, para confirmação do fenótipo identificado foi necessário realizar um novo tratamento com o antimicrobiano, desta vez adequando os valores de CIM para os níveis de resistência do mutante e evitando que o fenótipo seja mascarado por este fenômeno. Em uma seção posterior, este resultado será apresentado e devidamente abordado.

Apesar de duas linhagens com alteração na indução da resposta SOS terem sido identificadas com essa metodologia, esta apresentou uma grande proporção de falso positivos: apenas 2 clones candidatos de um total de 56, tiveram o fenótipo confirmado. A fim de tentar contornar esse problema, primeiramente realizamos a padronização para utilizar um novo controle positivo nos experimentos. Até esta etapa dos experimentos, a linhagem PAO1::*lux* utilizada foi a mesma dos experimentos realizados pela pós-doutoranda Estela Ynes Valencia, que teve a sua marca de resistência a gentamicina retirada pela ação de uma enzima flipase. Essa marca de resistência era proveniente da inserção dos genes do operon *luxCDABE* no sítio *att* a partir do vetor pUC18T-mini-Tn7T-*lux*-Gm. Para a padronização de um novo controle positivo, utilizamos duas construções baseadas no repórter por bioluminescência: a primeira sendo a linhagem *PrecA>::luxCDABE* que contém a fusão do promotor do gene *recA* aos genes do operon *luxCDABE* da mesma forma que a linhagem controle utilizada anteriormente, porém sem ter sua marca de resistência à gentamicina removida por ação da flipase; e a segunda sendo a linhagem *PlexA>::luxCDABE* que contém a fusão do promotor do gene *lexA* aos genes do operon *luxCDABE*, também sem qualquer ação da enzima flipase sobre o gene que confere resistência a gentamicina. Ambas as linhagens, *PrecA>::lux* e *PlexA>::lux*, tiveram sua funcionalidade

e a dinâmica de sua indução determinadas após a exposição de *P. aeruginosa* à ciprofloxacina (Figura 5).



**Figura 5** – Dinâmica da indução da resposta SOS com os promotores dos genes *recA* e *lexA*. (A) Quantificação da expressão do gene *lexA* em resposta à ciprofloxacina, medida através da atividade do promotor do gene fusionado ao repórter de luminescência. (B) Quantificação da expressão do gene *recA* em resposta à ciprofloxacina, medida através da atividade do promotor do gene fusionado ao repórter de luminescência. A concentração de ciprofloxacina utilizada no tratamento foi de 0,03125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os dados mostram a média de três experimentos independentes, e as barras de erro indicam o erro padrão.

Neste experimento, acompanhamos o comportamento da indução da resposta SOS em cada linhagem pela mensuração da razão Lux/DO<sub>600</sub> ao longo do tempo na linhagem com crescimento espontâneo e com crescimento na presença de ciprofloxacina, que é capaz de induzir a resposta SOS. Pode-se observar que ambos os promotores são induzidos pela exposição à ciprofloxacina de maneira eficiente, sendo que o promotor de *recA* apresenta uma maior expressão relativa (células tratadas com ciprofloxacina/células não tratadas), confirmando resultados anteriores de nosso laboratório. Além disso, os valores dos parâmetros avaliados, são mais altos para o promotor *recA* quando comparados ao promotor do gene *lexA*. Já que a linhagem *PrecA::lux* apresentou parâmetros mais satisfatórios e adequados aos experimentos que desejamos conduzir, prosseguimos com essa linhagem para dar continuidade a varredura genética, mas desta vez sem a remoção do marcador de resistência à gentamicina por ação da flipase.

Ainda sobre o dados apresentado na Figura 5, identificamos que o pico de indução da resposta SOS apresentado pela linhagem *PrecA::lux* foi observado em 2 horas após o tratamento com ciprofloxacina. Além de adotarmos a linhagem *PrecA::lux* sem remoção do marcador de resistência a gentamicina como controle positivo, alteramos o tempo de incubação com o antimicrobiano para 2 horas e também passamos a realizar a seleção feita após a conjugação utilizando gentamicina ao invés de ácido nalidíxico, aproveitando-se a resistência que a cepa controle apresenta e a linhagem doadora de *E. coli* não. Fora essas modificações, todo o protocolo se manteve como descrito anteriormente.

Fazendo as devidas alterações no protocolo, realizamos a geração de mais 1000 mutantes para compor a biblioteca. Destes, 30 mutantes foram pré-selecionados por apresentarem uma indução diferencial da resposta SOS, porém em nenhum desses candidatos fomos capazes de confirmar o fenótipo inicialmente identificado nos ensaios quantitativos realizados em múltiplas réplicas. Por este motivo resolvemos buscar por uma metodologia que conta com parâmetros com maior embasamento estatístico, uma vez que cálculos estatísticos próprios para metodologias de triagem em larga escala são utilizados para determinar se um dado ensaio exhibe reprodutibilidade suficiente para uma triagem.

#### 4.1.2 Estabelecimento de metodologia utilizando o parâmetro Z'

O parâmetro Z' é a medida mais aceita para estimar a qualidade de ensaios utilizada em grandes triagens, sendo calculado pela seguinte fórmula:

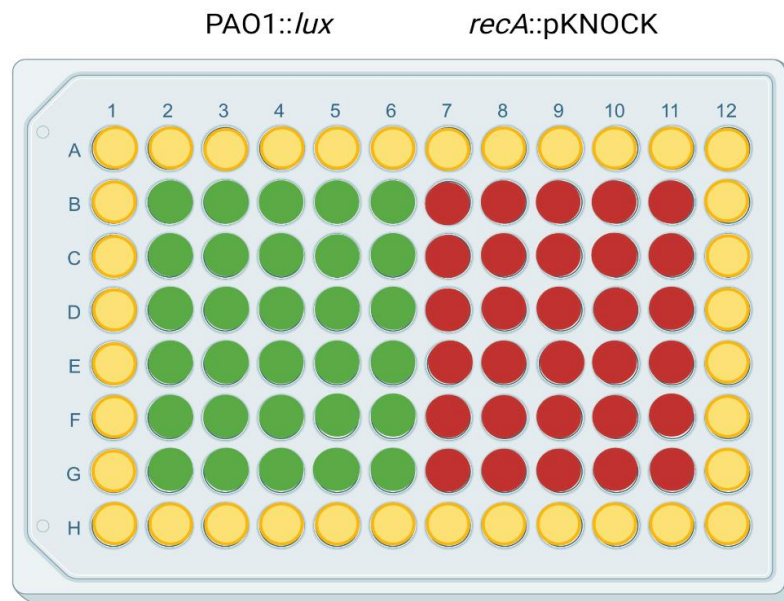
$$\text{Z-factor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Nesta fórmula,  $\sigma_p$  representa o desvio padrão dos resultados gerados por um controle positivo do ensaio.  $\sigma_n$  corresponde ao desvio padrão dos resultados do controle negativo.  $\mu_p$  é a média dos resultados do controle positivo e  $\mu_n$  consiste na média dos resultados do controle negativo. Valores de Z' entre 0,5 – 1 são considerados ideais e indicam um ensaio com alta confiabilidade. Valores entre 0 – 0,5 indicam que a metodologia pode ser utilizada, porém haverá uma maior incidência de resultados falso-positivos. Em valores de Z' abaixo de zero, os ensaios são considerados pouco confiáveis (ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999).

Como controle positivo de nossos experimentos foi utilizada a linhagem PAO1::*lux*, a linhagem parental para a construção dos mutantes da biblioteca de transposons. Já para o controle negativo foi construída uma linhagem capaz de expressar os genes da luciferase sob controle do promotor do gene *recA*, porém em um background *recA*<sup>-</sup> que não é capaz de induzir a resposta SOS (*recA*::pKNOCK PAO1::*lux*). O experimento foi realizado em uma placa de 96 poços, na qual metade da placa foi ocupada pelo controle negativo e a outra metade ocupada pelo controle positivo. Essas bactérias foram tratadas com 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina (0,03125 µg/mL) durante diferentes períodos, com agitação constante à 37°C (Figura 6). Os poços localizados nas bordas da placa de 96 poços foram desconsiderados para o cálculo do parâmetro Z', pois observamos que nestas posições ocorre uma maior evaporação do meio líquido que as bactérias estão em proliferação e isso pode interferir com o crescimento bacteriano. Como um parâmetro essencial para a realização dos experimentos de varredura genética é justamente a DO<sub>600</sub>, ao retirarmos as bordas das placas que apresentavam grandes variações nestes valores, fomos capazes de obter valores muito mais robustos do parâmetro Z' (ALEXEYEV, 1999).



## 0,5 x CIM Ciprofloxacina



2h	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Z'
B	6,87E+05	6,85E+05	7,40E+05	7,38E+05	7,28E+05	4,35E+05	4,20E+05	4,35E+05	4,41E+05	4,33E+05	0,21639
C	6,39E+05	6,40E+05	6,32E+05	6,69E+05	5,11E+05	3,92E+05	4,11E+05	4,07E+05	4,13E+05	4,49E+05	
D	6,01E+05	6,57E+05	6,84E+05	6,88E+05	6,72E+05	3,91E+05	3,69E+05	4,20E+05	4,29E+05	4,38E+05	
E	5,66E+05	5,60E+05	5,79E+05	6,71E+05	7,10E+05	3,81E+05	3,93E+05	3,85E+05	4,03E+05	4,15E+05	
F	6,76E+05	6,33E+05	6,68E+05	6,99E+05	7,51E+05	4,16E+05	4,05E+05	4,18E+05	4,32E+05	4,18E+05	
G	7,61E+05	7,23E+05	7,56E+05	7,89E+05	7,50E+05	4,81E+05	4,98E+05	4,67E+05	4,89E+05	5,12E+05	
3h	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Z'
B	1,32E+06	1,33E+06	1,43E+06	1,33E+06	1,32E+06	6,81E+05	6,88E+05	6,78E+05	6,97E+05	6,63E+05	0,598836
C	1,32E+06	1,40E+06	1,38E+06	1,48E+06	1,37E+06	6,28E+05	6,33E+05	5,72E+05	6,22E+05	6,32E+05	
D	1,35E+06	1,37E+06	1,43E+06	1,44E+06	1,46E+06	6,48E+05	6,71E+05	6,62E+05	5,86E+05	6,46E+05	
E	1,26E+06	1,35E+06	1,35E+06	1,37E+06	1,42E+06	6,79E+05	6,45E+05	6,57E+05	6,43E+05	6,30E+05	
F	1,32E+06	1,31E+06	1,41E+06	1,37E+06	1,45E+06	6,14E+05	6,22E+05	6,15E+05	6,76E+05	6,70E+05	
G	1,27E+06	1,22E+06	1,27E+06	1,33E+06	1,32E+06	6,43E+05	6,34E+05	6,84E+05	6,95E+05	6,95E+05	
4h	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Z'
B	1,36E+06	1,37E+06	1,35E+06	1,34E+06	1,27E+06	4,77E+05	4,94E+05	4,89E+05	4,86E+05	4,85E+05	0,383452
C	1,23E+06	1,21E+06	1,16E+06	1,20E+06	9,58E+05	4,20E+05	4,32E+05	4,19E+05	4,22E+05	4,34E+05	
D	1,38E+06	1,30E+06	1,21E+06	1,16E+06	1,11E+06	4,21E+05	4,16E+05	4,06E+05	4,24E+05	4,58E+05	
E	1,31E+06	1,19E+06	1,11E+06	1,08E+06	1,05E+06	4,00E+05	4,42E+05	4,19E+05	4,54E+05	4,86E+05	
F	1,39E+06	1,21E+06	1,07E+06	1,06E+06	1,03E+06	4,19E+05	4,53E+05	4,60E+05	4,66E+05	4,96E+05	
G	1,48E+06	1,31E+06	1,22E+06	1,17E+06	1,13E+06	4,52E+05	4,63E+05	4,30E+05	4,66E+05	4,94E+05	

**Figura 6** – Esquema de um ensaio utilizado para o cálculo do valor de Z'. A cepa PAO1::*lux* foi utilizada como controle positivo, e a cepa *recA*::pKNOCK como controle negativo. Os poços da borda não são utilizados e continham meio LB fresco. Os valores absolutos de Lux/DO<sub>600</sub> de cada poço são mostrados. O resultado é representativo de cinco ensaios independentes.

O ensaio foi realizado com 30 réplicas de cada controle por placa de 96 poços e em cinco réplicas independentes. As culturas saturadas das bactérias eram primeiramente diluídas 1:50 em meio LB fresco e incubadas por 2 horas à 37°C, então receberam tratamento com 0,03125 µg/mL de ciprofloxacina e voltaram a ser incubadas à 37°C. O melhor valor de Z' obtido foi com incubação por 3 horas com ciprofloxacina, na qual a maioria das bactérias encontram-se em uma DO<sub>600</sub> próxima de 0,6. Tempos de incubação inferiores a 3 horas apresentavam valores de Z' muito baixos, por vezes até mesmo negativos. Já tempos acima de 3 horas começavam a apresentar um decréscimo do valor de Z', como observado em um experimento representativo contido na Figura 6. Os valores de Z' para cada uma das cinco réplicas no tempo de 3h de incubação foram de 0,5988; 0,4648; 0,5383; 0,5603; 0,4147, respectivamente. Foi possível obter valores de Z' acima de 0,5 (considerado o ideal) em três dos cinco testes. Mesmo os valores mais baixos estiveram próximos de 0,5 e por isso as condições foram consideradas adequadas para a realização da varredura genética e essa passou a ser a metodologia utilizada em todos os ensaios posteriores.

#### *4.1.3 Varredura genética em biblioteca de mutantes por transposição*

Baseando-se nos dados obtidos a partir do cálculo de Z', passamos a utilizar os parâmetros padronizados na execução deste experimento para a realização de uma nova varredura de biblioteca de transposons. Dessa vez fomos capazes de avaliar cerca de 6000 mutantes, dos quais 138 foram pré-selecionados e submetidos a testes confirmatórios do fenótipo identificado. Os mutantes pré-selecionados estão resumidos na Tabela 6, tendo sido nomeados de acordo com o número da placa e posição da qual foram isolados, por exemplo o clone na posição A5 da primeira placa de 96 poços se chamará B1-A5.

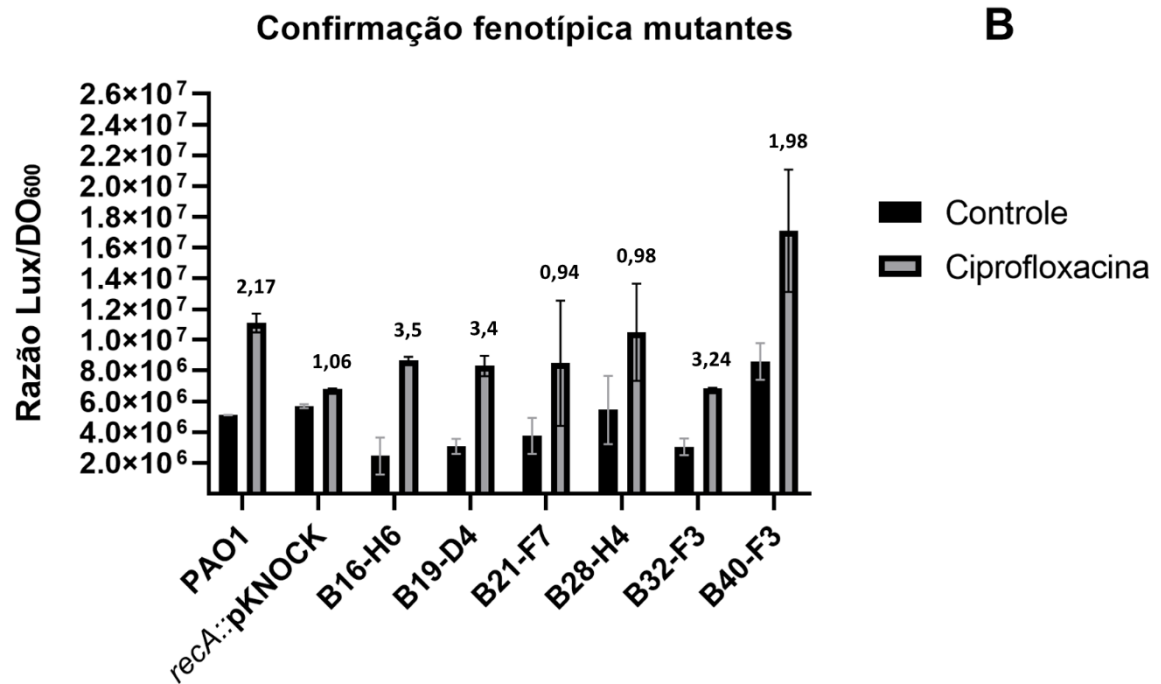
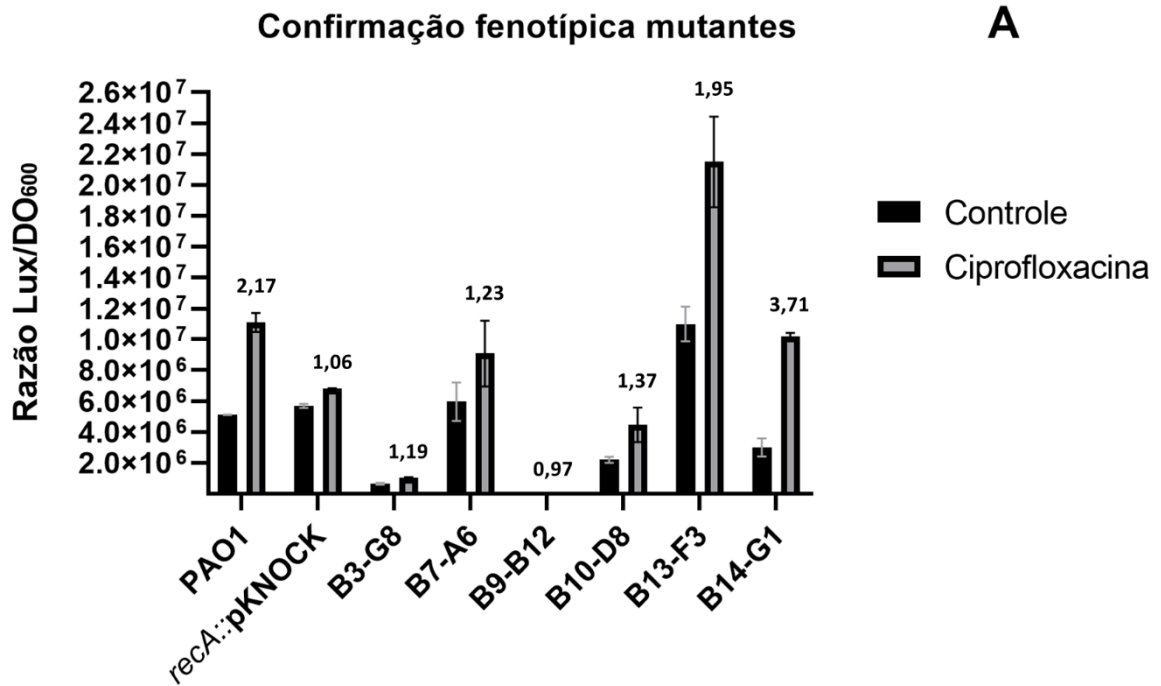
**Tabela 6** – Lista dos mutantes pré-selecionados a partir da varredura genética da biblioteca de mutantes por transposon. A expressão relativa é em comparação ao nível de expressão da cepa PAO1::*lux*. O valor de corte para a seleção de tais mutantes foi de um aumento de duas vezes da expressão relativa da resposta SOS ou de uma redução de duas vezes da expressão relativa da resposta SOS.

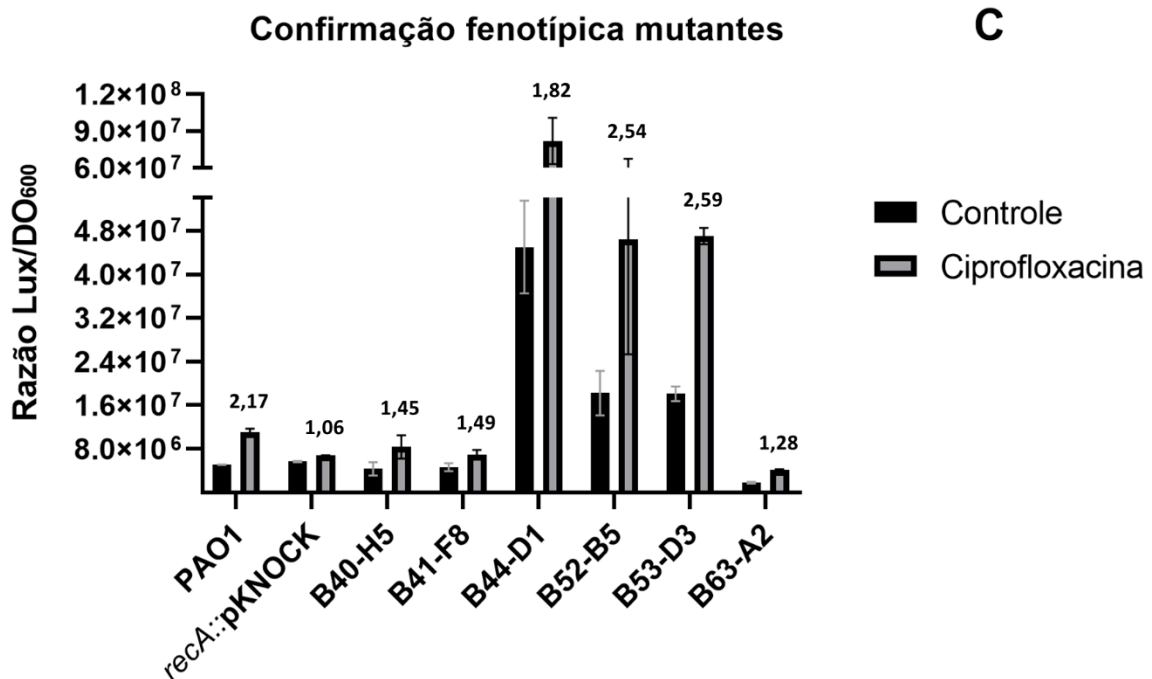
Nome	Expressão relativa	Nome	Expressão relativa	Nome	Expressão relativa
B1-A5	0,597	B22-E11	0,28	B38-B12	0,335
B3-G8	0,253	B22-F1	1,956	B38-D2	0,271
B3-H11	1,829	B22-F11	0,391	B39-C9	0,224
B4-C9	2,736	B22-G3	0,282	B39-E1	0,269
B5-A4	0,471	B22-H5	0,327	B39-F10	0,327
B5-A11	0,401	B22-H8	0,386	B39-H4	1,805
B5-D6	0,495	B22-H9	0,372	B40-D2	0,27
B5-F2	0,384	B23-A2	0,372	B40-F3	2,478
B5-F6	0,517	B23-A8	0,373	B40-G11	0,275
B6-B2	0,365	B23-B3	0,384	B40-H5	1,16
B5-F2	0,312	B23-B11	0,38	B41-D3	2,478
B5-F10	0,379	B23-E10	0,415	B41-D6	2,871
B5-G1	0,324	B23-G11	0,295	B41-F8	0,417
B5-H2	0,357	B23-H9	0,422	B41-H10	2,787
B7-A6	0,351	B24-B2	2,644	B42-H11	0,368
B7-F7	0,356	B26-B8	1,942	B44-D1	2,773
B8-D7	0,436	B26-E8	1,919	B44-H11	0,367
B8-E4	0,412	B26-E9	1,94	B46-A3	0,438
B9-B12	0,001	B27-A10	0,464	B48-A9	2,103
B9-G9	0,404	B27-F3	0,538	B48-B4	2,088
B10-C4	0,339	B27-G3	0,522	B49-B9	2,509
B10-D8	0,267	B28-A10	0,289	B49-D9	2,536
B13-F3	2,581	B28-B1	0,544	B49-D11	2,906
B14-A9	2,188	B28-D10	0,486	B50-D1	2,678
B14-G1	1,941	B28-H4	0,535	B51-B11	0,497
B15-A2	0,438	B28-H6	0,502	B52-B5	2,713
B15-H9	2,117	B28-H7	0,519	B52-C4	3,069
B16-E6	2,308	B30-A11	0,164	B53-B2	0,261
B16-G6	2,395	B30-A12	0,218	B53-D3	2,308
B16-H1	0,521	B30-D10	0,232	B53-H7	0,368
B16-H3	2,291	B32-A4	1,958	B54-E9	0,257
B16-H6	2,023	B32-A5	2,174	B54-F3	0,313

Nome	Expressão relativa	Nome	Expressão relativa	Nome	Expressão relativa
B17-A1	0,474	B32-D4	1,946	B55-A9	2,188
B17-E4	2,027	B32-F3	2,101	B55-F4	0,151
B18-B4	0,302	B33-A1	2,284	B57-H10	2,41
B19-A1	0,449	B33-A2	2,538	B58-G2	0,211
B19-A10	0,462	B33-A3	2,151	B60-A9	2,123
B19-D4	1,931	B33-C10	1,921	B60-F1	0,349
B20-B10	0,224	B33-H2	2,378	B61-B2	2,498
B21-A5	0,617	B35-B12	0,361	B61-H6	0,372
B21-D7	0,29	B35-E2	0,58	B62-F1	0,42
B21-D10	0,347	B35-F3	0,59	B62-G5	0,419
B21-F7	0,408	B36-E4	0,164	B63-A2	0,159
B21-H3	0,381	B37-G11	1,593	B63-E4	0,123
B22-B1	1,906	B38-A10	2,075	B63-F2	0,264
B22-D7	0,307	B38-B1	0,247	B64-A2	0,464

Uma grande diversidade de mutantes com alterações na indução da resposta SOS foi identificada, alguns apresentando fenótipos bastante expressivos. Contudo, fez-se necessário realizar a confirmação do fenótipo inicialmente identificado a fim de eliminar possíveis candidatos que sejam falso-positivos, que estarão sempre presentes em metodologias de varredura *high throughput* mesmo que valores ideais de Z' tenham sido obtidos durante a padronização da metodologia. A confirmação fenotípica foi realizada em placa de 96 poços, seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos para geração da varredura genética. Dessa vez, porém, cada mutante foi avaliado em três réplicas técnicas em três experimentos realizados independentemente.

Os dados da confirmação fenotípica encontram-se na Figura 7, contudo mostrando somente o resultado obtido com os mutantes que foram efetivamente selecionados para continuação do estudo. Em todo experimento de confirmação os controles positivo e negativo estavam presentes para garantir que não houve nenhum fator externo que nos impediu de obter dados satisfatórios acerca dos níveis de indução da resposta SOS. No total foram 18 mutantes selecionados dos 138 inicialmente identificados, o que foi uma diminuição satisfatória na porcentagem de falso-positivos quando comparado à porcentagem encontrada na metodologia previamente estabelecida no laboratório.





**Figura 7** – Confirmação fenotípica dos mutantes da biblioteca de transposon. A figura apresenta os 18 mutantes que confirmaram seu fenótipo identificado na pré-seleção, mostrando a razão Lux/DO<sub>600</sub> da condição controle e tratamento com ciprofloxacina para cada um dos mutantes. Os controles positivo e negativo do experimento também são mostrados. Valores acima das barras são referentes ao *fold change* para cada mutante. (A) Resultado da confirmação de 6 mutantes selecionados. (B) Resultado da confirmação de outros 6 mutantes selecionados. (C) Resultado da confirmação dos últimos 6 mutantes selecionados. Os dados mostram a média de três experimentos independentes, e as barras de erro indicam o erro padrão.

Os dados obtidos nos experimentos de confirmação fenotípica nos permitiram ampliar os fenótipos inicialmente esperados para as variações na indução da resposta SOS, quando buscávamos somente um aumento ou redução na expressão relativa (tratado com ciprofloxacina/não tratado) da resposta SOS para cada mutante. Porém, percebemos que em alguns mutantes que exibiam expressão relativa diferencial esse fenômeno ocorria devido a um aumento dos níveis de indução da resposta SOS basal do mutante, ou seja, em um estado SOS-induzido espontâneo e sem a presença de um agente indutor. Com essa elevação do nível indução espontânea nesses mutantes, o *fold change* para estes casos se tornavam alterados artificialmente e por isso decidimos categorizar esses mutantes em uma categoria diferente das duas outras previamente esperadas. Esse foi o caso para os mutantes B13-F3, B40-F3, B44-D1, B52-B5 e B53-D3.

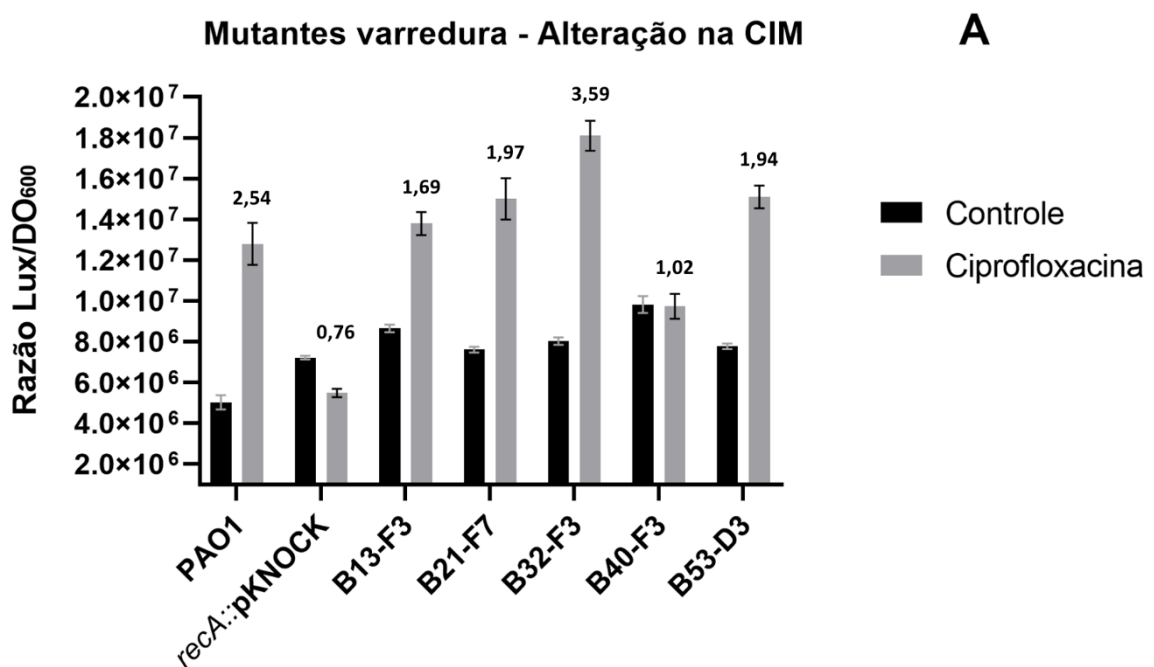
Na Tabela 7 encontra-se um resumo de todos os mutantes selecionados na varredura genética. Nela encontramos o nome, o fenótipo identificado, além da CIM e sítio de inserção do transposon para cada um dos mutantes. A CIM foi determinada segundo as normas do CLSI e é importante pois, posteriormente, foi avaliado se a diferença encontrada quanto a indução a resposta SOS por ciprofloxacina foi devido a uma alteração do seu nível de resistência ou não. Além disso, a determinação do sítio de inserção do transposon que ocasionou a interrupção gênica em cada um dos mutantes selecionados foi identificado a partir de uma PCR semi-degenerada proposto por Jacobs, 2003 que está descrito em detalhes na seção Material e Métodos.

**Tabela 7** – Lista dos 18 mutantes selecionados pela varredura genética, mais os 2 mutantes selecionados anteriormente. Nela podemos conferir o seu fenótipo identificado, o sítio de inserção do transposon que gerou a interrupção gênica e a CIM de ciprofloxacina. A CIM de PAO1 é de 0,06250 µg/mL.

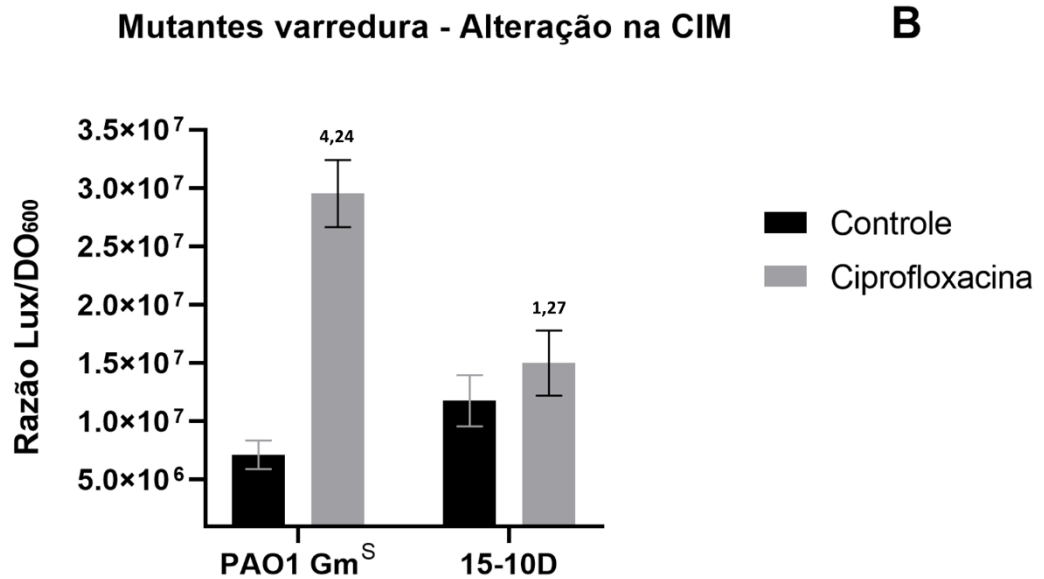
Clone	Sítio de inserção	Fenótipo	MIC Ciprofloxacina
<b>15-10D</b>	PA5362	Menor indução SOS	0,125 µg/mL
<b>115-11H</b>	<i>luxD</i>	Maior indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B3-G8</b>	<i>luxE</i>	Menor indução SOS	0,125 µg/mL
<b>B7-A6</b>	<i>purK</i>	Menor indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B9-B12</b>	<i>luxC</i>	Ausência de luminescência	0,125 µg/mL
<b>B10-D8</b>	<i>fleQ</i>	Menor indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B13-F3</b>	<i>pyrB</i>	SOS espontâneo elevado	0,125 µg/mL
<b>B14-G1</b>	PA3024	Maior indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B16-H6</b>	<i>napA</i>	Maior indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B19-D4</b>	<i>fliR</i>	Maior indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B21-F7</b>	PA1914	Menor indução SOS	0,125 µg/mL
<b>B28-H4</b>	PA1760	Menor indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B32-F3</b>	<i>pmrB</i>	Maior indução SOS	0,125 µg/mL
<b>B40-F3</b>	<i>pabC</i>	SOS espontâneo elevado	0,125 µg/mL
<b>B40-H5</b>	<i>ctpH</i>	Menor indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B41-F8</b>	PA5093	Menor indução SOS	0,0625 µg/mL
<b>B44-D1</b>	PA0401	SOS espontâneo elevado	0,0625 µg/mL
<b>B52-B5</b>	<i>pauA</i>	SOS espontâneo elevado	0,0625 µg/mL
<b>B53-D3</b>	PA1631	SOS espontâneo elevado	0,125 µg/mL
<b>B63-A2</b>	PA4012	Menor indução SOS	0,0625 µg/mL

O próximo passo foi verificar se a alteração da CIM foi o motivo de identificarmos expressão relativa alterada nos mutantes que tiveram seus níveis de resistência a ciprofloxacina alterados em decorrência da inserção do transposon em seus genomas. Isso porque se houve um aumento na CIM, o mutante em questão receberá um tratamento menor do que 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina, e menores concentrações irão induzir a resposta SOS de maneira menos eficiente. Portanto, o experimento foi realizado conforme os parâmetros utilizados durante o experimento de confirmação fenotípica, porém dessa vez utilizando os valores de 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina normalizado para os níveis de resistência adequado para cada cepa.

Os resultados desse experimento estão apresentados na Figura 8 separada em duas partes, sendo que a primeira analisa os mutantes identificados a partir da metodologia estabelecida a partir do Z' em que a linhagem controle é a cepa PAO1::*lux* Gm<sup>R</sup> e a segunda analisa o mutante selecionado pela metodologia previamente estabelecida no laboratório e que utiliza a cepa PAO1::*lux* Gm<sup>S</sup>. Essa separação se dá pois a indução da resposta SOS para a linhagem PAO1::*lux* Gm<sup>S</sup> é maior do que a cepa resistente a gentamicina, afim de ficar fidedigno com a linhagem controle utilizada para a geração de cada um dos mutantes.







**Figura 8** – Padronização dos níveis de indução da resposta SOS de acordo com a CIM adequada para cada uma das linhagens que tiverem alteração nos níveis de resistência a ciprofloxacina em decorrência da inserção do transposon. Valores acima das barras são referentes ao *fold change* para cada mutante. (A) Mutantes identificados com a metodologia estabelecida a partir do Z', em que a linhagem controle é a cepa PAO1::*lux* Gm<sup>R</sup>. (B) Mutantes selecionados pela metodologia previamente estabelecida no laboratório, em que a linhagem controle é a cepa PAO1::*lux* Gm<sup>S</sup>. Os dados mostram a média de três experimentos independentes, e as barras de erro indicam o erro padrão.

De acordo com os dados obtidos a partir da normalização da MIC, o único mutante que não replicou os dados apresentados durante a confirmação de fenótipo foi o mutante B21-F7. Esse candidato havia sido inicialmente identificado como apresentando um fenótipo de menor expressão relativa da resposta SOS, e após a normalização do tratamento para a sua CIM esse fenótipo não foi mais evidenciado. Isso provavelmente se deu ao fato de que por ter uma CIM maior do que a linhagem controle, o tratamento com 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina seria somente de 0,25 vezes a MIC deste mutante, o que fez com que a indução da resposta fosse mais discreta e potencializou o fenótipo que identificamos inicialmente. Para todos os outros mutantes com modificação da MIC, julgamos que os seus fenótipos se mantiveram os mesmos e por isso não foram retirados dos mutantes selecionados.

Por último, além do mutante B21-F7 também retiramos os mutantes 115-11H, B3-G8 e B9-B12 dos mutantes selecionados. Isso se deve ao fato de que todos esses mutantes apresentaram a interrupção gênica pela inserção do transposon em um dos genes do operon *luxCDABE*, e apesar de ser uma das possibilidades esperadas da

varredura genética, essas interrupções gênicas não nos trariam informações relevantes sobre genes que afetam a indução da resposta SOS, mas sim são um artefato experimental possível dentro da metodologia adotada. A Tabela 8 apresenta os mutantes finais selecionados segundo a varredura genética estabelecida. Nela foi acrescentada a função do gene identificado e também a informação sobre a posição da inserção do transposon que ocasionou a interrupção gênica, se referindo a extensão dessa sequência a partir da posição +1 da CDS do gene interrompido em questão.

**Tabela 8** – Lista dos 16 mutantes finais selecionados pela varredura genética. Nela podemos conferir o seu fenótipo identificado, o sítio de inserção do transposon que gerou a interrupção gênica, a posição do início e final da inserção (usando a posição +1 da CDS como referência) e a CIM de ciprofloxacina.

Clone	Sítio de inserção	Função	Posição da inserção	Fenótipo
<b>15-10D</b>	PA5362	Transportador de membrana	(-) 32/1341	Menor indução SOS
<b>B7-A6</b>	<i>purK</i>	AlR carboxilase	612/1083	Menor indução SOS
<b>B10-D8</b>	<i>fleQ</i>	Regulador transcricional	198/1473	Menor indução SOS
<b>B13-F3</b>	<i>pyrB</i>	Aspartato carbamoiltransferase	(-) 165/1005	SOS espontâneo elevado
<b>B14-G1</b>	PA3024	Carboidrato quinase	1042/1560	Maior indução SOS
<b>B16-H6</b>	<i>napA</i>	Nitrato redutase	124/2490	Maior indução SOS
<b>B19-D4</b>	<i>fliR</i>	Biossíntese flagelar	292/777	Maior indução SOS
<b>B28-H4</b>	PA1760	Regulador transcricional	954/2724	Menor indução SOS
<b>B32-F3</b>	<i>pmrB</i>	Efluxo de drogas	(-) 16/1434	Maior indução SOS
<b>B40-F3</b>	<i>pabC</i>	4-amino-4-deoxicorismato liase	628/816	SOS espontâneo elevado
<b>B40-H5</b>	<i>ctpH</i>	Transdução na quimiotaxia	155/1707	Menor indução SOS
<b>B41-F8</b>	PA5093	Histidina/fenilalanina amônia-liase	1346/1533	Menor indução SOS
<b>B44-D1</b>	PA0401	Diidroorotase não-catalítica	148/1005	SOS espontâneo elevado
<b>B52-B5</b>	<i>pauA</i>	Pimeloil-CoA sintetase	1875/2148	SOS espontâneo elevado
<b>B53-D3</b>	PA1631	Acil-CoA dehidrogenase	619/1155	SOS espontâneo elevado
<b>B63-A2</b>	PA4012	Proteína com N-terminal Lon	251/594	Menor indução SOS

Mais nenhum experimento acerca dos mutantes identificados foi realizado neste trabalho, mas podemos ver que há uma diversidade interessante de fenótipos identificados pela varredura genética. Experimentos de caracterização funcional desses genes acerca da resposta SOS são essenciais para o melhor entendimento de como dado gene pode interferir com os níveis de indução da resposta. Na seção Discussão, abordaremos um pouco mais sobre algumas características interessantes para algum destes genes e como eles podem estar contribuindo para o fenótipo identificado, bem como sugerir direções para a continuidade deste trabalho.

## 4.2 Caracterização funcional de genes regulados pela resposta SOS

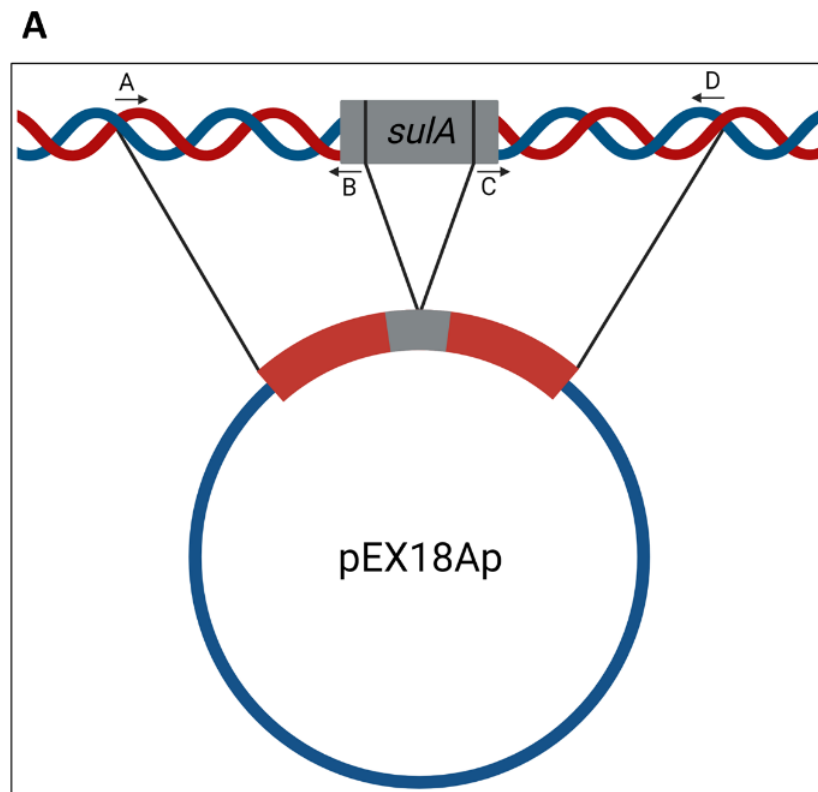
Os dados a seguir englobarão os dados resultados gerados para tentar elucidar a função de genes de função desconhecida da resposta SOS, são eles PA2288, PA3413 (*yebG*) e PA3008. Para isso, foi realizado a deleção de cada um desses genes e alteração de fenótipos relacionados a resposta SOS foram avaliados. O gene PA3008, também conhecido como *sulA*, foi o foco deste trabalho e aquele que teve um maior número de análises realizadas.

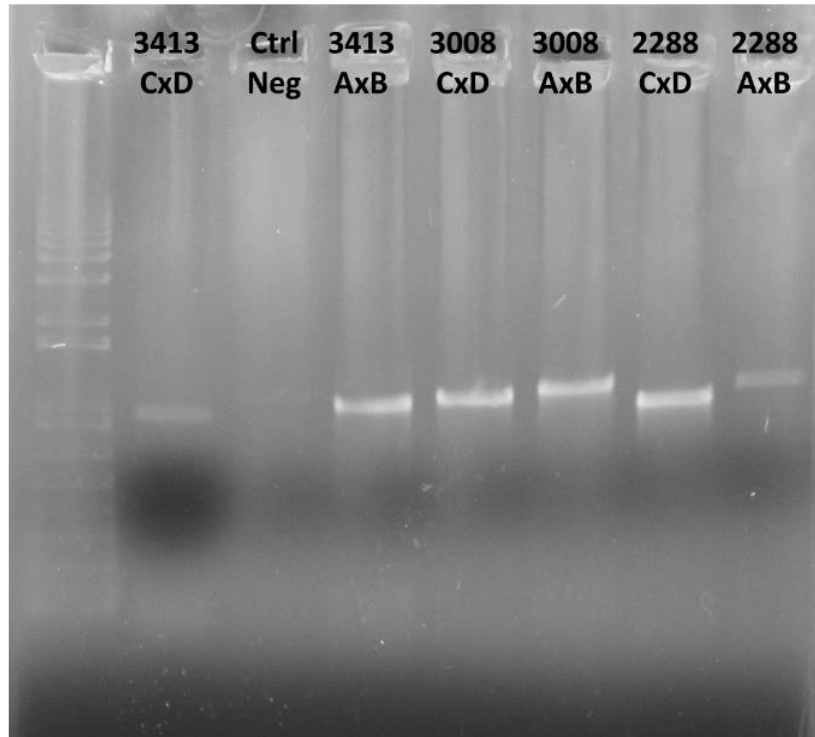
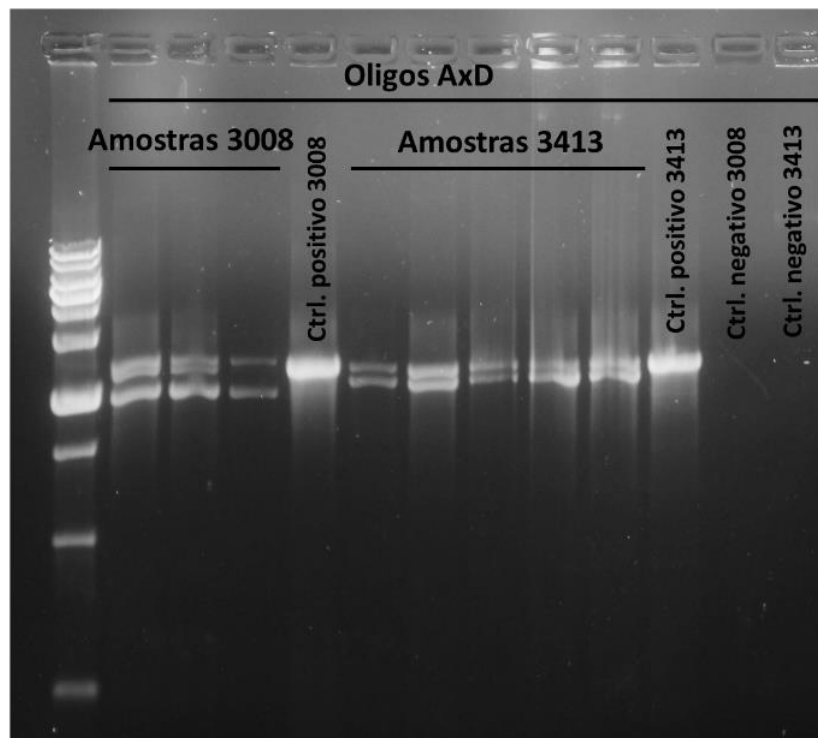
### 4.2.1 Construção de linhagens mutantes

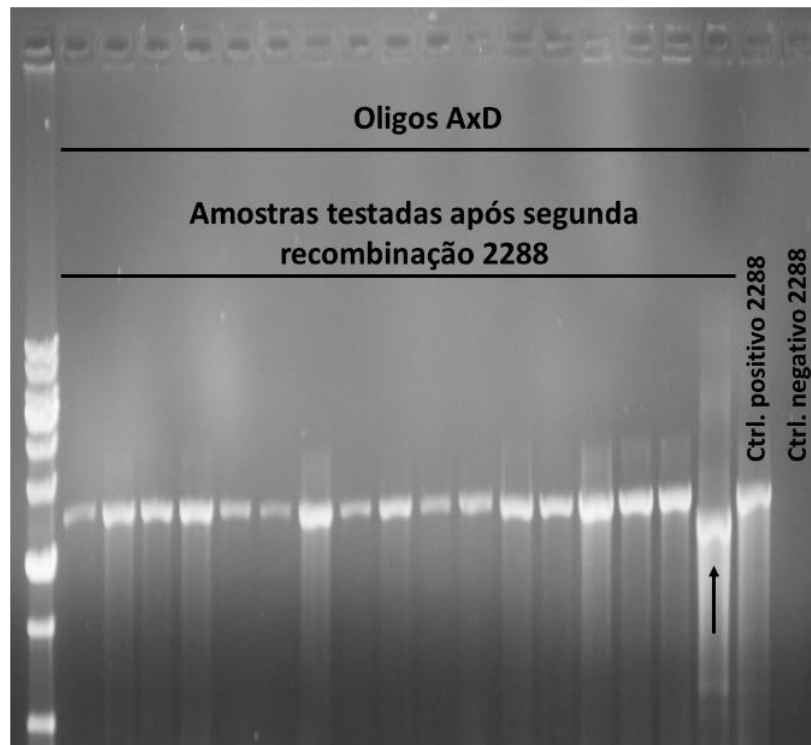
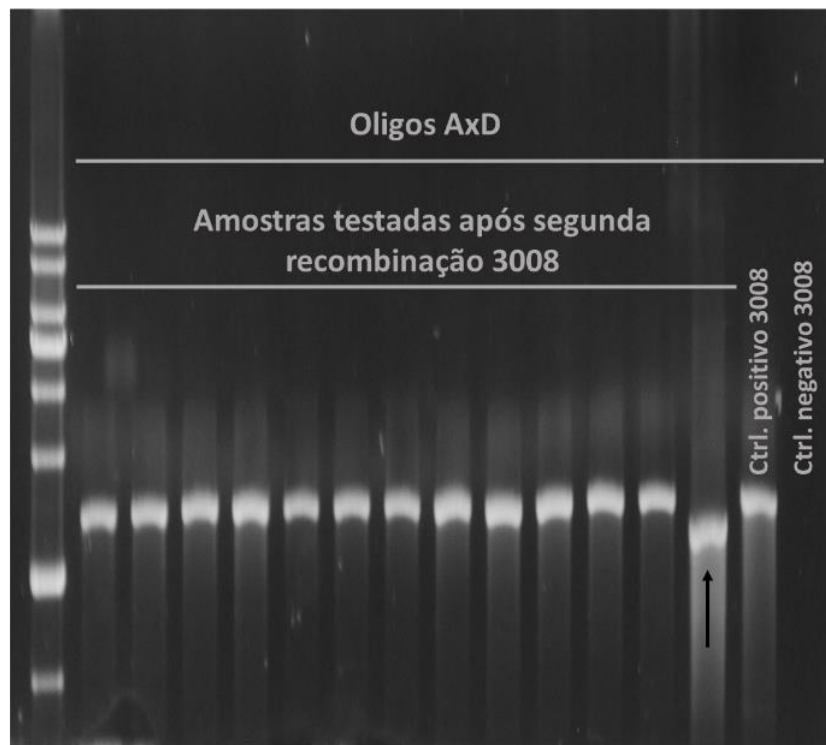
Realizamos a deleção dos genes PA2288, PA3008 (*sulA*) e PA3413 (*yebG*). Utilizando a ferramenta online In-Fusion® Primer Design Tool, desenhamos oligonucleotídeos para amplificação das regiões flanqueadoras dos genes e uma pequena porção da sua sequência codificadora de cada uma de suas extremidades, referidos de agora em diante como versão deletada dos genes. Os fragmentos foram então clonados no vetor pEX18Ap (Figura 9A), que contém marca de resistência a ampicilina e já é bem estabelecido em protocolos de deleção gênica em *Pseudomonas aeruginosa* (HOANG et al., 1998a).

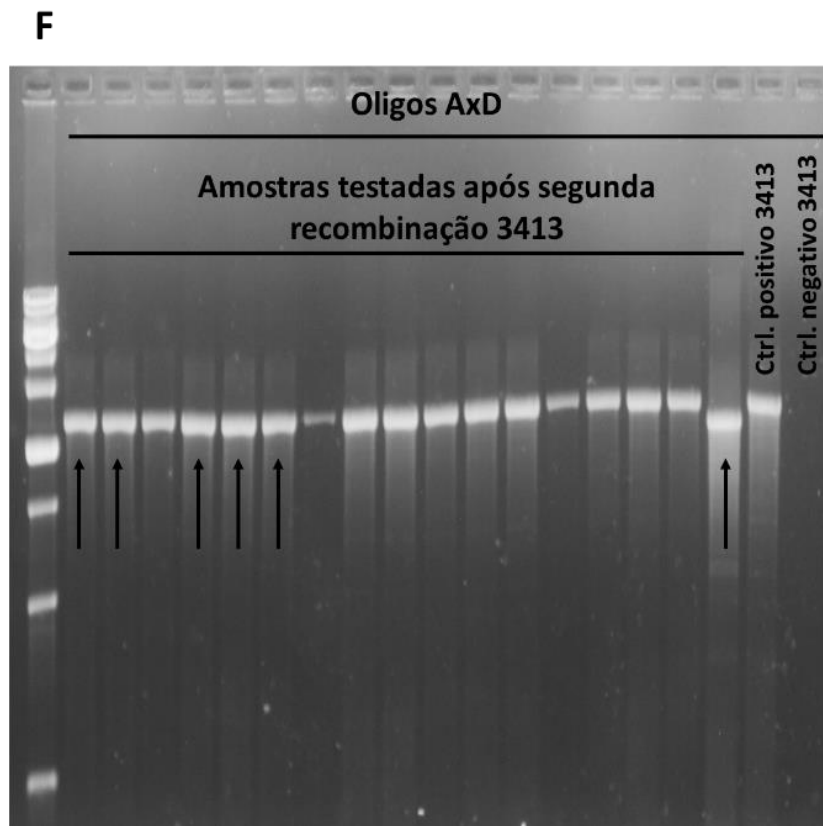
Após a reação de PCR para obtenção dos fragmentos da versão deletada dos genes, conferimos sua amplificação por eletroforese em gel de agarose (Figura 9B). Uma vez obtidos os fragmentos, realizamos a construção plasmidial contendo a versão deletada dos genes, que posteriormente foi transformado na linhagem S17 de *E. coli*. Tal linhagem permite a realização de conjugação com a linhagem PAO1 de *P. aeruginosa*, que é selecionada por ter recebido o plasmídeo por apresentar resistência a carbenicilina (conferida através do gene que confere resistência a ampicilina, presente no vetor pEX18Ap). A única forma do plasmídeo se manter na linhagem PAO1 é se integrar ao genoma da bactéria, já que este é um vetor não replicativo neste organismo. A integração se dá por recombinação homóloga, que utiliza a sequência das regiões flanqueadoras dos genes como sequência homóloga. Após o primeiro evento de recombinação, a PAO1 apresentou duas cópias dos genes de interesse, uma sendo a versão genômica e funcional do gene e a outra a versão deletada. A presença de duas cópias do gene foi verificada por PCR (Figura 9C).

Os clones que contém as duas cópias dos genes passaram por uma contra-seleção em sacarose que busca identificar as linhagens mutantes que sofreram um segundo evento de recombinação homóloga, fazendo a remoção do plasmídeo juntamente com a versão genômica do gene de interesse ou com a versão deletada, dependendo da sequência que foi utilizada como substrato para o segundo evento de recombinação homóloga. Identificamos aqueles clones que mantiveram apenas a cópia deletada através de PCR e as Figuras de 9D a 9F mostram os clones selecionados após análise por eletroforese em gel de agarose.



**B****C**

**D****E**



**Figura 9** – Deleção dos genes PA2288, PA3008 (*sulA*) e PA3413 (*yebG*). (A) Esquema da construção feita no vetor suicida pEX18ap para a deleção em fase dos genes de interesse. Os oligonucleotídeos usados para amplificação das regiões flanqueadoras dos genes estão indicados pelas letras de A a D. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% com amostras da amplificação das regiões flanqueadoras dos genes de interesse. Detalhes de cada amostra se encontram descritos acima de cada canaleta do gel de agarose. (C) Eletroforese em gel de agarose 0,8% com amostras de PCR feitas a partir dos oligonucleotídeos A e D de clones resistentes a carbenicilina após a transformação com o vetor pEX18Ap contendo as regiões flanqueadoras dos genes. A duplicação do produto de PCR nas amostras indica que houve recombinação do vetor transformado. O controle positivo utilizou DNA genômico de PAO1 e a banda presente nesta amostra é o tamanho esperado para o gene completo. (D-F) Eletroforese em gel de agarose 0,8% com amostras de PCR feita a partir dos oligonucleotídeos 1 e 4 em amostras de PAO1 sensíveis a carbenicilina após a contra-seleção em sacarose. As secas indicam eventos clones em que o evento de recombinação manteve a versão deletada dos genes no seu cromossomo. O controle positivo segue o mesmo princípio do utilizado na Figura C. A Figura D se refere a deleção do gene PA2288, a Figura E se refere a deleção do gene PA3008 (*sulA*) e a Figura F se refere a deleção do gene PA3413 (*yebG*).

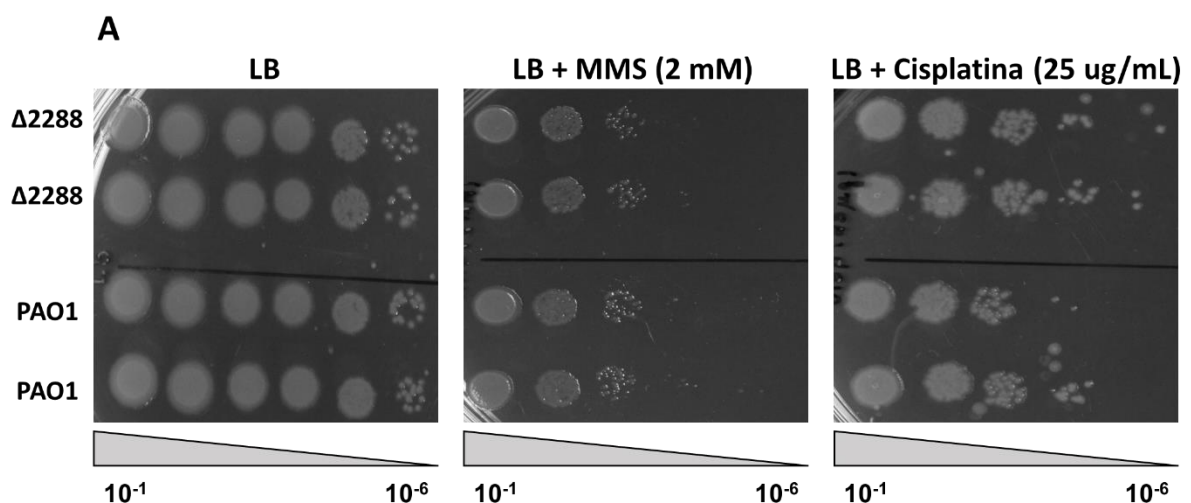
Selecionamos um dos clones obtidos dentre aqueles com deleção dos genes de interesse para continuação do trabalho. Os clones obtidos serão referidos como as linhagens  $\Delta$ PA2288,  $\Delta$ *sulA* (gene PA3008) e  $\Delta$ PA3413. Determinamos que nenhuma destas linhagens mutantes apresentam alteração na sensibilidade a ciprofloxacina e mantém a mesma CIM da linhagem parental PAO1, que é de 0,06250  $\mu$ g/mL.

Construímos também a complementação da linhagem mutante  $\Delta$ PA3413 para confirmar que os fenótipos observados são conferidos exclusivamente pela deleção do gene. Clonamos o gene PA3413 (*yebG*) acompanhado de sua região promotora em um vetor pJN105, onde é possível induzir a expressão do fragmento clonado por adição de L-arabinose. Em posse do vetor pJN105 [PA3413], realizamos a transformação deste na linhagem  $\Delta$ PA3413.

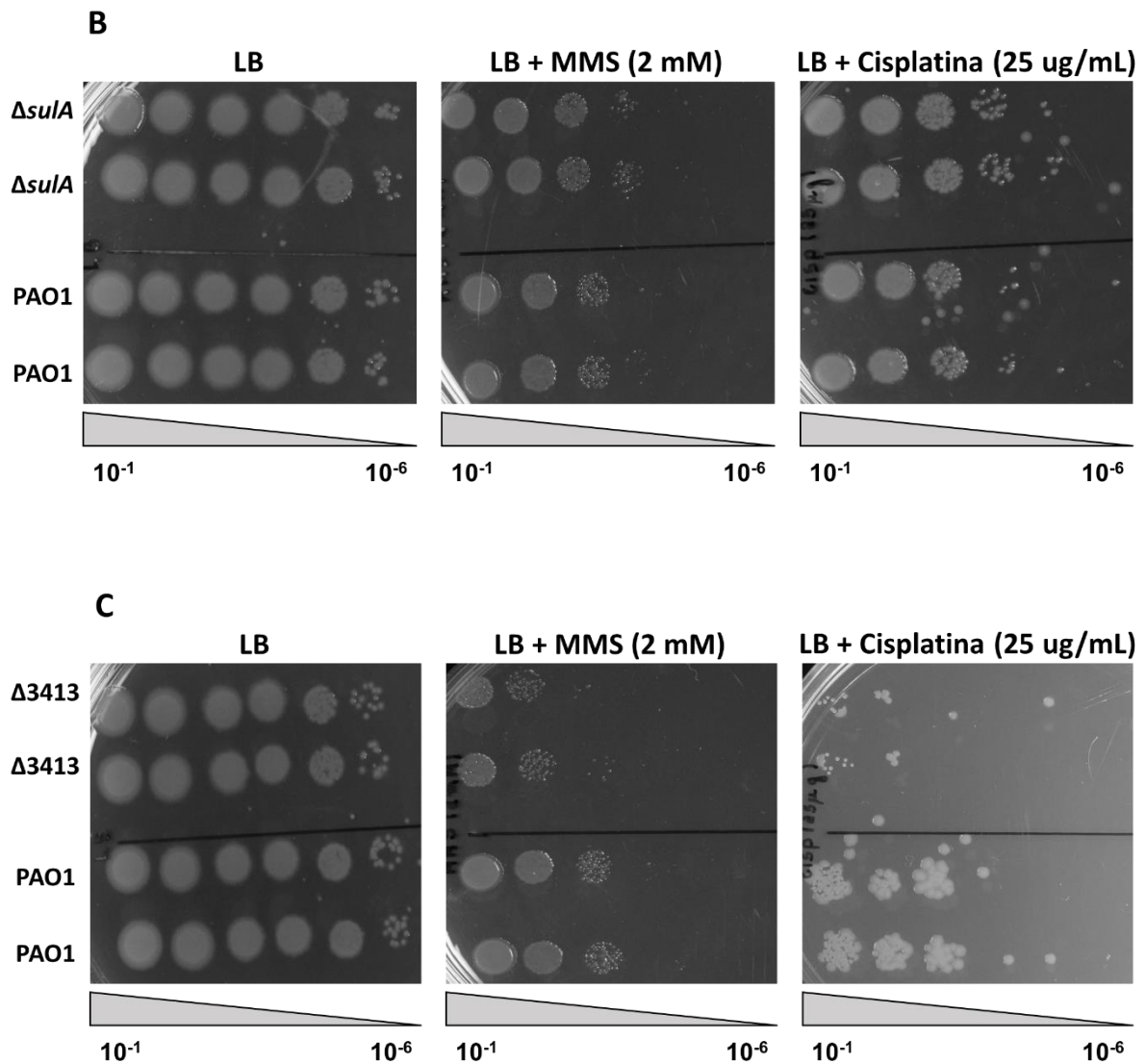
Também obtivemos os vetores pJN105 [PA2288] e pJN105 [*suIA*], que além de permitir a complementação da deleção destes genes nos permite realizar a transformação destes em diferentes linhagens e analisar os efeitos da super-expressão dos genes em diferentes condições, apesar destes ensaios não serem abordados neste trabalho.

#### 4.2.2 Análise fenotípica das linhagens mutantes

Para caracterização funcional das linhagens mutantes geradas, realizamos testes para identificar o fenótipo de sensibilidade a agentes genotóxicos. Dentre os agentes testados estão o metanosulfonato de metila (MMS) e cisplatina (Cis), que são capazes de induzir a ativação da resposta SOS, o que nos permitiu avaliar como a ausência de cada um dos genes de interesse afetou a resposta da célula na presença de tais agentes. Podemos conferir os resultados dos experimentos de sensibilidade a agentes genotóxicos na Figura 10.





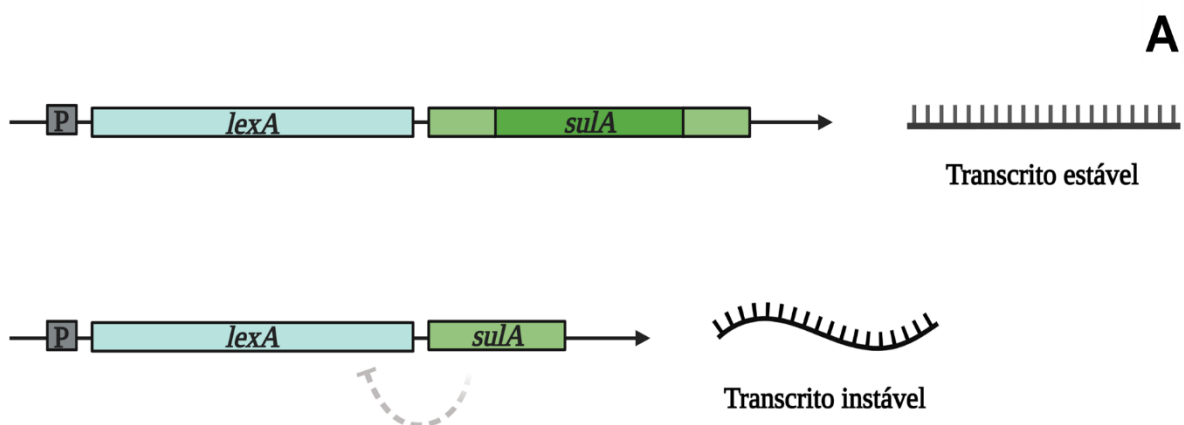


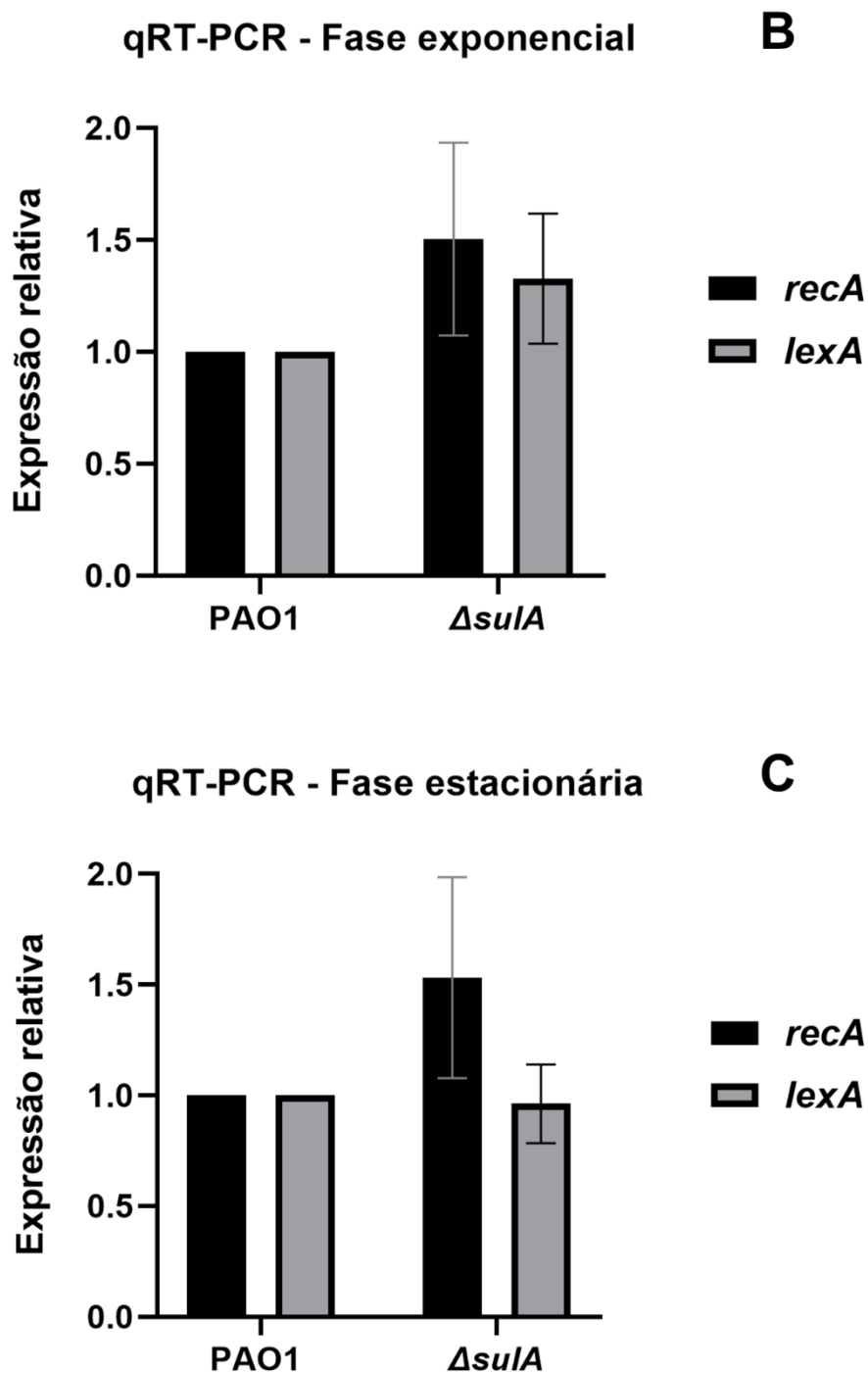
**Figura 10** – Ensaio de sensibilidade à agentes genotóxicos. Os resultados são representativos de um experimento, mas todas as condições foram analisadas em três réplicas biológicas independentes. (A) Resultado do teste de sensibilidade a agentes genotóxicos para a linhagem  $\Delta PA2288$ . Na extremidade direita encontramos a indicação da linhagem referente a cada umas das linhas analisadas, na extremidade superior encontramos a condição de crescimento das linhagens e no canto inferior encontramos a diluição de cada coluna. (B) Resultado do teste de sensibilidade a agentes genotóxicos para a linhagem  $\Delta sulA$ . Configuração da imagem segue como descrito para a Figura A. (C) Resultado do teste de sensibilidade a agentes genotóxicos para a linhagem  $\Delta PA3413$ . Configuração da imagem segue como descrito para a Figura A.

Não foi possível detectar nenhuma alteração quanto ao fenótipo exibido pela linhagem  $\Delta PA2288$ , que manteve os mesmos níveis de sensibilidade da linhagem parental PAO1. Já o mutante  $\Delta PA3413$ , apresentou maior sensibilidade a ambos os

agentes genotóxicos quando comparada a linhagem parental PAO1. A análise da sensibilidade a agentes genotóxicos do mutante  $\Delta sulA$  revelou que a ausência deste gene confere maior resistência ao tratamento de cisplatina e MMS, quando comparado a cepa parental PAO1. Esse resultado é inesperado, uma vez que vai contra a ideia de que a filamentação tem papel na manutenção da estabilidade genética durante situações de estresse, por promover maior tempo para resolução dos processos de reparo de DNA e replicação, que de outra forma poderiam ser bastante danosos para a célula.

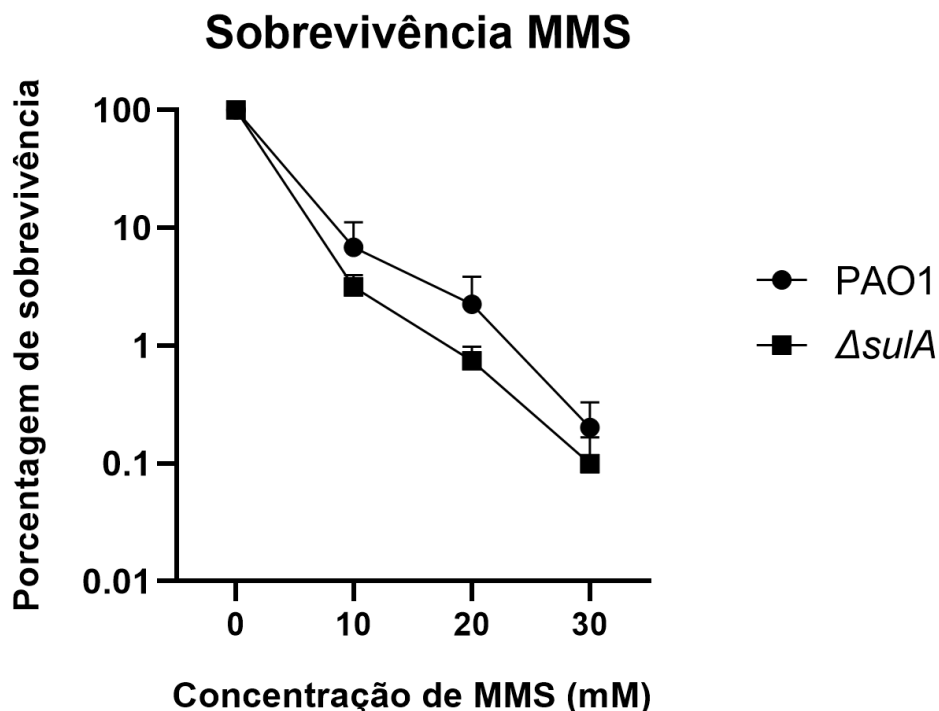
A primeira hipótese testada para tentar elucidar este dado, foi a de que a deleção do gene *sulA* poderia afetar a indução da resposta SOS. Tal hipótese surgiu do fato de que em *Pseudomonas aeruginosa* o gene *sulA* se encontra em um operon com o gene *lexA*, que é o repressor transcricional da resposta SOS. *sulA* encontra-se em uma região distal no operon, e a sua deleção poderia causar um efeito polar no mRNA do gene *lexA* levando a maior instabilidade do transcrito (Figura 11A). Essa instabilidade seria caracterizada por uma menor expressão da proteína repressora LexA, o que levaria a um quadro de maior expressão de todos os genes da resposta SOS, resultando na maior resistência a agentes genotóxicos encontrada no mutante  $\Delta sulA$ , uma vez que vários genes de reparo de DNA estão sob o controle da resposta SOS. Para testar essa hipótese, realizamos ensaios de qRT-PCR nos quais verificamos os níveis de transcrição dos genes *lexA* e *recA*, a fim de avaliar uma possível redução do controle transcricional promovido pela resposta SOS (Figura 11 B e C).





**Figura 11** – Análise da expressão de *recA* e *lexA* em células não expostas a agentes genotóxicos. Os dados estão representados como expressão relativa em relação à linhagem parental PAO1 e contém a média de três réplicas biológicas independentes. (A) Representação esquemática do possível efeito polar que a deleção do gene *sulA* pode ter gerado ao ser deletado, levando a maior instabilidade do transcrito do operon. (B) qRT-PCR da fase exponencial de crescimento, na qual não houve diferença de expressão detectada ( $P > 0.05$ ). (C) qRT-PCR da fase estacionária de crescimento, na qual não houve diferença de expressão detectada ( $P > 0.05$ ).

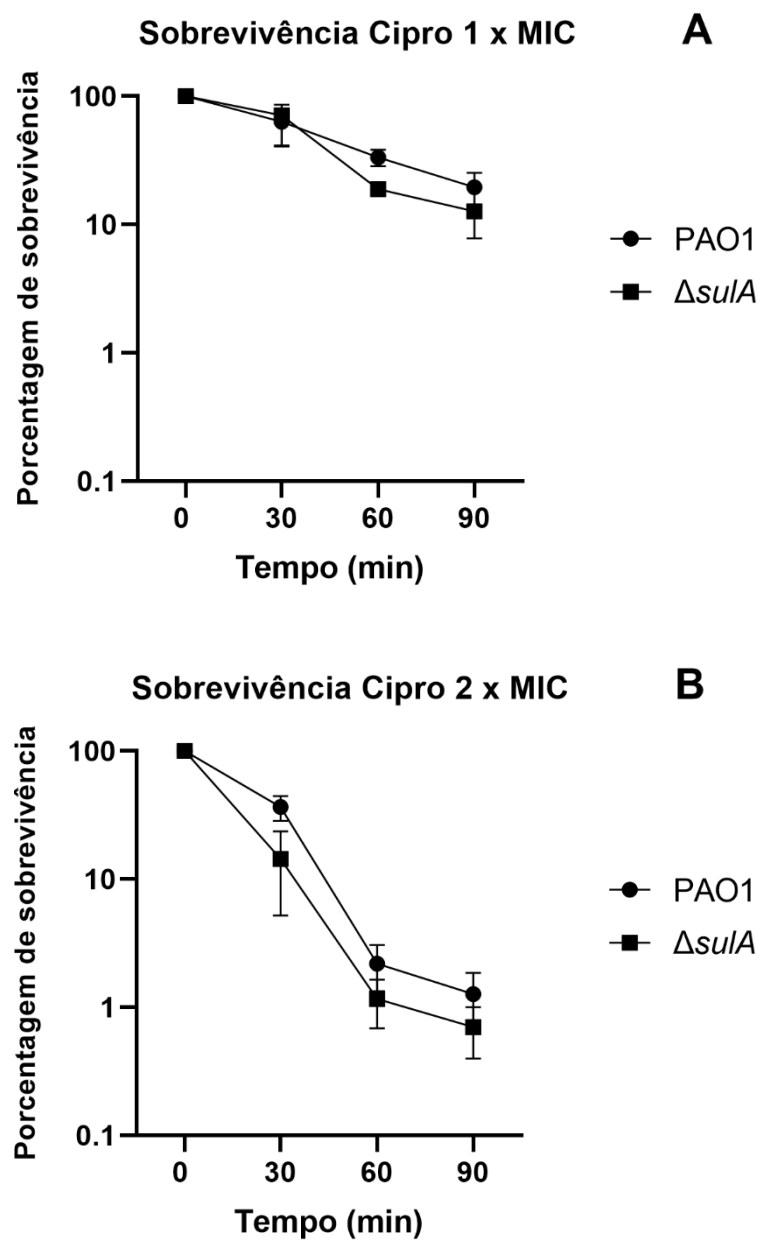
A análise do resultado obtido com o qRT-PCR nos mostrou que nossa hipótese inicial estava errada, e que não há alteração de expressão dos genes *lexA* ou *recA* que justifiquem uma modificação dos níveis de repressão da resposta SOS. Nossa próxima hipótese foi de que no experimento de sensibilidade proposto, as bactérias estão em exposição crônica aos agentes genotóxicos, já que precisam formar colônias no meio de cultivo contendo a droga. Desta forma, a constante indução da filamentação mediada por SulA acaba reduzindo a viabilidade, por impedir a divisão celular. A fim de analisarmos essa hipótese, propomos a realização do experimento de sensibilidade a agente genotóxico com uma exposição aguda em meio líquido, com posterior semeadura em meio livre de agentes genotóxicos para contagem de UFC, de forma que a morte celular não mascare o resultado obtido. Realizamos um ensaio de sobrevivência a MMS que está apresentado na Figura 12.

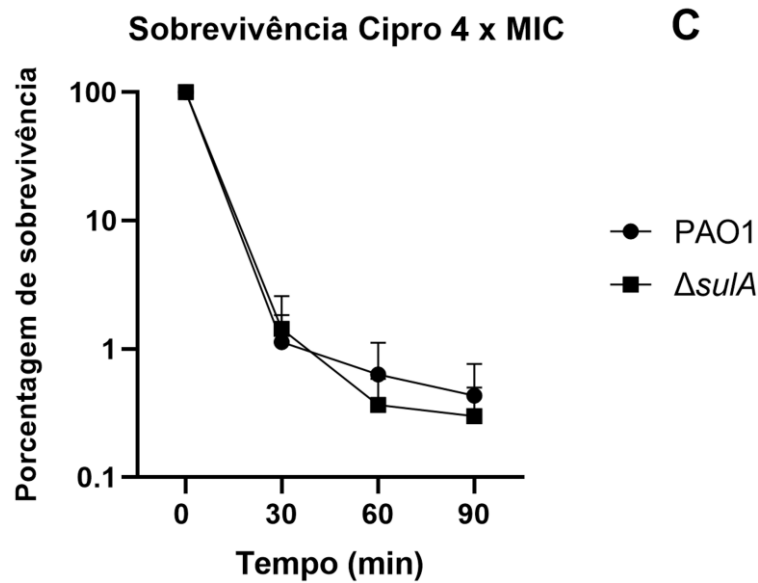


**Figura 12** – Ensaio de sensibilidade à MMS durante tratamento agudo. Neste experimento, três concentrações distintas do agente genotóxico foram testadas e a porcentagem de sobrevivência indica a razão entre o UFC das células com tratamento e o UFC das células com crescimento espontâneo. O gráfico apresenta a média de três experimentos independentes e as barras erro indicam o erro padrão. Os valores de  $P = 0,4022$ ,  $P = 0,4390$  e  $P = 0,2322$  indicam que não há diferença significativa nas porcentagens de sobrevivência das linhagens, para nenhuma das condições testadas.

Os dados apresentados na Figura 12 nos permitiram concluir que realmente não existe diferença de sensibilidade entre a linhagem parental e o mutante  $\Delta sulA$  em um tratamento agudo, o que confirma a nossa hipótese.

Ainda com relação a alterações fenotípicas da linhagem  $\Delta sulA$ , apesar de esta não ter apresentado alterações nos níveis de resistência à ciprofloxacina como demonstrado por sua CIM, gostaríamos de avaliar se o tratamento a concentrações crescentes com o antimicrobiano poderia afetar a sobrevivência dessas células. A Figura 13 apresenta o resultado obtido com este experimento de sobrevivência.



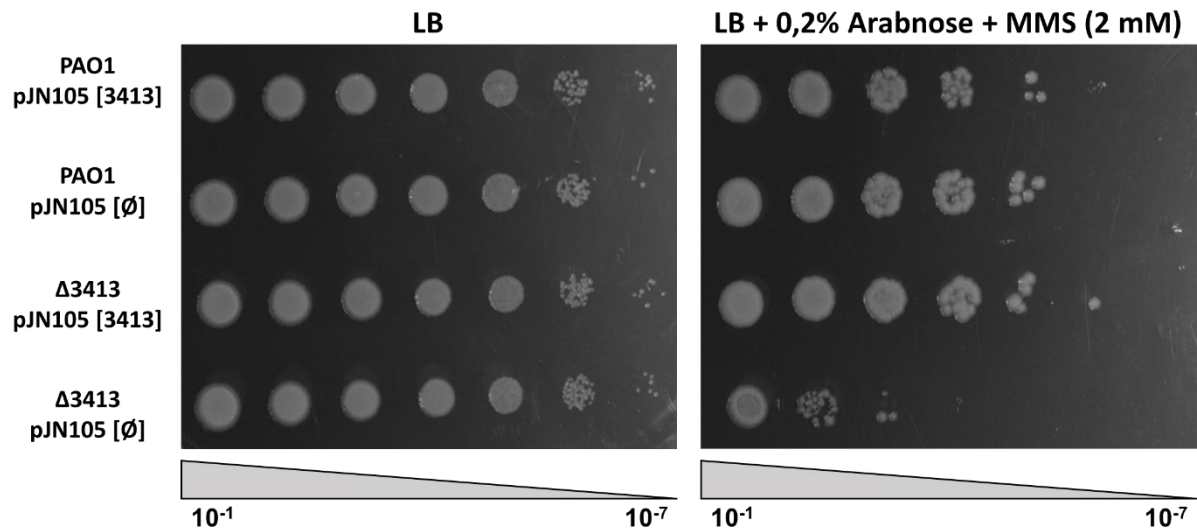


**Figura 13** – Ensaio de sobrevivência à ciprofloxacina. A porcentagem de sobrevivência indica a razão entre o UFC das células com tratamento e o UFC das células com crescimento espontâneo. Os dados apresentam a média de três experimentos independentes e as barras de erro se referem ao erro padrão. (A) Sobrevivência a 1 vez a CIM de ciprofloxacina das linhagens PAO1 e  $\Delta sulA$ , que não apresentam diferença significativa como indicado pelos valores de  $P = 0,8615$ ,  $P = 0,0882$  e  $P = 0,5364$ . (B) Sobrevivência a 2 vezes a CIM de ciprofloxacina das linhagens PAO1 e  $\Delta sulA$ , que não apresentam diferença significativa como indicado pelos valores de  $P = 0,1624$ ,  $P = 0,2361$  e  $P = 0,3486$ . (C) Sobrevivência a 4 vezes a CIM de ciprofloxacina das linhagens PAO1 e  $\Delta sulA$ , que não apresentam diferença significativa como indicado pelo valor de  $P = 0,6220$ ,  $P = 0,4315$  e  $P = 0,4226$ .

Com os resultados obtidos, podemos observar que em todas as concentrações utilizadas de ciprofloxacina, mesmo que muito maiores do que aquelas de sua CIM, as linhagens PAO1 e  $\Delta sulA$  se comportaram de maneira muito similar e não apresentaram qualquer diferença quanto à sobrevivência a ciprofloxacina.

Por último, realizamos a complementação da linhagem  $\Delta PA3413$ , que foi a única que apresentou alteração de sensibilidade na presença de agentes genotóxicos. A complementação tem por objetivo fazer a reposição da expressão do gene que foi deletado a fim de avaliar se o fenótipo encontrado foi devido à ausência do produto do gene em questão ou se foi alguma outra modificação no genoma não esperada devido a manipulação genética. A complementação foi realizada com a transformação do plasmídeo pJN105 [PA3413] na cepa  $\Delta PA3413$ , e suplementação com L-arabnose que é responsável por realizar a indução do promotor contido no gene pJN105 e levar a indução do gene PA3413 (*yebG*) exógeno. A linhagem  $\Delta PA3413$  também recebe o

plasmídeo pJN105, porém sem a clonagem de nenhum gene para nos certificarmos que a presença do vetor não cause qualquer alteração nos fenótipos observados. A Figura 14 mostra o resultado do experimento de sensibilidade à MMS, realizado da mesma forma como padronizado para os experimentos iniciais de identificação do fenótipo.



**Figura 14** – Ensaio de complementação da linhagem  $\Delta$ PA3413. Na extremidade direita encontramos a indicação da linhagem referente a cada umas das linhas analisadas, na extremidade superior encontramos a condição de crescimento das linhagens e no canto inferior encontramos a diluição de cada coluna. O sinal  $\emptyset$  indica o plasmídeo vazio. As cepas de PAO1 apresentadas foram utilizadas a fim de se avaliar o efeito da super-expressão do gene PA3413 (*yebG*), porém nenhuma alteração de fenótipo foi observada. Além disso, a linhagem PAO1 pJN105 [ $\emptyset$ ] funciona como linhagem parental e o controle do experimento. Os resultados são representativos de um experimento, mas todas as condições foram analisadas em três réplicas biológicas independentes.

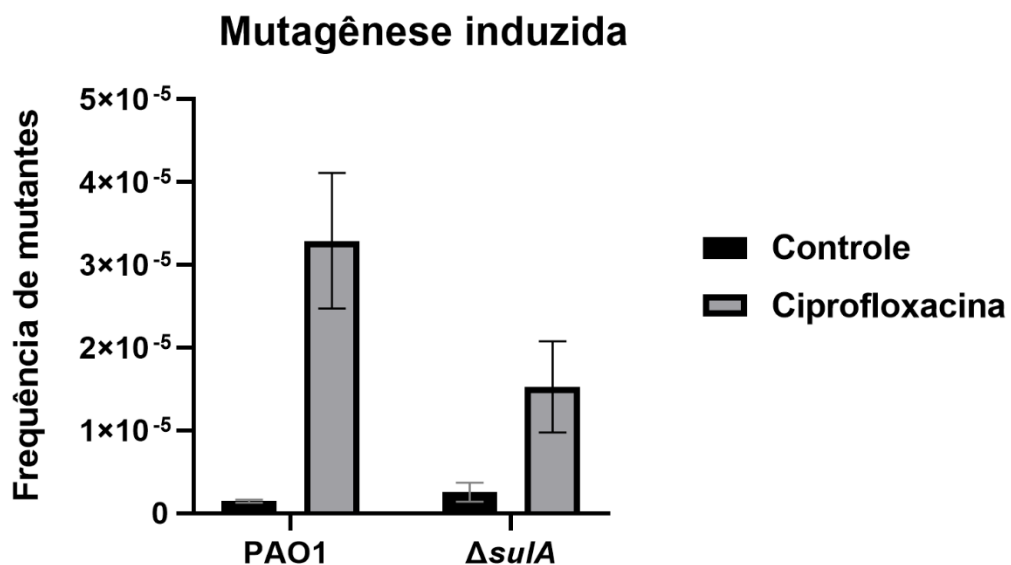
Podemos verificar que a complementação com o gene PA3413 (*yebG*) reestabeleceu com sucesso a sensibilidade à MMS, tendo níveis comparáveis ao da linhagem parental PAO1. Com isso, é possível afirmar que foi a ausência do produto do gene PA3413 que levou ao fenótipo de maior sensibilidade a agentes genotóxicos.

Com isso concluímos os experimentos relacionados a caracterização de fenótipos de sensibilidade dos mutantes gerados neste trabalho. Os próximos dados apresentarão outros aspectos relacionados a resposta SOS e estarão relacionados a função do gene *sulA*, portanto mais nenhum dado acerca dos genes PA2288 e PA3413 (*yebG*) foi gerado.

### 4.2.3 Mutagênese induzida por ciprofloxacina

Nesta seção iremos analisar outro aspecto relacionado a resposta SOS, que é a mutagênese. O aumento nas taxas de mutações das células que estão induzindo a resposta SOS é atribuído em grande parte ao mecanismo da síntese translesão, que depende da ação de polimerases que possuem menor fidelidade e são, portanto, mutagênicas. Buscamos analisar o efeito da deleção do gene *sulA* nas taxas de mutação induzidas por ciprofloxacina em *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que este gene mostrou ter uma importante implicação neste fenômeno em *E. coli* como demonstrado por Pribis e colaboradores, 2019.

O primeiro conjunto destes experimentos foi realizado de acordo com o protocolo previamente estabelecido no laboratório, como descrito na seção Material e Métodos. Em resumo esse protocolo realiza a indução da resposta SOS através do tratamento com 0,5 vezes a CIM por 4 horas, que é retirada do meio de cultivo com sucessivas lavagens, após as quais a cultura volta a crescer sem o antibiótico. O resultado obtido com essa metodologia é apresentado na Figura 15.

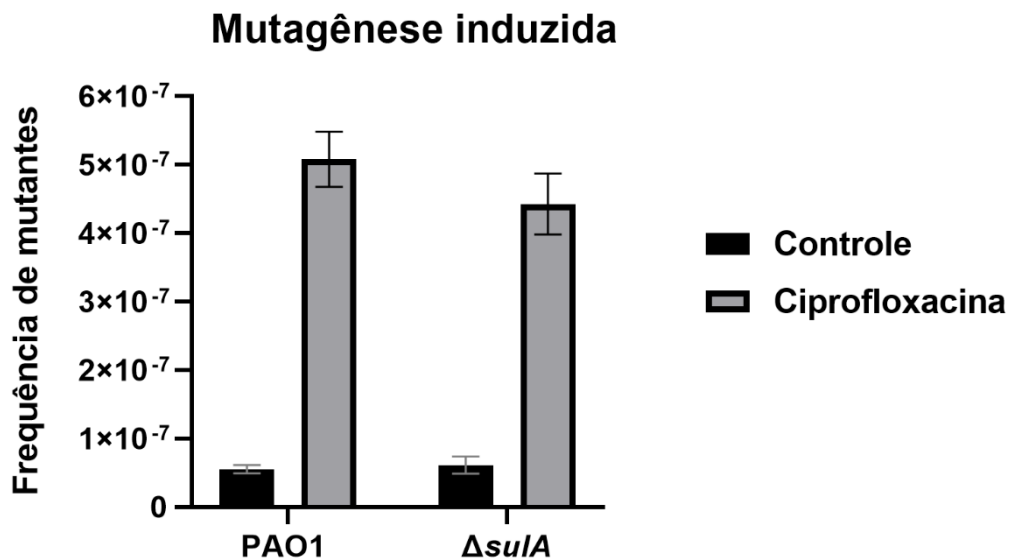


**Figura 15** – Ensaio de mutagênese induzida por ciprofloxacina. A frequência de mutação é calculada comparando-se o aparecimento de mutantes resistentes à fosfomicina de culturas tratadas com ciprofloxacina em relação a culturas não tratadas. O gráfico apresenta a média de três experimentos independentes e as barras de erros expressam o erro padrão. Não há diferença na frequência de mutantes entre as duas linhagens, como indicado pelo valor de  $P = 0,3333$ .



Os dados mostram uma ligeira redução da mutagênese induzida na ausência do gene *sulA* quando comparada a cepa parental, o que implica em sua participação neste evento. O dado obtido é coerente com dados recentes da literatura, que apontam que a mutagênese induzida por ciprofloxacina em *E. coli* é dependente do gene *sulA*. Porém, as análises estatísticas realizadas indicaram não haver diferença significativa entre as linhagens (PRIBIS et al., 2019).

Após analisar a metodologia empregada por Pribis e colaboradores, 2019 para execução de ensaios de mutagênese induzida, percebemos duas diferenças importantes quanto a metodologia previamente estabelecida no laboratório: a primeira diz respeito ao método de tratamento, que é realizado em um tratamento de aproximadamente 16 horas e que não realiza a retirada do antimicrobiano com lavagens do meio de cultivo; a segunda é a quantidade de culturas independentes utilizadas em cada experimento, que é consideravelmente maior nestas condições experimentais. Adotando essas novas condições, realizamos um novo ensaio de mutagênese induzida por ciprofloxacina e o resultado é apresentado na Figura 16.



**Figura 16** – Ensaio de mutagênese induzida por ciprofloxacina. A frequência de mutação é calculada comparando-se o aparecimento de mutantes resistentes à fosfomicina de culturas tratadas com ciprofloxacina em relação a culturas não tratadas. O gráfico apresenta a média de três experimentos independentes e as barras de erros expressam o erro padrão. Não há diferença na frequência de mutantes entre as duas linhagens, como indicado pelo valor de  $P = 0,4$ .

Os dados gerados por esta nova metodologia são mais consistentes e eliminam grande parte da variação experimental encontrada anteriormente, gerando dados mais robustos. Em contrapartida, este resultado confirma que não há diferença entre as linhagens e acreditamos que eles refletem a ausência de influência do gene *sulA* na mutagênese induzida em *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 4.2.4 Caracterização do padrão de mutações na linhagem $\Delta sulA$

O gene *sulA* além de ter sido implicado como essencial para a mutagênese induzida por ciprofloxacina em *E. coli*, também já foi reportado no surgimento de mutantes em populações bacterianas, uma vez que foi demonstrado por Bos e colaboradores, 2015 que a extremidade de células filamentosas contendo múltiplos cromossomos são responsáveis pela liberação de pequenas células mutantes que se propagam na população, em um evento denominado de *budding*.

Esses achados nos fizeram questionar se o padrão de mutações encontrados na linhagem  $\Delta sulA$  seria diferente daquele apresentado pela linhagem parental PAO1, o que poderia aprofundar conhecimento sobre o papel do gene para a célula e as implicações da filamentação celular. Além disso, a filamentação celular é um processo que pode levar a alterações na contagem de UFC, dado que células filamentadas contendo múltiplos cromossomos, que dariam origem a várias células-filhas, ao serem semeadas em meio sólido dão origem a apenas uma colônia. Assim sendo, decidimos investigar o processo de mutagênese induzido pela ciprofloxacina em *P. aeruginosa* por sequenciamento genômico, que não seria sensível a este tipo de artefato.

Para isso, coletamos colônias de bactérias resultantes do plaqueamento dos experimentos de mutagênese realizados na seção anterior. As condições analisadas foram: o surgimento espontâneo de mutações, comparando o plaqueamento realizado em meio LB (que pode não conter mutação alguma) e o plaqueamento realizado em meio LB com fosfomicina (que apresenta, por princípio, no mínimo a mutação de resistência ao antimicrobiano); e o surgimento de mutações após tratamento com ciprofloxacina e indução da resposta SOS e seus componentes mutagênicos, comparando também o plaqueamento em meio LB e meio LB com fosfomicina.

Duas rodadas de sequenciamento de próxima geração foram realizadas. Na primeira rodada foram coletadas colônias provenientes dos experimentos de

mutagênese realizados com o protocolo original, obtendo-se 5 colônias de cada linhagem (PAO1 e  $\Delta sulA$ ) somente nas condições de plaqueamento em LB com fosfomicina, gerando assim 20 clones sequenciados. Já para segunda rodada foram coletadas colônias provenientes dos experimentos de mutagênese realizados com o protocolo estabelecido por Pribis e colaboradores, obtendo-se 5 colônias de cada linhagem (PAO1 e  $\Delta sulA$ ) para cada uma das condições descritas acima, chegando assim a um total de 40 clones sequenciados por metodologia de sequenciamento de próxima geração, como descrito no protocolo da seção Material e Métodos.

O resultado do sequenciamento nos surpreendeu, uma vez que não houve mutações identificadas nas colônias vindas do cultivo em meio LB, seja com crescimento sem antibiótico ou com o tratamento com a ciprofloxacina. As únicas mutações presentes nestas células foram os SNPs comuns ao genoma referência, e, portanto, não foram computados, por não serem mutações novas surgidas durante o crescimento. Nem mesmo as colônias vindas do cultivo em meio LB com fosfomicina, provenientes das duas rodadas de NGS realizadas, apresentaram mutações, a não ser aquelas que conferiram a resistência ao antimicrobiano, que de outra forma não seriam capazes de crescer nestas condições. Portanto, fomos incapazes de determinar o padrão de mutações como desejado.

É interessante destacar que no trabalho de Pribis e colaboradores, foi demonstrado que a maioria dos mutantes identificados após tratamento com ciprofloxacina são provenientes de uma subpopulação de células que produzem EROs após o tratamento com o antimicrobiano e que levam a uma alta atividade de um fator sigma alternativo, chamado  $\sigma^S$ . Essas células são chamadas de *gamblers* (apostadoras, em tradução livre) por estarem arriscando um fenótipo de aumento de taxa de mutações para obtenções de mutações que podem ou não ser vantajosas dependendo do ambiente em que estão. A lógica por trás de sequenciar principalmente mutantes resistentes a fosfomicina é que por já apresentarem uma mutação de resistência ao antimicrobiano, eles teriam mais chances de pertencer a esta subpopulação e, portanto, possuir mais mutações em seu genoma por apresentarem altas taxas de mutagênese (PRIBIS et al., 2019).

Contudo, foi possível identificar uma informação interessante com a realização da primeira rodada de sequenciamento do genoma. Ao se observar os clones da linhagem PAO1 com resistência à fosfomicina, podemos identificar quatro tipos de

mutações que conferiram resistência ao antimicrobiano. Determinamos a CIM de fosfomicina para estes clones e os dados coletados estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Lista de genes que conferem resistência a fosfomicina em *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos através da primeira rodada de NGS. Na tabela é possível identificar o clone, a condição que foi isolado, o gene que sofreu a mutação que levou a resistência ao antimicrobiano e a CIM de fosfomicina. Para efeitos de comparação, a linhagem parental PAO1 possui uma CIM de 64 mg/mL de fosfomicina.

Clone	Condição de isolamento	Gene mutado	CIM de fosfomicina
01	Placa de fosfomicina – Crescimento espontâneo	<i>glpR</i>	> 256 mg/mL
02	Placa de fosfomicina – Crescimento espontâneo	<i>glpT</i>	> 256 mg/mL
03	Placa de fosfomicina – Crescimento espontâneo	-	> 256 mg/mL
04	Placa de fosfomicina – Crescimento espontâneo	<i>yibO</i>	> 256 mg/mL
05	Placa de fosfomicina – Crescimento espontâneo	<i>glpT</i>	> 256 mg/mL
06	Placa de fosfomicina – Crescimento com ciprofloxacina	<i>glpT</i>	> 256 mg/mL
07	Placa de fosfomicina – Crescimento com ciprofloxacina	<i>glpT</i>	> 256 mg/mL
08	Placa de fosfomicina – Crescimento com ciprofloxacina	PA3001	> 256 mg/mL
09	Placa de fosfomicina – Crescimento com ciprofloxacina	<i>yibO</i>	> 256 mg/mL
10	Placa de fosfomicina – Crescimento com ciprofloxacina	<i>glpT</i>	> 256 mg/mL

Três dessas mutações se destacaram por não terem sido previamente relatadas na literatura por conferir resistência a fosfomicina em *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que apenas mutações no gene *glpT* foi descrito por conferir tal fenótipo. Nós também realizamos a amplificação dos genes mutados de cada clone, e confirmamos a presença destas mutações por sequenciamento de Sanger.

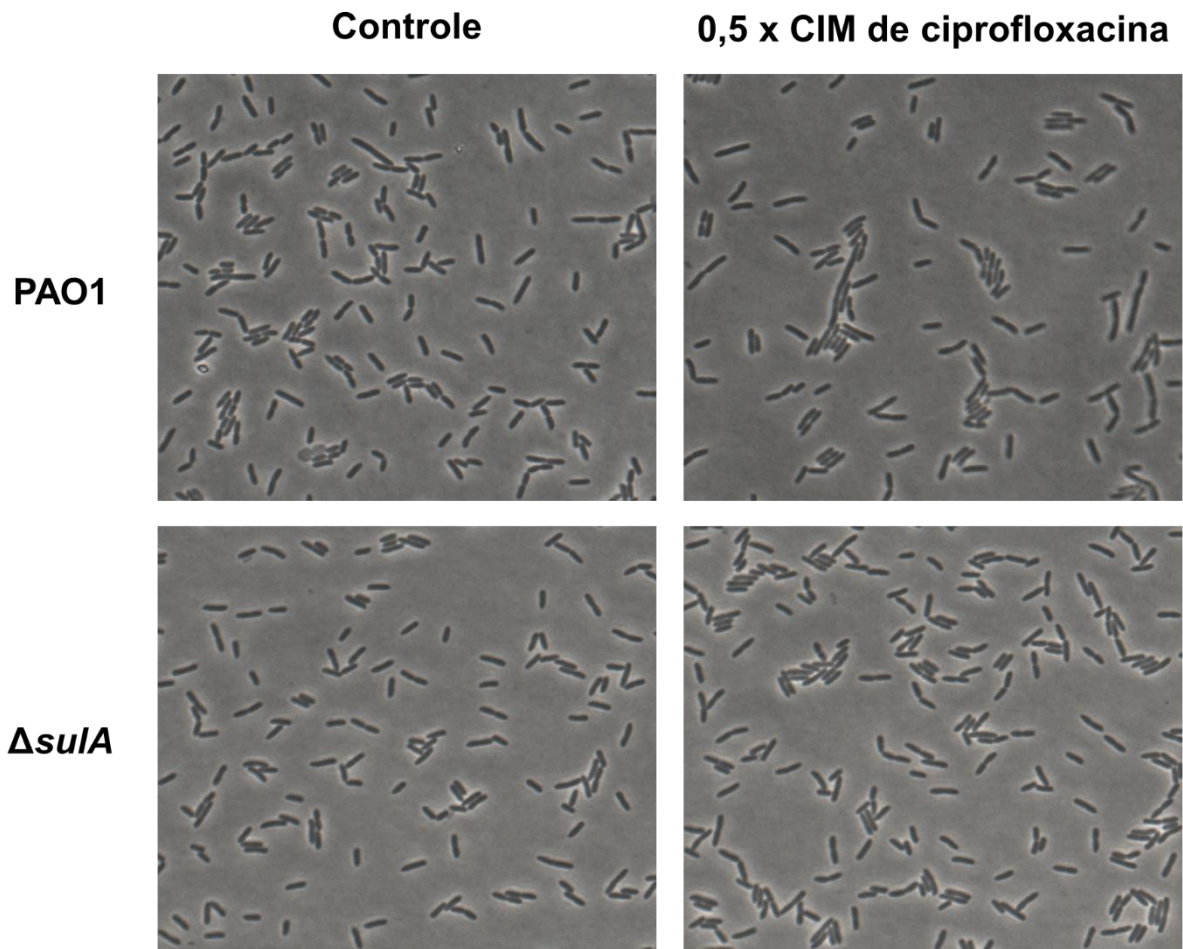
#### 4.2.5 Análise da filamentação em *Pseudomonas aeruginosa*

Para avaliar se a deleção do gene *sulA* interfere na filamentação de células tratadas com ciprofloxacina, realizamos experimentos de indução da resposta SOS e analisamos a filamentação as células ao microscópio, que é uma característica visual

da ativação da resposta. Primeiramente procuramos estabelecer as melhores condições para visualização das células. Inicialmente, percebemos que a preparação das amostras por métodos tradicionais de fixação diminuía muito a qualidade das imagens e por isso a primeira variável padronizada foi a preparação das amostras em *pads* de agarose com PBS 1x. Isso permite com que as células fiquem imóveis (ou com a movimentação muito reduzida) mas ainda vivas, e mantenham suas características morfológicas.

Em seguida, realizamos a padronização do melhor tempo de visualização da célula após o início do tratamento. Os tempos avaliados foram de 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 180 minutos e 24 horas. Para as 3 primeiras condições, percebemos que o tempo pode não ter sido o suficiente para que o processo filamento se iniciasse e tal fenótipo era bastante discreto. As condições de 90 minutos e 120 minutos se mostraram ideais, com boas concentrações de células e visualização dos filamentos. Já para os tempos superiores a 120 minutos, é possível que algum grau de morte celular tenha ocorrido, pois vários resíduos podiam ser visualizados e se assemelhavam a debris celulares. Por fim, estabelecemos o tempo de 2 horas para visualização.

Por último, fizemos modificações na concentração de ciprofloxacina utilizada para indução da resposta SOS. Os experimentos realizados até o momento foram todos conduzidos com 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina, e testamos outras duas outras concentrações. Utilizamos 0,25 vezes a CIM de ciprofloxacina e observamos que nessa concentração, as células apresentavam uma filamentação muito discreta e não se adequava para as condições desejadas. Utilizamos também a concentração de 0,8 vezes a CIM de ciprofloxacina e neste caso observamos com bastante distinção os filamentos. Apesar da concentração de 0,8 vezes a CIM de ciprofloxacina ter apresentado bons resultados, não julgamos que havia grandes diferenças da concentração de 0,5 vezes a CIM de ciprofloxacina. Como a última é a concentração padronizada para todos os outros experimentos que utilizam concentrações subinibitórias de ciprofloxacina no laboratório, optamos por continuar com essa concentração. A Figura 17 mostra o resultado de um dos experimentos realizados com as condições padronizadas.



**Figura 17** – Microscopia de contraste de fase mostrando a filimentação em células tratadas com 0,5 x CIM de ciprofloxacina por 2 horas. Pode-se observar que células filamentosas (alongadas) estão presentes na linhagem selvagem após o tratamento, mas ausentes na linhagem  $\Delta sulA$  nas mesmas condições. A imagem é representativa de três experimentos realizados independentemente, e apenas um campo de captura da imagem é mostrado. As imagens foram obtidas com um aumento de 100 vezes.

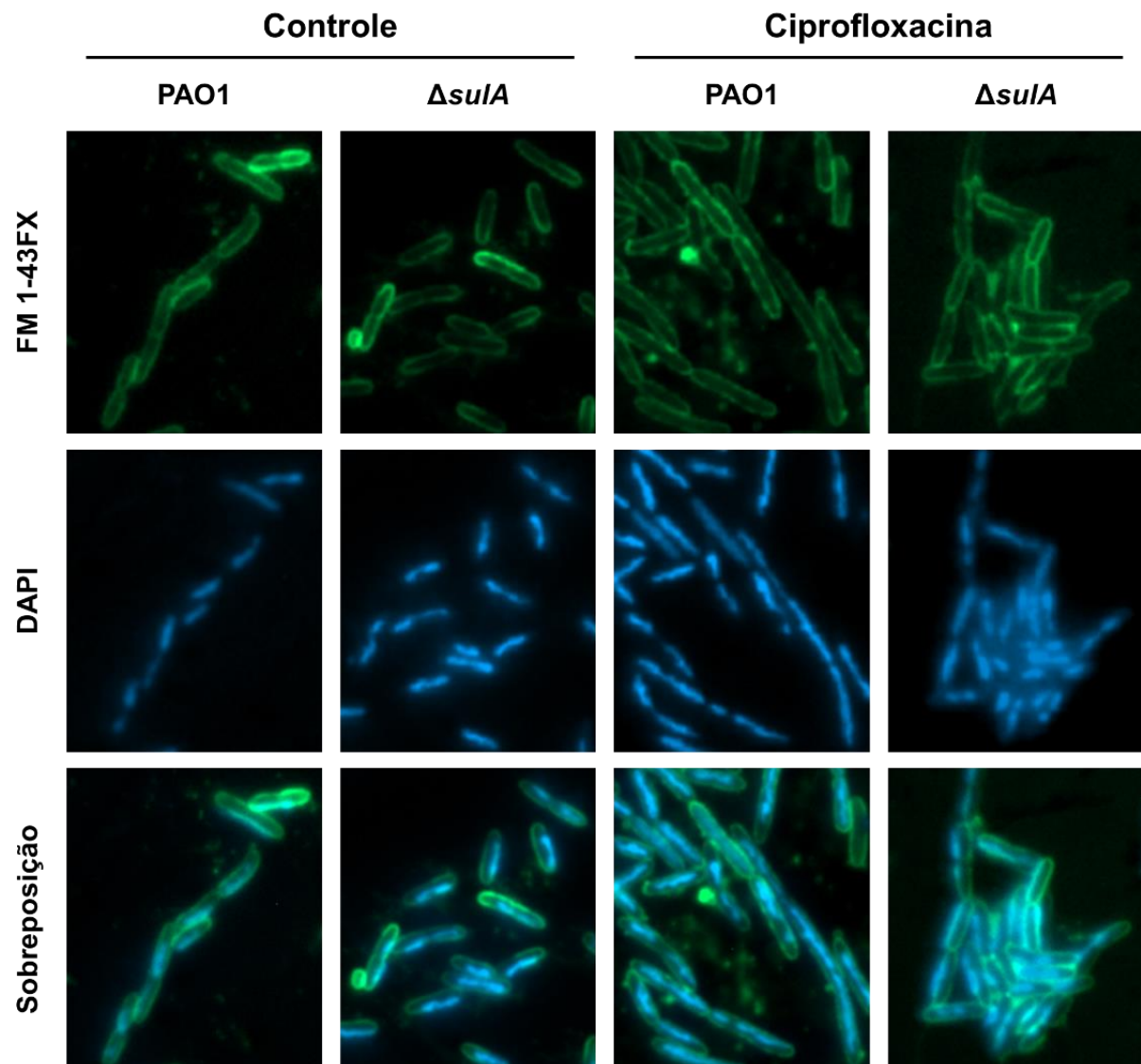
Com as imagens apresentadas na Figura 17, podemos perceber uma clara distinção entre a filimentação exibida pelas linhagens analisadas. Podemos verificar que a linhagem parental PAO1 apresenta células mais alongadas e que formam filamentos, diferente da linhagem  $\Delta sulA$  que exibe apenas células de tamanho padrão e sem filamentos. O mutante parece ser incapaz de realizar tal processo, e parece confirmar que SulA é ativada em resposta a esse antimicrobiano e promove a filimentação celular em *Pseudomonas aeruginosa*.

A fim de melhor caracterizar o processo de filimentação neste organismo, propomos realizar a captura das imagens utilizando corantes fluorescentes que permitiram uma análise mais precisa das imagens. O uso do corante DAPI para

coloração do material genéticos em conjunto com o corante FM 1-43FX para coloração da membrana celular, nos permitiu identificar as bordas celulares, bem como o septo divisional e o nucleóide com muito mais distinção. O objetivo é realizar uma contagem das células, dimensionar o comprimento delas, bem como quantas estão de fato formando um filamento, gerando um quadro mais preciso deste fenômeno. Um experimento inicial desta metodologia está mostrado na Figura 18.

Este experimento foi realizado em duas réplicas biológicas, buscando apenas realizar a padronização da metodologia de coloração das células e da obtenção das imagens. Ainda assim vários tempos foram avaliados, iniciando a visualização após 30 minutos de exposição à ciprofloxacina e obtendo imagens em intervalos 60 minutos após a primeira hora de tratamento, até que o último tempo analisado foi o de 240 minutos. Da mesma forma como constatado para a microscopia de contraste de fase anteriormente realizada, as melhores imagens foram obtidas no tempo de 2 horas.

As imagens apresentadas são representativas de uma réplica do experimento, e tem por finalidade demonstrar a aplicação da metodologia. Não foi realizada a quantificação dos parâmetros citados acima, sendo apenas um experimento piloto. Porém, é possível perceber que as imagens nos permitem uma melhor distinção das células que estão de fato filamentadas e isso permitirá caracterizar com maior precisão esse processo em *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figura 18** – Microscopia de fluorescência mostrando a filamentação em células tratadas com 0,5 x CIM de ciprofloxacina por 2 horas. Pode-se observar que células filamentosas (alongadas) estão presentes na linhagem selvagem após o tratamento, mas ausentes na linhagem  $\Delta sulA$  nas mesmas condições. O corante de membrana utilizado foi o FM 1-43FX, e o corante para o material genético foi o DAPI. As imagens foram obtidas com um aumento de 100 vezes.

Mais nenhum dado foi gerado acerca da caracterização da função do gene *sulA* na resposta SOS de *Pseudomonas aeruginosa*, e isso encerra a apresentação de resultados adquiridos durante a realização deste estudo. A próxima seção irá se aprofundar na discussão dos dados gerados para execução desta tese.



## 5 DISCUSSÃO

Buscaremos aprofundar o significado biológico e as implicações dos dados obtidos durante a execução deste trabalho, e que foram apresentados anteriormente no texto acima.

### 5.1 *Estabelecimento de varredura genética para identificação de genes que alteram a indução da resposta SOS*

Primeiramente, gostaríamos de analisar a eficácia das duas metodologias empregadas para realização da varredura genética. Quando observamos a quantidade de mutantes pré-selecionados pelas duas metodologias utilizadas neste trabalho, percebemos que não houve grandes diferenças em suas proporções. A metodologia previamente estabelecida no laboratório nos permitiu pré-selecionar 56 mutantes de um total de 3000, chegando a uma taxa de 1,78% de clones selecionados. Já a metodologia estabelecida após utilização do parâmetro  $Z'$  nos permitiu pré-selecionar 138 mutantes de um total de 6000, chegando a uma taxa de 2,3% de clones selecionados. Esses valores, numa primeira análise, nos indicavam que não havia um problema com a eficácia da geração de mutantes, já bem estabelecida por Jacobs, 2003; além disso, não parecia haver um problema metodológico com o parâmetro selecionado para realização da varredura, a luminescência. O maior problema se encontrava na confirmação dos mutantes pré-selecionados, que apresentavam uma alta taxa de clones falso positivos.

Anteriormente, 1 único mutante teve seu fenótipo confirmado dentre os 56 pré-selecionados gerando uma taxa de comprovação de apenas 1,78%. Com a nova metodologia, foram 15 mutantes com fenótipo comprovado dentre 138 pré-selecionados, gerando uma taxa de comprovação de 10,86%. Um aumento pouco mais de 6 vezes quando comparamos as duas metodologias, e mostrando que a metodologia padronizada por  $Z'$  teve uma redução importante na obtenção de falso-positivos. Se observarmos os valores em relação a quantidade total de mutantes gerados, esses valores se amplificam ainda mais e chegam a uma diferença de quase 8 vezes na proporção de mutantes identificados pela metodologia.

A proposta dessa nova metodologia é eliminar a grande variação que obtínhamos quando realizávamos a comparação de duas placas: a placa tratada com

ciprofloxacina para indução da resposta SOS e a placa controle, sem antibiótico. Comparando-se somente as razões Lux/DO<sub>600</sub> das linhagens mutantes com a linhagem parental, quando tratadas com ciprofloxacina, foi suficiente para determinar aqueles mutantes que apresentavam diferença quanto aos níveis de indução da resposta SOS. Por isso, acreditamos que a metodologia estabelecida após a padronização experimental com o parâmetro Z' foi eficaz no objetivo de identificar mutantes com alteração da indução da resposta SOS.

É importante destacar que a biblioteca de mutantes provavelmente não foi saturada com a geração dos 6000 clones obtidos. Isso quer dizer que não foi possível realizar a varredura em todos os genes presentes no genoma de *P. aeruginosa*, uma vez que a inserção do transposon é aleatória e não é possível prevermos qual gene ele irá interromper. Esse fato é evidenciado pois não fomos capazes de identificar mutantes nos genes *recA* ou genes do operon *recBCD*, que teriam grandes chances de não apresentar indução da resposta SOS por ciprofloxacina uma vez que são genes envolvidos no processamento e reparo do dano no DNA causado por esse antimicrobiano e que é um forte sinal indutor para a ativação da resposta.

Com relação aos mutantes identificados, foi possível verificar uma variedade de funções biológicas relacionadas a atividade de cada um dos genes afetados. Porém, é possível categorizar esses genes em alguns grupos com funções similares ou interligadas, mesmo que seus fenótipos possam ser variados.

O primeiro grupo que identificamos foi o dos genes pertencentes a biossíntese de nucleotídeos, que englobam os mutantes B7-A6, B40-F3, B13-F3 e B44-D1. O mutante B7-A6 teve o gene *purK* interrompido, que codifica uma AIR carboxilase que está envolvida na biossíntese de purinas, catalisando a conversão de 5'-fosforribosil-5-aminoimidazol ("AIR") em 5'-fosforribosil-4-carboxi-5-aminoimidazol ("CAIR"). O mutante B40-F3 teve o gene *pabC* interrompido, este codifica uma 4-amino-4-deoxicorismato liase que catalisa a formação de 4-aminobenzoato (PABA) e libera piruvato durante a biossíntese de folato, conhecido como ácido fólico ou vitamina B9. Essa é uma atividade essencial para o crescimento de bactérias Gram-negativas, a inibição de PabC levaria a redução dos níveis de PABA e assim depletaria o estoque de ácido fólico disponível para o microrganismo. Desde que o microrganismo não consiga obter PABA suficiente do ambiente celular ou por outros meios, é esperado que essas células parem de crescer e morram. Isso é o que é observado em *knockouts* do gene *pabC* em *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* e

*Acinetobacter baylyi*. Além disso, o folato é necessário na composição de precursores da síntese de timina através da ação da timidilato sintase e que, portanto, pode influenciar na via de biossíntese de pirimidinas. O mutante B13-F3 teve o gene *pyrB* interrompido, que codifica uma aspartato carbamoiltransferase (também conhecida como ATCase) que catalisa a primeira etapa da via de biossíntese de pirimidinas. Já o mutante B44-D1 teve o gene PA0401 interrompido, e este está em um operon com o gene *pyrB* e codifica para uma diidroorotase não-catalítica que parece participar da biossíntese de pirimidinas (DE BERARDINIS et al., 2008; GREEN; MERKEL; NICHOLS, 1992; HOANG et al., 1998a; LUKENS; BUCHANAN, 1959; MEYER et al., 1992; O'ROURKE et al., 2011; SALAMA; SHEPHERD; FALKOW, 2004; WEBER, 1968).

Neste grupo o mutante B7-A6 é o único que apresenta o fenótipo de menor indução da resposta SOS, enquanto os mutantes B13-F3, B40-F3, e B44-D1 apresentam o fenótipo de aumento na indução da resposta SOS de maneira espontânea. É possível especular que as mutações nos genes que participam na via de biossíntese destas moléculas irão gerar um desbalanço o *pool* de nucleotídeos na célula, que pode implicar em uma maior taxa de incorporações incorretas de nucleotídeos e até mesmo em um bloqueio da forquilha de replicação mais frequente, justificando assim um fenótipo de maior ativação da resposta SOS de maneira espontânea. Esse fenótipo é bastante interessante pois há na literatura um estudo realizado com *E. coli* que também identificou mutantes por inserção de transposon que alteravam o metabolismo de nucleotídeos e geravam um fenótipo de indução constitutiva da resposta SOS, corroborando com nossos resultados. É interessante destacar que diferentemente de *E. coli*, a indução da resposta SOS em *P. aeruginosa* leva também a ativação de outros dois regulons controlados por proteínas similares a LexA, que são PtrR, envolvido no processo de produção e liberação de piocinas; e AlpR, envolvido no processo de morte celular por autólise. Portanto, é importante avaliar se esses mutantes induzindo mais a resposta SOS de maneira espontânea também apresentam maiores taxas de produção de piocinas ou autólise, e se este for o caso, investigar como estas linhagens ainda se apresentam viáveis (MATSUI et al., 1993; MCFARLAND et al., 2015; O'REILLY; KREUZER, 2004; PEÑA et al., 2021; PENTERMAN; SINGH; WALKER, 2014).

Seria interessante verificar a necessidade de fornecimento de nucleotídeos exógenos no crescimento em meio mínimo, uma vez que todos os experimentos

realizados neste trabalho foram conduzidos em meio rico e a falta destas moléculas poderiam implicar em uma deficiência no crescimento ou até mesmo a morte destas células. Tal fato é evidenciado pelo fenômeno de *thymineless death*, em que mutantes deficientes na biossíntese de timina e que são expostas a privação dessa molécula durante seu crescimento apresentam danos endógenos no DNA e indução constitutiva da resposta SOS, e que culminam com a morte destas células. O gene *pabC* do mutante B40-F3 pode levar a uma deficiência na produção de folato que compõe a molécula 5,10-metilenotetrahidrofolato, um precursor na geração de deoxitimidina monofosfato (dTMP) e que, portanto, pode estar sujeito ao fenômeno de *thymineless death*. Contudo, este é um mecanismo bastante complexo e que não foi completamente elucidado (AHMAD; KIRK; EISENSTARK, 1998; LIN et al., 2007).

O segundo grupo identificado foi o de genes relacionados ao flagelo, *quorum sensing* e formação de biofilme, que englobam os mutantes B10-D8, B19-D4, B14-G1, B40-H5 e B16-H6. O mutante B10-D8 teve o gene *fleQ* interrompido, este codifica uma proteína ligadora de *enhancer* pertencente a superfamília AAA+ de ATPases e que funciona como um regulador transcricional. O gene *fleQ* desempenha um papel na modulação de adesão à mucina e na expressão de genes relacionados ao flagelo, além de regular a expressão de genes relacionados à formação de biofilme. Esse gene já foi reportado por atuar como um repressor transcricional na ausência de c-di-GMP, e um ativador transcricional na presença dessa molécula. O mutante B19-D4 teve o gene *fliR* interrompido, este é uma proteína envolvida na biossíntese do flagelo. Em *Salmonella typhimurium*, é considerado um componente do aparato de exportação flagelar do tipo III e está localizado no corpo basal do flagelo (ARORA et al., 1997; BARAQUET et al., 2012; FAN et al., 1997).

O mutante B14-G1 teve o gene PA3024 interrompido, este codifica uma provável carboidrato quinase da família FGGY. Essas enzimas promovem a fosforilação dependente de ATP em um de ao menos nove substratos de açúcar distintos. Esta família engloba uma subfamília que tem papel no *quorum sensing* por realizar a fosforilação de AI-2, uma molécula bacteriana sinalizadora originada de 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD). O mutante 40-H5 teve o gene *ctpH* interrompido, este é uma proteína transdutora de sinal quimiotático. Tais proteínas são responsivas a alterações na concentração de moléculas atrativas e repelentes no ambiente, realizam a transdução de sinais de fora para dentro da célula e facilitam a adaptação sensorial através da modificação do nível de metilação. O produto do gene *ctpH* é um

quimiorreceptor para fosfato inorgânico necessário para quimiotaxia em altas concentrações de fosfato, pode reconhecer fosfato inorgânico diretamente e pode se ligar a outros componentes que tem um grupo pirofosfato, incluindo ATP e ADP. O mutante B16-H6 teve o gene *napA* interrompido, este é uma proteína nitrato redutase periplasmática. É a subunidade catalítica do complexo NapAB, e recebe elétrons de NapB para catalisa a redução de nitrato a nitrito. Vários estudos usando perfis transcricionais demonstraram a importância do *quorum sensing* como um regulador global do metabolismo de nitrato e formação de biofilme em *P. aeruginosa* (BERKS et al., 1995; RASMUSSEN et al., 2005; RICO-JIMÉNEZ et al., 2016; SCHUSTER et al., 2003; WAGNER et al., 2003; WAGNER; GILLIS; IGLEWSKI, 2004; WU et al., 2000; XAVIER et al., 2007; ZHANG et al., 2011).

Neste grupo os mutantes apresentam uma alteração heterogênea quanto a indução da resposta SOS. Os mutantes B10-D8 e B40-H5 apresentam fenótipo de menor indução da resposta SOS, enquanto os mutantes B14-G1, B16-H6 e B19-D4 apresentam fenótipo de maior indução da resposta SOS. Os genes desse grupo são, de certa forma, necessários para a formação de biofilmes, uma vez que o flagelo é requerido para movimentação da célula mediante sinais químicos emitidos por ação do mecanismo de *quorum sensing*, que pode culminar na formação de biofilmes. Portanto, é possível especular que os mutantes com fenótipo de maior indução da resposta SOS poderiam ter uma deficiência na geração de biofilmes, o que tornaria as células individuais mais susceptíveis a ação da ciprofloxacina. Já os mutantes com fenótipo de menor indução da resposta SOS poderiam, contrariamente, exibir uma formação exacerbada ou mais expressiva de biofilmes o que poderia justificar uma menor susceptibilidade da ação da ciprofloxacina. Essa hipótese inclusive pode ser reforçada pelo fato de que nenhum mutante deste grupo apresentou uma alteração na sua CIM a ciprofloxacina, e o fenômeno de formação da biofilmes é capaz de tornar uma população mais resistente a ação de antimicrobianos mesmo sem alterações cromossômicas que afetem os níveis de sensibilidade das células. Experimentos de quantificação da formação de biofilme poderiam elucidar a hipótese aqui levantada (BROOUN; LIU; LEWIS, 2000; O'TOOLE, 2011; STEWART; WILLIAM COSTERTON, 2001; SUCI et al., 1994; WRIGHT et al., 1997).

O terceiro grupo identificado foi o de genes relacionados a proteínas de membrana, bombas de efluxo e determinantes de resistência a antimicrobianos, que englobam os mutantes 15-10D, B32-F3, B28-H4 e B63-A2. O mutante 15-10D teve o

gene PA5362 interrompido, cujo produto é anotado como um transportador de acordo com predições realizadas com o *software* STRING. Além disso, é uma proteína aparentemente localizada na membrana citoplasmática conforme análises *in silico* utilizando a ferramenta PSORTb 3.0. O mutante B32-F3 teve o gene *pmrB* interrompido, que codifica um transportador de efluxo de drogas e está em um operon com o gene *pmrA*, que juntos formam o sistema regulatório de dois componentes PmrAB. O principal mecanismo de resistência a polimixinas se dá por modificações do LPS a fim de diminuir sua carga negativa, enfraquecendo sua interação com polimixinas catiônicas. Tais modificações do LPS são diretamente controladas por PmrAB. Em *E. coli*, *S. entérica*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, o mecanismo mais comum de resistência a polimixinas envolve modificações de PmrAB. O mutante B28-H4 teve o gene PA1760 interrompido, cujo produto é classificado como um possível regulador transcricional baseado na presença de motivos conservados de aminoácidos, similaridade de sequência e características estruturais preditas pelo *software* STRING (ADAMS et al., 2009; GUNN; MILLER, 1996; JAYOL et al., 2014; LEE; KO, 2014; NIKAIDO, 2003; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; PHAN et al., 2017; SZKLARCZYK et al., 2015; WINFIELD; GROISMAN, 2004; YU et al., 2010).

O mutante B63-A2 teve o gene PA0412 interrompido, este é uma proteína que contém um domínio N-terminal Lon. A proteína Lon é uma protease da superfamília AAA+ de ATPases, que são essenciais para o processo homeostase celular através da promoção de degradação de proteínas regulatórias de vida curta e de polipeptídeos anormais ou danificados. Essa protease tem seu nome derivado do fenótipo caracterizado com mutantes do gene *lon* de *E. coli* formam filamentos longos e sem divisão quando expostos a radiação UV. Em *Pseudomonas aeruginosa* já foi descrito o envolvimento de Lon protease na resistência a antibióticos e propriedades relacionadas à virulência. Mutantes da Lon protease dependente de ATP em *P. aeruginosa* exibiram supersusceptibilidade à ciprofloxacina, filamentação, deficiência nas motilidades do tipo *swarming* e *twitching*, bem como na formação de biofilme. Ademais, mutantes do gene *lon* exibiram aumento na atividade hemolítica e essa protease regula o mecanismo de *quorum sensing*. Entretanto, nenhum estudo até o momento demonstrou a importância de Lon para a virulência de *P. aeruginosa in vivo* (BRAZAS et al., 2007; BREIDENSTEIN et al., 2008; BREIDENSTEIN; BAINS;

HANCOCK, 2012; HOWARD-FLANDERS; SIMSON; THERIOT, 1964; MARR et al., 2007; TAKAYA et al., 2008).

Nest grupo, os mutantes 15-10D e B32-F3 tiveram alteração nos valores de CIM para ciprofloxacina o que pode nos indicar a ausência dos genes PA5362 e *pmrB*, respectivamente, pode estar levando a uma alteração sobre a ação da ciprofloxacina na célula e desta forma afetando a indução da resposta SOS causada por essa droga. Entretanto o fenótipo para estes dois mutantes não é o mesmo, o mutante 15-10D apresenta menor indução da resposta SOS enquanto o mutante B32-F3 apresenta maior indução da resposta SOS. Portanto, o efeito do gene PA5362 parece afetar a ação da ciprofloxacina na célula talvez pela diminuição da permeabilidade da droga uma vez que o produto deste gene parece ser uma proteína de membrana envolvida com transporte e pode funcionar como uma porta de entrada para antimicrobiano. Já o efeito do gene B32-F3 pode estar potencializando o efeito da ciprofloxacina, uma vez que o produto deste gene codifica para um transportador de efluxo de drogas e o seu mal funcionamento garante a presença do antimicrobiano no ambiente intracelular por períodos mais longos. O efeito dos genes interrompidos nos mutantes B28-H4 e B63-A2 parece um pouco mais difícil de se especular, pois como não houve alterações quanto a CIM de ciprofloxacina tais genes não parecem afetar a ação desta drogas na células e suas deleções podem causar efeitos pleiotrópicos ainda não compreendidos.

O quarto e último grupo identificado foi o de genes relacionados ao metabolismo geral da célula, e engloba os mutantes B41-F8, B52-B5 e B53-D3. O mutante B41-F8 teve o gene PA5093 interrompido, que codifica uma provável histidina/fenilalanina amônia-liase que participa na via de produção de fenilpropanóide (PAL), que é uma molécula amplamente distribuída em plantas sendo componente essencial de polímeros estruturais, promove a proteção contra radiação UV, participa na defesa contra patógenos e herbívoros, além se estar na composição de pigmentos e aroma de flores. As poucas caracterizações funcionais de PAL em bactérias do solo indicam a sua participação na produção de metabólitos secundários com poderosa atividade antimicrobiana ou produção de pigmentos. Estudos recentes sugerem o ancestral de plantas terrestres recebeu os genes de biossíntese de PAL através de mecanismos de transferência horizontal, e pode ter conferido defesa contra uma comunidade já desenvolvida de micróbios e a proteção contra UV. O mutante B52-B5 teve o gene *pauA* interrompido, este é a enzima pimeloil-CoA sintetase que participa

da síntese de biotina, conhecida como vitamina B7 ou coenzima R. O mutante B53-D3 teve o gene PA1631 interrompido, este é anotado como uma provável acil-CoA dehidrogenase que é uma classe de enzimas que agem na etapa inicial de catálise em cada ciclo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (EMILIANI et al., 2009; ESTRADA et al., 2017; WANG et al., 2017).

Neste grupo o fenótipo identificado também é heterogêneo, sendo que o mutante B41-F8 apresenta menor indução da resposta SOS e os mutantes B52-B5 e B53-D3 apresentam fenótipo de maior indução espontânea da resposta SOS e somente o mutante B53-D3 apresenta alteração no valor para CIM de ciprofloxacina. Os genes interrompidos nestes mutantes afetam vias metabólicas gerais, podem estar ocasionando problemas de crescimento para as células, ou mesmo acionando mecanismos de estresse celular que de alguma forma estão gerando mais EROs e modulando a resposta SOS. Experimentos performando curvas de crescimentos em diferentes meios de cultivos poderiam lançar luz sobre possíveis deficiências no crescimento. Porém, o efeito da deleção desses genes pode ser difícil de se especular devido efeitos pleiotrópicos ainda não compreendidos.

Podemos perceber que de fato há uma grande diversidade dos genes identificados pela varredura genética, e vários apresentam características bastante interessantes para uma associação mais direta como a alteração da indução da resposta SOS por ciprofloxacina. Porém, de uma forma geral acreditamos que os próximos experimentos que se enquadram para todos os genes identificados é primeiramente a realização de experimentos de mutagênese induzida, uma vez que se a indução da resposta SOS está reduzida, por exemplo, é espero que as taxas de mutação dessa célula também estejam menores como reflexo da menor atividade das polimerases TLS. Com relação aos mutantes que apresentam uma resposta SOS espontaneamente elevada, acreditamos que experimentos de mutagênese espontânea (sem a ação de agentes indutores da resposta SOS) seja relevante para verificar se essas células apresentam taxas de mutação elevadas em condições normais de crescimento, o que conferiria uma característica interessante para este organismo.

Também é importante realizar a confirmação de que o fenótipo encontrado para cada mutante foi realmente devido a interrupção do gene em questão. A maneira mais comumente aceita para estes experimentos é a realização da complementação gênica, porém em experimentos de varredura é comum que se adote outras



metodologias, como a utilização de um mutante de deleção em fase do gene para confirmação do fenótipo ou a utilização de um mutante para o gene proveniente de uma outra biblioteca de mutantes, gerados com uma metodologia diferente da empregada no estudo.

Por fim, acreditamos que para uma análise mais detalhada da implicação da deleção de cada gene identificado, um desenho experimental deve ser realizado individualmente para o gene pretendido, buscando abordar experimentos relevantes a ação biológica do gene.

## 5.2 *Caracterização funcional de genes regulados pela resposta SOS*

No que diz respeito a caracterização funcional de genes da resposta SOS, o mutante  $\Delta$ PA2288 não apresentou nenhum fenótipo de sensibilidade relacionado a resposta SOS. O gene PA2288 possui similaridade com um gene de bacteriófago que codifica uma proteína homóloga da subunidade theta da DNA polimerase III. Foi reportado que quando esses homólogos de theta codificados por bacteriófagos são superexpressos, eles podem conferir um fenótipo mutador leve a estas bactérias, provavelmente interferindo com a atividade revisora do complexo DNA Polimerase III. O próximo passo na tentativa de obtenção de fenótipos relacionados a resposta SOS para esse gene seria realizar a sua superexpressão e verificar novamente a sua sensibilidade a agentes genotóxicos, bem como avaliar as taxas de mutação nessas condições. A construção para realização destes experimentos já foi obtida nesse trabalho, sendo necessário somente a execução dos experimentos pertinentes (KIRBY et al., 2006; SLATER et al., 1994).

O mutante  $\Delta$ PA3413 se mostrou mais sensível aos agentes genotóxicos cisplatina e MMS. É curioso que o produto de um mesmo gene seja capaz de efeito protetor contra agentes que causam danos com naturezas químicas diferentes. A cisplatina é capaz de formar ligações cruzadas intracadeia no DNA, e é altamente citotóxica. Já o MMS é um agente alquilante que gera modificações das bases nitrogenadas através da adição de grupos metil em diferentes posições dos nucleotídeos. Não só a natureza das lesões é bastante distinta, mas as vias de reparo de DNA que irão lidar com cada uma dessas lesões também são diferentes, uma vez que a primeira lesão requer as vias de recombinação e de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), o segundo é reparado principalmente pelo reparo por excisão de

bases (BER). Portanto, o efeito do gene PA3413 (*yebG*) parece ser através de um efeito protetor mais genérico. Uma possibilidade poderia ser devido a sua capacidade de se ligar a DNA independente de sequência e protegê-lo da interação com agentes genotóxicos. Por isso, uma das possibilidades para avaliar sua ligação ao DNA seria a realização de ensaios de coimunoprecipitação. Além disso, avaliar as taxas de mutagênese exibidas pelos mutantes pode ser interessante (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014; LOMBA et al., 2006; WYATT; PITTMAN, 2006).

O mutante  $\Delta sulA$  não apresentou fenótipo de sensibilidade a agentes genotóxicos. Em *E. coli* esse gene se mostrou importante para a mutagênese induzida por ciprofloxacina, porém os nossos dados em *Pseudomonas aeruginosa* não apontam para qualquer envolvimento neste processo. Outro aspecto relacionado ao gene *sulA* é que em *E. coli* foi demonstrado o surgimento de células mutantes provenientes de suas extremidades, tentamos realizar caracterização do padrão de mutações exibido por este mutante, porém não fomos bem-sucedidos. Uma possível causa da identificação apenas de mutações que conferiram resistência a fosfomicina seria o viés de confirmação, dados que estamos selecionando as mutações baseado na aquisição de resistência a um antimicrobiano e por isso só recuperamos células com mutações no gene que conferem alteração no fenótipo selecionado. Com relação as células semeadas em LB após o tratamento com o antimicrobiano, é possível que as taxas de mutação da célula não tenham sido elevadas pela ação das polimerases TLS pois o dano causado não foi o suficiente para prolongar a resposta e levar a indução destas enzimas. Alternativamente, mesmo com o aumento da mutagênese, o número médio de mutações ainda é menor do que 1 mutação por genoma, portanto, abaixo do limite de sensibilidade do experimento de sequenciamento. Com relação a caracterização da função desse gene, várias evidências obtidas neste trabalho indicam sua participação no processo de filamentação em *P. aeruginosa*, por isso gostaríamos apenas de finalizar a caracterização desse processo neste organismo com o experimento microscopia com coloração descritos anteriormente (BOS et al., 2015; PRIBIS et al., 2019).

Em *E. coli* o processo de filamentação já foi amplamente estudado, tendo sido demonstrado a interação de SulA com FtsZ *in vitro* e a dinâmica pela qual SulA e MinCD interferem com o processo de filamentação. Além disso, foram realizados experimentos de obtenção de imagem para quantificação e dimensionamento da proporção de células filamentosas em uma população e a extensão destes filamentos,

bem como foi um processo implicado durante a infecção no trato urinário por promover a propagação de células e aumento de resistência contra as defesas do hospedeiro. Além disso, existe um componente da filimentação não dependente do gene *sulA* neste organismo que é aparente mesmo na ausência desse inibidor (ABELL-KING et al., 2022; JUSTICE et al., 2006; JUSTICE; GARCIA-LARA; ROTHFIELD, 2000; KAWARAI et al., 2004; KLEIN et al., 2015; SCHOEMAKER; GAYDA; MARKOVITZ, 1984; TRUSCA et al., 1998b).

Embora o objetivo do experimento de sequenciamento de genomas fosse aferir o processo de mutagênese (quantas mutações, quais tipos, se haveria localização preferencial em regiões do cromossomo), acabamos por identificar aspectos interessantes sobre os mecanismos de resistência à fosfomicina em *P. aeruginosa*. Anteriormente foi descrito que a única rota de aquisição de resistência por mutação seria a inativação do transportador GlpT. Em nossos sequenciamentos de linhagens Fos<sup>R</sup>, foi possível identificar novos determinantes de resistência a fosfomicina em *Pseudomonas aeruginosa*, contando com genes não implicados previamente neste fenômeno. A resistência à fosfomicina ocorre principalmente através de mutações cromossômicas que afetam os mecanismos de transporte da glicose-6-fosfato ou do glicerol-3-fosfato. A fosfomicina chega ao citoplasma bacteriano através de dois sistemas de transporte ativo de nutrientes, o transportador de glicerol-3-fosfato (GlpT) e do sistema de *uptake* de hexose fosfato (UhpT) (KAHAN et al., 1974; POPOVIC et al., 2010).

A entrada principal da fosfomicina na célula se dá pela atividade de GlpT, que foi demonstrado por participar desse processo através da descoberta de que mutantes do gene *glpT* são resistentes a este antibiótico. Por outro lado, mutantes que produzem constitutivamente este transportador são hipersuscetíveis a essa droga. Em *Pseudomonas aeruginosa*, GlpT foi descrito como sendo o único transportador para a fosfomicina, pois este microrganismo não tem nenhum transporte específico para a glicose-6-fosfato nem possui o gene *uhpT* que codifica para o transportador alternativo da fosfomicina em outros gêneros bacterianos (CASTAÑEDA-GARCÍA et al., 2009; KAHAN et al., 1974; POPOVIC et al., 2010).

Os genes identificados por levar a resistência a fosfomicina além de *glpT* foram os genes *glpR*, *yibO* e PA3001. Em *E. coli* GlpR funciona como um repressor do regulon de glicerol-3-fosfato, que é organizado em diferentes operons. Esse regulador é parte do operon *glpERG*, porém pode ser constitutivamente expresso como uma

unidade transcricional independente (*glpR*). Já em *P. aeruginosa* PAO1, esse gene se encontra em uma organização de transcrito único e não está em um operon. O gene *yibO* codifica para uma fosfoglicerato mutase, uma enzima que catalisa a interconversão de 2-fosfoglicerato e 3-fosfoglicerato na via da glicólise. Já o gene PA3001 codifica para uma provável gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase, uma enzima que catalisa a interconversão de gliceraldeído 3-fosfato em D-glicerato 1,3-bifosfato na via da glicólise. O interessante é que todos os genes participam da via da glicólise, que promove conversão de glicose em piruvato e produz o glicerol-3-fosfato como um de seus intermediários metabólicos. O transportador GlpT tem sua expressão induzida pela presença de seu substrato, o glicerol-3-fosfato, e necessita da ação da proteína receptora de AMP cíclico (cAMP-CRP). É possível especular que as mutações nos genes identificados estejam reduzindo os níveis de glicerol-3-fosfato na célula, levando a uma expressão bastante reduzida do gene *glpT*, culminando com uma menor permeabilidade de fosfomicina e gerando o aumento dos níveis de resistência nestes mutantes (JEDRZEJAS, 2000; JOHNSEN; SCHÖNHEIT, 2007; LARSON; CANTWELL; VAN LOO-BHATTACHARYA, 1992; LIN, 1976; NICHOLLS; LI; LIU, 2012; SCHWEIZER; BOOS; LARSON, 1985; TRISTAN et al., 2011; WEISSENBORN; WITTEKINDT; LARSON, 1992; YANG; LARSON, 1998).

## 6 CONCLUSÕES

Fomos capazes de estabelecer com sucesso uma metodologia de varredura genética em biblioteca de transposons, sendo possível identificar 16 genes que tiveram sua expressão relativa da resposta SOS alterada.

Determinamos que a deleção gene PA2288 não apresentou nenhuma alteração de fenótipos relacionados a resposta SOS. Em contrapartida a deleção do gene PA3413 (*yebG*) acarretou numa maior sensibilidade aos agentes genotóxicos cisplatina e MMS, e que a suplementação da expressão do gene por experimentos de complementação foi suficiente para restaurar os padrões de sensibilidade exibidos pela linhagem parental PAO1.

Demonstramos que a deleção do gene *sulA* não causa um efeito de redução da mutagênese induzida por ciprofloxacina como observado em *E. coli*. O gene também não parece estar envolvido com a geração de fenótipo de sensibilidade a agentes genotóxicos, mas certamente está envolvido com o processo de filamentação em *Pseudomonas aeruginosa*.

Por últimos, determinamos outros quatro genes pertencentes a via de biossíntese do glicerol-3-fosfato e que estão envolvidos na geração de resistência ao antimicrobiano fosfomicina, são estes: *glpT*, *glpR*, *yibO* e PA3001. Anteriormente, somente o gene *glpT* havia sido reportado por conferir resistência a fosfomicina.

## REFERÊNCIAS\*

- ABDALLAH, M. et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453–472, 18 jul. 2014.
- ABELL-KING, C. et al. Bacterial filamentation during urinary tract infections. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 12, p. e1010950, 1 dez. 2022.
- ADAMS, M. D. et al. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3628–3634, set. 2009.
- AHMAD, S. I.; KIRK, S. H.; EISENSTARK, A. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 591–625, out. 1998.
- AKSENOV, S. V. Dynamics of the inducing signal for the SOS regulatory system in *Escherichia coli* after ultraviolet irradiation. **Mathematical Biosciences**, v. 157, n. 1–2, p. 269–286, mar. 1999.
- ALEXEYEV, M. F. The pKNOCK Series of Broad-Host-Range Mobilizable Suicide Vectors for Gene Knockout and Targeted DNA Insertion into the Chromosome of Gram-Negative Bacteria. **BioTechniques**, v. 26, n. 5, p. 824–828, maio 1999.
- ALVES, I. R. et al. Effect of SOS-induced levels of *imuABC* on spontaneous and damage-induced mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. **DNA Repair**, v. 59, p. 20–26, nov. 2017.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465–478, 27 jul. 2014.
- ANDRIOLE, V. T. The Quinolones: Past, Present, and Future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. Supplement\_2, p. S113–S119, 15 jul. 2005.
- ARORA, S. K. et al. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5574–5581, set. 1997.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley and Sons, 1996. v. 1–4
- BARAQUET, C. et al. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 7207–7218, 1 ago. 2012.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

- BAYLES, K. W. Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 63–69, jan. 2014.
- 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, 2004.
- BERG, O. G. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins: the LexA protein and the arginine repressor use different strategies for functional specificity. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 11, p. 5089–5105, 1988.
- BERKS, B. C. et al. The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. **Biochemical Journal**, v. 309, n. 3, p. 983–992, 1 ago. 1995.
- BJEDOV, I. et al. Involvement of *Escherichia coli* DNA Polymerase IV in Tolerance of Cytotoxic Alkylating DNA Lesions *in Vivo*. **Genetics**, v. 176, n. 3, p. 1431–1440, 1 jul. 2007.
- BLANCHARD, L.; DE GROOT, A. Coexistence of SOS-Dependent and SOS-Independent Regulation of DNA Repair Genes in Radiation-Resistant *Deinococcus* Bacteria. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 924, 16 abr. 2021.
- BLANCO, M. et al. Influence of RecA protein on induced mutagenesis. **Biochimie**, v. 64, n. 8–9, p. 633–636, set. 1982.
- BLÁZQUEZ, J. et al. PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, 2006.
- BLÁZQUEZ, J. et al. Antimicrobials as promoters of genetic variation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 561–569, 2012.
- BLÁZQUEZ, J.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; MATIC, I. Antibiotic-Induced Genetic Variation: How It Arises and How It Can Be Prevented. **Annual Review of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 209–230, 8 set. 2018.
- BOJER, M. S. et al. *SosA* inhibits cell division in *Staphylococcus aureus* in response to DNA damage. **Molecular Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 1116–1130, 16 out. 2019.
- BONNER, C. A. et al. Purification and characterization of an inducible *Escherichia coli* DNA polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 35, p. 18946–52, 15 dez. 1988.
- BOS, J. et al. Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 1, p. 178–183, 6 jan. 2015.
- BOSHOFF, H. I. M. et al. DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 183–193, abr. 2003.
- BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 100640, maio 2019.

- BOUDSOCQ, F. et al. Investigating the Role of the Little Finger Domain of Y-family DNA Polymerases in Low Fidelity Synthesis and Translesion Replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32932–32940, jul. 2004.
- BOYCE, K. J. Mutators Enhance Adaptive Micro-Evolution in Pathogenic Microbes. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 442, 15 fev. 2022.
- BRAZAS, M. D. et al. Role of Lon, an ATP-Dependent Protease Homolog, in Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4276–4283, dez. 2007.
- BREIDENSTEIN, E. B. M. et al. Complex Ciprofloxacin Resistome Revealed by Screening a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant Library for Altered Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4486–4491, dez. 2008.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. W. Involvement of the Lon Protease in the SOS Response Triggered by Ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 2879–2887, jun. 2012.
- BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 640–646, mar. 2000.
- BROWN, D. A mathematical model of the Gac/Rsm quorum sensing network in *Pseudomonas fluorescens*. **BioSystems**, v. 101, n. 3, p. 200–212, set. 2010.
- BUSH, N. G. et al. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. **Molecules**, v. 25, n. 23, 1 dez. 2020.
- 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. 6546–6557, ago. 2011.
- CASTAÑEDA-GARCÍA, A. et al. The Glycerol-3-Phosphate Permease GlpT Is the Only Fosfomycin Transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 6968–6974, 15 nov. 2009.
- CHANDLER, C. E. et al. Genomic and phenotypic diversity among ten laboratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 5, 1 mar. 2019.
- CHOI, K. H. et al. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. **Nature Methods** 2005 2:6, v. 2, n. 6, p. 443–448, 20 maio 2005.
- CHOI, K. H.; SCHWEIZER, H. P. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature Protocols** 2006 1:1, v. 1, n. 1, p. 153–161, 27 jun. 2006.
- CIRZ, R. T. et al. Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. **PLoS Biology**, v. 3, n. 6, p. e176, 10 maio 2005.



CIRZ, R. T. et al. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS Response and Its Role in the Global Response to the Antibiotic Ciprofloxacin. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 20, p. 7101–7110, 2006.

CIRZ, R. T.; ROMESBERG, F. E. Induction and Inhibition of Ciprofloxacin Resistance-Confering Mutations in Hypermutator Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 220–225, jan. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard— 10th ed. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.** [s.l: s.n.].

CORDELL, S. C.; ROBINSON, E. J. H.; LÖWE, J. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 7889–7894, 24 jun. 2003.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 21 maio 1999.

COURCELLE, J. et al. **Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli*.** [s.l: s.n.].

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 2001b.

COX, M. M. Motoring along with the bacterial RecA protein. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 127–138, 17 fev. 2007.

CRANE, J. K. et al. Zinc Blockade of SOS Response Inhibits Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Enteric Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 21 nov. 2018.

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, 17 jun. 2021.

DA ROCHA, R. P. et al. Characterization of the SOS Regulon of *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 4, p. 1209–1218, 15 fev. 2008.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, out. 2014.

DAVIES, G. et al. Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis center: natural history and implications for segregation. **Pediatric pulmonology**, v. 35, n. 4, p. 253–256, 1 abr. 2003.

DE BERARDINIS, V. et al. A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 174, 4 jan. 2008.

DE BOER, P.; CROSSLEY, R.; ROTHFIELD, L. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. **Nature**, v. 359, n. 6392, p. 254–256, set. 1992.

DREES, J. C. et al. A RecA Filament Capping Mechanism for RecX Protein. **Molecular Cell**, v. 15, n. 5, p. 789–798, set. 2004.

DUTREIX, M. et al. New recA mutations that dissociate the various RecA protein activities in *Escherichia coli* provide evidence for an additional role for RecA protein in UV mutagenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 5, p. 2415–2423, maio 1989.

DWYER, D. J. et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, 20 maio 2014.

DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482–489, out. 2009.

EMILIANI, G. et al. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. **Biology Direct**, v. 4, n. 1, p. 7, 16 dez. 2009.

EMMERSON, A. M. The quinolones: decades of development and use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 90001, p. 13–20, 1 maio 2003.

ERILL, I. et al. Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 1, p. 66–77, 8 jan. 2006.

ERILL, I.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 6, p. 637–656, nov. 2007.

ESTRADA, P. et al. The pimeloyl-CoA synthetase BioW defines a new fold for adenylate-forming enzymes. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 6, p. 668–674, 17 jun. 2017.

FAN, F. et al. The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 1035–1046, 31 dez. 1997.

FERNÁNDEZ DE HENESTROSA, A. R. et al. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1560–1572, 2000.

FISHER, L. M. et al. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. **The American Journal of Medicine**, v. 87, n. 5, p. S2–S8, 1989.

FOLKESSON, A. et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nature Reviews**, v. 10, 2012.

FRIEDBERG, E. C. et al. **DNA Repair and Mutagenesis**. Washington, DC, USA: ASM Press, 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–a012682, 1 dez. 2013.

FUJII, S.; FUCHS, R. P. A Comprehensive View of Translesion Synthesis in *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, 19 ago. 2020.

GALHARDO, R. S. et al. An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 8, p. 2603–2614, 2005.

GALHARDO, R. S. 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.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. *Gammaproteobacteria class. nov.* Em: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–1.

GOODMAN, M. F. Better living with hyper-mutation. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 57, n. 6, p. 421–434, jul. 2016.

GOODMAN, M. F.; WOODGATE, R. Translesion DNA Polymerases. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 5, n. 10, p. 26, 2014.

GOTOH, H. et al. SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. **Biofouling**, v. 26, n. 5, p. 603–611, 3 jun. 2010.

GOVAN, J. R. W.; DERETIC, A. V. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 539–574, 1996.

GREEN, J. M.; MERKEL, W. K.; NICHOLS, B. P. Characterization and sequence of *Escherichia coli pabC*, the gene encoding aminodeoxychorismate lyase, a pyridoxal phosphate-containing enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 16, p. 5317–5323, ago. 1992.

GUNN, J. S.; MILLER, S. I. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 23, p. 6857–6864, dez. 1996.

HA, D.-G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review . **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 2 abr. 2015.

HARDALO, C.; EDBERG, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk from Drinking Water. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 47–75, 25 jan. 1997.

HENRIKUS, S. S.; VAN OIJEN, A. M.; ROBINSON, A. Specialised DNA polymerases in *Escherichia coli*: roles within multiple pathways. **Current Genetics**, v. 64, n. 6, p. 1189–1196, 26 dez. 2018.

HOANG, T. T. et al. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Gene**, v. 212, n. 1, p. 77–86, maio 1998a.

HOANG, T. T. et al. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Gene**, v. 212, n. 1, p. 77–86, 28 maio 1998b.

HOWARD-FLANDERS, P.; SIMSON, E.; THERIOT, L. A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in *Escherichia coli* k-12. **Genetics**, v. 49, n. 2, p. 237–246, 5 fev. 1964.

JACOBS, M. A. et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. SUPPL. 2, p. 14339–14344, 25 nov. 2003.

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, jan. 2006.

JAROSZ, D. F. et al. Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 70–77, 2007.

JASZCZUR, M. et al. Mutations for Worse or Better: Low-Fidelity DNA Synthesis by SOS DNA Polymerase V Is a Tightly Regulated Double-Edged Sword. **Biochemistry**, v. 55, n. 16, p. 2309–2318, 26 abr. 2016.

JAYOL, A. et al. Resistance to Colistin Associated with a Single Amino Acid Change in Protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Worldwide Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4762–4766, ago. 2014.

JEDRZEJAS, M. J. Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 73, n. 2–4, p. 263–287, fev. 2000.

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

JIAO, H. et al. The Pyocin Regulator PrtR Regulates Virulence Expression of *Pseudomonas aeruginosa* by Modulation of Gac/Rsm System and c-di-GMP Signaling Pathway. 2021.

JOHNSEN, U.; SCHÖNHEIT, P. Characterization of cofactor-dependent and cofactor-independent phosphoglycerate mutases from Archaea. **Extremophiles**, v. 11, n. 5, p. 647–657, 28 ago. 2007.

JONES, A. M. et al. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. **Lancet**, v. 358, n. 9281, p. 557–558, 18 ago. 2001.

JUSTICE, S. S. et al. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 52, p. 19884–19889, 26 dez. 2006.

JUSTICE, S. S.; GARCIA-LARA, J.; ROTHFIELD, L. I. Cell division inhibitors SulA and MinC/MinD block septum formation at different steps in the assembly of the *Escherichia coli* division machinery. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 410–423, jul. 2000.

KAHAN, F. M. et al. The mechanism of action of fosfomicin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 235, n. 1 Mode of Actio, p. 364–386, maio 1974.

KAWAI, Y.; MORIYA, S.; OGASAWARA, N. Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1113–1122, 5 fev. 2003.

KAWARAI, T. et al. SulA-independent filamentation of *Escherichia coli* during growth after release from high hydrostatic pressure treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 255–262, 1 abr. 2004.

KEREN, I. et al. Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species. **Science**, v. 339, n. 6124, p. 1213–1216, 8 mar. 2013.

KIM, S.-R. et al. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: An overexpression of *dinB* / *dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 13792–13797, 9 dez. 1997.

KIM, S.-R. et al. Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, n. 2, p. 207–215, out. 2001.

KIRBY, T. W. et al. Structure of the *Escherichia coli* DNA Polymerase III  $\epsilon$ -HOT Proofreading Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38466–38471, dez. 2006.

KLEIN, K. et al. Quantification of filamentation by uropathogenic *Escherichia coli* during experimental bladder cell infection by using semi-automated image analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 109, p. 110–116, fev. 2015.

KLOCKGETHER, J. et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 4, p. 1113–1121, fev. 2010.

KNIPPERS, R. DNA Polymerase II. **Nature**, v. 228, n. 5276, p. 1050–1053, dez. 1970.

KOBAYASHI, S. et al. Fidelity of *Escherichia coli* DNA Polymerase IV. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34198–34207, set. 2002.

KOHANSKI, M. A. et al. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, set. 2007.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 311–320, fev. 2010.

KOORITS, L. et al. Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. **DNA Repair**, v. 6, n. 6, p. 863–868, jun. 2007.

KOVAČIČ, L. et al. Structural insight into LexA–RecA\* interaction. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 21, p. 9901–9910, nov. 2013.

KREUZER, K. N.; COZZARELLI, N. R. *Escherichia coli* Mutants Thermosensitive for Deoxyribonucleic Acid Gyrase Subunit A: Effects on Deoxyribonucleic Acid Replication, Transcription, and Bacteriophage Growth. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 424–435, nov. 1979.

KULAEVA, O. I. et al. Characterization of the *umu*-complementing operon from R391. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 10, p. 2737–43, 1995.

KULASAKARA, H. et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3-5)-cyclic-GMP in virulence. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511090103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511090103)>.

LAPOUGE, K. et al. Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. **Molecular Microbiology**, jan. 2008.

LARSON, T. J.; CANTWELL, J. S.; VAN LOO-BHATTACHARYA, A. T. Interaction at a distance between multiple operators controls the adjacent, divergently transcribed *glpTQ-glpACB* operons of *Escherichia coli* K-12. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 9, p. 6114–21, 25 mar. 1992.

LEBEL, M. Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 8, n. 1, p. 3–30, 2 jan. 1988.

LEE, A. C.; JONES, A. L. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in cystic fibrosis. **Paediatric respiratory reviews**, v. 27, p. 18–20, 1 jun. 2018.

LEE, J.-Y.; KO, K. S. Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 3, p. 271–276, mar. 2014.

LEWIS, E. B. et al. Effect of mismatch repair on the mutational footprint of the bacterial SOS mutator activity. **DNA Repair**, v. 103, p. 103130, jul. 2021.

LEWIS, L. K. et al. Identification of High Affinity Binding Sites for LexA which Define New DNA Damage-inducible Genes in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 241, n. 4, p. 507–523, ago. 1994.

LIMA-NORONHA, M. A. et al. Sending out an SOS - the bacterial DNA damage response. **Genetics and Molecular Biology**, v. 45, n. 3 suppl 1, 2022.

- LIN, D. et al. Genetic Polymorphisms in Folate- Metabolizing Enzymes and Risk of Gastroesophageal Cancers: A Potential Nutrient-Gene Interaction in Cancer Development. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 140–145.
- LIN, E. C. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 535–578, out. 1976.
- LITTLE, J. W. et al. Cleavage of the *Escherichia coli* *lexA* protein by the *recA* protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 6, p. 3225, 1980.
- LITTLE, J. W. Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. **Biochimie**, v. 73, n. 4, p. 411–421, abr. 1991.
- LITTLE, J. W.; GELLERT, M. The SOS regulatory system: Control of its state by the level of RecA protease. **Journal of Molecular Biology**, v. 167, n. 4, p. 791–808, jul. 1983.
- LITTLE, J. W.; MOUNT, D. W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. **Cell**, v. 29, n. 1, p. 11–22, maio 1982.
- LIU, Y.; IMLAY, J. A. Cell Death from Antibiotics Without the Involvement of Reactive Oxygen Species. **Science**, v. 339, n. 6124, p. 1210–1213, 8 mar. 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOMBA, M. R. et al. Identification of *yebG* as a DNA damage-inducible *Escherichia coli* gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, n. 1, p. 119–122, 17 jan. 2006.
- LONG, H. et al. Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 18, 3 maio 2016.
- LÓPEZ, E.; BLÁZQUEZ, J. Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Intrachromosomal Homologous Recombination in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3411–3415, ago. 2009.
- LUKENS, L. N.; BUCHANAN, J. M. Biosynthesis of the purines. XXIV. The enzymatic synthesis of 5-amino-1-ribosyl-4-imidazolecarboxylic acid 5'-phosphate from 5-amino-1-ribosylimidazole 5'-phosphate and carbon dioxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 234, n. 7, p. 1799–805, jul. 1959.
- LUO, Y. et al. Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. **Cell**, v. 106, n. 5, p. 585–594, 7 set. 2001.
- LUSETTI, S. L. et al. The DinI Protein Stabilizes RecA Protein Filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30037–30046, jul. 2004.
- LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 194–222, abr. 2002.
- LYNCH, M. et al. Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 11, p. 704–714, 14 nov. 2016.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012.

MAKI, H. Origins of Spontaneous Mutations: Specificity and Directionality of Base-Substitution, Frameshift, and Sequence-Substitution Mutageneses. **Annual Review of Genetics**, v. 36, n. 1, p. 279–303, dez. 2002.

MANN, A. et al. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100030, dez. 2021.

MARR, A. K. et al. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. **Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 474–482, 1 fev. 2007.

MATSUI, H. et al. Regulation of Pyocin Genes in *Pseudomonas aeruginosa* by Positive (*prtN*) and Negative (*prtR*) Regulatory Genes. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 175, n. 5, p. 1257–1263, 1993.

MCFARLAND, K. A. et al. A self-lysis pathway that enhances the virulence of a pathogenic bacterium. **PNAS**, v. 112, n. 27, p. 8433–8438, 2015.

MCHENRY, C. S. Breaking the rules: bacteria that use several DNA polymerase IIIs. **EMBO reports**, v. 12, n. 5, p. 408–414, 8 maio 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, mar. 2001.

MEMAR, M. Y. et al. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: current insights. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 11, p. 567–576, abr. 2018.

MEMAR, M. Y. et al. The central role of the SOS DNA repair system in antibiotics resistance: A new target for a new infectious treatment strategy. **Life Sciences**, v. 262, p. 118562, dez. 2020.

MERCOLINO, J. et al. RecA and Specialized Error-Prone DNA Polymerases Are Not Required for Mutagenesis and Antibiotic Resistance Induced by Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2022.

MÉRIDA-FLORIANO, A.; ROWE, W. P. M.; CASADESÚS, J. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of SOS Response Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 943, 19 abr. 2021.

MEYER, E. et al. Purification and characterization of the purE, purK, and purC gene products: identification of a previously unrecognized energy requirement in the purine biosynthetic pathway. **Biochemistry**, v. 31, n. 21, p. 5022–5032, jun. 1992.

MICHEL-BRIAND, Y.; BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimie**, v. 84, n. 5–6, p. 499–510, maio 2002.



MIGLIORINI, L. B. **Papel dos mecanismos de reparo de DNA na resposta de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos Ciprofloxacina e Ceftazidima.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2017.

MILLANAO, A. R. et al. Biological Effects of Quinolones: A Family of Broad-Spectrum Antimicrobial Agents. **Molecules**, v. 26, n. 23, 1 dez. 2021.

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.

MO, A. H.; BURKHOLDER, W. F. YneA, an SOS-Induced Inhibitor of Cell Division in *Bacillus subtilis*, Is Regulated Posttranslationally and Requires the Transmembrane Region for Activity. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3159–3173, 15 jun. 2010.

MODELL, J. W.; HOPKINS, A. C.; LAUB, M. T. A DNA damage checkpoint in *Caulobacter crescentus* inhibits cell division through a direct interaction with FtsW. **Genes & Development**, v. 25, n. 12, p. 1328–1343, 15 jun. 2011.

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–12, 2015.

NAIMAN, K. et al. Chronology in lesion tolerance gives priority to genetic variability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 15, p. 5526–5531, 15 abr. 2014.

NAPOLITANO, R. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 22, p. 6259–6265, 15 nov. 2000.

NEHER, S. B. et al. Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. **Genes & Development**, v. 17, n. 9, p. 1084–1089, 1 maio 2003.

NEWMAN, J. R.; FUQUA, C. Broad-host-range expression vectors that carry the l-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. **Gene**, v. 227, n. 2, p. 197–203, 18 fev. 1999.

NICHOLLS, C.; LI, H.; LIU, J.-P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 8, p. 674–679, ago. 2012.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–656, dez. 2003.

NOHMI, T. et al. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 6, p. 1816–1820, mar. 1988.

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

- OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 26 nov. 2014.
- OLIVER, A. et al. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. **Science**, v. 288, n. 5469, p. 1251–1253, 2000a.
- OLIVER, A. et al. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. **Science**, v. 288, n. 5469, p. 1251–1253, 19 maio 2000b.
- O'REILLY, E. K.; KREUZER, K. N. Isolation of SOS Constitutive Mutants of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7149–7160, nov. 2004.
- OREN, A. et al. Public discussion on a proposed revision of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 71, p. 4918, 2021.
- O'ROURKE, P. E. F. et al. *Pseudomonas aeruginosa* 4-Amino-4-Deoxychorismate Lyase: Spatial Conservation of an Active Site Tyrosine and Classification of Two Types of Enzyme. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24158, 15 set. 2011.
- O'TOOLE, G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 47, 30 jan. 2011.
- PARKER, C. T.; TINDALL, B. J.; GARRITY, G. M. International Code of Nomenclature of Prokaryotes - Prokaryotic Code (2008 Revision). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 69, n. 1A, 2019.
- PEDERSEN, S. S. et al. An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 17, n. 4, p. 505–516, abr. 1986.
- PEÑA, J. M. et al. Control of a programmed cell death pathway in *Pseudomonas aeruginosa* by an antiterminator. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.
- PENTERMAN, J.; SINGH, P. K.; WALKER, G. C. Biological Cost of Pyocin Production during the SOS Response in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 18, p. 3351–3359, 2014.
- PERRY, K. L.; WALKER, G. C. Identification of plasmid (pKM101)-coded proteins involved in mutagenesis and UV resistance. **Nature**, v. 300, n. 5889, p. 278–281, nov. 1982.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, 2001.
- PHAN, M.-D. et al. Modifications in the *pmrB* gene are the primary mechanism for the development of chromosomally encoded resistance to polymyxins in uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 10, p. 2729–2736, 1 out. 2017.
- PHILLIPS, I. et al. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, n. 5, p. 631–638, 1987.

PODLESEK, Z.; ŽGUR BERTOK, D. The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 4 ago. 2020.

POPOVIC, M. et al. Fosfomycin: an old, new friend? **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 127–142, 14 fev. 2010.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 6, p. 568–585, jun. 2015.

PRIBIS, J. P. et al. Gamblers: An Antibiotic-Induced Evolvable Cell Subpopulation Differentiated by Reactive-Oxygen-Induced General Stress Response. **Molecular Cell**, v. 74, n. 4, p. 785–800.e7, 2019.

QUILLARDET, P.; ROUFFAUD, M.-A.; BOUIGE, P. DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 8, p. 559–572, out. 2003.

RADCHENKO, E. A. et al. Quantitative Analysis of the Rates for Repeat-Mediated Genome Instability in a Yeast Experimental System. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 421–438.

RADMAN, M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. **Basic life sciences**, v. 5A, p. 355–367, 1975.

RAGONE, S. et al. Structural basis for inhibition of homologous recombination by the RecX protein. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 16, p. 2259–2269, 2008.

RASMUSSEN, T. B. et al. Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by Use of a Novel Genetic System, the QSI Selector. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1799–1814, mar. 2005.

RICO-JIMÉNEZ, M. et al. Two different mechanisms mediate chemotaxis to inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28967, 29 jun. 2016.

RODRÍGUEZ-ROSADO, A. I. et al. N-acetylcysteine blocks SOS induction and mutagenesis produced by fluoroquinolones in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 8, p. 2188–2196, 1 ago. 2019.

RYBTKE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 23, p. 3628–3645, nov. 2015.

SALAMA, N. R.; SHEPHERD, B.; FALKOW, S. Global Transposon Mutagenesis and Essential Gene Analysis of *Helicobacter pylori*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 23, p. 7926–7935, dez. 2004.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 1–3

- SANDERS, L. H. et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* *dinB*-Encoded DNA Polymerase IV in Mutagenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8573, dez. 2006.
- SASSANFAR, M.; ROBERTS, J. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*— The involvement of DNA replication. **J Mol Biol**, v. 212, 1990.
- SCHOEMAKER, J. M.; GAYDA, R. C.; MARKOVITZ, A. Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the *sulA* protein, a key to lon-associated filamentation and death. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 551–561, maio 1984.
- SCHUSTER, M. et al. Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: a Transcriptome Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2066–2079, abr. 2003.
- SCHWEIZER, H.; BOOS, W.; LARSON, T. J. Repressor for the sn-glycerol-3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: cloning of the *glpR* gene and identification of its product. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n. 2, p. 563–566, fev. 1985.
- SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.
- SHENG, D. et al. ImuA Facilitates SOS Mutagenesis by Inhibiting RecA-Mediated Activity in *Myxococcus xanthus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 18, 26 ago. 2021.
- SIDORENKO, J.; JATSENKO, T.; KIVISAAR, M. Ongoing evolution of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sublines complicates studies of DNA damage repair and tolerance. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 797–799, p. 26–37, 1 mar. 2017.
- SIKAND, A. et al. The SOS Error-Prone DNA Polymerase V Mutasome and  $\beta$ -Sliding Clamp Acting in Concert on Undamaged DNA and during Translesion Synthesis. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1083, 1 maio 2021.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology 1983 1:9**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.
- SLATER, S. C. et al. *holE*, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a *holE* mutant and comparison with a *dnaQ* (epsilon-subunit) mutant. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 3, p. 815–821, fev. 1994.
- SLILATY, S. N.; RUPLEY, J. A.; LITTLE, J. W. Intramolecular cleavage of *lexA* and phage lambda repressors: dependence of kinetics on repressor concentration, pH, temperature, and solvent. **Biochemistry**, v. 25, n. 22, p. 6866–6875, 4 nov. 1986.
- SOMMER, S.; BAILONE, A.; DEVORET, R. The appearance of the UmuD'C protein complex in *Escherichia coli* switches repair from homologous recombination to SOS mutagenesis. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 963–971, dez. 1993.

STEFANI, S. et al. Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, p. 353–362, 2017.

STEWART, P. S.; WILLIAM COSTERTON, J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, jul. 2001.

STOHL, E. A. et al. *Escherichia coli* RecX Inhibits RecA Recombinase and Coprotease Activities in Vitro and in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2278–2285, jan. 2003.

STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, 2000.

SUCI, P. A. et al. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 2125–2133, set. 1994.

SWEASY, J. B. et al. RecA protein of *Escherichia coli* has a third essential role in SOS mutator activity. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3030–3036, jun. 1990.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 28 jan. 2015.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, mar. 2018.

TAKAYA, A. et al. Negative Regulation of Quorum-Sensing Systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-Dependent Lon Protease. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 12, p. 4181–4188, 15 jun. 2008.

TAYLOR, P. K.; YEUNG, A. T. Y.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. **Journal of Biotechnology**, v. 191, p. 121–130, 2014.

THI, T. D. et al. Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 531–538, 1 mar. 2011.

TIMINSKAS, K. et al. Comprehensive analysis of DNA polymerase III  $\alpha$  subunits and their homologs in bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 3, p. 1393–1413, fev. 2014.

TIMINSKAS, K.; VENCLOVAS, Č. New insights into the structures and interactions of bacterial Y-family DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 9, p. 4393–4405, 21 maio 2019.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 2, p. 317–323, fev. 2011.

TRUSCA, D. et al. Bacterial SOS Checkpoint Protein Sula Inhibits Polymerization of Purified FtsZ Cell Division Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3946–3953, ago. 1998a.

TRUSCA, D. et al. Bacterial SOS Checkpoint Protein Sula Inhibits Polymerization of Purified FtsZ Cell Division Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3946–3953, ago. 1998b.

TSANG, S. S.; CHOW, S. A.; RADDING, C. M. Networks of DNA and RecA protein are intermediates in homologous pairing. **Biochemistry**, v. 24, n. 13, p. 3226–3232, 18 jun. 1985.

TURNBULL, L. et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl\_2, p. W71–W74, 1 jul. 2007.

URANGA, L. A. et al. The *Escherichia coli* DinD Protein Modulates RecA Activity by Inhibiting Postsynaptic RecA Filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 29480–29491, ago. 2011.

VAISMAN, A.; MCDONALD, J. P.; WOODGATE, R. Translesion DNA Synthesis. **EcoSal Plus**, v. 5, n. 1, 24 ago. 2012.

VALENCIA, A. O. et al. Role of error-prone DNA polymerases in spontaneous mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, 2020.

VALENCIA, E. Y. et al. Ciporfloxacin-Mediated Mutagenesis Is Suppressed by Subinhibitory Concentrations of Amikacin in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 1–5, 2017.

VALENTINI, M.; FILLOUX, A. **Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria**. **Journal of Biological Chemistry** American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 10 jun. 2016.

VINCENT, J.-L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **The Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2068–2077, jun. 2003.

WAGNER, V. E. et al. Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2080–2095, abr. 2003.

WAGNER, V. E.; GILLIS, R. J.; IGLEWSKI, B. H. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v. 22, p. S15–S20, dez. 2004.

WALKER, G. C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 1, p. 60–93, mar. 1984.

WANG, M. et al. Using the pimeloyl-CoA synthetase adenylation fold to synthesize fatty acid thioesters. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 6, p. 660–667, 17 jun. 2017.

WARNER, D. F. et al. Essential roles for *imuA*<sup>-</sup> and *imuB*-encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 29, p. 13093–13098, 20 jul. 2010.

WEBER, K. New Structural Model of E. coli Aspartate Transcarbamylase and the Amino-acid Sequence of the Regulatory Polypeptide Chain. **Nature**, v. 218, n. 5147, p. 1116–1119, jun. 1968.

WEISSENBORN, D. L.; WITTEKINDT, N.; LARSON, T. J. Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 9, p. 6122–31, 25 mar. 1992.

**WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17162–17167, 7 dez. 2004.

WRIGHT, T. L. et al. Effects of metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 32, n. 5, p. 473–477, jul. 1997.

WU, H. et al. Identification and Characterization of Two Chemotactic Transducers for Inorganic Phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 12, p. 3400–3404, 15 jun. 2000.

WU, W.; JIN, S. PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 6058–6068, set. 2005.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 12, p. 1580–1594, 1 dez. 2006.

XAVIER, K. B. et al. Phosphorylation and Processing of the Quorum-Sensing Molecule Autoinducer-2 in Enteric Bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 2, p. 128–136, 1 fev. 2007.

YANG, B.; LARSON, T. J. Multiple promoters are responsible for transcription of the *glpEGR* operon of *Escherichia coli* K-12. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1396, n. 1, p. 114–126, mar. 1998.

YSERN, P. et al. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. **Mutagenesis**, v. 5, n. 1, p. 63–66, 1 jan. 1990.

YU, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608–1615, 1 jul. 2010.

YU, X.; EGELMAN, E. H. Structural data suggest that the active and inactive forms of the RecA filament are not simply interconvertible. **Journal of Molecular Biology**, v. 227, n. 1, p. 334–346, set. 1992.

ZENG, Y.-H. et al. The flexibility of UV-inducible mutation in *Deinococcus ficus* as evidenced by the existence of the imuB–dnaE2 gene cassette and generation of superior feather degrading bacteria. **Microbiological Research**, v. 167, n. 1, p. 40–47, dez. 2011.

ZHANG, A. P. P.; PIGLI, Y. Z.; RICE, P. A. Structure of the LexA–DNA complex and implications for SOS box measurement. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 883–886, ago. 2010.

ZHANG, H. Mechanisms of mutagenesis induced by DNA lesions: multiple factors affect mutations in translesion DNA synthesis. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, n. 3, p. 219–251, 3 maio 2020.

ZHANG, J.-H.; CHUNG, T. D. Y.; OLDENBURG, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. **SLAS Discovery**, v. 4, n. 2, p. 67–73, abr. 1999.

ZHANG, X. et al. Quinolone Antibiotics Induce Shiga Toxin–Encoding Bacteriophages, Toxin Production, and Death in Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 664–670, fev. 2000.

ZHANG, Y. et al. The FGGY Carbohydrate Kinase Family: Insights into the Evolution of Functional Specificities. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 12, p. e1002318, 22 dez. 2011.