

FRANK SYDNEY FERNÁNDEZ SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS DE REPARO DE LESÕES OXIDATIVAS
E FOTOPRODUTOS DE *Caulobacter crescentus***

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

São Paulo

2019

FRANK SYDNEY FERNÁNDEZ SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS DE REPARO DE LESÕES OXIDATIVAS
E FOTOPRODUTOS DE *Caulobacter crescentus***

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

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo.

Versão Original.

São Paulo

2019

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)

FERNÁNDEZ SILVA, FRANK SYDNEY
CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS DE REPARO DE LESÕES
OXIDATIVAS E FOTOPRODUTOS DE *Caulobacter*
crenscentus. / FRANK SYDNEY FERNÁNDEZ SILVA;
orientador RODRIGO DA SILVA GALHARDO. -- São Paulo,
2019.

128 p.

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

1. *Caulobacter crenscentus*. 2. Sistema GO. 3. SP
liase. 4. Superfamília radical SAM. 5. Uracila-DNA
glicosilase. I. DA SILVA GALHARDO, RODRIGO,
orientador. II. Título.



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 **730/2015** referente ao projeto intitulado: "**Caracterização de sistemas de reparo de lesões oxidativas e fotoprodutos de *Caulobacter crescentus***" sob a responsabilidade de **Frank Sydney Fernandez Silva** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Rodrigo da Silva Galhardo**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 28 de fevereiro de 2018.


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


Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Rodrigo Galhardo, pela oportunidade de formar parte do seu grupo de pesquisa. Por todos os conhecimentos, paciência e apoio ao longo desses quase cinco anos desde primeira vez que cheguei ao Brasil. Obrigado pela confiança em mim e no meu trabalho desenvolvendo o projeto.

Agradeço aos Professores Dr. Carlos Frederico Martins Menck e Dra. Marilis do Valle Marques do ICB-USP e as professoras Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto e Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros do IQ-USP pelo espaço nos seus laboratórios e pela sua disponibilidade.

Agradeço aos meus amigos de laboratório pela ajuda em alguns dos experimentos e o mais importante pela ajuda emocional, tornando o dia a dia muito melhor!

Agradeço especialmente a meus pais Rosário e Daniel pelo apoio, pelos conselhos, pela paciência, pelo amor e principalmente pela força de suportar estar separados e vernos poucas vezes em estes quase dezessete anos, desde que sai de casa com o objetivo de ser um profissional.

Como não agradecer também a minha avó brasileira, Dona Neusa, que me acolheu na sua casa e me fez sentir como se fosse verdadeiramente seu neto durante este tempo em Brasil.

Agradeço a CNPq e CAPES pela bolsa e a FAPESP pelo financiamento deste projeto.

APOIO FINANCEIRO.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

RESUMO

FERNÁNDEZ SILVA, F. S. Caracterização de sistemas de reparo de lesões oxidativas e fotoprodutos de *Caulobacter crescentus*. 2019. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A preservação da informação genética de uma geração para outra exige que a sequência de DNA do genoma da célula seja mantida sem alteração. No entanto, a integridade da sequência de DNA está sob constante ameaça de danos oxidativos como as espécies reativas de oxigênio (ROS). Uma das lesões oxidativas mais comuns é a 8-oxoguanina (8-oxoG), que tem um potencial mutagênico muito elevado. Outra fonte de dano ao DNA é a radiação UV que induz lesões como os dímeros de ciclobutano – pirimidina (CPD) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina- pirimidona (6-4 PP) que prejudicam processos vitais como a replicação e transcrição no DNA. Neste trabalho, estudamos sistemas de reparo destes tipos de lesões no organismo modelo *Caulobacter crescentus*. O sistema GO bacteriano é dedicado à prevenir os efeitos mutagênicos da 8-oxoG, sendo composto por três enzimas, MutM (Fpg) e MutY (DNA- glicosilases) que removem a 8-oxoG e adenina mal emparelhadas, respectivamente, e MutT que hidrolisa 8-oxodGTP do pool de nucleotídeos. Os fotoprodutos são reparados por duas principais vias, o reparo da excisão de nucleotídeos (NER) que remove e substitui os nucleotídeos danificados, e o mecanismo de reparação por reversão direta, mediado pelas DNA fotoliases. Curiosamente, em esporos bacterianos, é encontrada outra enzima, a liase de fotoprodutos de esporos (SP liase), que realiza a reversão direta de um fotoproducto específico de esporos (SP) de maneira independente da luz. A SP liase pertence à superfamília de enzimas S-adenosil-L-metionina (SAM) radical. O gene *CCNA_02417* de *C. crescentus* codifica uma proteína desta superfamília e é parte de um operon com o gene *CCNA_02418* que codifica uma proteína com dois domínios; um domínio DUF4130 e outro com similaridade com as uracila-DNA glicosilases. Os resultados obtidos mostram que a falta das glicosilases do sistema GO de *C. crescentus* confere um fenótipo mutador leve quando comparado com *Escherichia coli*, e a baixa mutagênese espontânea não se deve à participação de outras vias de reparo na ausência do sistema GO. Dois genes que codificam homólogos de Endo III estão presentes no genoma de *C. crescentus*, mas não cooperam com o sistema GO para o

reparo de 8-oxoG. O estresse oxidativo por azul de metileno promove altos níveis de mutagênese na linhagem *mutM mutY*, mas estes genes não são regulados em resposta a danos oxidativos. Identificamos dois fatores que podem contribuir para a menor importância do sistema GO em *C. crescentus* na prevenção de mutagênese: menores níveis basais de 8-oxoG no DNA, e um efeito da menor temperatura ótima de crescimento deste microrganismo. Quanto ao reparo de fotoprodutos, caracterizamos pela primeira vez o operon *CCNA_02417/CCNA_02418*, demonstrando que estes genes são importantes para proteção contra os efeitos citotóxicos da luz UV-C, sendo que *CCNA_02418* possui um papel adicional de prevenção da mutagênese induzida por este agente. Dados preliminares de detecção imunológica mostram que estes genes estão envolvidos no reparo de fotoprodutos tipo CPDs.

Palavras-chave: *Caulobacter crescentus*. Sistema GO. SP liase. Superfamília radical SAM. Uracila-DNA glicosilase.

ABSTRACT

FERNÁNDEZ SILVA, F. S. Characterization of repair systems for oxidative lesions and photoproducts of *Caulobacter crescentus*. 2019. 128 p. Ph. D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Preservation of genetic information from one generation to another requires that the DNA sequence of the cell's genome be maintained unchanged. However, the integrity of the DNA sequence is under constant threat of oxidative damage such as reactive oxygen species (ROS), one of the most common among these lesions is 8-oxoguanine (8-oxodG), which has a very high mutagenic potential. Another source of DNA damage is UV radiation that induces lesions such as cyclobutane-pyrimidine dimers (CPD) and 6-4-pyrimidine-pyrimidone (6-4 PP) photoproducts that impair vital processes such as DNA replication and transcription. In this work, we studied systems of repair of these types of lesions in the model organism *Caulobacter crescentus*. The bacterial GO system is dedicated to avoid the mutagenic effects of 8-oxoG, consisting of three enzymes, MutM (Fpg) and MutY (DNA-glycosylases) that remove the 8-oxoG and mismatched adenine, respectively, and MutT that hydrolyzes 8-oxodGTP from the nucleotide pool. Photoproducts are repaired by two main pathways, nucleotide excision repair (NER) that removes and replaces damaged nucleotides, and the mechanism of direct reversal repair mediated by DNA photolyases. Interestingly, in bacterial spores, another enzyme is found, the spore photoproduct lyase (SP lyase), which performs the direct reversion of a specific photoproduct of spores (SP) in a light-independent manner. SP lyase belongs to the radical superfamily of S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzymes. The *C. crescentus* CCNA_02417 gene encodes a protein from this superfamily and is part of an operon with the CCNA_02418 gene encoding a two domain proteins; a DUF4130 domain and another with similarity to uracil-DNA glycosylases. The results show that the lack of GO system glycosylases confers a mild mutator phenotype to *C. crescentus* when compared to *Escherichia coli*, and the low spontaneous mutagenesis is not due to the participation of other repair pathways in the absence of the GO system. Two genes encoding Endo III homologs are present in the genome of *C. crescentus*, but do not cooperate with the GO system for the repair of 8-oxoG. Oxidative stress by methylene blue promotes high levels of mutagenesis in *mutM*

mutY cells, but these genes are not regulated in response to oxidative damage. We identified two factors that may contribute to the lower importance of the *C. crescentus* GO system in preventing mutagenesis: lower basal levels of 8-oxoG in DNA, and an effect of the lower optimal growth temperature of this microorganism. Regarding the repair of photoproducts, we characterized for the first time the operon *CCNA_02417/CCNA_02418*, demonstrating that these genes are important for protection against the cytotoxic effects of UV-C light. Additionally, *CCNA_02418* has a role in preventing mutagenesis induced by this agent. Preliminary immunological detection data show that these genes are involved in the repair of CPDs photoproducts.

Keywords: *Caulobacter crescentus*. GO system. SP lyase. Radical SAM superfamily. Uracil-DNA glycosylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da oxidação de guanina para 8-oxoguanina. --	22
Figura 2 – Representação esquemática da geração de oxigênio singlete. -----	23
Figura 3 – Desaminação da citosina. -----	27
Figura 4 – Representação esquemática da via de excisão de bases em <i>E.coli</i> . -----	28
Figura 5 – A 8-oxoG forma um par de bases com a citosina, assim como com a adenina. -----	33
Figura 6 – Representação esquemática do sistema de reparo GO. -----	34
Figura 7 – Representação esquemática do papel da proteína MutT e das consequências de incorporação de 8-oxoG durante a síntese do DNA. -----	35
Figura 8 – Representação esquemática da via de excisão de nucleotídeos em <i>E. coli</i> .	37
Figura 9 – Representação esquemática do reparo de bases mal emparelhadas (MMR) em <i>E. coli</i> . -----	40
Figura 10 – Reação de clivagem redutiva de SAM.-----	45
Figura 11 – Mecanismo de reparo de SP liase. -----	46
Figura 12 – Alinhamento da estrutura secundária da proteína CCNA_02417 com a SP liase de <i>B. subtilis</i> . -----	49
Figura 13 – Operon <i>CCNA_02417/CCNA_02418</i> . -----	50
Figura 14 – Esquema hipotético do sistema de reparo de fotoprodutos por <i>CCNA_02417/CCNA_02418</i> . -----	51
Figura 15 – Efeito da deficiência de <i>mutM mutY</i> nas taxas de mutação espontânea em <i>E.</i> <i>coli</i> e <i>C. crescentus</i> .-----	79
Figura 16 – Sensibilidade ao peróxido de hidrogênio dos mutantes <i>nth</i> . -----	80
Figura 17 – Curva de crescimento dos mutantes <i>nth</i> . -----	81
Figura 18 – Análise da curva de crescimento do triplo mutante <i>mutY mutM</i> <i>CCNA_02355</i> . -----	82
Figura 19 – Taxas de mutação espontânea de mutantes em vários genes de reparo de DNA de <i>C. crescentus</i> . -----	83
Figura 20 – Mutagênese induzida pelo tratamento com azul de metileno e luz visível (AM). -----	85

Figura 21 – Variação nos níveis do mRNA de <i>mutM</i> e <i>mutY</i> após tratamento com azul de metileno e luz visível.-----	86
Figura 22 – Determinação dos níveis de 8-oxoguanina no DNA de <i>E. coli</i> e <i>C. crescentus</i> em crescimento exponencial.-----	87
Figura 23 – Sobrevivência das cepas NA1000, <i>CCNA_02417</i> e <i>CCNA_02418</i> frente à irradiação com luz UV-C.-----	89
Figura 24 – Sobrevivência das cepas <i>uvrA</i> , <i>uvrA CCNA_02417</i> e <i>uvrA CCNA_02418</i> frente à irradiação com luz UV-C.-----	90
Figura 25 – Indução de mutagênese por luz UV-C.-----	91
Figura 26 – Modelo ilustrativo da consequência da falta da atividade de <i>CCNA_02418</i> para a mutagênese induzida por luz UV-C. -----	92
Figura 27 – Indução de mutagênese por luz UV-C na linhagem deficiente de TLS.---	94
Figura 28 – Modelo ilustrativo mostrando as contribuições de TLS e de <i>CCNA_02417</i> para a mutagênese induzida por luz UV-C. -----	95
Figura 29 – Representação esquemática das construções plasmidiais para complementação dos mutantes <i>CCNA_02417</i> e <i>CCNA_02418</i> . -----	97
Figura 30 – Complementação dos mutantes <i>CCNA_02417</i> e <i>CCNA_02418</i> . -----	98
Figura 31 – Detecção imunológica das lesões CPDs presentes no DNA de linhagens de <i>C. crescentus</i> irradiadas com luz UV-C.-----	99
Figura 32 – Quantificação da capacidade de reparo das lesões CPDs.-----	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes pertencentes à via de reparo de excisão de bases (BER) em <i>Caulobacter crescentus</i> . -----	29
Tabela 2 – Linhagens de <i>Caulobacter crescentus</i> utilizadas neste trabalho. -----	55
Tabela 3 – Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas neste trabalho. -----	57
Tabela 4 – Plasmídeos utilizados neste trabalho. -----	58
Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.-----	60
Tabela 6 – Primers utilizados para experimentos de qRT-PCR.-----	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

5'-dA – radical 5'-desoxi-adenosina

6,4PP – 6,4 pirimidina pirimidona fotoproducto

8-HDF – 8-hidroxi-5-deazariboflavina

8-oxoG – 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoguanina)

8-oxodGuo – 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

8-oxodGTP – 8-oxoguanosina tri-fosfato

8-oxodGMP – 8-oxoguanosina mono-fosfato

A, C, G, T – adenina, citosina, guanina, timina

AM – azul de metileno

Ap^R – ampicilina resistente

AP – sítio apurínico ou apirimidinico

ATP – adenosina trifosfato

BER – reparo por excisão de bases

C8-OH – aduto de guanina radical

cDNA – DNA complementar

CPD – dímero de pirimidina ciclobutano

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO₆₀₀ – densidade óptica a 600 nanômetros

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

Fapy-G – 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina

Fpg – Formamidapirimidina

g – grama

GO – sistema de reparo de 8-oxoG

GTP – guanosina trifosfato

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
J/m² – Joules por metro quadrado
Km^R – canamicina resistente
L – litro
LB – Lúria-Bertani
M – molar
MilliQ – água deionizada
mg – miligrama
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – micromolar
MMC – mitomicina C
MMR – *Mismatch repair* (reparo de bases mal emparelhadas)
MMS – metilmetanosulfonado
MTHF – meteniltetrahidrofolato
NER – reparo por excisão de nucleotídeos
nm – nanômetro
OGG1 – 8-oxoguanina DNA glicosilase
pb – pares de bases
PBS – tampão fosfato salino
PCR – reação em cadeia da polimerase
Pfu – unidades formadoras de placas de lises
pH – Potencial Hidrogeniônico
Pol – polimerase
Pol II – polimerase II
Pol III – polimerase III
Pol IV – polimerase IV
Pol V – polimerase V
PYE – meio de peptona e extrato de levedura para *C. crescentus*
qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa
Rif^R – Rifampicina resistentes

RNA – ácido ribonucleico
ROS – espécies reativas de oxigênio
SASPs – pequenas proteínas solúveis em ácidos
SAM – S-adenosil-L-metionina
SP – fotoproduto de esporos
SPL – liase de fotoprodutos de esporos
Spec^R – espectinomicina resistente
ssDNA – Fita-simples de DNA
TBE – tampão tris/borato/EDTA
Tet^R – tetraciclina resistente
Tg – timina glicol
TLS – síntese translesão
UDG – uracil-DNA-glicosilase
UFC – unidade formadora de colônia
UV – radiação ultravioleta
UV-A – radiação ultravioleta A
UV-B – radiação ultravioleta B
UV-C – radiação ultravioleta C
x g – força centrífuga aplicada
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.-----	19
1.1. <i>Caulobacter crescentus</i> .-----	19
1.2. Danos oxidativos no DNA do tipo 8-oxoguanina.-----	20
1.3. Danos no DNA por radiação ultravioleta (UV).-----	24
1.4. Desaminação de citosina e geração de uracilas no DNA.-----	26
1.5. Sistemas de reparo de DNA.-----	27
1.5.1. Reparo por Excisão de Bases.-----	27
1.5.2. Sistema de reparo GO.-----	32
1.5.3. Reparo por Excisão de Nucleotídeos.-----	36
1.5.4. Reparo de bases mal emparelhadas (Mismatch repair-MMR).-----	38
1.5.5. Reparo de reversão direta por DNA fotoliasas.-----	41
1.5.6. Reparo de reversão direta pela liase de fotoproduto de esporos (SP liase).-----	42
1.5.7. A resposta SOS.-----	47
1.5.8. Síntese translesão (TLS).-----	51
2. OBJETIVOS.-----	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.-----	54
3.1. Linhagens Bacterianas e condições de cultivo e manutenção.-----	54
3.2. Manutenção e cultivo de cepas de <i>C. crescentus</i> .-----	54
3.3. Manutenção e cultivo de cepas de <i>E. coli</i> .-----	54
3.4. Plasmídeos.-----	58
3.5. Oligonucleotídeos.-----	59
3.6. Técnicas de biologia molecular utilizadas em clonagem.-----	61
3.6.1. Extração de DNA cromossômico de <i>C. crescentus</i> .-----	61
3.6.2. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).-----	62
3.6.3. Reações de clonagem.-----	62
3.6.4. Preparação de DNA plasmidial.-----	63
3.6.5. Eletroforese em gel de agarose.-----	63

3.6.6. Reação para sequenciamento de DNA. -----	63
3.7. Obtenção de bactérias competentes. -----	64
3.7.1. Quimiocompetentes:-----	64
3.7.2. Eletrocompetentes:-----	65
3.8. Transformação de células de <i>E. coli</i> competentes por choque térmico. -----	65
3.9. Transformação de células competentes de <i>C. crescentus</i> por eletroporação. -----	66
3.10. Conjugação.-----	66
3.11. Construção de cepas mutantes.-----	67
3.11.1. Construção das cepas mutantes <i>mutY</i> e <i>CCNA_02417</i> pelo método de deleção em fase.-----	67
3.11.2. Construção da cepa mutante <i>CCNA_02418</i> pela interrupção da região codificantes pelo de cassete de resistência a espectinomicina. -----	68
3.11.3. Construção de cepas bacterianas por transdução com o bacteriófago Φ Cr30. --	69
3.11.4. Clonagem dos genes <i>CCNA_02417</i> e <i>CCNA_02418</i> para experimentos de complementação.-----	70
3.12. Teste flutuação para determinação de mutagênese espontânea.-----	71
3.13. Ensaio de sobrevivência e de indução da mutagênese com o azul de metileno (AM).-----	72
3.14. Experimentos para determinação da curva de crescimento. -----	73
3.15. Ensaio de sensibilidade a peróxido de hidrogênio. -----	73
3.16. Análise de expressão gênica. -----	73
3.17. Medição dos níveis 8-oxoguanina no DNA. -----	74
3.18. Ensaio de sobrevivência à luz UV-C.-----	75
3.19. Ensaio de mutagênese induzida por luz UV-C. -----	75
3.20. Ensaio de imuno slot-blot para determinação de lesões por luz UV-C. -----	76
4. RESULTADOS. -----	77
4.1. Estudo do reparo de 8-oxoguanina em <i>C. crescentus</i> .-----	77
4.1.1. A falta de <i>mutM</i> e <i>mutY</i> confere um fenótipo mutador leve a <i>C. crescentus</i> . ---	77

4.1.2. A baixa mutagênese espontânea na ausência dos genes <i>mutM</i> e <i>mutY</i> não se deve à interação com outras vias de reparo de DNA. -----	79
4.1.3. O estresse oxidativo promove altos níveis de mutagênese no mutante duplo <i>mutM mutY</i> .-----	84
4.1.4. Os genes <i>mutM mutY</i> não são regulados em resposta a danos oxidativos.-----	86
4.1.5. <i>C. crescentus</i> tem menores níveis basais de 8-oxodGuo no DNA do que <i>E. coli</i> na fase exponencial. -----	87
4.2. Caracterização funcional do envolvimento do operon CCNA_02417/CCNA_02418 no reparo de fotoprodutos. -----	88
4.2.1. Análises fenotípicas das linhagens deficientes dos genes CCNA_02417 e CCNA_02418 irradiadas com doses crescentes de UV-C. -----	88
4.2.2. A deleção dos genes CCNA_02417 e CCNA_02418 no background <i>uvrA</i> causa um fenótipo de sensibilidade severa à radiação UV-C. -----	89
4.2.3. Mutagênese induzida por UV-C está aumentada no mutante CCNA_02418. ---	91
4.2.4. Mutagênese induzida por UV-C na ausência de síntese translesão (TLS). -----	93
4.2.5. Complementação dos mutantes CCNA_02417, CCNA_02418. -----	96
4.2.6. Medidas da capacidade de reparação de fotoprodutos por imuno Slot- Blot ----	98
5. DISCUSSÃO. -----	100
5.1. Estudo do reparo de 8-oxoguanina em <i>C. crescentus</i> .-----	100
5.2. Caracterização funcional do envolvimento do operon CCNA_02417/CCNA_02418 no reparo de fotoprodutos. -----	103
6. CONCLUSÕES. -----	107
6.1. Estudo do reparo de 8-oxoguanina em <i>C. crescentus</i> .-----	107
6.2. Caracterização funcional do envolvimento do operon CCNA_02417/CCNA_02418 no reparo de fotoprodutos. -----	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	109

1. INTRODUÇÃO.

A preservação da informação genética de uma geração para outra exige que a sequência de DNA do genoma da célula seja mantida sem alteração. No entanto, a integridade da sequência de DNA está sob constante ameaça de danos por erros nos processos celulares normais, como a replicação do DNA, além da sua interação com metabolitos reativos e agentes ambientais. O dano do DNA por tais agentes pode resultar em mudanças na sequência de bases ou mesmo na estrutura cromossômica, potencialmente deletérias, porém também gera variabilidade que serve de matéria prima para a seleção natural e evolução. Apesar dos mecanismos sofisticados que evoluíram para garantir a precisão da replicação do DNA, erros podem acontecer, sendo outra causa de mudanças genéticas. Se os erros permanecem não corrigidos, as mudanças no DNA são propagadas como mutações. Se ocorrerem danos no decurso da replicação do DNA, os cromossomos podem ser quebrados ou replicados de forma incompleta e não conseguem segregar adequadamente durante a divisão celular. Os efeitos deletérios de erros de replicação e de danos no DNA são bastante reduzidos por processos especializados de reparo de DNA. Existem muitas vias para a detecção e reparação do DNA danificado. Um aspecto interessante e ainda pouco explorado na literatura é que os organismos com genomas com alto conteúdo de G+C, como *Caulobacter crescentus*, supostamente tem uma maior chance de danos nestes resíduos, como danos oxidativos na guanina (como a 8-oxodG) e de desaminação da citosina (à uracila).

1.1. *Caulobacter crescentus*.

C. crescentus é uma alfa-proteobactéria (gram-negativa), com um conteúdo de G+C de 67,2% (SCOTT et al., 2018), presente em ambientes aquáticos oligotróficos. Este organismo apresenta um ciclo celular muito bem caracterizado, a sua característica mais marcante é uma divisão celular assimétrica, dando origem a dois tipos celulares com morfologias distintas (MARKS et al., 2010). O primeiro é o planctônico (célula de dispersão), que contém um único flagelo e pili múltiplos num polo da célula. O segundo é sésil (célula pedunculada) e frequentemente associado à superfície, onde o flagelo polar

foi substituído com uma extensão fina do envelope celular conhecido como pedúnculo. A haste é inclinada com uma organela adesiva chamada "*holdfast*" (CURTIS; BRUN, 2010; COLLIER, 2012). As células flageladas desempenham papel na dispersão, uma vez que não são capazes de se dividir ou replicar seu DNA, e as células pedunculadas desempenham um papel na reprodução (SKERKER; LAUB, 2004). Este microrganismo é considerado um excelente modelo para o estudo dos mecanismos de divisão e diferenciação celular. Nosso grupo vem usando *C. crescentus* como um modelo alternativo para estudos de mutagênese e mecanismos de reparo de DNA, dada a facilidade de cultivo e disponibilidade de ferramentas para análise genética. Além disso, esta bactéria apresenta várias diferenças que podem ser relevantes para uma melhor compreensão dos mecanismos de reparo em procariotos. Foi demonstrado que esta bactéria apresenta várias respostas fisiológicas características do sistema SOS quando irradiada com luz UV, incluindo o aumento da mutagênese, e foram identificados os genes responsáveis pela mutagênese SOS (GALHARDO et al., 2005), quando se caracterizou pela primeira vez o operon *imuA imuB imuC* (*dnaE2*) que está presente em diversas espécies bacterianas (ERILL et al., 2006). Posteriormente, outros genes de reparo ainda não caracterizados que formam parte do regulon SOS foram estudados por nosso grupo (DA ROCHA et al., 2008; LOPES-KULISHEV et al., 2015). Este trabalho visou caracterizar alguns genes envolvidos no reparo de DNA ainda pobremente explorados em *C. crescentus*.

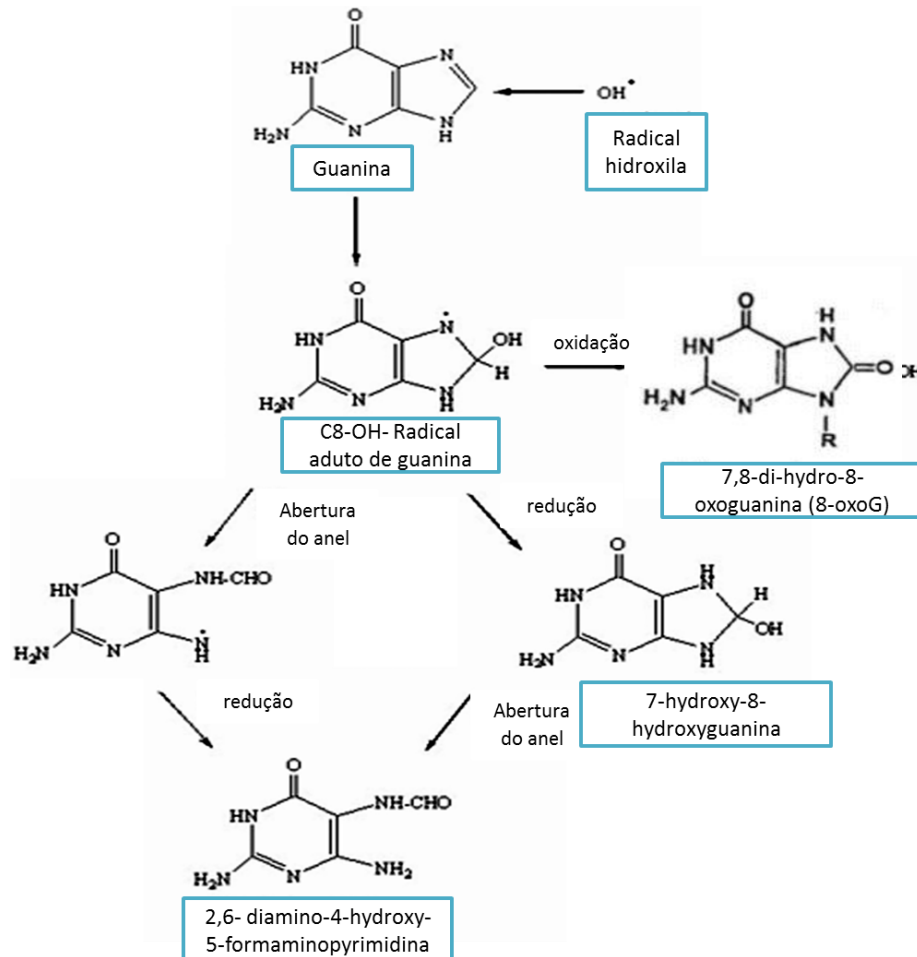
1.2. Danos oxidativos no DNA do tipo 8-oxoguanina.

Danos oxidativos induzidos ao DNA são causados quando o oxigênio e derivados como os radicais livres e outros agentes oxidantes reagem com os componentes do DNA. O dano oxidativo ao DNA inclui quebras de cadeia simples e de cadeia dupla do DNA, modificações de bases, sítios abásicos e ligações cruzadas de DNA-proteína. As espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila altamente destrutivo (OH^{\cdot}) podem ser produzidos por redução incompleta do oxigênio durante o metabolismo aeróbico (HALLIWELL, 2007; CADET; DOUKI; RAVANAT, 2008). O radical hidroxila é a principal espécie de oxigênio ativo que ataca as bases e resíduos de desoxirriboses no DNA e nucleotídeos livres. ROS podem

também oxidar lipídeos ou moléculas de proteínas para gerar intermediários que reagem com o DNA para formar adutos (LU et al., 2001).

O ataque de ROS ao DNA pode conduzir à geração de mais de 20 adutos de bases oxidadas, sendo a mais proeminente 7,8-di-hidro-8-oxoguanina, também denominada 8-hidroxi-guanina ou 8-oxoguanina (8-oxoG) (CADET et al., 2017). Devido ao seu baixo potencial de oxidação em relação às outras três bases do DNA, a guanina é a mais prontamente oxidada (NEELEY; ESSIGMANN, 2006). O ataque ao C8 da guanina leva à formação de um aduto de guanina C8-OH radical, que pode sofrer três reações: (1) abertura do anel e subsequente redução, conduzindo à formação de 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG); (2) redução para formar 7-hidro-8-hidroxi-guanina que, após a abertura do anel, leva à FapyG e (3) oxidação da guanina C8-OH para formar 8-oxoG (LOVELL; MARKESBERY, 2007) (Figura 1). Isto resulta do fato da guanina ter uma estrutura de purina rica em elétrons, o que lhe permite reagir com radicais facilmente. Além disso, guanina também atua como um "hot spot" para a migração de elétrons. Vários estudos têm mostrado que o 5'-G das sequências GG ou GGG (LEE et al., 2008) é significativamente mais fácil de ser oxidado do que guaninas isoladas, e por isso a transferência de elétrons em resíduos de guanina ao longo de DNA contribui para um maior dano oxidativo (KIM et al., 2004).

Figura 1 – Representação esquemática da oxidação de guanina para 8-oxoguanina.

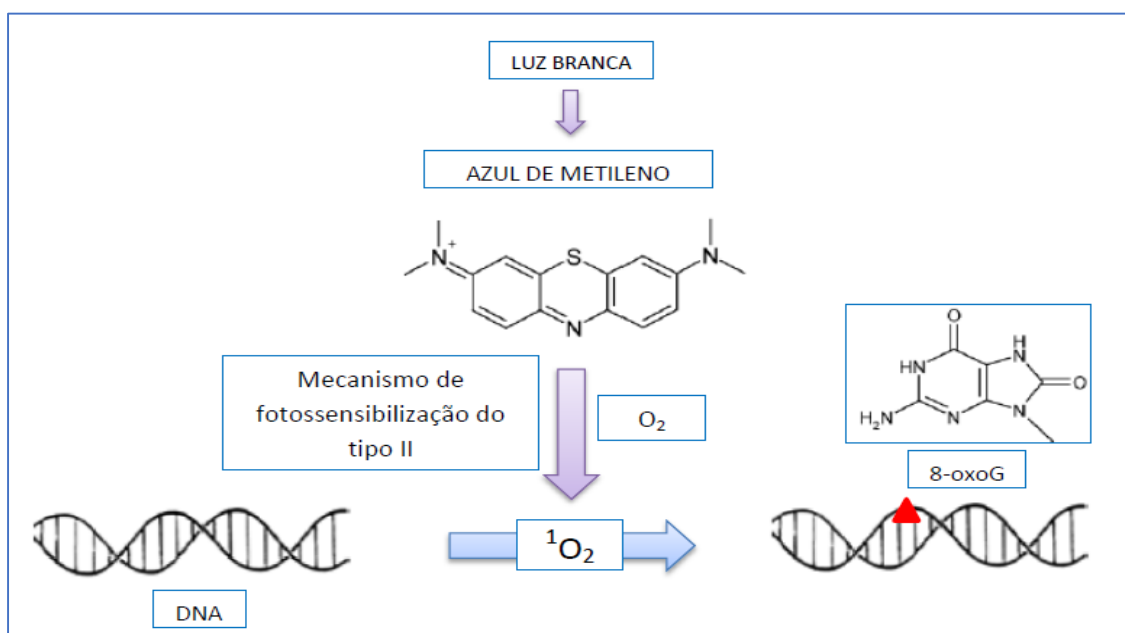


Radicais hidroxila originados após estresse oxidativo celular podem reagir com o carbono 8 da guanina e resultar em um radical de guanina C8-OH, que pode ser oxidado a 8-oxoguanina. Fonte: modificado de (LOVELL; MARKESBERY, 2007)

O oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são continuamente gerados por organismos aeróbicos, e reagem continuamente com as suas biomoléculas (MENCK et al., 1993). Em quantidades excessivas, o oxigênio singlete induz estresse oxidativo e mostra efeitos carcinogênicos e tóxicos devido à oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (AGNEZ-LIMA et al., 2012). Também foi identificado como uma ROS envolvida em numerosos processos biológicos, e pode ser

gerado através de um mecanismo de fotossensibilização do tipo II (CADET et al., 2006). Entre outros processos biológicos o $^1\text{O}_2$ é produzido por neutrófilos na fagocitose e por muitos processos enzimáticos. Além disso, o $^1\text{O}_2$ é conhecido por ser mutagênico e genotóxico (PIETTE, 1991; RAVANAT; CADET, 1996). O azul de metileno (AM) é um fotossensibilizador e é bem conhecido como gerador $^1\text{O}_2$ pelo mecanismo de fotossensibilização do tipo II, após fotoativação com luz branca (Figura 2). $^1\text{O}_2$ oxida guanina, quase exclusivamente, gerando assim, lesões 8-oxoG. (BERRA et al., 2010; AGNEZ-LIMA et al., 2012).

Figura 2 – Representação esquemática da geração de oxigênio singlete.



A geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) por fotossensibilização (tipo II) do azul de metileno e oxidação do DNA por $^1\text{O}_2$ levando a formação de 8-oxoguanina.

A 8-oxoG é potencialmente mutagênica devido à sua capacidade de se emparelhar tanto com a base cognata citosina, quanto com a base não cognata adenina (SHIBUTANI; TAKESHITA; GROLLMAN, 1991). A lesão 8-oxoG é caracterizada como pré-mutagênica e não letal, considerando que estes danos não bloqueiam a progressão das DNA polimerases, e também não resultam em severas distorções estruturais na dupla hélice do DNA (WALLACE, 2002).

As células têm múltiplas linhas de defesa contra danos oxidativos ao DNA, a linha primária de defesa protege contra as próprias espécies ativas de oxigênio oxidantes que podem ser eliminadas pelos sistemas enzimáticos e não enzimáticos, tais como superóxido dismutase, catalase, ácido ascórbico e betacaroteno. Além disso, outras linhas de defesa são formadas por sistemas de reparo de DNA (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; BIRBEN et al., 2012).

Bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e *C. crescentus* são organismos com alto conteúdo de G+C no genoma (COLE et al., 1998; STOVER et al., 2000; NIERMAN et al., 2001), sendo supostamente mais susceptíveis a danos oxidativos do tipo 8-oxoG, e por isso o reparo desta lesão deve ser crucial para estas bactérias.

1.3. Danos no DNA por radiação ultravioleta (UV).

A luz solar é uma fonte de danos ao DNA muito importante para todos os seres vivos, principalmente por causa dos comprimentos de onda correspondentes à luz ultravioleta (UV). O espectro de radiação UV foi subdividido por comprimento de onda em três segmentos designados UV-A (320 a 400 nm), UV-B (295 a 320 nm) e UV-C (100 a 295 nm). A radiação UV solar consiste principalmente de UV-A e UV-B, uma vez que a penetração da camada atmosférica de ozônio cai drasticamente para comprimentos de onda abaixo de 300 nm. A maioria dos estudos laboratoriais envolvem luz UV-C de lâmpadas germicidas, com um máximo de emissão a 254 nm. Isto é próximo ao pico de absorção do DNA a 260 nm, e não é eficientemente absorvido pelas proteínas. Conseqüentemente, em contraste com outros agentes genotóxicos, o dano UV-C é relativamente específico para o DNA (KULUNCSICS et al., 1999; MCKENZIE et al., 2007).

Todo organismo que é exposto à luz solar deve ter mecanismos para reparar os danos decorrentes no DNA. A estrutura do anel conjugado das bases no DNA faz com que absorvam fortemente a luz nos comprimentos de onda UV. Os fótons absorvidos energizam as bases, fazendo com que suas ligações duplas reajam com outros átomos

próximos e, portanto, formem ligações químicas adicionais. Essas ligações químicas resultam em ligações anormais entre as bases do DNA, ou entre as bases e os açúcares dos nucleotídeos. Um tipo comum de dano de irradiação UV é o dímero de pirimidina, no qual os anéis de duas pirimidinas adjacentes tornam-se covalentemente ligados. Em um dos dois dímeros possíveis, os átomos de carbono nas posições 5 e 6 de duas pirimidinas adjacentes são unidos para formar um anel de ciclobutano, que constituem 80 a 90% dos fotoprodutos. No outro tipo de dímero, o carbono na posição 6 de uma pirimidina é unido ao carbono na posição 4 de uma pirimidina adjacente para formar lesões tipo 6-4 pirimidina-pirimidona fotoprodutos, que representam 10 a 20% das lesões causadas por UV (MITCHELL; KARENTZ, 1993; SINHA; HÄDER, 2002).

Os dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD, do inglês *cyclobutane pyrimidine dimers*), são os fotoprodutos mais frequentes de ligações covalentes entre pirimidinas adjacentes quando o DNA é exposto à radiação UV-C. Na forma B do DNA em dupla fita, os CPDs existem predominantemente na forma *cis-syn*. De todos os CPDs, os dímeros de timina-timina (T<>T) são os mais comuns, e os dímeros de citosina-citosina (C<>C) são os menos comuns; e os dímeros de uracila-timina (U<>T) e uracila-uracila (U<>U) como produtos secundários que resultam da desaminação de dímeros contendo citosina (FRIEDBERG et al., 2006) (ver seção 1.4 abaixo). Todos os dímeros possuem propriedades fotoquímicas semelhantes, porém não idênticas. Em bactérias com alto conteúdo de G+C como *Micrococcus luteus* é mais frequente encontrar CPDs do tipo T<>C e C<>T (50%) em relação aos outros tipos (SETLOW; CARRIER, 1966).

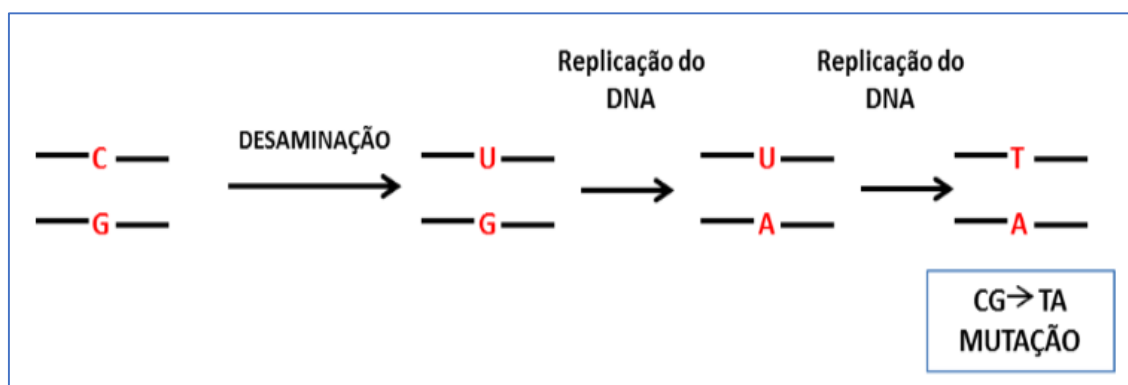
Os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona, (6-4 PPs) são formados pela ligação covalente entre a posição C-6 de uma pirimidina 5' e a posição C-4 da pirimidina 3' adjacente. Este tipo de lesão introduz uma distorção proeminente na estrutura dupla helicoidal do DNA porque os planos das pirimidinas dentro da lesão são quase perpendiculares (YOKOYAMA; MIZUTANI, 2014). No DNA irradiado com luz UV, o dímero TC (6-4 PP) é o dímero mais comum, mas também pode se encontrar os dímeros CC e TT com menos frequência, e mais raramente a formação de dímeros CT (BRASH; HASELTINE, 1982; GLICKMAN et al., 1986; PFEIFER et al., 1991).

Ambos fotoprodutos são capazes de prejudicar a replicação e transcrição do DNA, com efeito potencialmente citotóxico para as células, é por isso que as células tem mecanismos importantes de reparo para estas lesões como veremos nas seções 1.5.3, 1.5.5 e 1.5.6 abaixo.

1.4. Desaminação de citosina e geração de uracilas no DNA.

Um dos tipos mais comuns de danos ao DNA é a desaminação das bases. Alguns dos grupos amino em adenina, citosina e guanina são particularmente vulneráveis, e podem ser removidos espontaneamente ou por muitos agentes químicos. Quando a adenina é desaminada, torna-se hipoxantina, quando a guanina é desaminada, torna-se a xantina e quando a citosina é desaminada, torna-se uracila. A desaminação de bases de DNA é mutagênica porque resulta em emparelhamentos errôneos de base (JACOBS; SCHÄR, 2012). Assim, a hipoxantina se emparelha com citosina durante a replicação, incorporando C em vez de T naquela posição. Em uma replicação subsequente, a C se emparelha corretamente com a G, causando uma transição AT→GC no DNA. Da mesma forma, uma uracila resultante da desaminação da citosina se emparelha com adenina durante a replicação, causando um tipo de mutação de transição GC→AT (Figura 3) (SETLOW; CARRIER, 1966). Em fotoprodutos tais como os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs), a desaminação de citosinas é favorecida, ocorrendo muito mais frequentemente do que em citosinas não dimerizadas (BARAK; COHEN-FIX; LIVNEH, 1995).

Figura 3 – Desaminação da citosina.



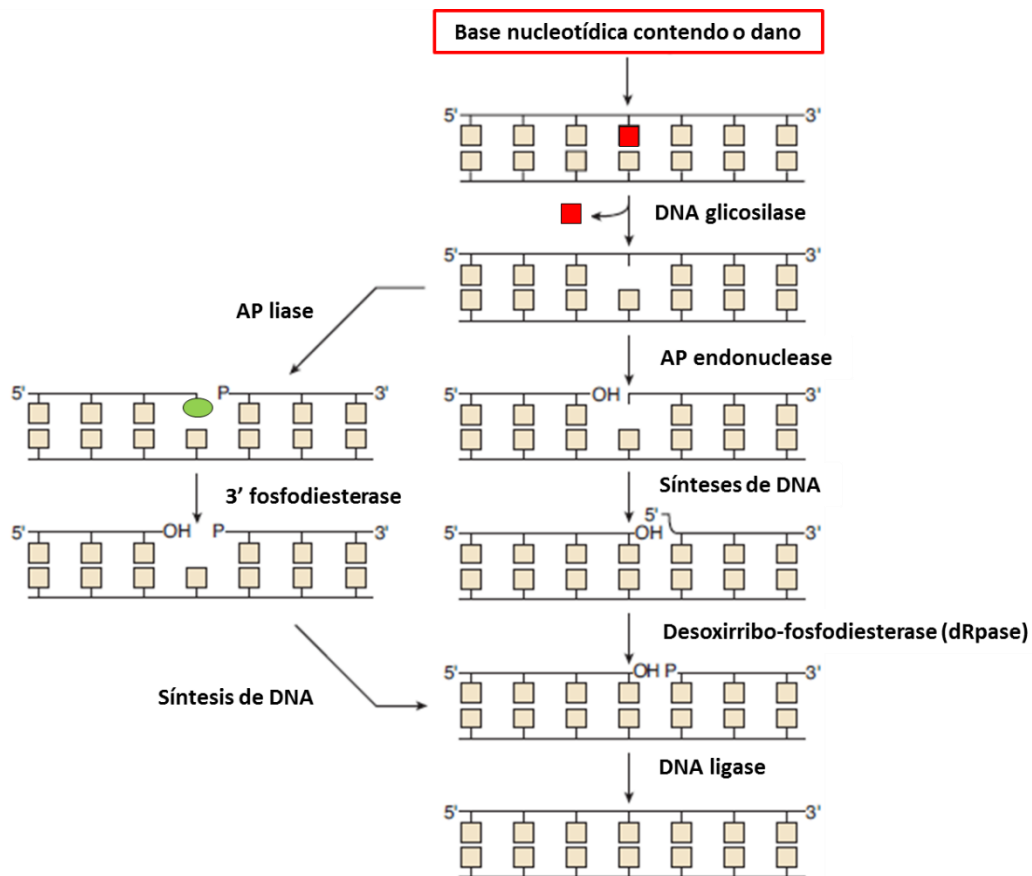
1.5. Sistemas de reparo de DNA.

1.5.1. Reparo por Excisão de Bases.

O reparo por excisão de bases (BER) é provavelmente a via de reparo mais frequentemente utilizada na natureza, considerando que modificações de bases nucleotídicas ocorrem frequentemente no genoma das células (ZHARKOV, 2008). Apesar de existirem diferentes vias de BER, todas contam com cinco passos (Figura 4): (1) reconhecimento e remoção, por DNA glicosilases, que são enzimas altamente específicas que clivam a ligação N-glicosídica entre a base danificada e a 2-desoxirribose do nucleotídeo de uma base incorreta ou danificada, gerando um sítio abásico intermediário (JACOBS; SCHÄR, 2012); (2) incisão do sítio abásico (AP= sítio apurínico/apirimidínico) por uma AP endonuclease, que hidrolisa a ligação fosfodiéster na porção 5' do sítio AP, originando uma extremidade 3'OH e outra 5'fosfato-desoxirribose (5'dRP) que é removida por enzimas DNA desoxirribo-fosfodiesterase (dRpses) (BARAJAS-ORNELAS et al., 2014). As glicosilases com atividade AP liase incisam o sítio AP no DNA por uma reação de β -eliminação que resulta em resíduos desoxinucleosídeo-5'-fosfato 5'-terminal e aldeídos 3'-terminal $\alpha\beta$ -insaturados. O terminal 3'-fosfato e os aldeídos insaturados são processados pela enzima 3' fosfodiesterase (SOWLATI-HASHJIN; WETMORE, 2015); (3) a remoção do fragmento de açúcar por uma liase ou fosfodiesterase; (4) preenchimento do gap por uma DNA

polimerase I; (5) ligação por uma DNA ligase I (KIM; WILSON III, 2012). Há duas vias principais de BER: a longa (*long-patch*), onde de dois a dez nucleotídeos são substituídos, e a curta (*short-patch*), na qual apenas um nucleotídeo é excisado (HITOMI; IWAI; TAINER, 2007; JACOBS; SCHÄR, 2012).

Figura 4 – Representação esquemática da via de excisão de bases em *E.coli*.



As DNA glicosilases são responsáveis por iniciar a via BER. Estas enzimas reconhecem e removem bases nucleotídicas contendo danos, gerando um sítio AP. Enzimas AP endonucleases promovem a remoção destes sítios AP, gerando um resíduo 5' fosfato-desoxirribose, que são removidos pela enzima desoxirribo-fosfodiesterase (dRpase). As enzimas AP liases incisam o DNA e resultam em resíduos desoxinucleosídeo-5'-fosfato 5'-terminal e aldeídos 3'-terminal $\alpha\beta$ -insaturados, que são processados por 3' fosfodiesterases. A DNA polimerase sintetiza um novo nucleotídeo e a DNA ligase promove a ligação deste ao DNA original. Fonte: modificado de (WYATT et al., 1999)

E. coli apresenta oito tipos diferentes de DNA glicosilases codificadas em seu genoma, incluindo Ung, Mug, MutM (Fpg), MutY, Nth, TagA, AlkA e Nei (DEMPLE; HARRISON, 1994; FRIEDBERG et al., 2006). A Endonuclease III (*nth*) e a Endonuclease VIII (*nei*) são glicosilases /AP liases que atacam DNA danificado por agentes oxidantes. As lesões mutagênicas espontâneas são reparadas principalmente pela Endonuclease III (SAITO et al., 1997). Por outro lado, *C. crescentus*, possui quase todas as glicosilases descritas para *E. coli*, com exceção da Endonuclease VIII, codificada pelo gene *nei*; apesar disto, ela possui duas DNA glicosilases pertencente à superfamília Endo III (CCNA_02355 e CCNA_03847- Tabela 1). Curiosamente, CCNA_02355 é regulado pela resposta SOS, o que é incomum no que se refere à regulação de genes de BER (DA ROCHA et al., 2008). Desta forma, a expressão dessa glicosilase de *C. crescentus* é induzida por diversos estressores genotóxicos que são capazes de induzir a resposta SOS.

Tabela 1 – Genes pertencentes à via de reparo de excisão de bases (BER) em *Caulobacter crescentus*.

Gene de <i>E.coli</i>	Locus em <i>C. crescentus</i>	Nome	Características
<i>mutY</i>	(CCNA_00381)	Adenina glicosilase	Glicosilase monofuncional
<i>mutM</i> (<i>fpg</i>)	(CCNA_03822)	Formamidopirimidina DNA glicosilase	Glicosilase Bifuncional
<i>xhA</i>	(CCNA_03821) (CCNA_02090) (CCNA_02166)	Exodeoxirribonuclease III	AP endonuclease
<i>ung</i>	(CCNA_01394) (CCNA_02418) (CCNA_01618)	Uracil-DNA-glicosilase	Glicosilase Monofuncional
<i>nth</i>	<u>(CCNA_02355)</u> (CCNA_03847)	Endonuclease III	Glicosilase Bifuncional

<i>tagA</i>	(CCNA_00386)	3-Metiladenina DNA glicosilase I	Glicosilase Monofuncional
<i>alkA</i>	(CCNA_02284)	3-Metiladenina DNA glicosilase II	Glicosilase Monofuncional
<i>nei</i>	Ausente	Endonuclease VIII	Glicosilase Bifuncional

Fonte: modificado de (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007; DA ROCHA et al., 2008)

Dado que a desaminação de bases é potencialmente mutagênica, não é surpreendente que enzimas especiais tenham evoluído para remover bases desaminadas do DNA. O gene *ung/udg*, codifica a uracila-DNA-glicosilase monofuncional que é uma proteína altamente conservada encontrada em todos os organismos, como archaea, eubacteria, eucariontes e vírus grandes de DNA (herpes vírus, poxvirus) (SCHORMANN; RICCIARDI; CHATTOPADHYAY, 2014), e remove as uracilas do DNA que foram mal incorporadas durante a replicação ou decorrentes da desaminação de citocinas, evitando transições G:C→A:T. (PEARL, 2000).

Com base na especificidade do substrato, as UDGs são classificadas em seis famílias. A família I UDGs (também conhecidas como UNGs), como de *E. coli* e as proteínas UNG humanas, são as enzimas mais amplamente estudadas na superfamília UDG; UNGs são altamente específicas para a uracila e as removem de DNA de fita simples (ssDNA) e DNA de fita dupla (dsDNA) com a preferência ssU > U:G > U:A (BARRETT et al., 1998).

As UDGs da família II são exemplificadas pela uracila-DNA-glicosilase específica de mal emparelhamento (MUG) de *E.coli*, que remove a uracila de U:G mal emparelhada, mas exibem apenas uma fraca ou nenhuma atividade contra o par de bases U:A; e a timina- DNA-glicosilase (TDG) presente em eucariotos, que remove a timina de T:G mal emparelhada; ambas enzimas são específicas de mal emparelhamento em

dsDNA. Em altas concentrações enzimáticas, MUG pode também remover as timinas mal emparelhadas com a guanina (BARRETT et al., 1998; O'NEILL et al., 2003). Esta família também pode remover a base alquilada 3,N⁴-etenocitosine quando esta emparelhada com a guanina (PEARL, 2000).

As UDGs da família III (sMUGs) são encontradas somente em eucariotos superiores (KAVLI et al., 2002; WIBLEY et al., 2004). Embora tenha sido inicialmente identificada como seletiva para ssDNA, a enzima sMUG não usa apenas dsDNA como substrato, mas tem uma maior afinidade por substratos de dsDNA contendo uracila (WIBLEY et al., 2004). Curiosamente, além de remover uracila de U:G e U:A mal emparelhada, as enzimas sMUG também podem excisar 5-hidroximetiluracil, mas não 5-metiluracil (SCHORMANN; RICCIARDI; CHATTOPADHYAY, 2014).

As três famílias restantes de UDGs são tipicamente encontradas em eubactérias e archaea termofílicas e hipertermofílicas. Estas enzimas possuem quatro resíduos de cistina conservados que atuam como ligantes para quatro átomos de Fe num cluster cúbico de ferro-enxofre (4Fe-4S) (HOSEKI et al., 2003; KOSAKA et al., 2007). As enzimas UDG nestas famílias podem remover uracilas mal emparelhadas no dsDNA. As famílias IV e VI, mas não a família V, também podem excisar uracilas de substratos ssDNA (SCHORMANN; RICCIARDI; CHATTOPADHYAY, 2014). Os membros da família VI compartilham um domínio central α -helicoidal, que consiste em um motivo helix-hairpin-helix (HhH). Com um resíduo de aspartato (Asp) conservado no motivo HhH que é essencial para a atividade catalítica. A enzima é específica para mal emparelhamentos U:G e T:G. Além disso, a enzima também catalisa a excisão da 8-oxoguanina do dsDNA mal emparelhada com a adenina (A:GO) e timina (T:GO) (CHUNG et al., 2003; SCHORMANN; RICCIARDI; CHATTOPADHYAY, 2014).

Em bactérias com alto conteúdo de G+C, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium smegmatis* a abolição da atividade de UDG confere um fenótipo mutador aumentado (VENKATESH et al., 2003).

C. crescentus apresenta quatro genes (*CCNA_01394*, *CCNA_01618*, *CCNA_02166* e *CCNA_02418*) que codificam proteínas da família uracila-DNA-glicosilase (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007). Embora estas

enzimas não tenham uma similaridade de sequência significativa com a proteína UDG encontrada em *E. coli*, todas pertencem à família IV de UDGs (COG1573) anteriormente descrita em *Thermotoga marítima* (SANDIGURSKY; FRANKLIN, 1999).

Dois destes genes *CCNA_01394* e *CCNA_01618* são essenciais para a viabilidade de *C. crescentus* (CHRISTEN et al., 2011). O mutante *CCNA_02166* não apresenta uma diferença significativa da taxa de mutação comparada com a cepa parental NA1000 (MARTINS-PINHEIRO et al., 2017). Interessantemente, o gene *CCNA_02418* é regulado pela resposta SOS (DA ROCHA et al., 2008), o que é uma característica incomum para esta família de enzimas uracil-DNA-glicosilase. A presença de quatro diferentes glicosilases de uracila de DNA em *C. crescentus* poderia contribuir, pelo menos em parte, para os baixos níveis de transições espontâneas de C:G→T:A observadas entre mutações espontâneas em *rpoB* (MARTINS-PINHEIRO et al., 2017).

1.5.2. Sistema de reparo GO.

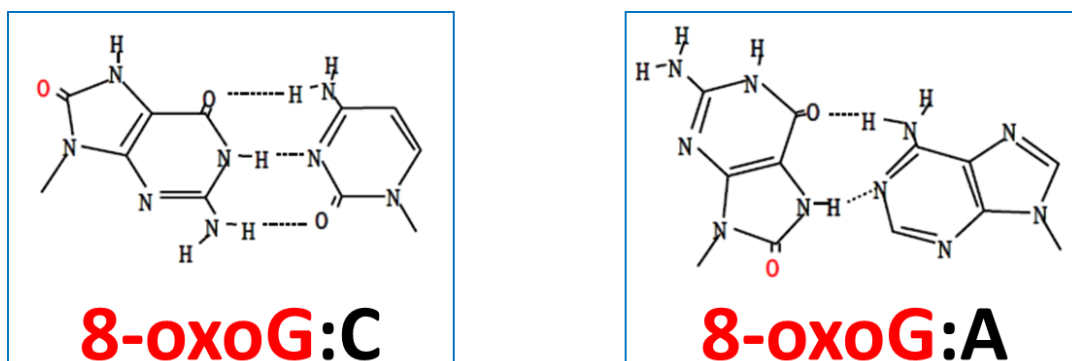
A reparação do DNA é um processo essencial em todos os organismos vivos. Existem vários sistemas genéticos que evitam ou reparam as lesões produzidas no DNA e assim mantêm a integridade do genoma. Os genes envolvidos no reparo de DNA são comumente conhecidos como genes mutadores porque a sua inativação conduz a um aumento da taxa de mutação ou fenótipo mutador.

O dano oxidativo pode levar à formação de lesões 8-oxoguanina (GO) no DNA. As enzimas de reparo de excisão de base Fpg (MutM) e MutY são guardiões cruciais de genomas bacterianos contra tais danos oxidativos (MICHAELS et al., 1992). Este sistema tem sido principalmente estudado em *E. coli*, e é conhecido por envolver pelo menos três genes: *mutM*, *mutY* e *mutT* (FOWLER et al., 2003).

Dependendo da conformação da 8-oxoG no DNA, como se mostra na Figura 5, a síntese de DNA pode levar à incorporação errada de adenina em frente à lesão GO (8-oxoG:A). Desta forma, 8-oxoguanina não reparada no DNA leva a transições G:C→T:A (CABRERA; NGHIEM; MILLER, 1988). A proteína MutM (Formamidopirimidina DNA glicosilase - Fpg/AP lyase) remove as lesões GO e FapyG

do DNA, e a subsequente reparação pela via de BER pode restaurar o emparelhamento original G:C (BOITEUX; COSTE; CASTAING, 2017).

Figura 5 – A 8-oxoG forma um par de bases com a citosina, assim como com a adenina.

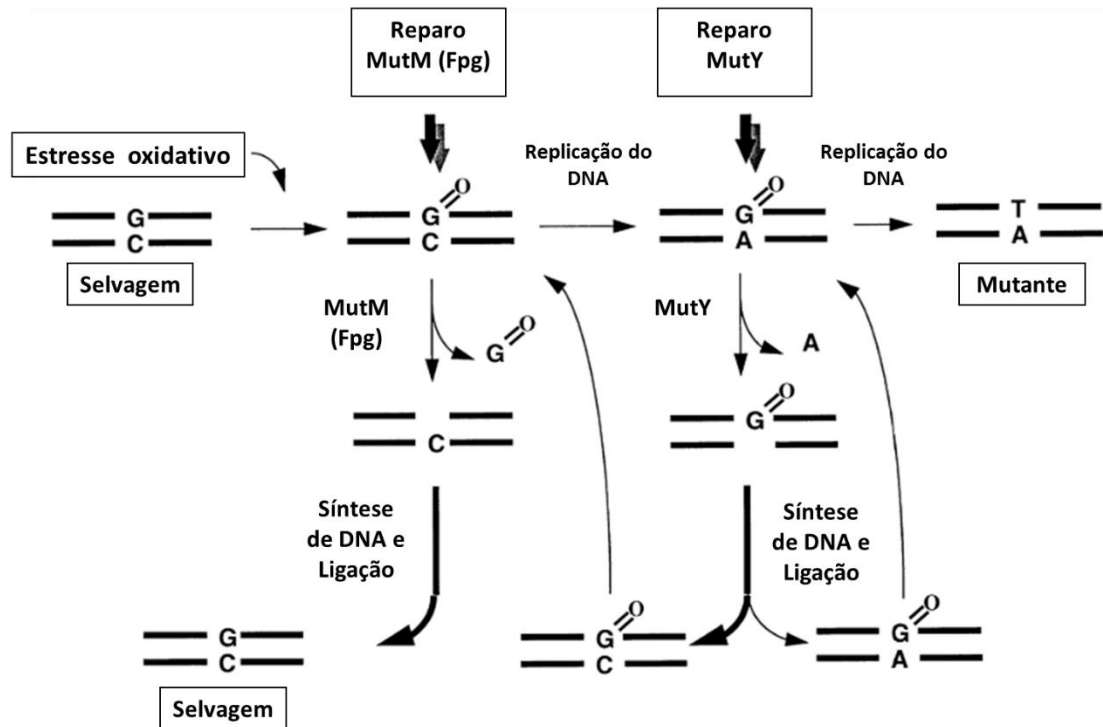


A 8-oxoG prefere a forma *syn* no DNA e pode emparelhar-se com adenina ou citosina com a mesma eficiência, enquanto a guanina no DNA toma principalmente uma forma *anti* e emparelha-se exclusivamente com citosina. Fonte: modificado de (NAKABEPPU, 2014).

A proteína MutY é uma adenina DNA glicosilase que remove a adenina erroneamente emparelhada com 8-oxoG (8-oxoG:A), resultante da replicação da lesão 8-oxoG (AU et al., 1989); gerando assim um sítio abásico que será preenchido pelo Reparo por Excisão de Bases (BER) (NGHIEM et al., 1988).

Em *E. coli*, uma linhagem com os genes que codificam *mutM* e *mutY* deletados apresenta frequências de mutação 1000 vezes maiores do que a cepa selvagem, enquanto, que o mutante *mutY* apresenta um aumento de 40 vezes e o mutante *mutM* de 20 vezes (NGHIEM et al., 1988; MICHAELS et al., 1992; FOWLER et al., 2003), demonstrando a grande importância do reparo de 8-oxoG. A Figura 6 apresenta um esquema da ação das proteínas MutM e MutY na prevenção dos efeitos genotóxicos de 8-oxoG.

Figura 6 – Representação esquemática do sistema de reparo GO.

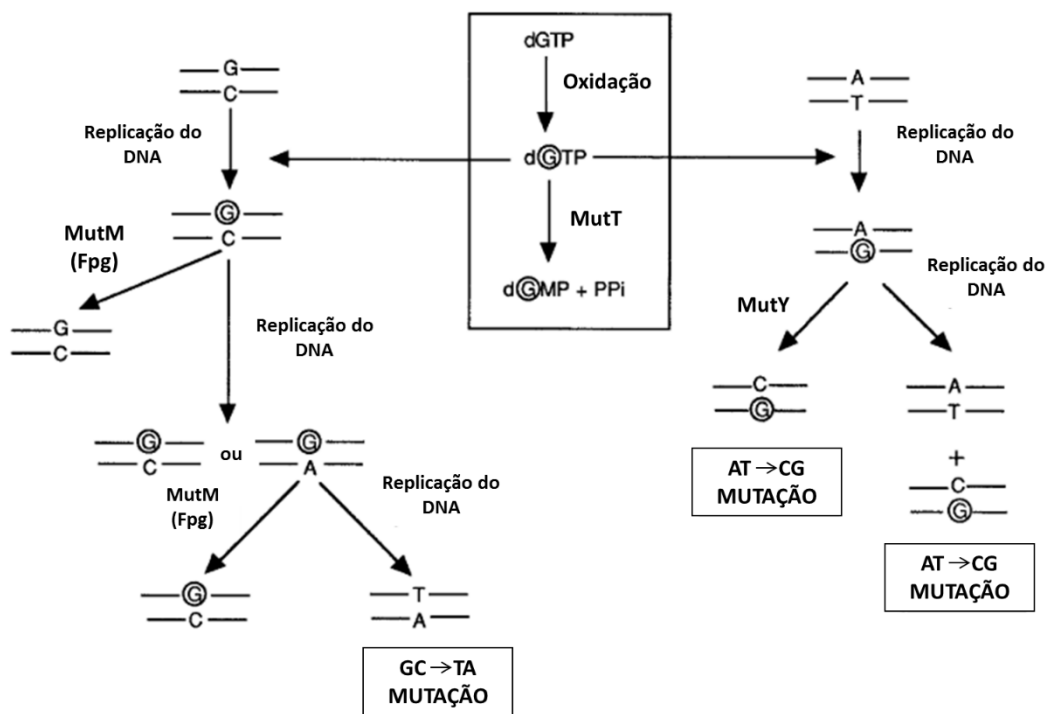


O estresse oxidativo pode resultar em danos do tipo 8-oxoG. A base oxidada 8-oxoG pode ser removida pela glicosilase MutM, e o reparo subsequente pela via BER pode restaurar o emparelhamento original G:C. Caso eventos de replicação ocorram antes do reparo por MutM, polimerases replicativas podem incorporar citosina ou adenina frente a 8-oxoG. A glicosilase MutY atua removendo a adenina emparelhada com 8-oxoG, gerando uma lacuna que é preenchida pela via BER. A síntese de nucleotídeos durante o reparo pode restaurar o emparelhamento 8-oxoG:C, que pode ser corrigido por MutM. Este reparo pode também resultar no emparelhamento 8-oxoG:A, o qual pode ser novamente alvo de MutY. Caso eventos de replicação ocorram antes do reparo por MutY, transversões GC→TA podem ser fixadas. Fonte: modificado de (BOITEUX; RADICELLA, 1999).

MutT é uma proteína que remove 8-oxoguanina formada no pool de dNTPs. MutT hidrolisa 8-oxodGTP a 8-oxodGMP e PP_i (Figura 7), e impede a sua utilização como um substrato por DNA polimerases (BHATNAGAR; BULLIONS; BESSMAN, 1991). Seu uso na replicação pode resultar na incorporação errada de 8-oxo-dGTP no molde oposto aos resíduos de adenina (A:8-oxodG). MutY poderia estar envolvido no processo de

mutação na ausência de *mutT* porque é ativo no substrato A:8-oxodG, e removeria a adenina molde, levando para as transversões A:T→C:G que são características de uma cepa *mutT* (MAKI; SEKIGUCHI, 1992; FOWLER; SCHAAPER, 1997). O 8-oxo-dGTP também poderia ser incorporado em oposição à citosina no molde, resultando em um par C:8-oxodG que poderia ser corrigido por MutM (BOITEUX; COSTE; CASTAING, 2017).

Figura 7 – Representação esquemática do papel da proteína MutT e das conseqüências de incorporação de 8-oxoG durante a síntese do DNA.



O pool de nucleotídeos também pode ser alvo de ROS, e dGTPs oxidados podem resultar em 8-oxodGTPs. O nucleotídeo trifosfatado oxidado pode ser hidrolisado por *mutT* a monofosfato (8-oxodGMP), ou pode ser incorporado frente à adenina. Na ausência de MutT, MutY pode atuar removendo a adenina emparelhada com 8-oxoG erroneamente incorporado durante a síntese de DNA, e favorecer a fixação da mutação A:T→C:G. Eventos de replicação podem ocorrer antes do reparo por MutY, o que também favorece mutações A:T→C:G. Fonte: modificado de (FOWLER; SCHAAPER, 1997).

Ao contrário dos estudos anteriores em *E. coli* (MICHAELS et al., 1992) ou *P. aeruginosa* (SANDERS; SUDHAKARAN; SUTTON, 2009), a perda de *mutY* em *C. crescentus* mostra um incremento moderado na taxa de mutagênese espontânea (~7 vezes) em relação a cepa parental (MARTINS-PINHEIRO et al., 2017). Este fenótipo também foi observado em *Mycobacterium smegmatis* onde a deficiência de MutY não resultou em uma mudança significativa na taxa de mutagênese (~ 1,3 vezes) em relação cepa parental (KURTHKOTI et al., 2010).

Portanto, procuramos caracterizar o papel biológico de *mutM* e *mutY* em *C. crescentus*, para compreender melhor as consequências genotóxicas da formação da 8-oxoguanina no DNA bacteriano, já que MutY não parece ter um papel anti- mutagênico em *C. crescentus* tão forte como *E. coli* e *P. aeruginosa*.

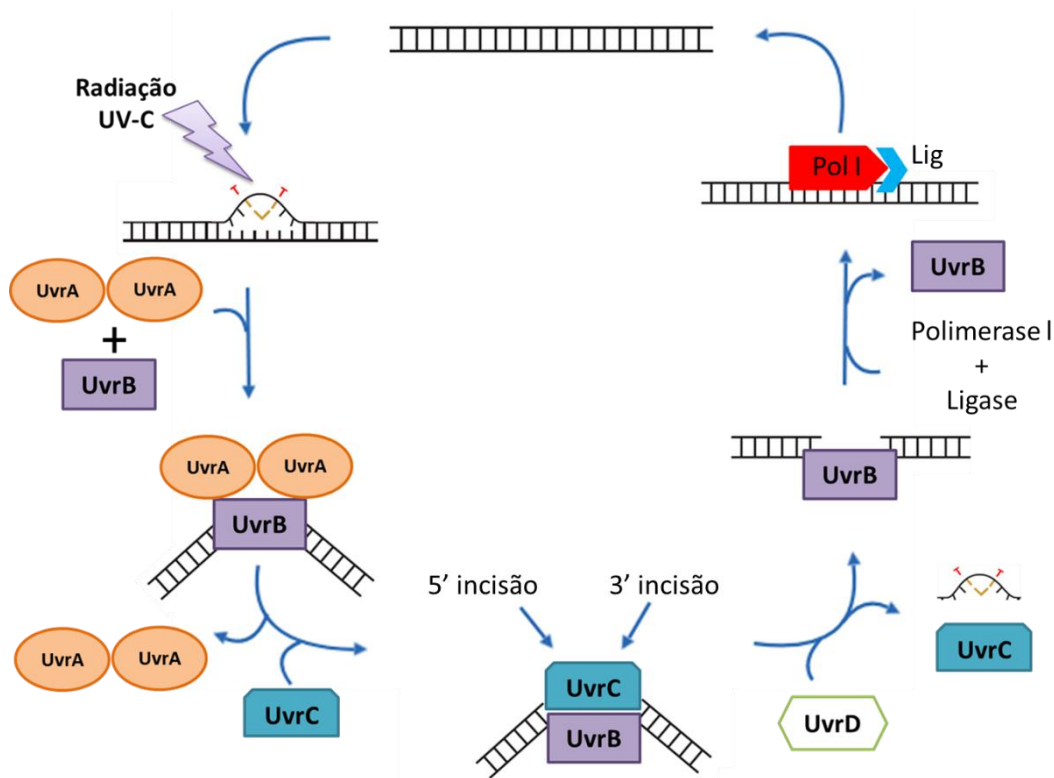
1.5.3. Reparo por Excisão de Nucleotídeos.

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é considerado um dos mais versáteis e flexíveis, por atuar no reparo de uma grande variedade de lesões que resultam em distorções significativas na dupla-hélice da molécula de DNA. Dentre os danos mais relevantes reparados pela via NER, destacam-se CPDs e 6-4 PPs, principais lesões induzidas por luz UV. Em *E. coli*, a via NER é mediada pelos genes *uvrABC*. Tanto o reconhecimento específico do dano, como a incisão da fita de DNA afetada em ambos os lados da lesão, são efetuados por três proteínas: UvrA e UvrB que são ATPases e UvrC que é uma nucleasse (SETLOW; CARRIER, 1966; GOOSEN; MOOLENAAR, 2008). Esta via compreende essencialmente as seguintes etapas: o reconhecimento e verificação específicos da lesão, incisão da fita de DNA afetada em ambos os lados dos locais do dano na base (incisão bimodal ou dupla), excisão de um fragmento de oligonucleotídeo gerado pelas incisões bimodais, síntese de reparo do DNA para preencher a lacuna deixada pela excisão do oligonucleotídeo, e ligação do DNA (KISKER; KUPER; VAN HOUTEN, 2013).

O reconhecimento da lesão é realizado pelas enzimas UvrA e UvrB, de forma dependente do ATP, associadas como um heterotrímero (UvrA₂UvrB) ou heterotetrâmero

(UvrA₂UvrB₂) cuja formação requer hidrólise de ATP (TRUGLIO et al., 2006). Ao encontrar uma base danificada, as fitas são separadas para formar uma bolha de DNA de fita simples contendo a lesão, e UvrA se dissocia, deixando UvrB firmemente ligado ao sítio danificado. UvrB então recruta a endonuclese UvrC que contém dois domínios de nucleases, que clivam oito nucleotídeos da ligação fosfodiéster no lado 5' e quatro a cinco do lado 3' liberando um fragmento de 12 a 13 nucleotídeos contendo a lesão. A enzima UvrD (DNA helicase II) atua então removendo este fragmento e liberando a proteína UvrC do complexo enzimático, através da ação de helicase da UvrD. Finalmente, a DNA polimerase I desloca UvrB e sintetiza e fragmento de DNA, e o nick resultante é selado pela DNA ligase I (Figura 8). (VAN HOUTEN et al., 2005; KISKER; KUPER; VAN HOUTEN, 2013).

Figura 8 – Representação esquemática da via de excisão de nucleotídeos em *E. coli*.



UvrA se associa e forma um dímero (UvrA)₂ em presença de ATP. (UvrA)₂ interage com UvrB resultando no complexo UvrA₂B, o qual reconhece e se liga à lesão. Esta ligação desencadeia mudanças

conformacionais no complexo, seguidas de liberação das moléculas de UvrA. UvrC reconhece o complexo UvrB/DNA e catalisa duas incisões no DNA, uma à 5' e outra à 3' do dano. A UvrD (helicase) remove a sequência excisada (12 a 13 nucleotídeos) e libera a proteína UvrC do complexo. DNA polimerase I ressintetiza um fragmento de DNA utilizando a outra fita como molde, e a DNA ligase finalmente liga este novo fragmento ao DNA.

Em *E. coli* e *Porphyromonas gingivalis*, foi proposto que a via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER) pode desempenhar um papel no reparo do dano oxidativo, incluindo a remoção da 8-oxoguanina (CZECZOT et al., 1991; JOHNSON et al., 2004). Isto pode sugerir que em *C. crescentus* a via NER poderia participar no reparo de DNA contendo 8-oxoG.

1.5.4. Reparo de bases mal emparelhadas (Mismatch repair-MMR).

O reparo de bases mal emparelhadas no DNA é necessário para manter a estabilidade genômica e é altamente conservado desde procariotos até eucariotos. Os erros cometidos durante a replicação do DNA, como deleções, inserções e mal emparelhamento de pares de bases, são substratos para o reparo por MMR (YANG, 2000).

O sistema MMR de *E. coli* inclui pelo menos 11 componentes proteicos que funcionam tanto na reação de discriminação de fita quanto no próprio processo de reparo: MutS (como dímero MutS₂), MutL (como dímero MutL₂), MutH, DNA helicase II (MutU/UvrD), quatro exonucleases (ExoI, ExoVII, ExoX, e RecJ), proteínas de ligação ao DNA de fita simples (SSB), DNA polimerase III e DNA ligase (LAHUE; AU; MODRICH, 1989; BURDETT et al., 2002). O sinal que permite a discriminação da fita recém sintetizada é baseado na ação da Dam metilase, a enzima que metila o DNA na posição N⁶ da adenina na sequência GATC (MARINUS, 1976). Esta metilação ocorre somente um intervalo de tempo após a síntese de DNA durante a replicação. Desta forma, as enzimas de correção reconhecem a fita não metilada temporariamente como a fita filha, dando início rapidamente à excisão da base incorreta (AU; WELSH; MODRICH, 1992).

O par de bases mal emparelhadas cria uma distorção no DNA que é reconhecida pela proteína MutS (ALLEN et al., 1997). Isto permite que MutS ligue à proteína MutL,

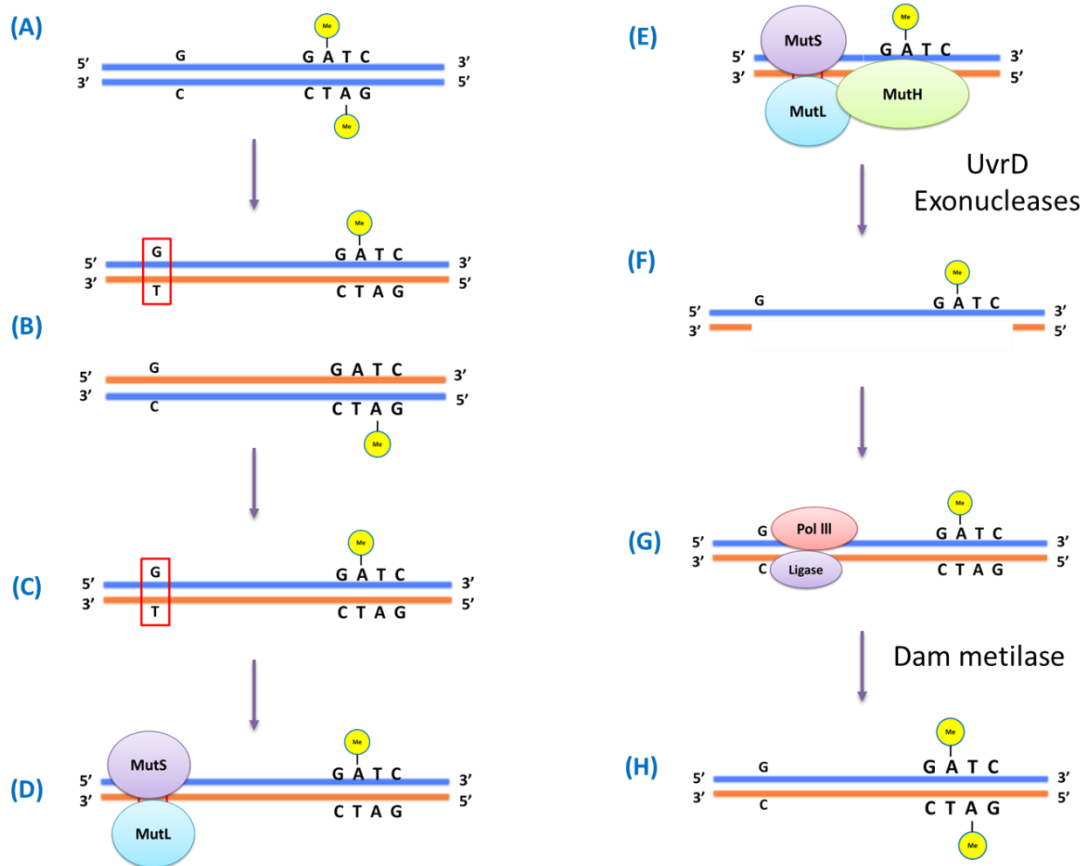
e o complexo MutS-MutL, usando ATP, varre bidireccionalmente ao longo do DNA, formando um loop de DNA (ACHARYA et al., 2003; JEONG et al., 2011). Ao chegar a um local GATC hemimetilado, o complexo recruta e ativa a MutH, uma endonuclease sítio específica que cliva sítios GATC não metilados (POLOSINA et al., 2009). Após a clivagem da fita, o MutS-MutL recruta a helicase II (também chamada UvrD), que separa as fitas do DNA na direção da base mal emparelhada (YAMAGUCHI; DAO; MODRICH, 1998). Durante o a dissociação das fitas, uma exonuclease degrada a fita de DNA onde houve a clivagem. Diferentes exonucleases são usadas, dependendo se a enzima precisa viajar na direção 5'→3' ou 3'→5' ao longo do DNA (LI, 2008; FUKUI, 2010).

O desenovelamento e a degradação do DNA param logo após a base mal emparelhada para ser removido, deixando uma lacuna na fita simples que se estende desde onde estava a base mal emparelhada até a incisão original no sítio GATC não metilado. A lacuna na fita simples é resintetizada pela Pol III, com auxílio das proteínas SSB e a ligase (Figura 9) (STOJIC; BRUN; JIRICNY, 2004; GROOTHUIZEN; SIXMA, 2016).

O genes *mutH*, *mutL* e *mutS* são componentes essenciais para este tipo de reparo em *E. coli*, porém na maioria das bactérias onde este sistema está presente homólogos do gene *mutH* não são encontrados, o que correlaciona bem com a ausência do gene *dam*, que normalmente realiza a metilação e sinalização para reparo de DNA mal emparelhado em *E. coli* (HSIEH, 2001; SCHOFIELD; HSIEH, 2004). Em uma via alternativa de MMR, a endonuclease Vsr é responsável por cortar 5' do nucleotídeo timina quando este se encontra emparelhado erroneamente com guanina, e é estimulada por MutL em *E. coli* (MONASTIRIAKOS et al., 2004).

As células eucarióticas têm várias proteínas que são estrutural e funcionalmente análogas às proteínas MutS e MutL em bactérias e não possuem homólogos à MutH bacteriana e à Dam metilase, já que não usam a metilação para distinguir entre novas e velhas fita de DNA (LI, 2008; FUKUI, 2010).

Figura 9 – Representação esquemática do reparo de bases mal emparelhadas (MMR) em *E. coli*.



As bases mal emparelhadas incorporadas durante a replicação no DNA são reparadas pelo sistema MMR (A e B). A fita hemimetilada com a base mal emparelhada é reconhecido pela enzima MutS e forma um complexo com MutL, que varre bidireccionalmente ao longo do DNA (C e D). MutS-MutL encontra o sítio GATC mais próximo, e recruta MutH, que cliva a sequência GATC hemimetilada recém sintetizada (E). A helicase II e uma exonuclease separam e degradam a fita filha na direção da base mal emparelhada (F). Pol III preenche a lacuna e a ligase sela o DNA (G) e finalmente a fita recém-sintetizada é metilada pela ação da Dam metilase completando o processo (H).

Em *C. crescentus*, o MMR é provavelmente realizada por homólogos *mutS/mutL* (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007). Os mutantes *mutL* e *mutS* têm um aumento de aproximadamente 100 vezes nas taxas de mutações, enquanto a cepa *uvrD* mostra um aumento de 10 vezes em relação ao tipo selvagem. O forte fenótipo mutador encontrado nas linhagens *mutS* e *mutL* é compatível com a deficiência no reparo de bases

mal emparelhadas em outras bactérias (MARTINS-PINHEIRO et al., 2017). Além disso, *C. crescentus* não possui um homólogo *mutH* em seu genoma (NIERMAN et al., 2001). Portanto, isso implica que *C. crescentus* e outras bactérias devem usar proteínas diferentes para reconhecimento e incisão da fita para completar a MMR. Um ortólogo da endonuclease Vsr que é estimulada por MutL foi encontrado no genoma de *C. crescentus*, mas sua função ainda precisa ser confirmada (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007).

Em *E. coli*, a proteína MutY compete com o sistema MMR dependente de MutS para remover pelo menos algumas adeninas mal emparelhadas com a citosina (A:C) in vivo, para restaurar o emparelhamento original G:C (KIM; HUANG; MILLER, 2003). Em *S. cerevisiae* na ausência do homólogo MutY, a proteína OGG1 (homólogo funcional do produto do gene *fpg* bacteriano) coopera com o sistema MMR para remover as adeninas mal emparelhadas com 8-oxodG (A:8-oxodG) (NI; MARSISCHKY; KOLODNER, 1999; BOITEUX; GELLON; GUIBOURT, 2002). Estes dados sugerem que o sistema MMR poderia contribuir com a prevenção da mutagênese pela oxidação da guanina em 8-oxoG em *C. crescentus*.

1.5.5. Reparo de reversão direta por DNA fotoliasas.

Este é talvez um dos sistemas de reparo mais simples e mais antigos, que consiste em uma única enzima: a fotoliase. Para remover as lesões de DNA formadas por UV, muitos organismos contêm as enzimas fotoliasas, flavoproteínas que se ligam especificamente a CPDs (CPD fotoliase) ou 6-4 PPs (6-4 fotoliase), e revertem o dano usando a energia da luz. Essas enzimas surgiram no início da evolução e estão presentes nos três domínios da vida, Archaea, Bactérias e Eucariotos, o que atesta seu papel fundamental na proteção dos organismos contra os efeitos danosos luz UV (SINHA; HÄDER, 2002). Nos vertebrados, as fotoliasas são encontradas em peixes, anfíbios, aves e mamíferos. Curiosamente, no entanto, alguns mamíferos parecem ter perdido este poderoso mecanismo de proteção após a separação de marsupiais e mamíferos placentários, já que as fotoliasas específicas de CPD foram encontradas em marsupiais,

mas nenhuma fotoreparação foi observada em mamíferos placentários, incluindo rato e homem. (TODO, 1999; MENCK, 2002).

Para reparar o dano no DNA induzido por UV, as DNA fotolases contêm um grupo reduzido de dinucleotídeo de flavina e adenina, que absorve luz com comprimentos de onda entre 350 e 500 nm, e usa a energia derivada da luz UV e visível absorvida para reverter os dímeros de pirimidina (LIU; WANG; ZHONG, 2015). Um fóton de luz azul é absorvido por um primeiro cromóforo (na maioria das fotolases, o cromóforo é um meteniltetrahidrofolato (MTHF) ou 8-hidroxi-5-deazariboflavina (8-HDF), que age como um painel solar, a energia de excitação é então transferida para o sítio ativo da flavina (FADH⁻), a flavina excitada atua como um catalizador e doa um elétron para o CPD no DNA, e rearranjos eletrônicos restauram as bases de timina para seu estado nativo (ZHANG; WANG; ZHONG, 2017). O elétron é transferido de volta para a fotoliase para regenerar pirimidinas monoméricas e FADH⁻. (SANCAR; SANCAR, 1987; BENJIDIA, 2012).

C. crescentus possui os genes *CCNA_01495* e *CCNA_00683*, que codificam proteínas da família das fotolases (*phr*) (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007). A proteína codificada por *CCNA_01495* foi purificada e demonstrou-se que é uma fotoliase que contém MTHF como segundo cromóforo, capaz de remover dímeros CPD, mas não 6-4PP (ÖZTÜRK et al., 2008). Além disso, foram identificados os genes *CCNA_01391* e *CCNA_02417* que codificam proteínas com domínio similar as fotolase e SP liase, respectivamente, como parte do regulon SOS e ambos são similares às proteínas da superfamília radical de S-adenosil-L-metionina (SAM) (DA ROCHA et al., 2008).

1.5.6. Reparo de reversão direta pela liase de fotoproduto de esporos (SP liase).

A luz UV induz reações de cross-linking intrafitas no DNA nos sítios das bipyrimidinas, que são citotóxicas à medida que alteram a estrutura do DNA, inibem as polimerases e impedem a replicação. Entre as quatro bases do DNA, a timina (T) é a mais sensível à irradiação UV seguida pela citosina (C). Em células típicas após excitação

fotoquímica, um resíduo T dimeriza com um T ou C adjacente, gerando tanto (CPDs) ou (6-4PPs) como as principais fotolesões. Em contraste, em endósporos bacterianos, o fotoproduto de DNA dominante é 5-timinil-5,6-dihidrotimina, um dímero de timina único, que também é chamado de fotoproduto de esporos ou SP (SETLOW, 2001; DESNOUS; GUILLAUME; CLIVIO, 2010; LI, 2012).

O DNA genômico do esporo é saturado por um grupo de proteínas de ligação ao DNA denominadas pequenas proteínas solúveis em ácido (SASPs). A interação proteína-DNA solúvel em pequenos ácidos, juntamente com outros fatores, como o baixo nível de hidratação dos esporos, muda o DNA de tipo B para a conformação tipo A. Como consequência, o fotoproduto de esporos é produzido como o produto de dano UV exclusivamente em esporos (NICHOLSON; SETLOW; SETLOW, 1990, 1991; MOHR et al., 1991; SETLOW; HAND; SETLOW, 1991).

Tanto estudos *in vitro* quanto *in vivo* descobriram que SP formado sob irradiação UV poderia representar até 8% da timina total no DNA genômico, e esses danos SP se acumulam nos esporos dormentes. Quando os esporos deixam a fase de dormência e começam a germinar, esses SPs devem ser reparados, uma vez que podem ser letais para as bactérias germinadas. Os esporos em germinação utilizam duas principais vias para reparar lesões SP: a via geral de excisão de nucleotídeos (NER), e um sistema de reparo de DNA específico de esporos, que envolve a monomerização *in situ* de SP em duas timinas mediadas por uma enzima chamada de liase de fotoproduto de esporo (SPL) (LI, 2012). A primeira proteína SP liase caracterizada foi a enzima de *Bacillus subtilis* (SETLOW, 1995). Tanto SPL como as proteínas de NER são sintetizadas durante a esporulação e empacotadas em esporos. As enzimas NER são expressas constitutivamente em um nível baixo, enquanto cada esporo contém de 100 a 200 cópias de SPL (REBEIL et al., 1998). No entanto, as enzimas NER podem ser induzidas por danos no DNA na germinação de esporos, enquanto a SPL é constitutiva. A SPL é a principal enzima para reparar SPs, embora o NER possa, pelo menos em parte, substituir o SPL em termos de reparação SP (YANG; LI, 2015).

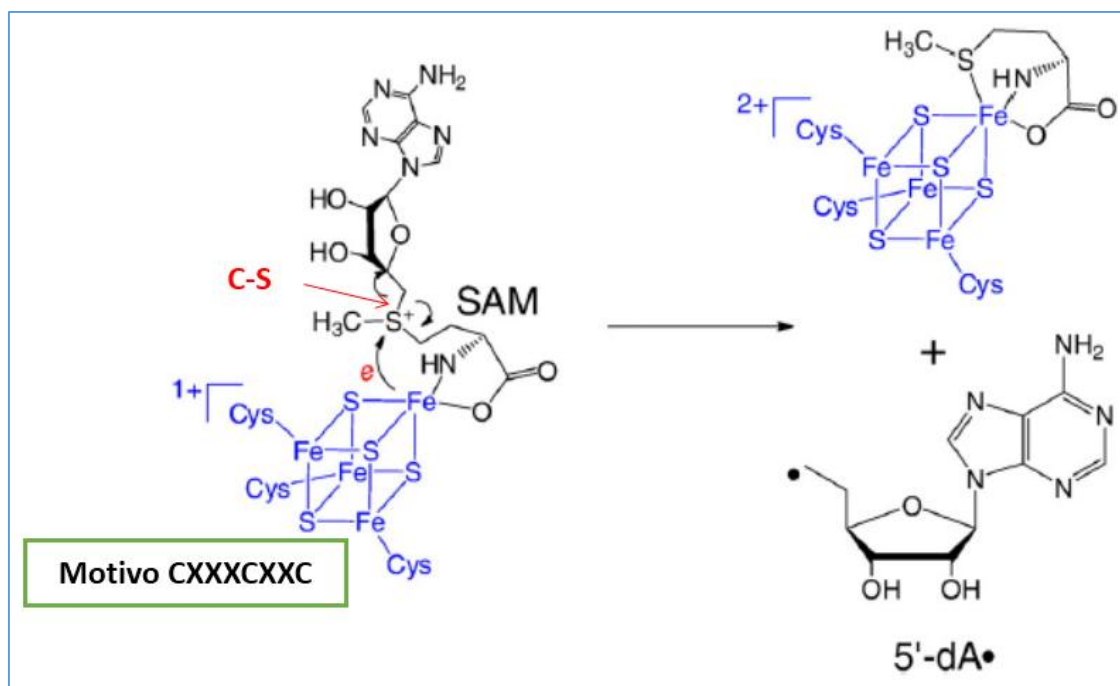
SP liase é de grande interesse devido ao seu mecanismo de reparo do DNA exclusivo e sua capacidade de conferir alta resistência UV aos esporos, incluindo as de

espécies patogênicas, como *Bacillus anthracis* e *Clostridium botulinum*. Revisado em (BENJDIA, 2012; BENJDIA et al., 2012; YANG; LI, 2015). A análise da sequência proteica identificou uma região homóloga nas porções carboxi-terminal da CPD fotoliase e SPL, indicando que estas enzimas podem ter evoluído de uma proteína ancestral comum (FAJARDO-CAVAZOS; SALAZAR; NICHOLSON, 1993).

Curiosamente, ao contrário das DNA fotolases, a SP liase não usa energia de luz azul para iniciar a reação de reparo e, portanto, constitui uma família única de liases independentes da luz envolvidas no reparo do DNA. SP liase pertence a uma muito difundida superfamília de enzimas S-adenosil-L-metionina (SAM) radical, envolvidas em uma ampla gama de processos biológicos (SOFIA et al., 2001). Essas enzimas compartilham várias características comuns, principalmente três resíduos de cisteína estritamente conservados geralmente incluídos no motivo CxxxCxxC. Os três resíduos de cisteína servem como ligantes para três átomos de ferros no cluster $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$, enquanto o SAM serve como ligante para o quarto átomo de ferro e atua como um cofator ou um co-substrato (FREY; HEGEMAN; RUZICKA, 2008).

O mecanismo proposto de reparo mediado pela SP liase inicia quando o cluster em seu estado de +1 oxidação doa um elétron a SAM, induzindo a clivagem redutora da ligação C5'-S e a formação de metionina e uma espécie altamente reativa, o radical 5'-desoxi-adenosina (5'-dA) como mostrado na Figura 10 (YANG et al., 2013).

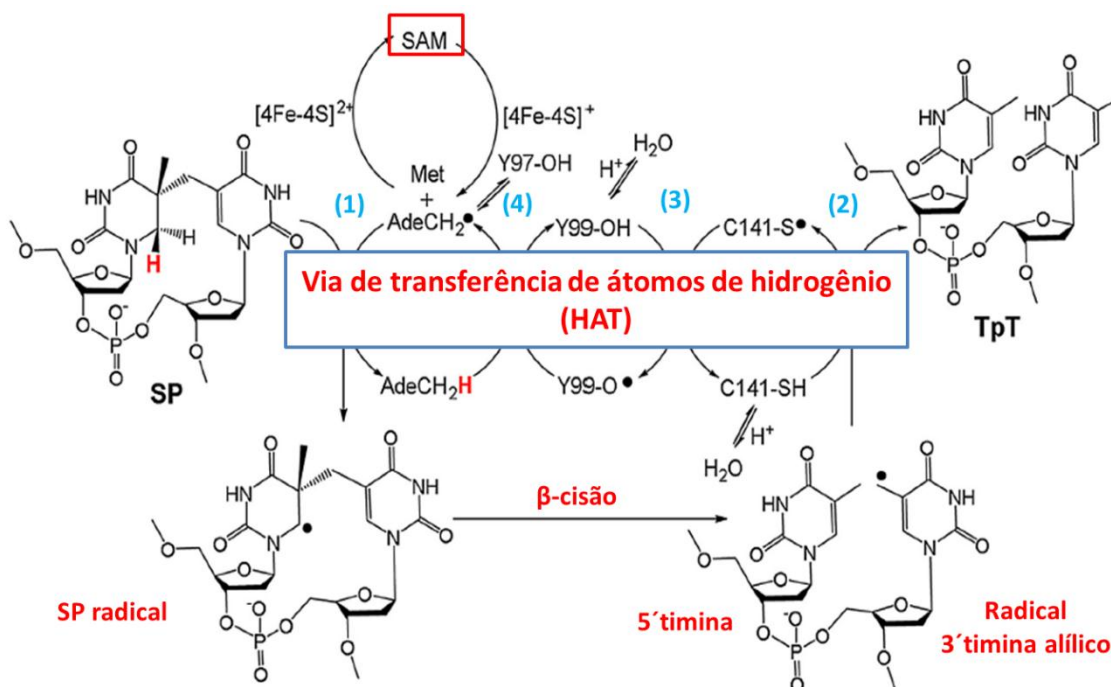
Figura 10 – Reação de clivagem redutiva de SAM.



A Reação de clivagem redutiva de SAM para produzir o radical 5'-dA•. Fonte: modificado de (LI, 2012).

Este radical 5'-dA abstrai o átomo de hidrogênio localizado no C6 do resíduo de 5'-dihidrotimina de SP, levando a um intermediário de SP radical que sofre uma β -cisão resultando a formação de um resíduo de 5'-timina reparado e um intermediário radical de 3'-timina alílico. Este radical abstrai um átomo de hidrogênio de um resíduo de cisteína conservado (C141) para formar o resíduo 3'-timina reparado. Em conjunto esta cisteína (C141) e duas tirosinas (Y97 e Y99) estão envolvidas numa via de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) para a regeneração de SAM (Figura 11) na SPL de *Bacillus subtilis*. (YANG et al., 2013; YANG; LI, 2015; BERTEAU; BENJDIA, 2017). Em *Geobacillus thermodenitrificans* uma cisteína (C1401) e duas tirosinas (Y96 e Y98) estão envolvidas nesta via HAT (BENJDIA et al., 2012).

Figura 11 – Mecanismo de reparo de SP liase.



O hipotético mecanismo de reação para SP liase em *B. subtilis*. Este mecanismo implica que a SP liase usa um mínimo de quatro processos de transferência de átomos H (números em azul) em cada ciclo catalítico. Acredita-se que o Y97 facilita o passo de abstração de H do grupo metil de 5'-dA, deslocando o radical no 5'-dA• resultante. Os dois primeiros processos do HAT estão bem estabelecidos e os dois últimos processos do HAT estão em debate. Fonte: modificado de (YANG et al., 2017).

Até onde sabemos, o SPL representa um exemplo sem precedentes de uma importante enzima de reparo de DNA que não pode efetivamente reparar sua lesão de substrato dentro da conformação normal de DNA adotada em células em crescimento. Fatores como outras proteínas de ligação ao DNA, helicases ou uma conformação de DNA alterada podem cooperar com SPL para permitir a reparação eficiente do SP na germinação de esporos. Portanto, tanto a formação de SP como o reparo de SP provavelmente são rigidamente controlados pelo ambiente celular único em bactérias formadoras de esporos dormentes e em crescimento, e assim o reparo de SP pode ser extremamente lento em organismos não formadores de esporos (YANG et al., 2017).

Em *C. crescentus*, o gene *CCNA_02417* codifica uma proteína da superfamília "Radical SAM", com similaridade distante com a SP liase de *B. subtilis* (DA ROCHA et al., 2008). Como *C. crescentus* é uma bactéria não-esporulante, é possível que este homólogo distante de SPL atue sobre outros fotoprodutos que normalmente são formados no DNA-B.

1.5.7. A resposta SOS.

A resposta SOS é um mecanismo regulador para a resistência a estresses e adaptação de bactérias quando as condições ambientais exigem. Este é um sistema conservado, induzido como resultado de estresse causando danos ao DNA, que é essencial para o reparo do DNA e retomada da replicação.

A regulação deste sistema em resposta a danos no DNA é dependente dos produtos dos genes *recA* e *lexA*. Em um estado celular não induzido, os genes pertencentes a esse sistema são reprimidos pela proteína LexA, a qual interage com sequências regulatórias específicas dos respectivos genes, denominadas "caixa SOS" (LITTLE, 1991; GIESE; MICHALOWSKI; LITTLE, 2008). Estas sequências operadoras se localizam em proximidade ou sobrepostas ao sítio de ligação da RNA polimerase e, portanto, a ligação de LexA a este trecho afeta o início do processo de transcrição (ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007).

O sistema SOS é induzido pelo acúmulo de trechos de fitas simples no DNA (ssDNA), que são formados por bloqueio da replicação e problemas na recombinação (BUTALA; ŽGUR-BERTOK; BUSBY, 2009). Após se ligar a íons de Mg^{2+} e em presença de ATP, a proteína RecA interage com regiões ssDNA e se torna ativa (RecA*), formando fragmentos de nucleoproteínas (KOVAČIČ et al., 2013). Nesta forma, RecA* se liga ao repressor LexA, promovendo a auto-clivagem deste entre a ligação Ala84-Gly85 desta proteína. A proteína RecA* atua ativando o sistema SOS por diminuir os níveis intracelulares de moléculas de LexA intactas, e com isto, promove a dissociação deste repressor de sequências operadoras no DNA (BUTALA et al., 2011). Depois de clivada, LexA perde a capacidade de se ligar às sequências operadoras (KOVAČIČ et al.,

2013), e a repressão dos genes do regulon SOS é interrompida. A transcrição destes genes resulta na produção de enzimas específicas necessárias para proteção contra os danos celulares, através de mecanismos específicos de reparo, incluindo, por exemplo: *uvrA*, *uvrB*, *ruvAB*, *uvrD*, *recN* e *recA* em *E. coli* (COURCELLE et al., 2001). Em situações onde as lesões não podem ser reparadas por estes mecanismos, o sistema SOS atua regulando a expressão de polimerases especiais responsáveis pela síntese de DNA frente a esses danos (descritas na seção 1.5.8).

À medida que os danos no DNA são reparados ou tolerados, o nível do sinal indutor diminui, acarretando na diminuição da conversão da proteína RecA em RecA*. Com isso, tem-se novamente um acúmulo da proteína LexA intacta, a qual passa a se ligar aos operadores, resultando na repressão transcricional de genes do sistema SOS (GIESE; MICHALOWSKI; LITTLE, 2008; BUTALA; ŽGUR-BERTOK; BUSBY, 2009).

Esses níveis basais de LexA e RecA são justificáveis pelo seu papel importante no controle da resposta SOS. Além disso, a proteína RecA também está envolvida em diversos processos celulares, como recombinação homóloga e síntese translesão (SASSANFAR; ROBERTS, 1990; COX, 2007).

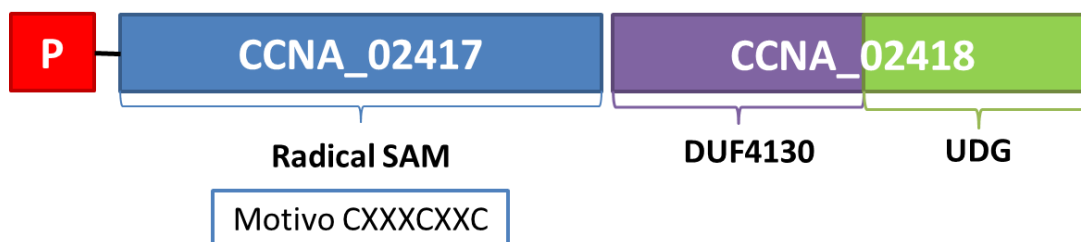
A resposta SOS está amplamente distribuída entre as bactérias, mas a sequência de ligação de LexA e os genes induzidos pela resposta variam consideravelmente, mesmo entre bactérias proximamente relacionadas (ERILL et al., 2006; ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007). O grupo de genes composto por *lexA*, *recA*, *ssb*, *uvrA* e *ruvCAB* são regulados por LexA em praticamente todas as proteobactérias (ERILL et al., 2004). No entanto, a expressão dos genes SOS canônicos, *recA*, *uvrA*, *ruvCAB* e *ssb* não é regulada por LexA na proteobactéria delta *Bdellovibrio bacteriovorus* (CAMPOY et al., 2005). *Neisseria gonorrhoeae* é uma exceção, já que não possui um sistema semelhante ao SOS que é induzido em resposta a danos no DNA (BLACK; FYFE; DAVIES, 1998).

Atualmente, mais de cinquenta genes foram descritos como pertencentes ao regulon SOS de *E. coli* (COURCELLE et al., 2001; WADE et al., 2005; BUTALA et al., 2011). Em *P. aeruginosa*, o LexA regula a expressão de 15 genes, incluindo genes envolvidos no reparo do DNA (*recX* e *recN*), três genes ligados à replicação de baixa

(Y78) que hipoteticamente estão envolvidas na via de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) para a regeneração de SAM, conforme estudos com SPL de *B. subtilis* e *G. thermodenitrificans*.

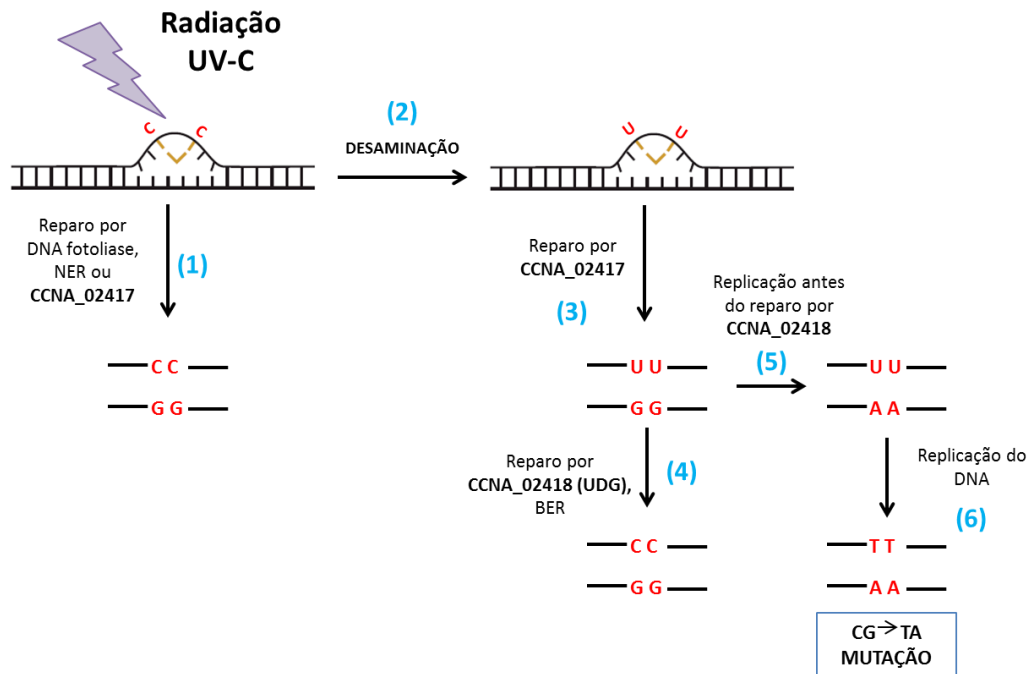
O gene *CCNA_02417* é parte de um operon com o gene *CCNA_02418*, que codifica uma proteína com dois domínios distintos como se mostra na Figura 13. Um domínio de função desconhecida (DUF4130) que frequentemente está em operon com proteínas da família “radical SAM” em genomas bacterianos, e outro domínio com similaridade com as uracila-DNA glicosilases. 20% dos genomas bacterianos apresentam proteínas da família DUF4130, e em 40% delas, este domínio está fusionado a uma uracila-DNA glicosilase (FINN et al., 2007; MARCHLER-BAUER et al., 2017), de maneira idêntica ao observado em *C. crescentus*.

Figura 13 – Operon *CCNA_02417/CCNA_02418*.



Desta forma, acreditamos que *CCNA_02417/CCNA_02418* compõem um sistema de reparo direto de fotoprodutos independente de luz, que opera em células vegetativas que não formam esporos, associado a um mecanismo de prevenção de mutagênese induzida pela desaminação de citosina dentro destes fotoprodutos (Figura 14). Estes genes são conservados em diversos genomas bacterianos, mas nunca foram estudados funcionalmente.

Figura 14 – Esquema hipotético do sistema de reparo de fotoprodutos por CCNA_02417/CCNA_02418.



A radiação UV-C forma dímeros de pirimidina (C<->C), que podem ser removidos por NER ou monomerizados pelas DNA fotolases ou pela ação da enzima codificada pelo gene *CCNA_02417* (1); os dímeros não reparados favorecem a desaminação das citosinas em uracilas (2); os dímeros de uracilas são monomerizados por *CCNA_02417* (3); as uracilas são reparadas subsequente pela via BER, incluindo *CCNA_02418* que apresenta um domínio similar à uracila-DNA glicosilase (4) restaurando o emparelhamento original G:C. Caso eventos de replicação ocorram antes do reparo por *CCNA_02418*, polimerases replicativas podem incorporar adenina frente a uracila (5); se estas uracilas não são removidas antes de um segundo evento replicativo, mutações de transversões GC→TA podem ser fixadas (6).

1.5.8. Síntese translesão (TLS).

A via TLS envolve a participação de polimerases especializadas, principalmente aquelas da família Y (OHMORI et al., 2001), que são capazes de sintetizar DNA frente a lesões no DNA, como por exemplo, dímeros de pirimidinas. Essas proteínas são caracterizadas por não possuírem atividade de exonuclease de revisão (3'– 5') e taxa de erro de incorporação elevada, quando comparadas com as replicases. Em *E. coli* existem

cinco DNA polimerases, sendo três delas induzidas como parte da resposta SOS ao dano de DNA (Pol II, Pol IV e Pol V) (NAPOLITANO et al., 2000).

A Pol II de *E. coli*, codificada pelo gene *polB*, é uma proteína da família B de polimerases que realiza TLS (WANG; YANG, 2009). DinB (Pol IV), a única DNA polimerase da Família Y que é conservada em todos os domínios da vida, não possui atividade de exonuclease de revisão 3' – 5' e realiza TLS (WAGNER et al., 1999). Em outras bactérias como *C. crescentus* e *Mycobacterium tuberculosis*, a expressão de *dinB* não é induzida por SOS (GALHARDO et al., 2005; DA ROCHA et al., 2008; ORDONEZ; USON; SHUMAN, 2014). A polimerase V de *E. coli* é uma polimerase da Família Y, codificada pelos genes *umuC* e *umuD*, cujos produtos formam o complexo UmuC/UmuD₂ (TANG et al., 1999; FUCHS; FUJII; WAGNER, 2004), após o processamento de UmuD a UmuD' mediado por RecA ativada. A Pol V é responsável em grande medida pela mutagênese induzida pelo sistema SOS em *E. coli*.

Em *C. crescentus*, o ortólogo de *dinB* não está envolvido na mutagênese induzida por danos por luz UV, e ortólogos de *umuDC* e de *polB* estão ausentes. A mutagênese induzida durante a resposta SOS em *C. crescentus* é promovida por proteínas codificadas pelo operon *imuAB dnaE2 (imuC)* (GALHARDO et al., 2005; ERILL et al., 2006). Em *C. crescentus* e *M. tuberculosis*, esses genes cooperam em uma via que promove a mutagênese dependente de SOS após a exposição ao dano no DNA, presumivelmente atuando na síntese translesão de DNA (TLS) (BOSHOFF et al., 2003; GALHARDO et al., 2005; WARNER et al., 2010).

A proteína ImuA é a menos conservada dentro deste cassete mutagênico, com similaridades com a proteína ImuA de *M. tuberculosis*, assim como apresenta similaridade distante com as proteínas RecA e Sula (IPPOLITI et al., 2012). A proteína ImuB faz parte da família Y de polimerases e possui todos os domínios proteicos típicos dessa família, e a proteína DnaE2 que representa uma segunda cópia da subunidade catalítica da DNA polimerase III (BOSHOFF et al., 2003).

Em *C. crescentus* os genes *imuABC* são os únicos genes necessários nos níveis induzidos por SOS para que a mutagênese induzida por UV ocorra, e sua atividade de TLS não requer RecA (ALVES et al., 2017), ao contrário da mutagênese dependente de

umuDC em *E. coli*. Além disso, este operon é responsável pela maioria (aproximadamente 2/3) das mutações induzidas por radiação UV e a pela totalidade daquelas induzidas por mitomicina C em *C. crescentus* (GALHARDO et al., 2005). Estes genes estão presentes em *C. crescentus* e outras bactérias, indicando que esta maquinaria enzimática é amplamente envolvida na mutagênese induzida pelo estresse e contribui para a variabilidade genética no domínio bacteriano. Entretanto, ainda não é sabido como o restante (1/3) das mutações induzidas por UV são formadas em *C. crescentus*, uma vez que estas independem da presença dos genes *dinB* e *imuAB dnaE2*, e não há outros genes que codificam polimerases alternativas no genoma desta bactéria. Os fotoprodutos causados por luz UV não são mutagênicos para as polimerases replicativas, uma vez que constituem bloqueios intransponíveis para a progressão das mesmas. Assim sendo, a mutagênese induzida por UV em bactérias é tida como estritamente dependente de TLS. Desta forma, aquelas mutações induzidas por UV em *C. crescentus*, que ocorrem mesmo na ausência de *dinB* e *imuAB dnaE2*, possivelmente surgem por vias independentes de TLS, de natureza ainda não conhecida.

2. OBJETIVOS.

Objetivo geral: Caracterizar os sistemas de reparo de lesões oxidativas e fotoprodutos de *Caulobacter crescentus*

Objetivos específicos:

- Estudar o papel dos genes *mutM* e *mutY* de *C. crescentus*, analisando seu papel na mutagênese espontânea e induzida por tratamento com azul de metileno, de forma a contribuir para o entendimento da relevância do sistema GO para a manutenção da integridade genética em bactérias.
- Estudar a interação entre o sistema GO e outras vias de reparo de DNA na prevenção de mutagênese.
- Avaliar os fatores que influenciam na mutagênese espontânea em células deficientes no sistema GO, como a temperatura e os níveis basais de 8-oxoG em células em crescimento exponencial.

- Construção de linhagens de *C. crescentus* deficientes nos genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*, para análises fenotípicas de sensibilidade à luz UV mutagênese induzida por este agente.

- Medição da capacidade de reparo de lesões causadas por luz UV-C nos mutantes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Linhagens Bacterianas e condições de cultivo e manutenção.

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão listadas nas Tabelas 2 e 3.

3.2. Manutenção e cultivo de cepas de *C. crescentus*.

As cepas de *C. crescentus* foram cultivadas a 30°C em meio PYE (Ely,1991) (peptona 2 g/L, extrato de levedura 1 g/L; MgSO₄.7 H₂O 0,2 g/L, CaCl₂ 0,5 mM; 15 g/L ágar para preparo de meio PYE sólido). Quando necessário, os antibióticos a seguir foram acrescidos nas seguintes concentrações: 20 µg/mL ácido nalidíxico, 5 µg/mL canamicina, 50 µg/mL espectinomicina, 50 µg/mL estreptomicina, 50 e 100 µg/mL rifampicina. Os estoques destas cepas foram mantidos com DMSO 10% a -80°C. A cepa NA1000 (EVINGER; AGABIAN, 1977) foi utilizada como parental para a construção dos mutantes e demais experimentos.

3.3. Manutenção e cultivo de cepas de *E. coli*.

As cepas de *E. coli* DH5α (HANAHAN, 1983), DH10β (HANAHAN, 1983) e S17-1 (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983) foram utilizadas para processos de clonagem e conjugação com *C. crescentus*. Estas cepas foram cultivadas a 37°C em meio LB (peptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; 15 g/L ágar para preparo de LB sólido). Quando necessário, os antibióticos a seguir foram acrescidos nas seguintes concentrações:

100 µg/mL ampicilina, 50 µg/mL canamicina, 10µg/mL tetraciclina. Os estoques destas cepas foram mantidos com glicerol 20% a -80°C.

Tabela 2 – Linhagens de *Caulobacter crescentus* utilizadas neste trabalho.

NOME	GENÓTIPO	CONSTRUÇÃO	REFERÊNCIA
NA1000	Linhagem derivada de <i>C. crescentus</i> CB15, selvagem para os genes de reparo de DNA	-----	(EVINGER; AGABIAN, 1977)
RSG52	NA1000 <i>mutM::ΩSpec^R</i>	NA1000, plasmídeo <i>mutM::ΩSpec^R</i>	Este trabalho
RSG33	NA1000 <i>ΔCCNA_02355</i>	NA1000, plasmídeo 2272del	Este trabalho
RSG87	NA1000 <i>ΔCCNA_02355</i> <i>mutM::ΩSpec^R</i>	<i>ΔCCNA_02355</i> , plasmídeo <i>mutM::ΩSpec^R</i>	Este trabalho
RSG363	NA1000 <i>ΔmutY</i>	NA1000, plasmídeo <i>mutYdel</i>	Este trabalho
RSG120	NA1000 <i>ΔmutY</i> <i>ΔCCNA_02355</i>	<i>ΔmutY</i> , plasmídeo 02355del	Este trabalho
RSG47	NA1000 <i>ΔmutY</i> <i>mutM::ΩSpec^R</i>	<i>ΔmutY</i> , transdução com ΦCr30(<i>mutM::ΩSpec^R</i>)	Este trabalho
RSG253	NA1000 <i>Δ mutY</i> <i>ΔCCNA_02355 mutM::ΩSpec^R</i>	<i>ΔmutY ΔCCNA_02355</i> , transdução com ΦCr30 (<i>mutM::ΩSpec^R</i>)	Este trabalho
RSG267	NA1000 <i>mutM::ΩSpec^R</i> <i>mutY::Tn5</i>	<i>mutM::ΩSpec^R</i> , transdução com ΦCr30(<i>mutY::Tn5</i>)	Este trabalho
RSG606	NA1000 <i>CCNA_03847::ΩSpec^R</i>	NA1000, plasmídeo <i>CCNA_03847::ΩSpec^R</i>	Este trabalho

	NA1000	<i>ΔCCNA_02355</i>	
RSG609	<i>ΔCCNA_02355</i> <i>ΦCr30(CCNA_03847::ΩSpec^R)</i>	transdução com <i>ΦCr30</i> (<i>CCNA_03847::ΩSpec^R</i>)	Este trabalho
RSG297	NA1000 <i>ΔCCNA_02417</i>	NA1000, plasmídeo <i>Δ02417</i>	Este trabalho
RSG96	NA1000 <i>uvrA::Tn5</i>	NA1000 transdução com <i>ΦCr30 (uvrA::Tn5)</i>	(MARQUES, 2008)
RSG98	NA1000 <i>ΔCCNA_02417</i> <i>uvrA::Tn5</i>	NA1000 <i>ΔCCNA_02417,</i> transdução com <i>ΦCr30</i> (<i>uvrA::Tn5</i>)	Este trabalho
RSG474	NA1000 <i>ΔdnaE2::Ωspec^R</i>	NA1000, plasmídeo <i>pdnaE2del</i>	(GALHARDO et al., 2005)
RSG361	NA1000 <i>ΔCCNA_02417</i> <i>ΔdnaE2::ΩSpec^R</i>	NA1000 <i>ΔCCNA_02417,</i> transdução com <i>ΦCr30</i> (<i>dnaE2::ΩSpec^R</i>)	Este trabalho
RSG674	NA1000 <i>ΔCCNA_02418::Spec^R</i>	NA1000, plasmídeo <i>Δ02418::Spec^R</i>	Este trabalho
RSG681	NA1000 <i>CCNA_02418</i> <i>uvrA::Tn5</i>	NA1000 <i>ΔCCNA_02418,</i> transdução com <i>ΦCr30</i> (<i>uvrA::Tn5</i>)	Este trabalho
(GM30)	NA1000 <i>ΔimuB</i>	NA1000, plasmídeo <i>pimuBdel</i>	(GALHARDO et al., 2005)
RSG717	NA1000 <i>ΔimuB</i> <i>ΦCr30@</i> <i>CCNA_02418::ΩSpec^R</i>	NA1000 <i>ΔimuB</i> (GM30) transdução com <i>ΦCr30</i> (<i>CCNA_02418::Spec^R</i>)	Este trabalho
RSG720	NA1000 <i>imuB</i> <i>ΔCCNA_02417</i>	NA1000, plasmídeo <i>Δ02417</i>	Este trabalho

RSG728	<i>uvrA</i> ::Tn5 [pMR20]	NA1000, plasmídeo [pMR20]	Este trabalho
RSG726	<i>uvrA</i> ::Tn5 [pRVMCS5]	NA1000, plasmídeo [pRVMCS5]	Este trabalho
RSG713	NA1000 $\Delta CCNA_02417$ <i>uvrA</i> ::Tn5 [pMR20]	NA1000, plasmídeo [pMR20]	Este trabalho
RSG715	NA1000 $\Delta CCNA_02417$ <i>uvrA</i> ::Tn5 [pMRCCNA_02417]	NA1000, plasmídeo [pMRCCNA_02417]	Este trabalho
RSG707	NA1000 <i>CCNA_02418</i> :: Ω Spec ^R Φ Cr30@ <i>uvrA</i> ::Tn5 [pRVMCS5]	NA1000, [pRVMCS5]	Este trabalho
RSG709	NA1000 <i>CCNA_02418</i> :: Ω Spec ^R Φ Cr30@ <i>uvrA</i> ::Tn5 [pRVCCNA_02418]	NA1000, plasmídeo [pRVCCNA_02418]	Este trabalho
RSG711	NA1000 <i>CCNA_02418</i> :: Ω Spec ^R Φ Cr30@ <i>uvrA</i> ::Tn5 [pRVDUF4130]	NA1000, plasmídeo [pRVDUF4130]	Este trabalho

Tabela 3 – Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho.

LINHAGENS		GENÓTIPO	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 11 <i>gyrA</i> 96 <i>thi-1 relA1</i>	(HANAHAN, 1983)

	F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)	
DH10 β	Φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL nupG	(HANAHAN, 1983)
S17-1	294::RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)	(SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983)
CC104	-----	(CUPPLES; MILLER, 2006)
BH990	CC104 <i>mutY68::Km^R fpg::Tet^R</i>	(DUWAT et al., 1995)

3.4. Plasmídeos.

Os plasmídeos utilizados ao longo deste trabalho encontram-se listados na Tabela 4.

Tabela 4 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.

PLASMÍDEO	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
pGEM-T Eassy	Vetor de clonagem, Ap ^R	Promega*
pNPTS138	Replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> (Km ^R), <i>sacB</i>	(TSAI; ALLEY, 2001)
<i>pmutM::ΩSpec^R</i>	Fragmento do gene <i>CCNA_03822</i> interrompido pelo cassete Ω no sítio <i>Bam</i> HI, clonado no vetor pNPTS138	(KULISHEV, 2014)
p2272del	Segmento para deleção em fase do gene <i>CCNA_02355</i> clonado no vetor pNPTS138	(ROCHA, 2011)

<i>pmutYdel</i>	Segmento para deleção em fase do gene <i>CCNA_00381</i> clonado no vetor pNPTS138	Este trabalho
<i>pimuAdel</i>	Segmento para deleção em fase do gene <i>CC_3213</i> clonado no vetor pNPTS138	(GALHARDO et al., 2005)
<i>p3731::ΩSpec^R</i>	Fragmento do gene <i>CCNA_03847</i> interrompido pelo cassete Ω no sítio <i>BamHI</i> , clonado no vetor pNPTS138	(ROCHA, 2011)
<i>p02417del</i>	Segmento para deleção em fase do gene <i>CCNA_02417</i> clonado no vetor pNPTS138	Este trabalho
<i>p02418::ΩSpec^R</i>	Gene <i>CCNA_02418</i> interrompido pelo cassete de resistência a espectionomicina clonado no vetor pNPTS138	Este trabalho
<i>pMR20</i>	Vetor de ampla gama de hospedeiros de baixa copias	(ROBERTS et al., 1996)
<i>pMR2417</i>	Derivado de <i>pMR20</i> contendo a região codificadora <i>CCNA_02417</i> e seu promotor nativo	Este trabalho
<i>pRVMCS5</i>	Vetor de ampla gama de hospedeiros de baixa copias	(THANBICHLER; INIESTA; SHAPIRO, 2007)
<i>pRV2418</i>	Derivado de <i>pRVMCS5</i> contendo a região codificadora <i>CCNA_02418</i> e seu promotor nativo	Este trabalho
<i>pRVDF4130</i>	Derivado de <i>pRVMCS5</i> contendo a região codificadora <i>CCNA_02418</i> e seu promotor nativo	Este trabalho

* Promega, Madison, WI, EUA.

3.5. Oligonucleotídeos.

Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com auxílio do software Primer 3 e sintetizados pelas empresas IDT Integrated DNA Technologies, Exxtend (São Paulo, SP, Brasil) ou Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Estes se encontram listados na Tabela 5.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Os nucleotídeos sublinhados representam sítios de reconhecimento por enzimas de restrição que foram adicionados aos oligonucleotídeos.

Propósito	Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb*)
Construção do plasmídeo <i>pmutYdel</i> , para deleção de <i>mutY</i>	mutY 2	TCAGAGCAGCCGCTGCGCCG	556
		CCATGCGGAGAGCGTCGCG	
	GTCTTTCAT		
	mutY 3	<u>AAGCTT</u> CCTAGGCCGTAAGT	
		TCATCG	
mutY 4	ATGAAAGACCGCGACGCTCT	563	
CCGCATGGCGGCGCAGCGG			
CTGCTCTGA			
mutY 5	<u>GGATCC</u> CTGTCGGCCAGTTG	CTTT	
Construção do plasmídeo p02417del, para deleção de <i>CCNA_02417</i>	2332A	<u>GAATTC</u> CTTTCCCTAACGGGT	499
		GACAA	
	2332B	<u>CTGCAG</u> GAGAACGGCCATGT	429
		CGAGCAC	
2332C	<u>CTGCAG</u> GTTTCAGTTGAGCCT		
	GTTCTGA		
2332D	<u>AAGCTT</u> CCGCGTAGGTTTCCT	TGG	
Construção do plasmídeo p02418::Spec ^R , para deleção de <i>CCNA_02418</i>	2333A	CCC <u>AAGCTT</u> AGTCCACCCAA	583
		CTGATCGTC	
	2333B	TCAAGGGGATGTCGCGGCCA	627
	GGCC <u>GAATTCT</u> GAGGCGAGG		
	CGAACCACTTGCAT		
	ATGCAAGTGGTTCGCCTCGC	627	
2333C	CTCAG <u>AATTC</u> GGCCTGGCCG		
	CGACATCCCCTTGA		

	2333D	<u>CGGCTCGAGGAAGACATGGC</u> CCGGTACTA	
Construção do vetor pMR2417, para complementado do mutante <i>CCNA_02417</i>	2332A	<u>GAATTCCTTTCTAACGGGT</u> GACAA	2116
	2332D	<u>AAGCTTCCGCGTAGGTTTCT</u> TGG	
Construção do vetor pRV2418, para complementação do mutante <i>CCNA_02418</i>	pRVMCS5- 2333-com.Fw	<u>ATATGAATTCTCGAGGTACC</u> CCTTTCCTAACGGGTGACAA ACG	2568
	pRVMCS5- 2333-com.Rv	<u>AGAGCTCACCACGTGGTACC</u> GAAGACATGGCCCGGTACTA TCC	
Construção do vetor pRVDUF4130, para complementação do mutante <i>CCNA_02418</i>	pRVMCS5- DUF Fw	<u>ATATGAATTCTCGAGGTACC</u> CCTTTCCTAACGGGTGACAA ACG	1323
	pRVMCS5- DUF Rv	<u>AGAGCTCACCACGTGGTACC</u> ATGGCGCTGCGCGGCCTTCA GAACG	

3.6. Técnicas de biologia molecular utilizadas em clonagem.

3.6.1. Extração de DNA cromossômico de *C. crescentus*.

Para a obtenção de DNA cromossômico de *C. crescentus*, utilizamos o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Madison, WI, USA) conforme especificações do fabricante. Além disso, para os procedimentos de clonagem se utilizou o Wizard® SV

Gel and PCR Clean-Up System (Promega Madison, WI, USA) para extração de DNA a partir do gel de agarose e produto de PCR.

3.6.2. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificação de genes de interesse e validação de clonagens. Para reações que visavam amplificar insertos gênicos para clonagem, usamos as enzimas de alta fidelidade Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA), Pfu DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) ou Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) conforme as especificações dos fabricantes. Para PCR que tinha o objetivo de checar clonagem quanto à presença de insertos positivos, se utilizou Easy Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia, Brasil) e Taq DNA polimerase (Sinapse Inc, Brasil) conforme as especificações do fabricante. A temperatura de anelamento dos primers com o DNA foi utilizada de acordo com as características particulares das sequências de cada par de iniciadores utilizado neste trabalho. Todas as reações foram acrescidas de DMSO para facilitar a amplificação a partir do DNA rico em GC de *C. crescentus*.

3.6.3. Reações de clonagem.

Para as ligações de DNA utilizamos uma proporção de 3:1 (inserto:vetor); 1U de T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA e Promega, Madison, WI, USA); tampão T4 DNA ligase 1 X, e adicionamos água milliQ para se obter um volume final de 10 µL. As ligações entre inserto e o vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) foram mantidas à 4°C por cerca de 16 horas, e as ligações entre inserto e os demais vetores ocorreram à 16°C também por aproximadamente 16 horas. Alternativamente, utilizamos o kit In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio USA, Inc.), seguindo as recomendações do fabricante.

3.6.4. Preparação de DNA plasmidial.

A extração de plasmídeos de interesse em pequena escala foi realizada utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA).

3.6.5. Eletroforese em gel de agarose.

Os DNAs plasmidiais e cromossômicos obtidos de extração, amplicons de PCR e produtos de digestão foram verificados através de géis de agarose (0,80% a 1%, dependendo do tamanho dos fragmentos) em tampão TBE 0,5X (89 mM Tris base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8) contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL (Invitrogen, USA). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com o auxílio do padrão de peso molecular GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). Para visualização dos géis foi utilizado o UV/ White Light Transilluminator SPECTROLINE BI-O-VISON, e a quantificação dos DNAs foi realizada através do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA).

3.6.6. Reação para sequenciamento de DNA.

Para realizar o sequenciamento dos plasmídeos pGEM-T Easy contendo os fragmentos de interesse clonados, os DNAs plasmidiais foram extraídos com os kits acima descritos, e utilizamos 150 ng de DNA para cada reação de sequenciamento. Em cada reação (volume final de 10µL) acrescentamos ao DNA 2µL de tampão *Save Money* 5X (200 mM de Tris-HCl; 5 mM de MgCl₂, pH 9); 3,2 pmoles do oligonucleotídeo; 1µL do mix BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e adicionamos água MilliQ estéril até completar o volume total. As reações foram submetidas a 40 ciclos de 96°C por 10 segundos; 20 segundos a 52° e 4 minutos a 60°C, em termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA).

Para precipitação das reações de sequenciamento, 50 μ L de isopropanol 75% foram adicionados ao produto da reação e, após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 12 000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado através de spin invertido dos tubos, e o sedimento foi ressuscitado duas vezes em 150 μ L de etanol 70% e centrifugado 12 000 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento permaneceu à temperatura ambiente por 16 horas para posterior sequenciamento. As amostras secas e precipitadas foram então encaminhadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SSDNA IQUSP). A sequência obtida foi verificada *in silico* com auxílio do programa BioLign versão 3.2 para análise dos contigs e da qualidade do sequenciamento, e através do programa Geneious, a sequência gerada foi comparada com uma sequência de DNA genômico de *C. crescentus* NA1000 disponível no Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

3.7. Obtenção de bactérias competentes.

3.7.1. Quimiocompetentes:

Para as células DH5 α e S17-1 de *E. coli* tornarem-se quimiocompetentes, utilizamos a técnica descrita por (HANAHAN, 1983). Uma colônia de *E. coli* obtida de uma placa recente de LB ágar foi inoculada em 2 mL de meio LB e mantida sob agitação constante a 37°C por aproximadamente 16 horas. Este pré-inóculo foi transferido para 50 mL de LB e mantido a 37°C sob agitação por cerca de 3 horas para que atingisse DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. O frasco contendo a cultura foi então transferido para um recipiente com gelo e foi acrescido de 0,5 mL de MgCl₂ 1M. As culturas foram transferidas para tubos de polipropileno previamente resfriados e mantidas em repouso por 15 minutos. As células foram então precipitadas por centrifugação durante 12 minutos, a 4°C e 3000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi gentilmente ressuscitado em 10 mL de solução RF I (100 mM KCl; 50 mM MnCl₂.4H₂O; 30 mM de acetato de potássio; 10 mM CaCl₂.2H₂O; 15% glicerol; pH 5,8), e mantido em gelo por 15 minutos. O inóculo foi novamente centrifugado a 3000 x g por 12 minutos a 4°C, o sobrenadante

descartado, e as células foram ressuspensas em 2 mL de solução RF II (10 mM Na-MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl₂.2H₂O; 15% glicerol; pH 6,8). A suspensão bacteriana foi distribuída em alíquotas de 100 µL por microtubo. Todos os procedimentos foram realizados em condição estéril e mantendo as células refrigeradas.

3.7.2. Eletrocompetentes:

Para as células de *C. crescentus* tornarem-se eletrocompetentes, uma cultura da linhagem NA1000 foi crescida em 20 mL de meio PYE a 30°C pernoite. Posteriormente, foi diluída em 100 mL de PYE para uma DO₆₀₀ 0,2 a 30°C e mantida sob agitação até um DO₆₀₀ entre 0,6 a 0,8. As células foram então precipitadas por centrifugação durante 13 minutos, a 4°C e 7000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o rendimento bacteriano foi ressuspendido em 100 mL de glicerol 10% gelado, para novamente ser centrifugado a 7000 x g por 13 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspendido em 50 mL de glicerol 10% gelado e centrifugar 7000 x g por 13 minutos a 4°C e lavar e ressuspender em 5 mL de glicerol 10% gelado. A suspensão bacteriana foi distribuída em alíquotas de 100 µL por microtubo e estocar a -80°C.

3.8. Transformação de células de *E. coli* competentes por choque térmico.

Para a realização da transformação bacteriana, primeiramente as células competentes mantidas a -80°C foram descongeladas em gelo por 15 minutos. As transformações de *E. coli* ocorreram por choque térmico de 50 µL de cultura competente com no máximo 5 µL do DNA de interesse. Esta mistura foi mantida por 30 minutos em gelo, e então submetida ao choque térmico por 2 minutos a 42°C e em seguida mantida por mais 5 minutos em gelo. Após este período, 500 µL de meio LB foram adicionados e os microtubos foram mantidos a 37°C por 1 hora. Ambas as linhagens DH5α, DH10β e S17-1 de *E. coli* foram utilizadas em experimentos de transformação. Porém, a linhagem DH5α foi utilizada para ensaios de clonagem, e a linhagem S17-1 para posterior inserção de construções em *C. crescentus*, por conjugação. Após a recuperação das células, as

bactérias foram distribuídas em placas de LB acrescidas com o antibiótico apropriado e incubadas a 37°C por 16 horas.

3.9. Transformação de células competentes de *C. crescentus* por eletroporação.

Para a realização da transformação de *C. crescentus* eletrocompetente, primeiramente as células mantidas a -80°C foram descongeladas em gelo por 15 minutos. A eletroporação de 50 µL da cultura competente com no máximo 5 µL do plasmídeo de interesse foi realizada em cubetas de 0,1 mm a 1,8 kV, 200 Ω e 25 µFD. Após da eletroporação, as células foram inoculadas em 1 mL de meio PYE e incubadas a 30°C durante 2 horas. Após a incubação, a cultura e o controle foram semeados em placas de Petri com meio PYE contendo o antibiótico apropriado, e incubadas a 30°C por 48 horas.

3.10. Conjugação.

A linhagem doadora de *E. coli* S17-1 foi utilizada para introdução de plasmídeos conjugativos nas linhagens de *C. crescentus*. Ambas as linhagens foram previamente semeadas em meio sólido, e estas foram misturadas na proporção de aproximadamente 1:2 de *E. coli* S17-1 e *C. crescentus*, respectivamente, em placa de Petri contendo meio PYE sólido, e mantidas a 30°C por aproximadamente 16 horas. Após este período, a mistura bacteriana foi transferida para placas contendo PYE sólido acrescido de ácido nalidíxico, visando eliminar as células de *E. coli* (sensíveis a este antibiótico) e promover somente o crescimento de células de *C. crescentus* que são resistentes a este antibiótico. Além disto, adicionamos também ao meio um antibiótico específico, ao qual o plasmídeo conferia resistência com a finalidade de selecionar somente as células de *C. crescentus* que receberam o plasmídeo por conjugação.

3.11. Construção de cepas mutantes.

Para a construção das cepas utilizadas empregamos basicamente duas diferentes metodologias, descritas abaixo.

3.11.1. Construção das cepas mutantes *mutY* e *CCNA_02417* pelo método de deleção em fase.

A cepa mutante para o gene *mutY* (*CCNA_00381*) foi construída pelo método de deleção em fase, utilizando-se construções derivadas do vetor pNPTS138. Para construir estes plasmídeos, amplificamos dois fragmentos a partir do DNA genômico da cepa parental NA1000 por PCR com os oligonucleotídeos mutY5 x mutY2 e mutY3 x mutY4 (Tabela 5), obtendo regiões flanqueadoras do gene a ser deletado, sendo que o primeiro fragmento continha a porção inicial do gene somado a algumas centenas de pares de bases à 5' deste, e o segundo fragmento continha a porção final do gene juntamente com algumas centenas de bases à extremidade 3' deste. Nas extremidades dos oligonucleotídeos inserimos sítios de enzimas de restrição específicos, *Bam*HI e *Hind*III, respetivamente. Os dois fragmentos foram misturados e amplificados por PCR com os oligonucleotídeos externos (mutY5 x mutY3) e clonados no vetor pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA). O mesmo procedimento foi realizado para *CCNA_02417* com os oligonucleotídeos 2332A x 2332B e 2332C x 2332D (Tabela 5). Após sequenciamento para verificar a integridade do DNA clonado, com o auxílio dos sítios de restrição introduzidos nos oligonucleotídeos, os fragmentos correspondentes às porções flanqueadoras 5' e 3' do gene foram removidos do vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA) e subclonados no vetor suicida para *Caulobacter*, pNPTS138, produzindo uma deleção em fase. Este vetor se integra no genoma por meio de eventos de recombinação homóloga, e confere resistência à canamicina por possuir o gene *nptI*, e sensibilidade a sacarose por carregar o gene *sacB*, que converte este metabólito em um produto polimérico tóxico. As construções derivadas do vetor pNPTS138 foram inseridas através de transformação por eletroporação na cepa de *C. crescentus* eletrocompetente.

Após a transformação, o primeiro evento de recombinação homóloga foi selecionado através da semeadura das células em placas de PYE acrescido com canamicina (5 µg/mL) e incubação a 30°C por 48 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi removida e inoculada em 1 mL de PYE líquido, sem antibiótico, e incubada por 24 horas a 30°C. A perda do plasmídeo após o segundo evento de recombinação homóloga foi selecionada através do crescimento das culturas em placas de PYE contendo 3% de sacarose. Nesta etapa, somente as células que sofreram um segundo evento de recombinação serão capazes de formar colônias na presença de sacarose. Logo estas colônias foram semeadas em placas de PYE acrescido de canamicina e PYE acrescido de sacarose. Os clones recombinantes candidatos a possuírem a disrupção gênica desejada (Kan^S Sac^R) foram confirmados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, e os tamanhos dos amplicons foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmação das deleções gênicas.

3.11.2. Construção da cepa mutante *CCNA_02418* pela interrupção da região codificantes pelo de cassete de resistência a espectinomicina.

A cepa mutante para o gene *CCNA_02418* foi construída utilizando-se a construção p02418::Spec^R. Para estas construção, amplificamos a partir do DNA genômico da cepa parental NA1000 por PCR com os oligonucleotídeos da tabela 5, obtendo dois fragmentos flanqueadores ao gene a ser deletado, sendo que o primeiro fragmento continha a porção inicial do gene somado a algumas centenas de pares de bases à 5' deste, e o segundo fragmento continha a porção final do gene juntamente com algumas centenas de bases à extremidade 3' deste. Todos os fragmentos obtidos por PCR foram primeiramente clonados no vetor pGEM-T easy (Promega) e sequenciados, visando garantir a integridade das sequências nucleotídicas de nossas construções. Com o auxílio dos sítios de restrição introduzidos nos oligonucleotídeos, os fragmentos correspondentes às porções flanqueadoras 5' e 3' de cada gene foram digeridos do vetor de clonagem pGEM-T easy com as enzimas de restrição (*Hind*III e *Xho*I) e subclonados no vetor suicida pNPTS138. O plasmídeo pNPTS138-Δ*CCNA_02418* então foi digerido

com a enzima *EcoRI*, cujo sítio estava presente no interior do gene deletado, para a posterior inserção do cassete de resistência espectinomicina obtido a partir do vetor pHP45Ω. Após a transformação, o primeiro evento de recombinação homóloga foi selecionado através da semeadura das células em placas de PYE acrescido de canamicina (5 µg/mL), 50 µg/mL espectinomicina e 50 µg/mL estreptomina, e posterior incubação a 30°C por 48 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi removida e inoculada em 1 mL de PYE líquido, sem antibiótico, por 24 horas a 30°C. A perda do plasmídeo após o segundo evento de recombinação homóloga foi selecionada através do crescimento das culturas em placas de PYE contendo 3% de sacarose, 50 µg/mL espectinomicina, 50 µg/mL estreptomina. Nesta etapa, somente as células que sofreram um segundo evento de recombinação serão capazes de formar colônias na presença de sacarose. Logo estas colônias foram semeadas em placas de PYE acrescido com canamicina e PYE acrescido com sacarose, espectinomicina e estreptomina. Os clones recombinantes candidatos (Kan^S, Sac^R,Spec/Str^R) foram analisados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, e os tamanhos dos amplicons foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmação da inserção do cassete de resistência a espectinomicina.

3.11.3. Construção de cepas bacterianas por transdução com o bacteriófago ΦCr30.

As cepas *mutM::ΩSpec^R*, *dnaE2::ΩSpec^R* e *CCNA_02418::ΩSpec^R* foram inoculadas em meio líquido PYE acrescido com espectomicina e as cepas *mutY::Tn5* e *uvrA::Tn5* em canamicina para logo ser incubadas a 30°C por 16 horas sob agitação. Em seguida, uma alíquota de 200 µL foi retirada deste inóculo e transferida para um microtubo contendo 100 µL de fago ΦCr30 (10³-10⁴ pfu/mL). Esta reação foi mantida a 30°C por 30 minutos, e, posteriormente, transferida para 3 mL de PYE top ágar (3% ágar) enriquecido com 1 mM de MgSO₄ a 40°C. A mistura foi então vertida em placa de PYE, e mantida a 30°C por cerca de 48 horas. Após este período, removemos a camada de top ágar contendo as placas de lise, lavamos a placa de petri com solução tampão λ (NaCl 5

mM; MgSO₄ 16 mM; 5 mM Tris-HCl pH 7,5 e 0,01% gelatina), e transferimos o resíduo da lavagem e ágar para um tubo tipo falcon (50 mL) contendo 100 µL de clorofórmio. O tubo foi agitado por alguns minutos e centrifugado a 9000 x g por 10 minutos. Após este período, o sobrenadante foi removido, transferido para uma placa de petri estéril e submetido à irradiação (216 J/m²) por luz UVC para eliminação das células bacterianas e inativação dos fagos. Os lisados celulares contendo as partículas transdutoras (Φ Cr30*mutM*:: Ω Spec^R, Φ Cr30*dnaE2*:: Ω Spec^R, Φ Cr30CCNA_02418:: Ω Spec^R, Φ Cr30*uvrA*::Tn5 e Φ Cr30*mutY*::Tn5) foram estocados a 4°C até o momento do uso.

Para transdução, as linhagens de interesse foram inoculadas em PYE e mantidas por aproximadamente 16 horas a 30°C. Uma alíquota de 500 µL destas culturas foi transferida para tubo contendo 500 µL de PYE líquido e 50 µL do fago a transduzir (10⁷ pfu/mL), e os tubos foram incubados a 30°C por 4 horas sob agitação. Os inóculos foram então semeados em placas de PYE contendo o antibiótico apropriado, e mantidos a 30°C por 48 horas. Após este período, verificamos a formação de colônias isoladas nestas placas. Três colônias isoladas a foram inoculadas em PYE líquido acrescido com antibiótico apropriado e, incubadas por 16 horas a 30°C e posteriormente congeladas conforme descrito na seção 3.2. Os fagos utilizados na construção de mutantes encontram-se descrito na Tabela 2.

3.11.4. Clonagem dos genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418* para experimentos de complementação.

As regiões codificantes de *CCNA_02417* e *CCNA_02418* e a região à montante contendo os seus promotores putativos foram clonados nos vetores de baixo número de cópias pMR20 e pRVMCS5, respectivamente, para a complementação dos respectivos mutantes. *CCNA_02417* foi amplificado usando a enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) com os primers 2332A e 2332D, e o fragmento foi clonado inicialmente no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) e sequenciado para verificar a sua integridade. O fragmento foi subclonado em pMR20 usando os sítios de restrição *EcoRI* e *HindIII* introduzidos nos primers,

produzindo o vetor pMR2417, que contém o gene *CCNA_02417* e sua região promotora. O gene *CCNA_02418* e a região DUF4130 deste gene foram amplificados a partir do mutante *CCNA_02417* com os primers pRVMCS5-2333-com.Fw X pRVMCS5-2333-com.Rv e pRVMCS5-DUF Fw X pRVMCS5-DUF Rv, respectivamente, e clonados usando In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio USA, Inc.) no vetor pRVMCS5 conforme as especificações do fabricante produzindo os vetores pRV2418 e pRVDUF4130. As construções para complementação foram transformadas na cepa S17-1 de *E. coli* para posteriormente serem transferidas para *C. crescentus* por conjugação. A seleção foi realizada pela marca de resistência dos plasmídeos (tetraciclina) e ácido nalidíxico, para eliminar as células de *E. coli* doadoras.

3.12. Teste flutuação para determinação de mutagênese espontânea.

A determinação das taxas de mutação foi feita utilizando-se testes de flutuação (ROSCHE; FOSTER, 2000). Estes consistem em determinar as frequências de mutantes (número total de mutantes por células viáveis) em várias culturas independentes. Nestes ensaios as linhagens de interesse de *C. crescentus* foram cultivadas em PYE por cerca de 16 horas a 30°C (até a saturação). Posteriormente, as células foram diluídas em PYE para aproximadamente 10^2 células/mL, em 11 sub-cultivos de 1 mL realizados em tubos de 15 mL de fundo redondo. Estes foram então mantidos por 48 horas a 30°C sob agitação. Após este cultivo, o número de células viáveis foi determinado por diluição seriada e plaqueamento em meio PYE. O número de mutantes presentes em cada uma das culturas foi determinado através do plaqueamento em meio PYE contendo rifampicina (50 µg/mL) e contagem de Rif^R UFC após 48 horas.

Para a cepa de *E. coli* selvagem e mutante duplo *mutM mutY*, alíquotas de 200 µL e 50 µL de célula foi espalhada em placas LB contendo rifampicina (100 µg/MI) para selecionar mutantes Rif^R, respectivamente, e as diluições seriadas foram plaqueadas em meio LB para determinar o número de células viáveis. Estes números foram utilizados para calcular as taxas de mutação, utilizando-se o método de Maximum Likelihood, com auxílio da ferramenta da web Flucalc (RADCHENKO et al., 2018).

3.13. Ensaio de sobrevivência e de indução da mutagênese com o azul de metileno (AM).

As linhagens de interesse de *C. crescentus* foram submetidas ao tratamento com azul de metileno 2,5 µM e irradiadas com luz branca por 10 min. Para estes ensaios, culturas de *C. crescentus* foram incubadas em PYE líquido a 30°C por cerca de 16 horas sob agitação, e diluídas em 15 mL PYE para DO₆₀₀ equivalente a 0,1. Os inóculos foram então mantidos nas mesmas condições até alcançarem fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ entre 0,4 a 0,5), para serem então expostas ao tratamento. Foram separados dois sub- cultivos de 5 mL em tubos de 15 mL de fundo redondo. As culturas foram centrifugadas a 7000 x g por 13 minutos e o sedimento foi ressuscitado em 5mL da solução tampão M2 (M2 sais 10x (NH₄Cl, NaHPO₄, K_{H2}PO₄), FeSO₄ 1 mM, MgSO₄ 1 M, CaCl₂ 1 M), a um tubo foi adicionado 2,05 µL de uma solução estoque de azul de Metileno (AM) 6,1 mM e transferidos para uma placa de Petri estéril e expostos a luz branca por 10min no UV/White Light Transilluminator SPECTROLINE BI-O-VISON. Como controle, uma cultura foi exposta à luz branca em ausência de azul de metileno. Após os tratamentos, as células foram diluídas e semeadas em meio de cultura, e incubadas a 30°C por 48h para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). O percentual de sobrevivência era calculado em relação ao número de colônias obtidas com o plaqueamento da cultura não tratada.

Para o ensaio de mutagênese, duplicatas de 500 µL das culturas tratada e não tratada foram inoculadas em tubos de 1,7 mL e centrifugadas a 16 000 x g por 3 minutos. O sobrenadante com o azul de metileno foi removido, e o sedimento foi lavado com 500 µL de PYE e novamente centrifugado a 16 000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi removido, o sedimento foi ressuscitado em 2 mL de PYE em tubos de 15 mL de fundo redondo, e as células foram cultivadas a 30°C sob agitação até a saturação. Após estes cultivos, o número de células viáveis foi determinado por diluição seriada e plaqueamento em meio PYE. O número de mutantes presentes em cada uma das culturas foi determinado através de plaqueamento em meio PYE contendo rifampicina (50 µg/mL) e contagem de Rif^R UFC após 48 horas.

3.14. Experimentos para determinação da curva de crescimento.

As culturas saturadas de *C. crescentus* foram diluídas para uma densidade ótica (DO₆₀₀) de 0,1 em meio PYE, e 2 mL de cada cultura celular foram incubados em duplicatas em placas Nunc 12-Well Plate, Round (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) com agitação constante a 30°C, usando a Plataforma SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices), que registrava periodicamente a DO₆₀₀ das culturas.

3.15. Ensaio de sensibilidade a peróxido de hidrogênio.

As culturas de *C. crescentus* foram cultivadas até a fase exponencial (DO₆₀₀ 0,4), cada cultura bacteriana foi espalhada em meio PYE com um *swab* estéril, assegurando uma boa distribuição do inóculo na superfície do meio. Discos estéreis de papel-filtro com 10 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 1 M foram colocados em placas e incubados a 30°C por 48 horas. Os halos de inibição de crescimento foram medidos (cm) para cada cultura. Foram realizados quatro experimentos independentes para cada linhagem.

3.16. Análise de expressão gênica.

A extração de RNA de células em crescimento exponencial foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, USA). Para a síntese de cDNA, aproximadamente 3 µg de RNA foram tratados com 3 unidades de DNase I (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) seguindo as instruções do fabricante. As alíquotas de RNA foram utilizadas para a síntese de cDNA em 20 µL de reação utilizando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) para RT-PCR. Os cDNAs foram usados como moldes para reações de qPCR usando a Power SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA), para expressão relativa de *mutM* e *mutY* em fase exponencial (OD₆₀₀ 0,4) e fase exponencial (OD₆₀₀ 0,4) tratada com azul de metileno (2,5 µM) na presença de luz branca (Transiluminador UV/Luz Branca SPECTROLINE BI-O-VISON) por 10 minutos. O gene *dnaQ* foi utilizado como controle

endógeno para o cálculo da expressão relativa. Experimentos de qRT-PCR foram realizados em triplicatas técnicas com cDNAs obtidos usando a plataforma StepOne Plus (Applied Biosystems). As análises foram realizadas no programa Step One Software v. 2.2.1. Os primers usados nesta análise estão listados na Tabela 6.

Tabela 6 – Primers utilizados para experimentos de qRT-PCR.

Primers	Sequencia (5'→3')	Proposito
mutMfow	TGCACCGATCCGGTATCTC	RT-PCR (<i>mutM</i>)
mutMrev	CCGCTTCTTCGCGATGTT	RT-PCR (<i>mutM</i>)
mutYfow	GTCTGGCTGTCGGAGGTGAT	RT-PCR (<i>mutY</i>)
mutYrev	TGGGTGAAGCTCAGGAAATAGG	RT-PCR (<i>mutY</i>)
dnaQfow	CGAGCTGGAGAAATGCCGCAA	RT-PCR (<i>dnaQ</i>)
dnaQrev	AGTTGTACATGCCCGGGAAGC	RT-PCR (<i>dnaQ</i>)

3.17. Medição dos níveis 8-oxoguanina no DNA.

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de culturas em crescimento exponencial com DO₆₀₀ 0,4, utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Madison, WI, EUA.) conforme as especificações do fabricante, sendo que as soluções foram acrescidas de desferroxamina 0,1 mM e o precipitado de DNA foi coletado e lavado cuidadosamente com isopropanol 100%, isopropanol 60% e etanol 70%, nessa ordem. O sedimento de DNA foi ressuspensionado em 100 µL de água com 0,1 mM desferroxamina. A concentração e pureza foram determinadas, respectivamente, pela leitura da absorbância a 260 nm e pela relação Abs₂₆₀/Abs₂₈₀.

Os DNAs extraídos foram processados para medição de 8-oxoguanina por cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massa em tandem com ionização por eletropulverização (HLPC-ESI-MS/MS) no laboratório da Profa. Marisa de Medeiros, do Instituto de Química da USP, pela aluna Mariane Leichsenring Schulz.

3.18. Ensaios de sobrevivência à luz UV-C.

As linhagens de *C. crescentus* foram incubadas em PYE líquido a 30°C por cerca de 16 horas sob agitação, e diluídas em PYE para DO₆₀₀ equivalente a 0,1. Os inóculos foram então mantidos nas mesmas condições por aproximadamente 3 horas até alcançarem fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ entre 0,4 a 0,5). Foram separados dois sub- cultivos de 5 mL em tubos de 15 mL de fundo redondo. As culturas foram centrifugadas a 7000 x g por 13 minutos e o sedimento foi ressuscitado em 5 mL da solução tampão M2 (M2 sais 10x, FeSO₄ 1 mM, MgSO₄ 1 M, CaCl₂ 1 M), as bactérias foram irradiadas em doses crescentes de UVC com uma lâmpada germicida Philips TUV 15W/G15T8 (emissão de 254nm). Sendo 0, 50, 100 e 200 J/m² para as linhagens selvagem, Δ CCNA_02417 e Δ CCNA_02418. As linhagens deficientes no gene *uvrA* foram irradiadas com 0, 2,5, 5 e 10 J/m². Alíquotas foram removidas antes e depois da irradiação, após as células foram diluídas e semeadas em meio de cultura, e incubadas a 30°C por 48h para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e cálculo da fração de sobreviventes. Este cálculo foi realizado em relação ao número de UFCs obtidas nas placas das culturas sem irradiar. Todos estes procedimentos foram realizados minimizando a exposição das culturas a luz visível, para evitar a fotorreativação.

3.19. Ensaios de mutagênese induzida por luz UV-C.

Para o ensaio de mutagênese, alíquotas de 200 µL das linhagens irradiadas com 50 J/m² de UV-C como descrito acima foram inoculadas em 1 mL de meio PYE e mantidas a 30°C por um pernoite para permitir a saturação das culturas e fixação das mutações. Em seguida, as culturas foram submetidas a diluições seriadas e semeadas em meio PYE para contagens de células viáveis. As culturas também foram semeadas em meio PYE contendo 100 mg/mL de rifampicina para selecionar as células mutantes Rif^R. As frequências de mutantes foram calculadas dividindo o número de mutantes pelo número total estimado de células analisadas nos experimentos.

3.20. Ensaios de imuno slot-blot para determinação de lesões por luz UV-C.

Ensaios de slot-blot foram realizados para determinar os níveis de danos do tipo CPD em células não irradiadas e irradiadas com 10 J/m^2 . Estes ensaios foram desenvolvidos em colaboração com o Prof. Carlos Menck. As linhagens *uvrA*, *uvrA CCNA_02417* e *uvrA CCNA_02418* foram incubadas em PYE líquido a 30°C por cerca de 16 horas sob agitação, e diluídas em 40 mL de PYE para DO_{600} equivalente a 0,1. Os inóculos foram então mantidos nas mesmas condições por aproximadamente 3 horas até alcançarem fase exponencial de crescimento (DO_{600} entre 0,4 a 0,5). Foram separados 30 mL das culturas em tubos de 50 mL de fundo cônico. As culturas foram centrifugadas a $7000 \times g$ por 13 minutos e o sedimento foi ressuscitado em 30 mL da solução tampão M2 (M2 sais 10x, FeSO_4 1 mM, MgSO_4 1 M, CaCl_2 1 M). Antes da irradiação, uma alíquota de 5 mL de cultura foi tomada para a extração de DNA, então as culturas foram irradiadas com UV-C. Após a irradiação foi tomada outra alíquota de 5 mL de cultura para extração de DNA, e o resto da cultura foi centrifugada a $7000 \times g$ por 13 minutos e o sedimento foi ressuscitado em 30 mL de PYE, para tomar alíquotas de 5 mL após 30, 60 e 120 minutos de incubação, de forma a se medir o reparo dos fotoprodutos ao longo do tempo nas diferentes linhagens. Os DNAs de todas as amostras foram extraídos com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Madison, WI, USA) e quantificados com Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA).

O volume correspondente à 200 ng de DNA de cada amostra foi então diluído em TE para um volume final de 100 μL . Estes foram então desnaturados (100°C por 10 minutos), transferidos imediatamente para o gelo e acrescidos de 100 μL de NH_4OAc 2 M. Os DNAs foram transferidos para uma membrana de Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare Life Sciences) que foi mantida previamente junto a dois papéis do mesmo tamanho (Blotting Paper Hybond, Amersham 20 x 20 cm) em solução de NH_4OAc 1M por 5 minutos. Para esta transferência, a membrana de nitrocelulose foi primeiramente acoplada a um aparato de acrílico, e o conjunto foi parafusado a uma base, criando-se vácuo. As suspensões contendo DNA foram depositadas nas fendas deste aparato. Nas canaletas vazias (sem DNA) foram adicionados 200 μL de NH_4OAc 2 M. Todo o volume foi sugado da membrana com o auxílio de bomba de vácuo, e a membrana foi retirada do

aparato e mantida em solução SSC 5X (NaCl 750 mM; 75 mM citrato de sódio) por 15 minutos a temperatura ambiente. A membrana foi então mantida em papel absorvente por 15 minutos para completa secagem, e incubada a 80°C por 1 hora.

Posteriormente, a membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo PBS 1X (NaCl 137 mM; 2,7 mM KCL; Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM) e 5% de leite em pó por uma noite a 4°C sob agitação leve. Após este período, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-CPD monoclonal antibody, clone TDM-2; (Cosmo Bio Co. Ltda.) diluído 1:2000 em solução de bloqueio por 1 hora a 37 °C sob agitação leve. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes durante 5 minutos em PBS 1X acrescido com 0,1% de Tween 20 e 1 vez durante 5 minutos em PBS 1X, e incubada por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário Peroxidase Labelled anti-mouse IgG (whole molecule) R-Phycoerythrin antibody produced in goat (SIGMA-ALDRICH, Inc.) diluído 1:5000 em solução de bloqueio. Após este período, a membrana foi lavada como descrito anteriormente, e exposta a reações de quimiluminescência utilizando o reagente Immobilon Forte Western HRP substrate (Millipore, USA); o sinal luminoso é gerado pela oxidação do luminol presente no reagente pela enzima HRP, conjugada ao anticorpo secundário. As bandas foram visualizadas através do equipamento Alliance Q9 Advanced (UVITEC, Cambridge, UK), e quantificadas com ajuda do programa ImageJ.

4. RESULTADOS.

4.1. Estudo do reparo de 8-oxoguanina em *C. crescentus*.

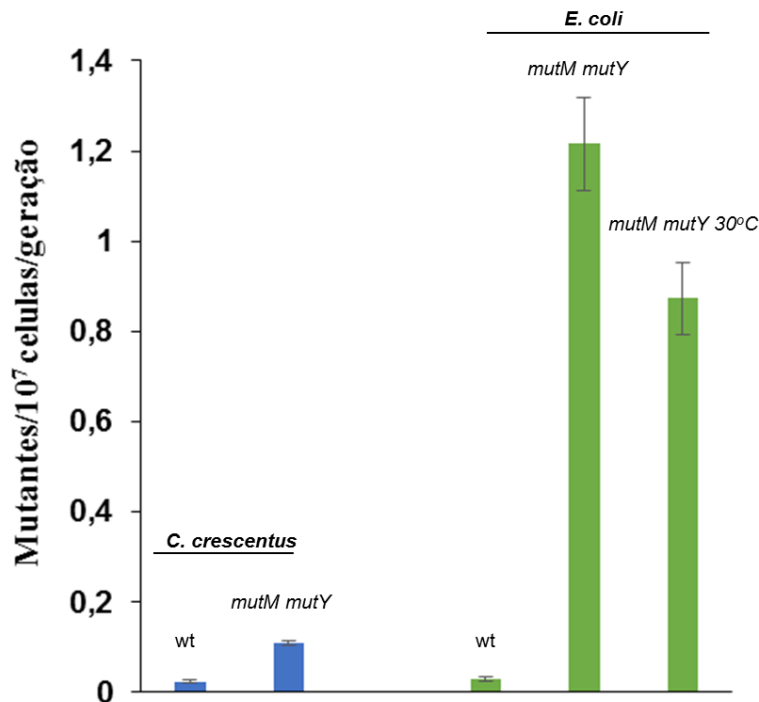
4.1.1. A falta de *mutM* e *mutY* confere um fenótipo mutador leve a *C. crescentus*.

Estudos prévios identificaram o mutante *mutY* em uma triagem de mutantes em *C. crescentus*. No entanto, se observou que o fenótipo mutador apresentado por essa linhagem é modesto quando comparado aos dados de *E. coli* da literatura (MARTINS-PINHEIRO et al., 2017). Para explorar melhor os efeitos biológicos da 8-oxoguanina gerada espontaneamente em *C. crescentus*, foi construído o mutante duplo *mutY mutM*, e

comparamos as taxas de mutação espontânea com a linhagem de *E. coli* com o mesmo genótipo, usando o mesmo marcador de mutagênese (mutações Rif^R em *rpoB*).

Os resultados mostrados na Figura 15 indicam que a falta das glicosilases do sistema GO tem consequências biológicas muito diferentes em *E. coli* e *C. crescentus*. A falta combinada dos genes *mutM* e *mutY* resulta em um aumento de ~50 vezes nas taxas de mutação espontânea em *E. coli*, mas apenas um aumento de 5 vezes na mutagênese em *C. crescentus*, a despeito de taxas de mutação espontânea muito semelhantes nas linhagens selvagens. Este resultado é mais surpreendente devido do maior conteúdo G+C de *C. crescentus*: 67,2%, comparado a 50,8% em *E. coli* (BLATTNER et al., 1997; MARKS et al., 2010). Uma razão possível para esta discrepância seria a temperatura ótima de crescimento mais baixa para *C. crescentus*, dado que a temperatura pode influenciar na taxa de formação de 8-oxoguanina (BRUSKOV et al., 2002). Portanto, foram realizados experimentos para medir a mutagênese espontânea no mutante *mutM mutY* de *E. coli* crescido a 30°C, e encontramos apenas uma pequena redução nas taxas de mutação (~30%) em comparação com os resultados a 37°C, o que não justifica completamente a diferença observada de 10 vezes entre *E. coli* e *C. crescentus* deficientes em *mutM* e *mutY*.

Figura 15 – Efeito da deficiência de *mutM mutY* nas taxas de mutação espontânea em *E. coli* e *C. crescentus*.



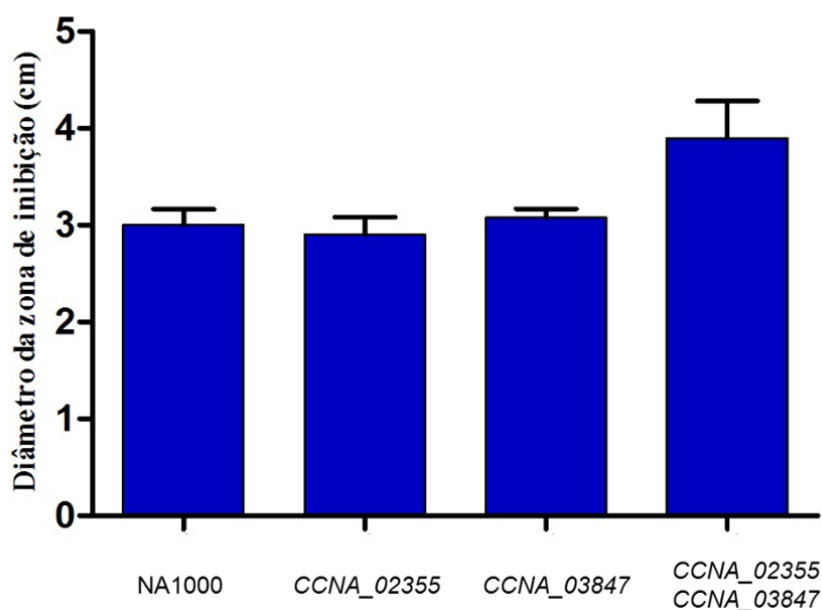
Os dados representam a média de pelo menos 3 experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão da média. A significância estatística foi avaliada com o teste de Mann Whitney (diferença significativa, $P < 0,05$), com os seguintes resultados para as comparações relevantes: *C. crescentus* wt X *mutM mutY*, $P=0,003$; *E. coli* wt X *mutM mutY*, $P=0,0286$; *E. coli mutM mutY* X *E. coli mutM mutY* 30°C, $P= 0,0286$.

4.1.2. A baixa mutagênese espontânea na ausência dos genes *mutM* e *mutY* não se deve à interação com outras vias de reparo de DNA.

Uma possível explicação para o fenótipo moderado do mutante duplo *mutM mutY* de *C. crescentus* seria a participação de outras vias de reparo do DNA como NER e MMR no reparo da 8-oxoguanina (CZECZOT et al., 1991; SAITO et al., 1997; NI; MARSISCHKY; KOLODNER, 1999; JOHNSON et al., 2004). O genoma de *C.*

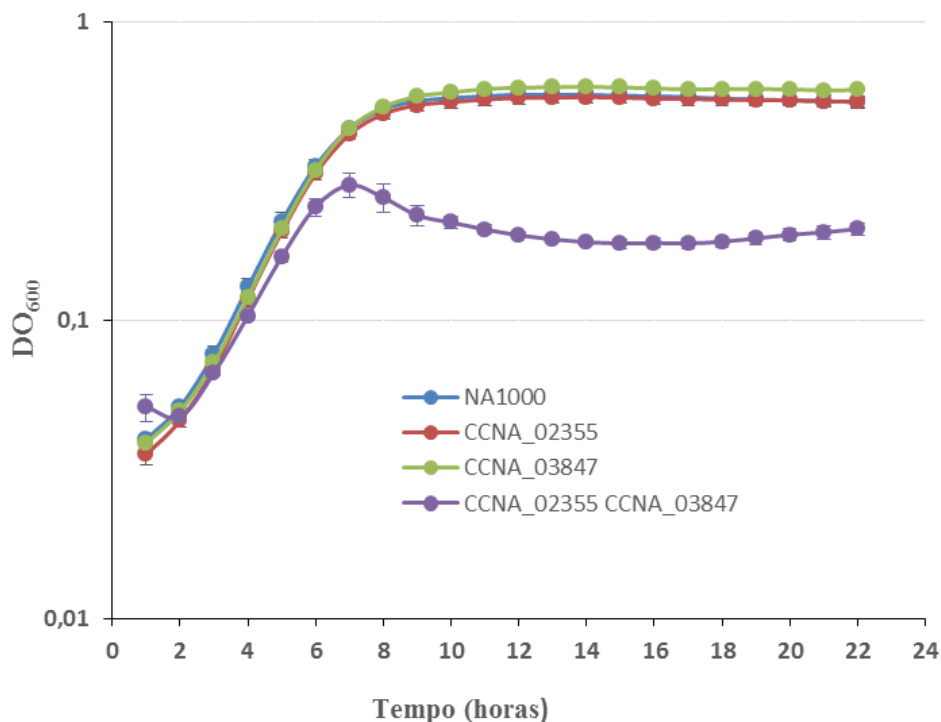
crenscentus possui dois genes que codificam glicosilases de DNA da superfamília Endo III, *CCNA_02355* e *CCNA_03847*. O primeiro é um gene regulado por SOS, sem função biológica atribuída, e o segundo é mais semelhante ao homólogo de *E. coli* (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007; DA ROCHA et al., 2008; MODELL; HOPKINS; LAUB, 2011). Foi construído o mutante duplo *CCNA_02355 CCNA_03847*, que apresentou um fenótipo de maior sensibilidade ao peróxido de hidrogênio do que os mutantes simples e a linhagem selvagem (Figura 16). Além disso, o mutante duplo mostra um crescimento pobre em meio líquido (Figura 17), indicando que estes genes têm um papel combinado na proteção contra lesões citotóxicas no DNA.

Figura 16 – Sensibilidade ao peróxido de hidrogênio dos mutantes *nth*.



Os dados representam a média de 4 experimentos independentes para cada linhagem. As barras de erro indicam o erro padrão da média. Os valores foram obtidos medindo a zona de inibição causada por 1 M H_2O_2 . A significância estatística foi avaliada com o teste t (diferença significativa, $P < 0,05$), com os seguintes resultados: NA1000 X *CCNA_02355*, $P=0,4454$, NA1000 X *CCNA_03847*, $P=0,4583$, NA1000 X *CCNA_02355 CCNA_03847*, $P=0,0050$; *CCNA_02355* X *CCNA_02355 CCNA_03847*, $P=0,0033$; *CCNA_03847* X *CCNA_02355 CCNA_03847*, $P=0,0058$.

Figura 17 – Curva de crescimento dos mutantes *nth*.

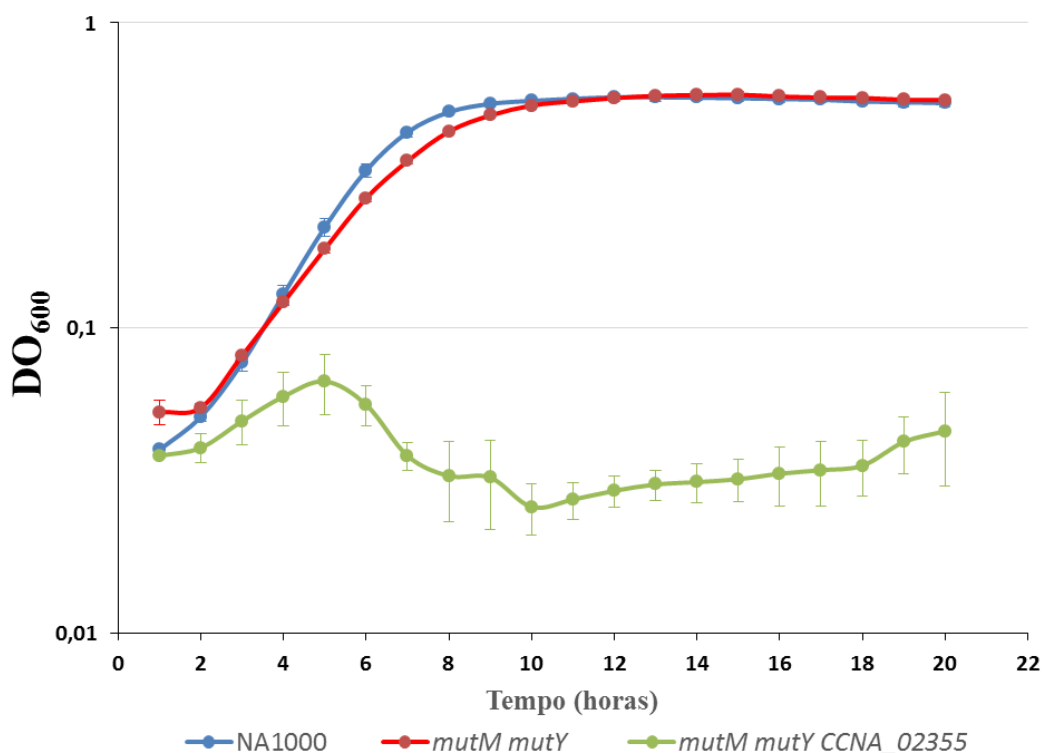


Os resultados representam a média de quatro experimentos independentes para todas as linhagens. As barras de erro indicam o erro padrão da média.

Dado que as glicosilases Endo III podem estar envolvidas no reparo de 8-oxoG em outros organismos (MATSUMOTO et al., 2001), nós prevemos que, se este fosse o caso, a deleção de genes codificadores de Endo III deveria conferir um aumento sinérgico nas taxas de mutação quando combinado com uma mutação *mutY*, da mesma forma como observado para *mutM* e *mutY* em *E. coli*. O plano original era realizar uma análise dos mutantes triplos *mutM mutY CCNA_02355* e *mutM mutY CCNA_03847*, e também do mutante quádruplo *mutM mutY CCNA_02355 CCNA_03847*. Entretanto, limitamos a nossa análise aos mutantes duplos *CCNA_02355 mutY* e *CCNA_03847 mutY*, dada a baixa viabilidade do duplo mutante *CCNA_02355 CCNA_03847* descrita acima, o que torna a construção e análise de mutantes triplos complicada. Além disso, o mutante triplo *CCNA_02355 mutY mutM* também apresenta crescimento pobre em meio líquido, nunca

atingindo a saturação total (Figura 18). Este mutante triplo, embora obtido como pequenas colônias viáveis durante a construção da linhagem, exibia pouco crescimento em cultivo subsequente em meio líquido. Portanto, não realizamos nenhuma análise em triplos ou quádruplos mutantes.

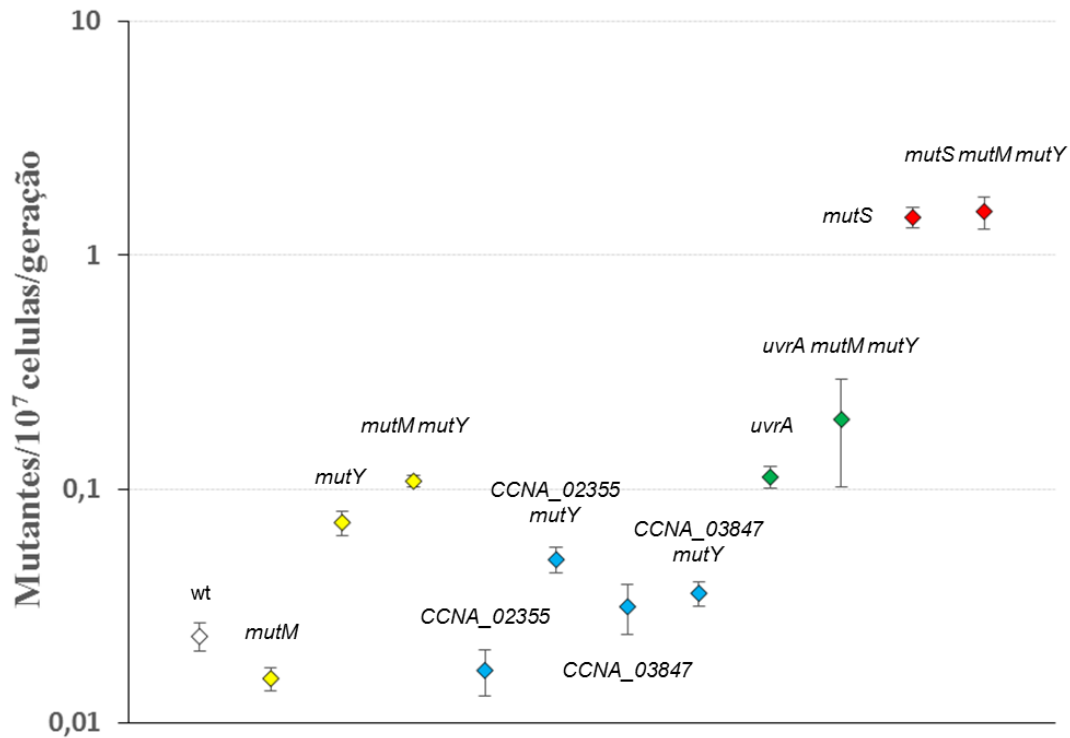
Figura 18 – Análise da curva de crescimento do triplo mutante *mutY* *mutM* *CCNA_02355*.



Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes para todas as linhagens. As barras de erro indicam o erro padrão da média.

A análise das taxas de mutação mostra uma ação combinada de *mutM* e *mutY* (Figura 19). O mesmo não pode ser observado para as deleções do gene *CCNA_02355* e *CCNA_03847*, que não aumentam as taxas de mutação quando combinadas com a deficiência de *mutY*. Portanto, é improvável que os homólogos de Endo III desempenhem qualquer papel no reparo da 8-oxoguanina, embora estejam claramente envolvidos na proteção contra danos citotóxicos, conforme mostrado nas Figuras 16 e 17

Figura 19 – Taxas de mutação espontânea de mutantes em vários genes de reparo de DNA de *C. crescentus*.



Os dados representam a média de pelo menos 3 experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão da média. A significância estatística foi avaliada com o teste de Mann Whitney (diferença significativa, $P < 0,05$), com os seguintes resultados para as comparações relevantes: wt X *mutM*: $P=0,15$; wt x *mutY*, $P=0,0036$; wt X *CCNA_02355*, $P=0,22$; wt X *CCNA_03847*, $P=0,42$; wt X *uvrA*, $P=0,081$; wt X *mutS*: $P=0,0027$; *mutY* X *CCNA02355 mutY*: $P=0,1143$; *mutY* X *CCNA03847 mutY*: $P= 0,0081$; *uvrA mutM mutY* X *mutM mutY*: $P=0,7$; *mutS mutM mutY* X *mutM mutY*: $P= 0,5556$.

Também testamos se o reparo de excisão de nucleotídeos (NER) e o sistema de reparo de mal emparelhamento (MMR) poderiam desempenhar um papel na prevenção da mutagênese espontânea devido à 8-oxoguanina. Para este propósito, construímos os mutantes triplos *uvrA mutM mutY* e *mutS mutM mutY*. Os resultados representados na Figura 19 mostram uma falta de aumento na mutagênese nos triplos mutantes quando comparados com os fenótipos do respectivo mutante único (*uvrA* x *uvrA mutM mutY* e

mutS X *mutS mutM mutY*). Portanto, concluímos que a baixa mutagênese observada no mutante duplo *mutM mutY* não se deve a NER ou MMR atuando como sistemas alternativos para o reparo de 8-oxoguanina.

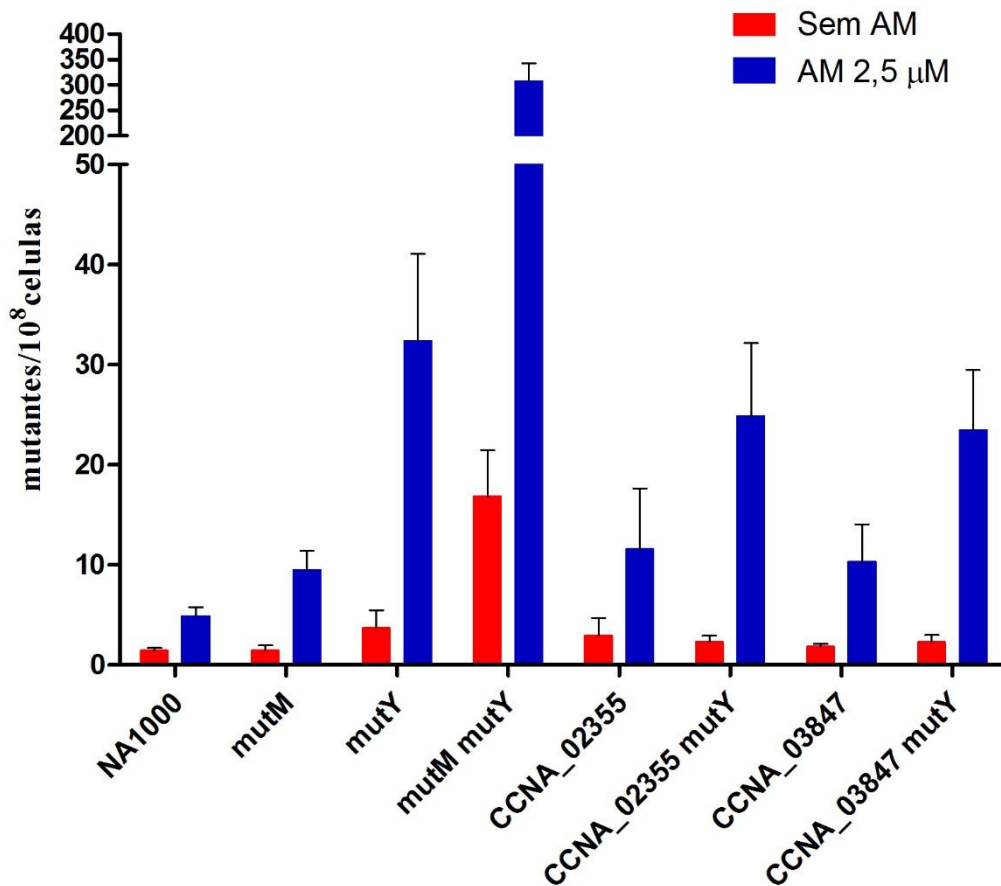
4.1.3. O estresse oxidativo promove altos níveis de mutagênese no mutante duplo *mutM mutY*.

A deficiência em genes do tipo *nth* não conferiu um fenótipo de mutagênese aumentada quando combinada com a deleção de *mutY*, mas não fomos capazes de conduzir análises com mutantes triplos e quádruplos, conforme descrito acima. Portanto, investigamos ainda o papel dos genes que codificam homólogos de Endo III na prevenção da mutagênese induzida pela 8-oxoguanina. Para este propósito, medimos as frequências de mutantes de células expostas ao azul de metileno (AM) e à luz visível, uma fonte conhecida de oxigênio singlete e, conseqüentemente, 8-oxoguanina (AGNEZ-LIMA et al., 2012).

O tratamento com AM aumenta a mutagênese no mutante duplo *mutM mutY* em ~ 20 vezes em relação à frequência de mutantes espontânea, o que está de acordo com a extensa geração de 8-oxoguanina por este agente. Além disso, a frequência de mutação após o tratamento com AM da cepa *mutM mutY* é 70 vezes superior à observada na linhagem selvagem nas mesmas condições. Estes resultados mostram que em células sob estresse oxidativo severo, a ação combinada das glicosilases do sistema GO é crucial, apesar do papel menor que essas enzimas parecem desempenhar na prevenção de mutações em células que não sofrem estresse oxidativo.

A deleção dos genes *nth* em combinação com a deficiência de *mutY* não conseguiu aumentar a mutagênese induzida por AM a níveis mais altos do que aqueles observados para o mutante simples *mutY* (Figura 20). Estes resultados dão suporte adicional à ideia de que nenhum dos dois homólogos de Endo III presentes em *C. crescentus* atuam em combinação com o sistema GO para prevenir a mutagênese induzida pela 8-oxoguanina.

Figura 20 – Mutagênese induzida pelo tratamento com azul de metileno e luz visível (AM).

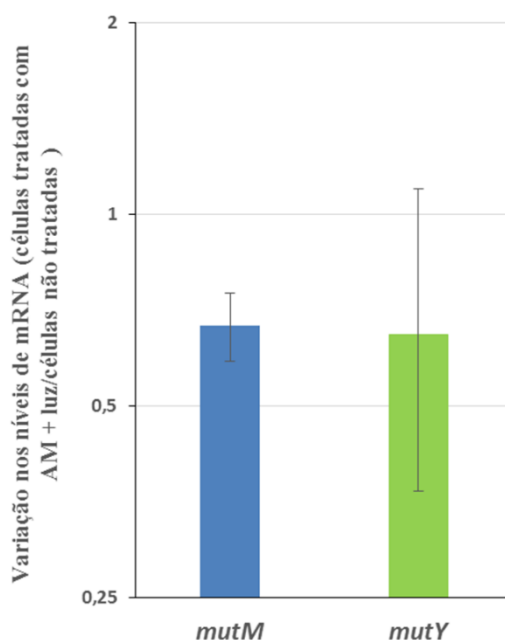


Os dados representam a média de pelo menos 3 experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão da média. A significância estatística foi avaliada com o teste de Mann Whitney (diferença significativa, $P < 0,05$), com os seguintes resultados para as comparações relevantes: wt X wt MB, $P = 0,0004$; *mutM* X *mutM* AM, $P = 0,0286$; *mutY* X *mutY* AM, $P = 0,0064$; *mutM mutY* X *mutM mutY* AM, $P = 0,0286$; *CCNA_02355* X *CCNA_02355* AM, $P = 0,0952$, *CCNA_02355 mutY* X *CCNA_02355 mutY* AM, $P = 0,0286$; *CCNA_03847* X *CCNA_03847* AM, $P = 0,0079$; *CCNA_03847 mutY* X *CCNA_03847 mutY* AM, $P = 0,0286$; wt MB X *mutM* AM, $P = 0,078$; wt MB X *mutY* MB, $P = 0,0006$; wt MB X *mutM mutY* AM, $P = 0,0025$; wt AM X *CCNA_02355* AM, $P = 0,35$; wt AM X *CCNA_03847*, $P = 0,093$; wt AM X *CCNA_02355 mutY* AM, $P = 0,0044$; wt AM X *CCNA_03847 mutY*, $P = 0,0073$; *mutY* AM X *mutM mutY* AM, $P = 0,023$; *mutY* AM X *CCNA_02355 mutY* AM, $P = 0,76$; *mutY* MB X *CCNA_03847 mutY* AM, $P = 0,47$.

4.1.4. Os genes *mutM* *mutY* não são regulados em resposta a danos oxidativos.

Um baixo nível basal de expressão em células sem estresse, e um aumento na regulação de *mutM* e/ou *mutY* por dano oxidativo, poderia, pelo menos em parte, explicar por que esses genes desempenham apenas um papel menor na prevenção de mutações em células em crescimento exponencial que não foram expostos a agentes exógenos que danificam o DNA, sendo mais importantes em células expostas a condições geradoras de 8-oxoguanina. Para avaliar se a expressão de *mutM* e/ou *mutY* está sujeita à regulação transcricional, analisamos se a exposição ao AM aumentaria os níveis de transcritos de *mutM* e *mutY*. Os resultados são mostrados na Figura 21. Está claro que a exposição de células a MB não aumenta os níveis de *mutM* ou *mutY* em *C. crescentus*. Portanto, a expressão diferencial de *mutM* e *mutY* em células estressadas versus não estressadas não está implicada nos fenótipos observados.

Figura 21 – Variação nos níveis do mRNA de *mutM* e *mutY* após tratamento com azul de metileno e luz visível.



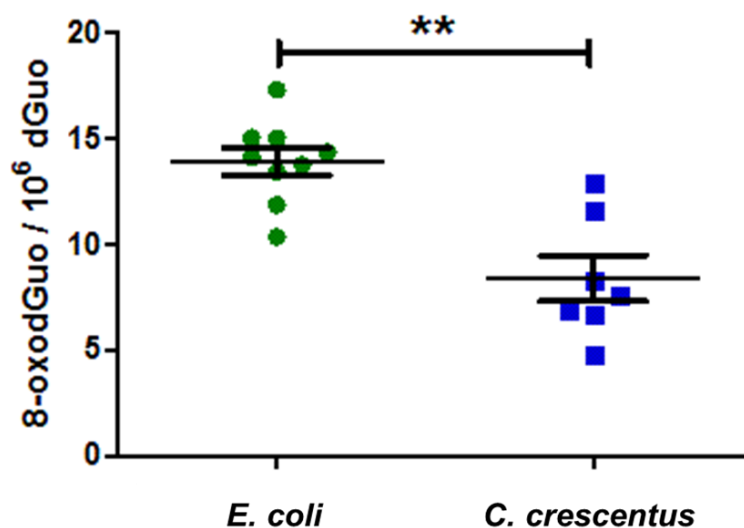
Os dados representam a média de 2 réplicas biológicas analisadas em triplicata técnica para o gene *mutM* e três réplicas biológicas analisadas em triplicata técnica para o gene *mutY*. As barras de erro representam os valores máximo e mínimo obtidos.

4.1.5. *C. crescentus* tem menores níveis basais de 8-oxodGuo no DNA do que *E. coli* na fase exponencial.

Investigamos se os níveis basais de 8-oxoguanina seriam maiores em *E. coli* que em *C. crescentus*, o que poderia explicar as diferenças na mutagênese espontânea nas respectivas linhagens deficientes do sistema GO. Para avaliar esta hipótese, foram medidos os níveis basais de 8-oxodGuo por HPLC-ESI+-MS/MS, em DNAs extraídos de células de *E. coli* e *C. crescentus* em crescimento exponencial (Figura 22). Estes resultados mostram que os níveis de 8-oxodGuo são aproximadamente 2 vezes maiores em *E. coli* do que em *C. crescentus*, com significância estatística ($P=0,0030$). Esses resultados poderiam explicar, em parte, a diferença na mutagênese observada quando ambas espécies são comparadas.

Com os experimentos até aqui descritos, podemos concluir que o sistema GO de *C. crescentus* desempenha um papel menos importante na prevenção de mutagênese espontânea do que o descrito para *E. coli*. Este fenômeno é em pequena parte devido à diferença na temperatura ótima de crescimento de cada espécie, e possivelmente influenciado pela maior presença de 8-oxoG no DNA de *E. coli*. Estes resultados serão discutidos mais adiante, na Seção 5.

Figura 22 – Determinação dos níveis de 8-oxoguanina no DNA de *E. coli* e *C. crescentus* em crescimento exponencial.



Os dados representam a média dos valores obtidos no DNA de 6 culturas independentes. Cada amostra é representada por pontos, a barra grande indica a média e as barras de erro representam o erro padrão da média. Os grupos são significativamente diferentes de acordo com o teste de Mann Whitney ($P = 0,0030$).

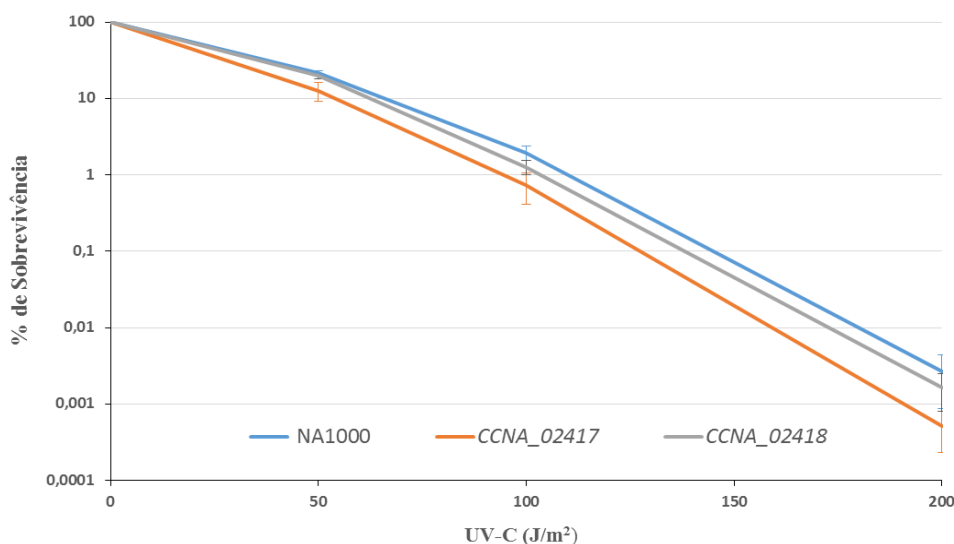
4.2. Caracterização funcional do envolvimento do operon *CCNA_02417/CCNA_02418* no reparo de fotoprodutos.

4.2.1. Análises fenotípicas das linhagens deficientes dos genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418* irradiadas com doses crescentes de UV-C.

Os genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418* constituem um operon regulado pela resposta SOS, e potencialmente envolvido no reparo de lesões causadas por luz UV, dada a similaridade de *CCNA_02417* com enzimas responsáveis pelo reparo de fotoprodutos em esporos bacterianos. Já *CCNA_02418* possui um domínio de UDG, e um domínio conservado de função desconhecida, DUF4130. Almejando uma caracterização funcional dos genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*, e a avaliação do seu papel no reparo de lesões induzidas por luz UV, construímos os respectivos mutantes simples no *background* da cepa selvagem NA1000. O mutante *CCNA_02417* foi obtido rapidamente, no entanto para construção do mutante *CCNA_02418* por deleção em fase, se fez uma varredura de ~800 colônias candidatas, onde todas se mostraram recombinantes contendo o alelo selvagem, e não o mutante esperado. Optamos então pela introdução de um marcador de resistência em substituição à região codificante de *CCNA_02418*. Com esta seleção positiva, foi possível obter o mutante desejado.

Primeiramente, foram realizados ensaios de sobrevivência às doses crescentes de 0, 50, 100 e 200 J/m² (Figura 23). Análises fenotípicas de ambos mutantes mostram que ambos se comportam de forma semelhante à cepa selvagem no que se refere à sobrevivência às doses testadas. Há uma ligeira tendência de maior sensibilidade ao UV-C do mutante no gene *CCNA_02417*, mas que é mascarada pela variação entre experimentos.

Figura 23 – Sobrevivência das cepas NA1000, CCNA_02417 e CCNA_02418 frente à irradiação com luz UV-C.



A figura representa a média de pelo menos três experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão da média. As doses de UV-C se encontram indicadas na figura. A significância estatística ($P < 0,05$) foi avaliada com o teste t-test. Para os dados correspondentes à dose de 200 J/m². NA1000 x CCNA_02417, $P = 0,3015$; NA1000 x CCNA_02418, $P = 0,6391$.

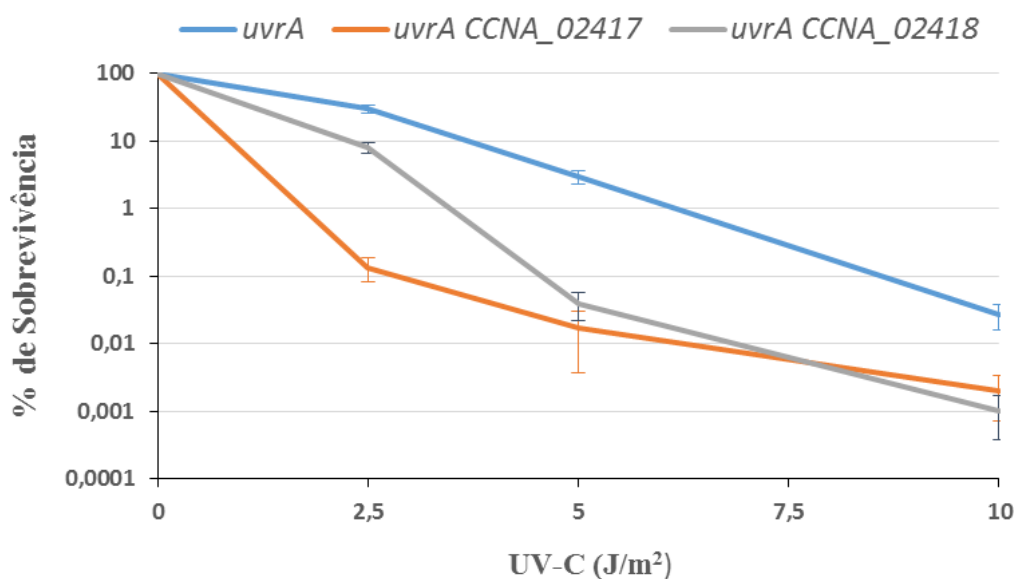
4.2.2. A deleção dos genes CCNA_02417 e CCNA_02418 no background *uvrA* causa um fenótipo de sensibilidade severa à radiação UV-C.

Foram construídos o mutante *uvrA* e os mutantes duplos *uvrA* CCNA_02417 e *uvrA* CCNA_02418 para realizar uma análise de epistasia com a via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER), envolvida no reparo de fotoprodutos induzidos por irradiação UV-C. Foram realizados ensaios de sobrevivência às doses crescentes de 0, 2,5, 5 e 10 J/m². Desta forma, buscamos identificar se os genes CCNA_02417 e CCNA_02418 são importantes para o reparo de fotoprodutos, em uma via independente do principal mecanismo de remoção destas lesões, o reparo por excisão de nucleotídeos.

Os mutantes duplos *uvrA* CCNA_02417 e *uvrA* CCNA_02418 apresentaram uma sensibilidade de 218 e 4 vezes maior do que o mutante *uvrA* na dose 2,5 J/m², respectivamente (Figura 24). Já em doses maiores de luz UV, as deficiências tanto em

CCNA_02417 como em *CCNA_02418* aumentam de maneira semelhante a sensibilidade ao UV na ausência da via de NER. Estes dados sugerem que os genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*, regulados pela resposta SOS, estão envolvidos no reparo de fotoprodutos causados por luz UV-C, e que estes atuam em uma via independente do reparo por excisão de nucleotídeos, uma vez que o fenótipo do mutante duplo *uvrA CCNA_02417* é mais severo do que os fenótipos observados com apenas uma das mutações. Isso provavelmente se deve a uma maior deficiência no reparo de fotoprodutos nos mutantes duplos. Somente com estes dados ainda não podemos saber qual tipo de fotoproduto é reparado pelas proteínas codificadas neste operon.

Figura 24 – Sobrevivência das cepas *uvrA*, *uvrA CCNA_02417* e *uvrA CCNA_02418* frente à irradiação com luz UV-C.

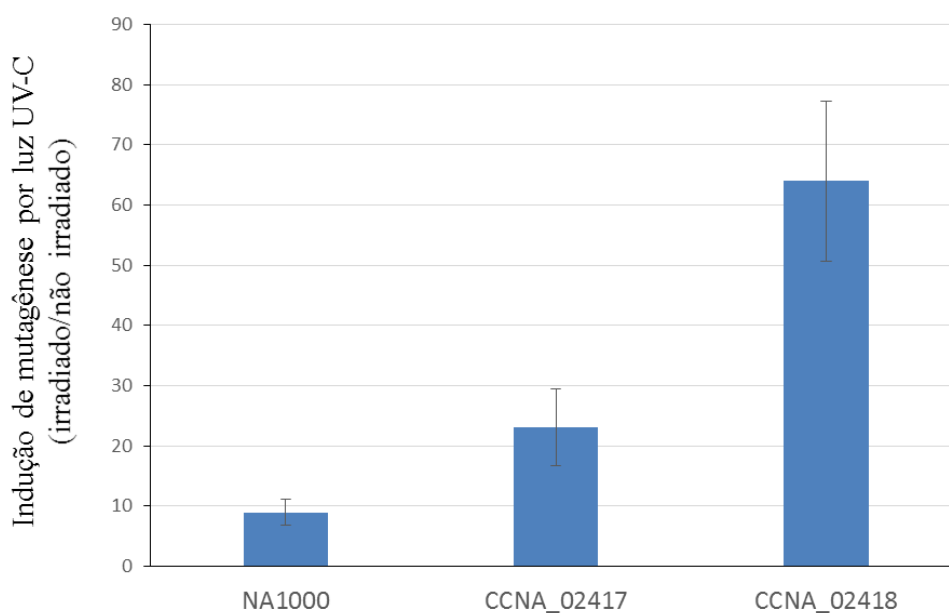


A figura representa a média de pelo menos três experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão da média. As doses de UV-C se encontram indicadas na figura. A significância estatística ($P < 0,05$) foi avaliada com o teste t-test com os seguintes resultados para a dose de 2,5 J/m²: *uvrA* X *uvrA CCNA_02417*, $P=0,0003$; *uvrA* X *uvrA CCNA_02418*, $P=0,0018$ e *uvrA CCNA_02417* X *uvrA CCNA_02418*, $P=0,0013$.

4.2.3. Mutagênese induzida por UV-C está aumentada no mutante *CCNA_02418*.

Segundo nossa hipótese (Figura 14), o gene *CCNA_02418* poderia desempenhar um papel na prevenção de mutagênese induzida pela desaminação das citosinas dimerizadas nos fotoprodutos, uma vez que possui um domínio relacionado às uracila DNA glicosilases. Para avaliar essa hipótese, medimos a indução de mutagênese por luz UV nos mutantes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*. As células foram irradiadas com 50 J/m² de UV-C, e a frequência de mutantes foi determinada pelo gene marcador *rpoB* (Rif^R). Os mutantes *CCNA_02417* e *CCNA_02418* apresentam uma indução de mutagênese de ~3 e ~7 vezes maiores do que a linhagem selvagem tratada da mesma forma, respectivamente. No entanto, não existe uma diferença significativa (P= 0,1111) entre o mutante *CCNA_02417* e a linhagem selvagem (Figura 25).

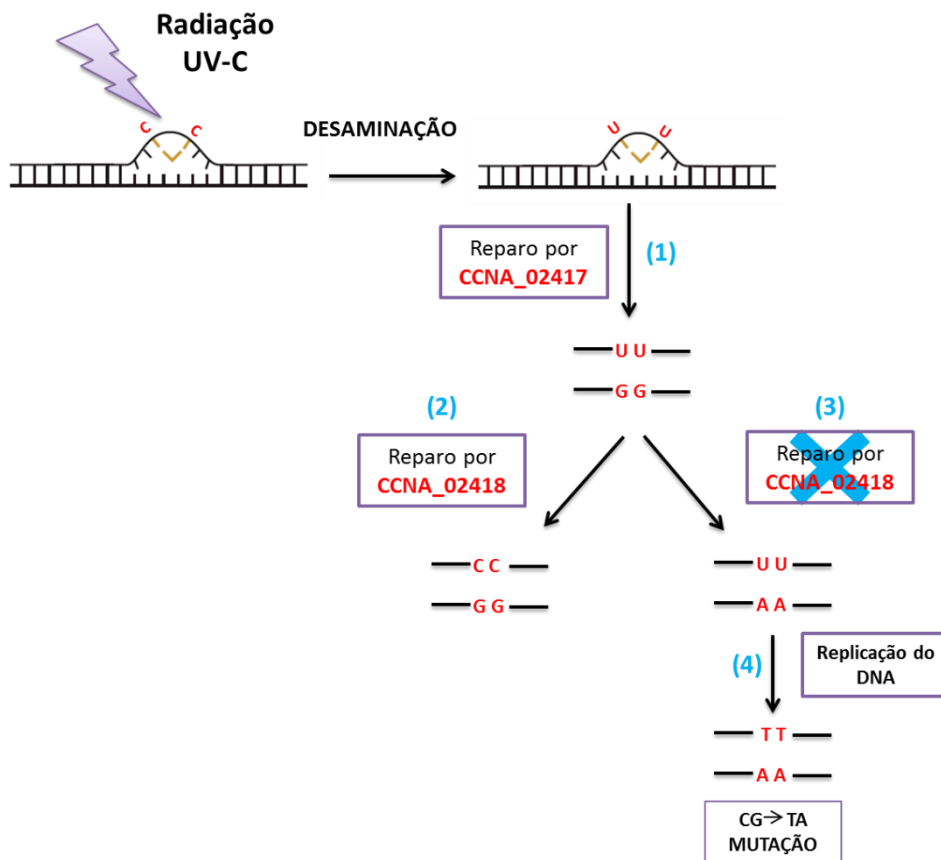
Figura 25 – Indução de mutagênese por luz UV-C.



A figura representa a média de pelo menos três experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão da média. A dose de UV-C foi de 50 J/m². A significância estatística foi avaliada com o teste de Mann Whitney (diferença significativa, P< 0,05), com os seguintes resultados para as comparações relevantes: wt X *CCNA_02417*, P= 0,1111; wt X *CCNA_02418*, P= 0,0043 e *CCNA_02417* X *CCNA_02418*, P= 0,0381.

Estes resultados confirmam a hipótese de que a falta do gene *CCNA_02418* induz um aumento na mutagênese induzida por UV, supostamente como consequência da falta de reparo de uracilas geradas pela desaminação de citosinas dimerizadas, favorecendo o aumento da mutagênese como esquematizado na Figura 26. Como na ausência de reparo direto destes fotoprodutos as eventuais uracilas geradas por desaminação estariam “aprisionadas” em dímeros de pirimidinas, estas não seriam mutagênicas, dada a natureza dos fotoprodutos que impossibilita o emparelhamento de bases. Porém, após a monomerização dos fotoprodutos, estas uracilas poderiam ser mutagênicas. Por esta razão, a atividade de reversão de fotoprodutos por enzimas da família SPL seria acompanhada pela atividade de uracila DNA glicosilase de *CCNA_02418*, e o funcionamento orquestrado destas duas proteínas promoveria a sobrevivência celular por eliminar os fotoprodutos citotóxicos, e evitaria a eventual mutagênese resultante da desaminação das citosinas nos fotoprodutos.

Figura 26 – Modelo ilustrativo da consequência da falta da atividade de *CCNA_02418* para a mutagênese induzida por luz UV-C.

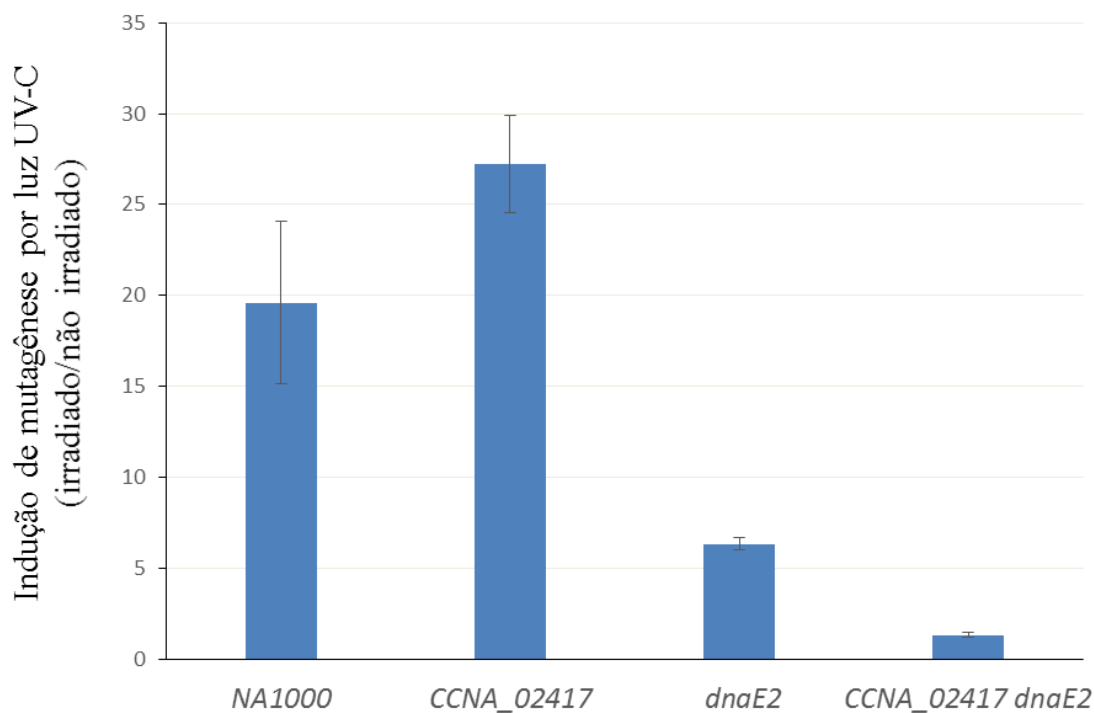


A radiação UV-C forma dímeros de citosina (C<>C), que podem sofrer desaminação gerando dímeros de uracilas; o gene *CCNA_02417* atua no reparo direto de estes fotoprodutos (1) e as uracilas são removidas por ação da proteína codificada pelo gene *CCNA_02418*, que apresenta um domínio similar à uracila-DNA glicosilase, restaurando o emparelhamento original G:C (2). No caso, da falta de atividade de *CCNA_02418*, polimerases replicativas podem incorporar adenina frente a uracila (3); e após de um segundo evento replicativo, são incorporadas timinas frente às adeninas (4), favorecendo a fixação da mutação GC→TA.

4.2.4. Mutagênese induzida por UV-C na ausência de síntese translesão (TLS).

Estudos realizados por nosso laboratório (GALHARDO et al., 2005) indicam que DnaE2, em conjunto com ImuA e ImuB, é responsável pela TLS em *C. crescentus*. Entretanto, apenas 2/3 das mutações induzidas por luz UV-C são abolidas nas linhagens deficientes nestes genes. Ainda não sabemos qual o mecanismo responsável pelos outros 1/3 das mutações induzidas por luz UV-C. Uma possibilidade é que a reversão por reparo direto de dímeros contendo citosinas desaminadas, mediado por *CCNA_02417*, gere resíduos de uracila no DNA, que contribuem para a mutagênese induzida por luz UV-C independente da via de síntese translesão, quando estes escapem à ação das uracila DNA-glicosilases. Para avaliar se o gene *CCNA_02417* está envolvido com a mutagênese induzida por UV-C, as células foram irradiadas com 50 J/m² de luz UV-C, e a indução da mutagênese foi determinada pelo gene marcador *rpoB* (Rif^R). Os resultados estão mostrados na Figura 27.

Figura 27 – Indução de mutagênese por luz UV-C na linhagem deficiente de TLS.



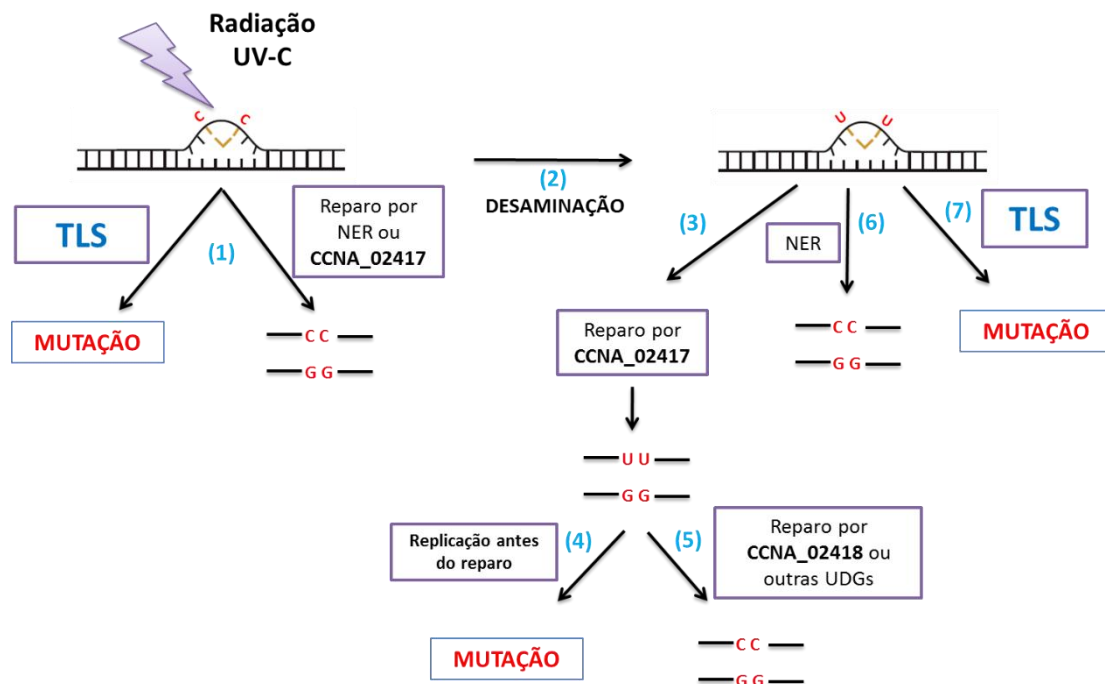
Os dados representam a média de 2 réplicas biológicas. As barras de erro representam os valores máximo e mínimo obtidos.

A cepa mutante *dnaE2*, que não possui TLS, apresentou uma diminuição da mutagênese induzida por luz UV de cerca de três vezes em relação à cepa selvagem, confirmando os resultados publicados por nosso grupo previamente (GALHARDO et al., 2005). O duplo mutante *dnaE2 CCNA_02417* apresentou uma diminuição da mutagênese de 5 vezes em relação ao mutante *dnaE2*, e nele não se observa nenhuma indução de mutagênese por luz UV-C em relação à células não irradiadas. Desta maneira, na ausência de TLS e CCNA_02417, a mutagênese induzida por luz UV é totalmente suprimida.

Este resultado se encaixa perfeitamente com o modelo mostrado na Figura 14, que pressupõe que a atividade do produto do gene *CCNA_02417*, que atua no reparo direto de fotoprodutos, favorece o surgimento de uracilas monomerizadas no DNA, visto que a desaminação de citosinas ocorre muito mais frequentemente nos fotoprodutos (BARAK; COHEN-FIX; LIVNEH, 1995). As eventuais uracilas que escapem do reparo por

CCNA_02418 ou outras uracila DNA glicosilases, contribuiriam para o componente independente de TLS da mutagênese induzida por luz UV-C em *C. crescentus*, conforme esquematizado na Figura 28.

Figura 28 – Modelo ilustrativo mostrando as contribuições de TLS e de CCNA_02417 para a mutagênese induzida por luz UV-C.



A radiação UV-C forma dímeros de pirimidina (C↔C), (1) frente a estas lesões a maquinaria de TLS é capaz de sintetizar DNA, promovendo um aumento de mutagênese devido a sua baixa fidelidade durante a replicação ou estes fotoprodutos podem ser monomerizados pela ação de CCNA_02417. (2) Os dímeros não reparados favorecem a desaminação das citosinas em uracilas; (3) o gene CCNA_02417 atua no reparo direto de estes fotoprodutos; (4) então, se em um evento replicativo estas uracilas não são removidas, estas podem favorecer a fixação da mutação; (5) no entanto, as uracilas monomerizadas podem ser removidas por CCNA_02418 ou outras UDGs restaurando o emparelhamento original G:C. (6) Os dímeros podem ser reparados pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), ou serem replicado em eventos de TLS promovendo a mutagênese (7).

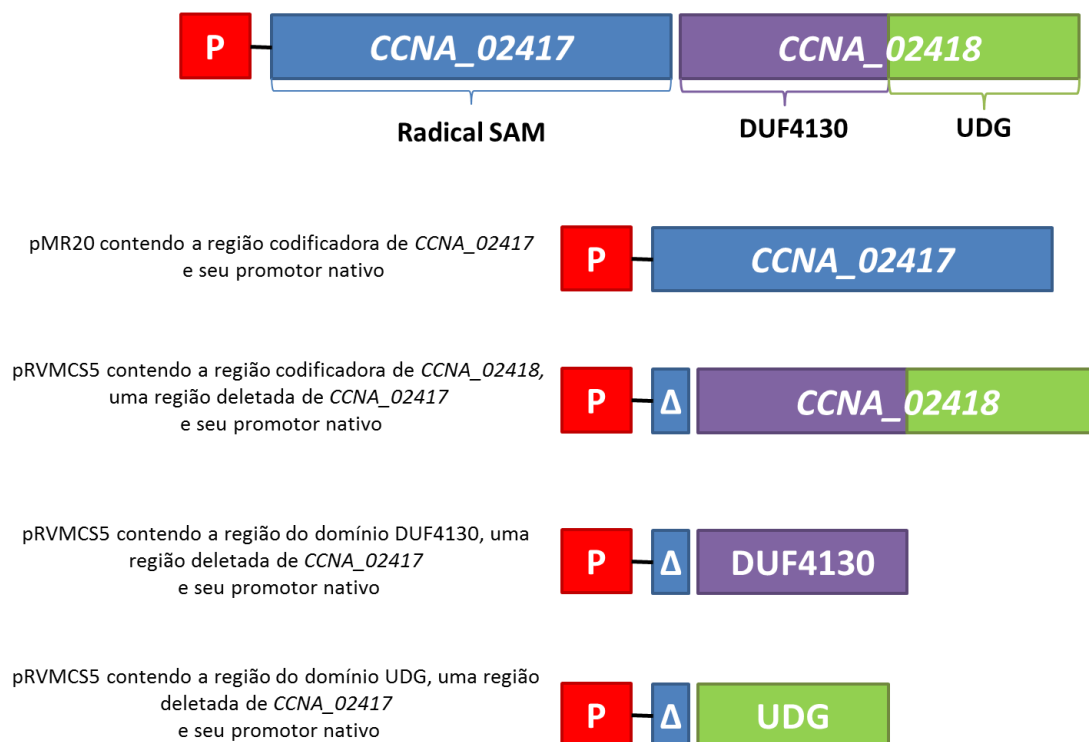
A mutagênese ligeiramente aumentada que mostra o mutante CCNA_02417 em relação à linhagem selvagem pode se dever à presença de mais fotoprodutos no DNA,

pela ausência de reparo por reversão direta, conferindo mais substratos para a via de TLS mediada por *dnaE2*. Para confirmar estes dados apresentados faremos mais réplicas dos experimentos de mutagênese. Além disso, construiremos o mutante duplo *CCNA_02418 CCNA_02417*. Neste mutante duplo, esperamos que a mutagênese seja igual ao mutante simples *CCNA_02417*, devido à ausência de reversão dos dímeros contendo uracilas, tornando o papel de *CCNA_02418* irrelevante após a irradiação com UV.

4.2.5. Complementação dos mutantes *CCNA_02417*, *CCNA_02418*.

Para avaliar inequivocamente a sensibilidade à luz UV-C dos mutantes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*, realizamos ensaios de complementação, reintroduzindo os alelos do tipo selvagem em vetores plasmidiais de baixo número de cópias. Além disso, planejamos duas construções para complementar o mutante *CCNA_02418*, uma com o domínio DUF4130 e outra com o domínio UDG, para avaliar o papel de cada um na resistência a luz UV-C, como se mostra na Figura 29.

Figura 29 – Representação esquemática das construções plasmidiais para complementação dos mutantes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*.



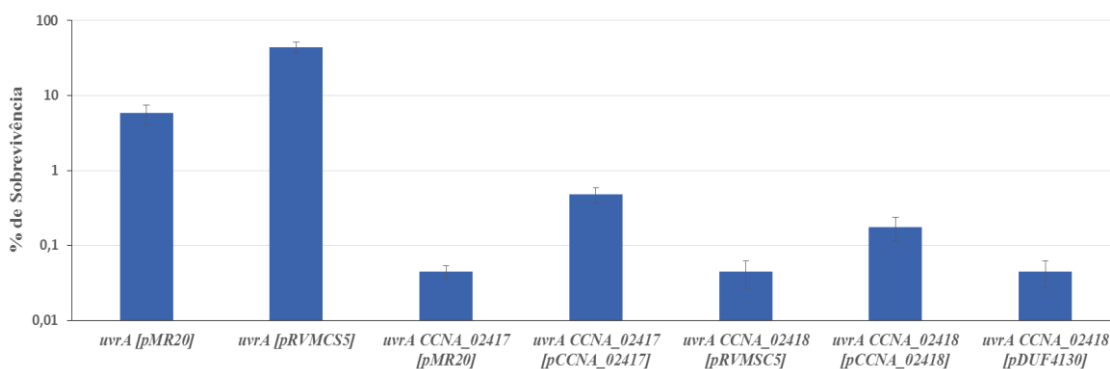
P = Promotor nativo, Δ = região deletada do gene *CCNA_02417* no respectivo mutante, cujo DNA foi usado como molde para amplificação de *CCNA_02418*.

Os resultados mostrados na Figura 30, demonstram que a reintrodução de *CCNA_02417* e *CCNA_02418* nos respectivos mutantes confere complementação parcial do fenótipo de sensibilidade à luz UV-C. Como ambos genes estão arranjados em operon, a transcrição e/ou estabilidade do mRNA pode estar de algum modo afetada nos mutantes, comprometendo a expressão em níveis máximos do gene vizinho. Estamos planejando experimentos RT-PCR para confirmar os níveis de expressão destes genes nas linhagens selvagem, mutantes e mutantes complementados, para reavaliar a funcionalidade destas construções.

De qualquer modo, a complementação com do mutante *CCNA_02418* com o gene inteiro foi parcial, mas a complementação com apenas o domínio DUF4130 foi nula. Isso

sugere que somente o DUF4130 não é suficiente para a atividade de resistência ao UV, sendo também necessária a parte do domínio UDG. O vetor para complementação do mutante *CCNA_02418* com apenas o domínio UDG ainda está em construção.

Figura 30 – Complementação dos mutantes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*.



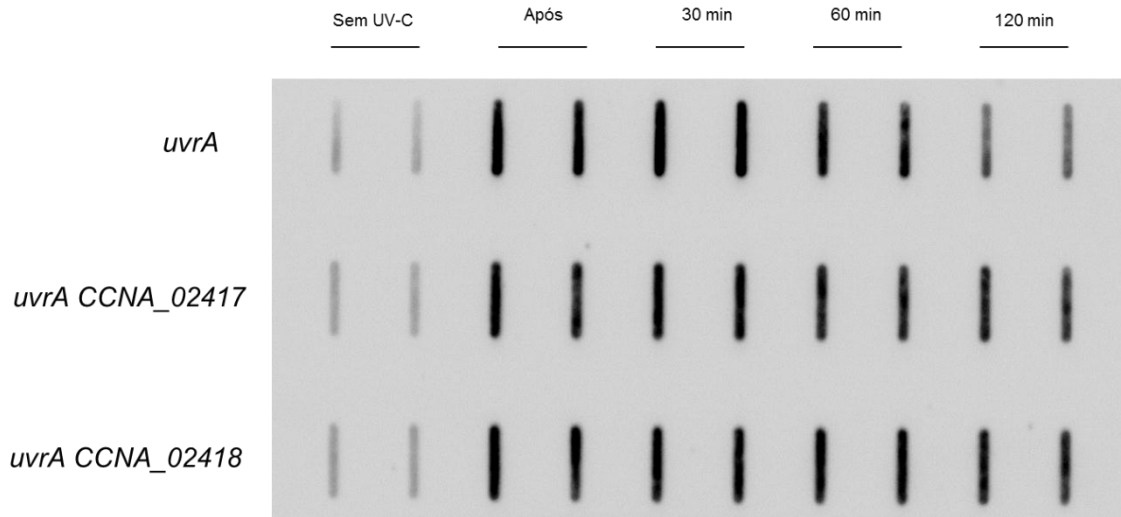
A figura representa a média de pelo menos três experimentos independentes para cada linhagem, e as barras de erro representam o erro padrão da média. A dose de UV-C utilizada foi de 5 J/m².

4.2.6. Medidas da capacidade de reparação de fotoprodutos por imuno Slot- Blot

Para avaliar a capacidade de reparo de fotoprodutos mediada pelo operon *CCNA_02417/CCNA_02418*, foram realizados ensaios de imuno Slot Blot para a detecção e quantificação de lesões do tipo CPD no DNA irradiado com 10 J/m² e o reparo destas lesões 30, 60 e 120 minutos após a irradiação. Realizamos estas medidas nos duplos mutantes deficientes nestes genes e na via de NER (Figura 31). Na cepa *uvrA*, pode-se observar que após 120 minutos foram removidos ~60 % dos CPDs gerados, indicando que estes foram reparados por outras vias, ou que as células foram capazes de replicar o DNA lesado via TLS. Já nos mutantes *uvrA CCNA_02417* e *uvrA CCNA_02418* apenas 20 % dos dímeros foram removidos após 120 minutos (Figura 32). Estes dados preliminares sugerem que o operon *CCNA_02417/CCNA_02418* pode estar envolvido no reparo do fotoprodutos CPDs que constituem o principal fotoproduto gerado por luz UV-C (SANCAR; RUPP, 1983; SANCAR, 2016). É interessante notar que o reparo mediado

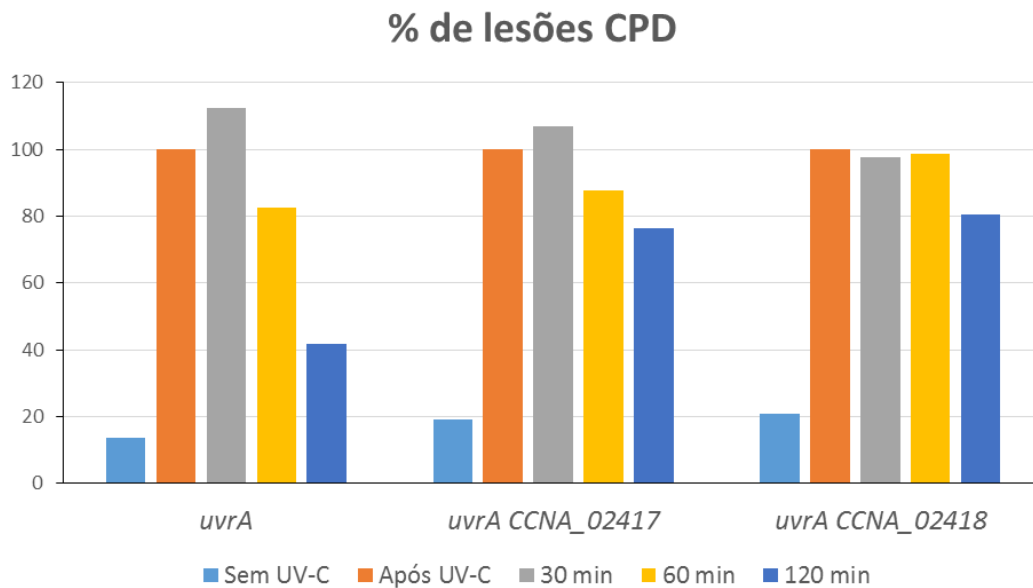
por estes genes parece ser mais tardio, sendo apenas evidente após 120 minutos, não havendo diferença entre as linhagens duplo-mutantes e o mutante simples *uvrA* nos tempos anteriores.

Figura 31 – Detecção imunológica das lesões CPDs presentes no DNA de linhagens de *C. crescentus* irradiadas com luz UV-C.



A figura representa um experimento para cada linhagem com duplicada técnica. A dose de UV-C foi de 10 J/m².

Figura 32 – Quantificação da capacidade de reparo das lesões CPDs.



5. DISCUSSÃO.

5.1. Estudo do reparo de 8-oxoguanina em *C. crescentus*.

A 8-oxoG é uma lesão oxidativa proeminente, e é consenso que seja uma ameaça à integridade genética em todos os seres vivos aeróbicos, já que possui um potencial mutagênico claramente estabelecido. Aqui relatamos que uma cepa de *C. crescentus* que não possui as glicosilases do sistema GO exibe apenas um aumento de ~5 vezes na mutagênese espontânea, o que está em notável contraste com os resultados obtidos com uma cepa de *E. coli* do mesmo genótipo. Este resultado é surpreendente, considerando a alta conservação deste sistema em bactérias.

Como ponto de partida para tentar entender por que a falta de reparo de 8-oxoG mediada pelo sistema GO poderia ser menos prejudicial para *C. crescentus* do que para *E. coli*, verificamos se outras vias de reparo poderiam participar na proteção contra as consequências mutagênicas desta lesão no DNA, pela análise de fenótipos sinérgicos de cepas portadoras de múltiplas deficiências de reparo. O reparo por excisão de nucleotídeos, mediado por UvrABC em bactérias, é conhecido por remover uma ampla variedade de lesões de DNA, e foi demonstrado que atua em DNA exposto a condições de geração de 8-oxoG (CZECZOT et al., 1991). Além disso, um reparo tipo NER foi proposto como um mecanismo para excisar 8-oxoG em *Porphyromonas gingivalis* (JOHNSON et al., 2004). No entanto, nossa análise sugere que o reparo dependente de *uvrA* não é responsável pelo fenótipo de mutagênese baixa do mutante *mutM mutY*, corroborando dados *in vitro*, que mostram que o UvrABC não é capaz de reconhecer eficientemente a 8-oxoG no DNA (MCKIBBIN et al., 2013). Um resultado semelhante foi obtido para o sistema MMR, que foi anteriormente implicado no reparo de lesões oxidativas em *E. coli* (WYRZYKOWSKI; VOLKERT, 2003), e que coopera com MutY na prevenção de mutagênese (BAI; LU, 2007). Apesar destes trabalhos anteriores, nossa análise não indicou nenhum efeito combinatório de MMR com o sistema GO na prevenção de mutagênese.

C. crescentus carece de homólogos do gene *nei* (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007), mas possui homólogos do gene *nth*. Também investigamos

se os genes do tipo *nth* presentes neste organismo poderiam contribuir para evitar a mutagênese do 8-oxoG. Dados *in vitro* com homólogos de Endo III de *E. coli* e humanos mostraram que essas enzimas possuem atividade contra alguns substratos de DNA em dupla-fita contendo essa lesão (MATSUMOTO et al., 2001). Análise da interação destes genes com o sistema GO na mutagênese espontânea e induzida por AM indica que as enzimas Endo III de *C. crescentus* não estão envolvidas na proteção contra a mutagênese causadas por 8-oxoG. Embora ainda exista a possibilidade formal de que outras vias de reparo desconhecidas presentes em *C. crescentus* possam ajudar a prevenir a mutagênese 8-oxodG e atuar como um backup para o sistema GO, isso é improvável, dado que não foram encontrados outros mutadores além dos genes de reparo canônicos em *C. crescentus* (MARTINS-PINHEIRO et al., 2017).

Os níveis de 8-oxodGuo encontrados no DNA de *C. crescentus* e *E. coli* em nosso estudo são da mesma ordem de magnitude daqueles encontrados em medidas anteriores em *E. coli* (ALHAMA et al., 1998) e eucariotos unicelulares (DA SILVA et al., 2017), mas uma ordem de magnitude superior ao normalmente observado em células humanas (GEDIK; COLLINS, 2004). Apesar das medidas na mesma ordem de magnitude, a *E. coli* apresenta níveis basais aproximadamente de 2 vezes maiores de 8-oxodGuo no DNA do que *C. crescentus*. *C. crescentus* tem muitos regulons que promovem resistência ao estresse oxidativo (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007; DA SILVA NETO et al., 2009; LOURENÇO; GOMES, 2009; BRAZ et al., 2010; FOREMAN; FIEBIG; CROSSON, 2012), e talvez seja mais protegida contra fontes endógenas de ROS, levando a níveis mais baixos de 8-oxoG. É difícil prever o impacto cumulativo desse pequeno aumento nos níveis de 8-oxoG sobre as taxas de mutação espontânea ao longo de muitas gerações de crescimento (tipicamente ~ 24-25 gerações em um teste de flutuação em que as culturas começam com ~ 10² células/mL e saturam em ~ 10⁹/mL). De toda forma, é possível que os níveis basais mais altos de 8-oxoG em *E. coli* contribuam, pelo menos em parte, para a mutagênese espontânea mais alta em cepas mutantes deficientes em *mutM mutY*. Nossos resultados também apontam que as diferentes temperaturas ótimas de crescimento (30°C X 37°C) podem contribuir parcialmente para a diferença na mutagênese espontânea em células deficientes no reparo de 8-oxoG.

Outra questão a ser considerada é que o 8-oxoG é muito mais propenso a ser mais oxidado que as outras bases canônicas no DNA, devido ao seu baixo potencial redox (BUCHKO et al., 1995; BURROWS; MULLER, 1998). Além disso, esta oxidação é facilitada em sequências de 5'-(8-oxodG)G-3' (PRAT; HOUK; FOOTE, 1998), que presume-se que sejam mais comuns em genomas ricos em G+C, como *C. crescentus*. Portanto, pode ser o caso de que os níveis mais baixos de 8-oxodGuo no DNA de *C. crescentus*, em comparação com *E. coli*, sejam devidos a uma maior suscetibilidade para promover a oxidação desta lesão em um genoma rico em G+C, formando outros produtos secundários, como hidantoínas.

Além do organismo modelo bem estudado *E. coli*, o sistema GO foi estudado em outras espécies bacterianas. Um ponto de confusão é que muitos estudos usam apenas frequências mutantes, não cálculos de taxa de mutação, portanto comparações diretas são difíceis. No entanto, é o caso de que, para muitas bactérias, a falta de glicosilases do sistema GO não é tão prejudicial para a estabilidade genética, como é para *E. coli*. No patógeno gram-positivo *Staphylococcus aureus*, a inativação de *mutY* leva a um aumento de 7 a 12 vezes na mutagênese espontânea, e a inativação *mutM* leva a um aumento de 2 a 3 vezes (CANFIELD et al., 2013). Estudos em *P. aeruginosa* são discrepantes, apontando para um aumento de 0 a 4 vezes na mutagênese em cepas *mutM*, e aumento de 7 a 39 vezes na mutagênese para um genótipo *mutY* (MANDSBERG et al., 2009; MORERO; ARGARAÑA, 2009; SANDERS; SUDHAKARAN; SUTTON, 2009). Em *Mycobacterium smegmatis*, a deleção de *mutY* ou *mutM* aumenta mutagênese apenas algumas vezes, e uma cepa deficiente de *mutM* e *mutY* tem um fenótipo semelhante ao descrito aqui para *C. crescentus*, com um aumento de 4 a 8 vezes na taxa de mutação espontânea (HASSIM et al., 2015). Portanto, um forte fenótipo mutador, com incrementos de dezenas a centenas de vezes na mutagênese, como observado para *E. coli* desprovida de *mutM* e *mutY*, parece ser a exceção, não a regra. Dado o alto potencial mutagênico do 8-oxoG, parece razoável especular que as outras bactérias estudadas até o momento tenham outros meios para prevenir a atividade mutagênica dessa lesão no DNA, que podem estar ausentes da *E. coli*. Alternativamente, a *E. coli* pode ser mais propensa a danos oxidativos espontâneos no DNA do que outras bactérias, como sugerido pelos níveis basais aumentados de 8-oxoG quando comparados a *C. crescentus*.

5.2. Caracterização funcional do envolvimento do operon *CCNA_02417/CCNA_02418* no reparo de fotoprodutos.

Uma das principais fontes ambientais de danos ao DNA é a radiação UV devido à exposição solar. A radiação UV induz lesões nocivas no DNA prejudicando processos vitais como a replicação e transcrição. Nas bactérias, os principais mecanismos de reparo de fotoprodutos são o reparo direto de danos por fotoliasas e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (GOOSEN; MOOLENAAR, 2008). No entanto, muitas das bactérias que formam esporos, como *B. subtilis* apresentam uma enzima de reparo direto (SPL) para fotoprodutos específicos de esporo (SP), que devem ser reparados durante a germinação (FAJARDO-CAVAZOS; SALAZAR; NICHOLSON, 1993). *E. coli* apresenta tanto a reversão por fotoliasas como o NER, as duas principais vias de reparo, possivelmente porque é uma bactéria comensal intestinal e que está exposta eventualmente a condições de vida livre.

C. crescentus, uma bactéria de vida exclusivamente livre, encontrada em solos e água doce, apresenta pelo menos 3 vias para o reparo lesões por UV; a via NER, o reparo por reversão direta por fotoliasas (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007) e o reparo direto de fotoprodutos independente da luz pelas proteínas codificadas pelos genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418*, caracterizado neste trabalho. É possível que *Caulobacter*, em comparação a outras bactérias de vida livre, careça de pigmentos que são importantes para a resistência das bactérias à radiação solar (TONG; LIGHTHART, 1997; MOHANA; THIPPESWAMY; ABHISHEK, 2014). Em endósporos de *Bacillus* sp., o desenvolvimento de pigmentos endógenos, como os carotenoides e as melaninas, proporcionou uma vantagem evolutiva durante a esporulação, protegendo os esporos contra a radiação UV-A ambiental nociva (MOELLER et al., 2005). De qualquer modo, *C. crescentus* apresenta a terceira via alternativa de reparo de fotoprodutos, potencialmente compensando a constante exposição solar à qual está submetida, de acordo com seu estilo de vida. Uma análise preliminar (dados não mostrados) indica que este sistema de reparo está presente em várias alfa-proteobactérias de vida livre, mas ausente em gama-proteobactérias comensais, corroborando a vantagem adaptativa

conferidas por estes genes aos organismos com estilos de vida que implicam em constante exposição à luz solar.

Entretanto, cabe ressaltar que os fenótipos de sensibilidade à luz UV-C das linhagens deficientes nos genes *CCNA_02417* e *CCNA_02418* só se mostraram evidentes em células deficientes na via de NER. Isto indica que NER deve ser a via principal de reparo de fotoprodutos, e que o sistema *CCNA_02417/02418* desempenha um papel secundário na remoção deste tipo de lesão. Ademais, também deve-se levar em conta que a participação do reparo direto dependente de luz, mediado pelas fotoliasas, não foi avaliada neste trabalho. Por fim, ainda há a possibilidade de outros genes ainda não caracterizados estarem envolvidos no reparo de fotoprodutos. Em *C. crescentus* existem três cópias de pequenos genes que codificam proteínas com um domínio (COG2827) de endonuclease. Este domínio encontra-se nas subunidades C do sistema UvrABC bacteriano e de arqueas, que catalisa a reparação da excisão de nucleotídeos num processo de múltiplos passos. UvrC catalisa a primeira incisão na quarta ou quinta ligação fosfodiéster 3' e na oitava ligação fosfodiéster 5' do dano que deve ser removido (VERHOEVEN et al., 2002).

Os genes *CCNA_03633*, *CCNA_01405* e *CCNA_00744* apresentam este domínio, codificando proteínas com tamanhos que variam de 96 a 123 resíduos de aminoácidos e estão amplamente difundidos em proteobactérias do grupo alfa, embora também possam ser encontrados em outros grupos bacterianos (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007). O gene *CCNA_03633* é parte do regulon SOS de *C. crescentus* (DA ROCHA et al., 2008). No entanto, o papel dessas pequenas endonucleases em potencial no reparo de *C. crescentus* seja desconhecido, outras proteínas, também contendo um domínio semelhante foram observadas, como é o caso da proteína de 295 aminoácidos codificada pelo gene *cho* (*ydjQ*), homólogo *uvrC*, de *E. coli*. Cho é uma enzima de respaldo para UvrC no processo de reparo de certos tipos de danos obstrutivos, onde o UvrC é menos eficiente; possivelmente ampliando a capacidade de reparo da via de excisão nessas bactérias (MOOLENAAR et al., 2002)

Alguns dos homólogos Cho, particularmente os que pertencem ao grupo da beta-proteobacteria, apresentaram uma fusão N-terminal com um putativo domínio 3'

exonuclease, semelhante subunidade épsilon da DNA polimerase III. Estas duas atividades (endonuclease e exonuclease) desta proteína de fusão foram propostas para atuar em função coordenada e sequencial em um novo mecanismo de reparo de DNA (VAN HOUTEN; EISEN; HANAWALT, 2002).

As análises fenotípicas realizadas neste estudo mostraram que o mutante duplo *uvrA CCNA_02417* apresentou uma maior sensibilidade em relação ao mutante simples *uvrA* após exposição à 2,5, 5 e 10 J/m² de UV-C, sugerindo uma maior deficiência no reparo dos fotoprodutos. No entanto o mutante duplo *uvrA CCNA_02418* apresentou sensibilidade menor do que o mutante *uvrA CCNA_02417* na dose de 2,5 J/m², e igual grau de sensibilidade a partir de 5 e 10 J/m². Estes dados sugerem que *CCNA_02417* é ainda mais importante que *CCNA_02418* para a remoção de danos citotóxicos, o que está de acordo com a função predita da primeira, de liase de fotoprodutos. Por outro lado, a proteína *CCNA_02418* é constituída de dois domínios, um de função desconhecida (DUF4130) e outro relacionado às uracila DNA glicosilases. As funções biológicas conhecidas de uracila-DNA glicosilases estão relacionadas à prevenção de mutagênese induzida por resíduos de uracila no DNA, mas esta atividade não deve estar implicada numa maior resistência ao UV, uma vez que uracila formada no DNA deve ser mutagênica, mas não citotóxica, já que não bloqueia a progressão da replicação. Possivelmente o domínio DUF4130 possui alguma outra atividade importante para o reparo de DNA, que ainda não está contemplada no nosso modelo.

Ainda não temos pistas sobre a possível atividade de *CCNA_02418* no reparo de fotoprodutos, mas especulamos que de alguma maneira estimule ou facilite a ação de *CCNA_02417*. Entretanto, a expressão do domínio DUF4130 sozinho não foi capaz de promover nenhuma melhora no fenótipo de sensibilidade à UV-C do mutante *CCNA_02418*, sugerindo que este domínio não possui atividade quando separado do domínio UDG. É possível que nossa construção expresse uma proteína com menor estabilidade ou que não esteja propriamente enovelada. De todo modo, estas análises deverão ser refeitas, já que tivemos dificuldade de promover a completa complementação dos mutantes, mesmo com os respectivos genes selvagens inteiros sendo reintroduzidos em cópias plasmidiais.

Em ambos os mutantes *CCNA_02417* e *CCNA_02418* a remoção de danos do tipo CPD está prejudicada, confirmando o papel dos respectivos genes no reparo de DNA. É possível que este sistema também seja ativo contra os 6-4-PPs gerados pela luz UV, mas não foi possível testar esta hipótese por falta de bons anticorpos contra esta lesão.

Por outro lado, os experimentos de mutagênese induzida por luz UV mostram que *CCNA_02418* de fato desempenha um papel adicional, de prevenção da mutagênese induzida por luz UV. Já o mutante *CCNA_02417* não apresenta diferenças significativas na mutagênese induzida por luz UV em comparação com a linhagem selvagem. Isso corrobora o modelo por nós proposto (Figura 14), onde a atividade de UDG de *CCNA_02418* previne a mutagênese proveniente da desaminação de citosinas em dímeros.

Ensaio realizados previamente em nosso laboratório determinaram que a mutagênese induzida por UV-C em linhagens deficientes nos genes de TLS é abolida em cerca de 2/3 (GALHARDO et al., 2005). Até o presente, não sabíamos qual a origem dos 1/3 restantes, já que estas mutações não dependem das polimerases de TLS. Ao estudar o sistema *CCNA_02417/02418*, notamos que a reversão de dímeros contendo uracilas mediada por *CCNA_02417* poderia promover mutagênese induzida por UV, desde que algumas destas uracilas escapassem ao reparo mediado por *CCNA_02418*. Desta forma, testamos a hipótese de que a mutagênese observada na ausência de TLS (mutante *dnaE2*) fosse dependente da atividade de *CCNA_02417*. O resultado mostra que claramente as mutações induzidas por UV independentemente de TLS só são formadas em células proficientes em *CCNA_02417*. Desta forma, identificamos que este sistema promove a sobrevivência celular, ao eventual custo de mutagênese, sendo um fator tanto de resistência ao UV quanto fonte de variabilidade genética.

Uma aparente incongruência neste modelo, é que a deleção de *CCNA_02417* na linhagem TLS^- causa uma diminuição da mutagênese, mas tal deleção não afeta a mutagênese no contexto TLS^+ . Isto pode ser explicado pelo fato de que a falta de reparo de fotoprodutos por *CCNA_02417* acarreta em mais lesões servindo de substrato para TLS, gerando um efeito compensatório nas taxas de mutação. Já a falta combinada de TLS e de reversão de dímeros abole a mutagênese completamente, como esperado.

Outro ponto interessante é a redundância de UDGs em *C. crescentus*. Quatro genes codificam enzimas desta família neste organismo, dentre eles *CCNA_02418* (MARTINS-PINHEIRO; MARQUES; MENCK, 2007). Dois destes genes são essenciais, segundo varreduras em larga escala (CHRISTEN et al., 2011). É interessante notar que a construção do mutante *CCNA_02418* se mostrou difícil, de tal forma que só fomos bem-sucedidos quando testamos uma metodologia com seleção positiva para os mutantes, por inserção de gene de resistência. O envolvimento das demais UDGs na prevenção da mutagênese por luz UV é uma hipótese que não pode ser descartada, apesar da associação em operon de *CCNA_02417* e *CCNA_02418* sugerir que esta última seja a UDG dedicada a evitar mutagênese decorrente da formação de uracila em fotoprodutos.

6. CONCLUSÕES.

6.1. Estudo do reparo de 8-oxoguanina em *C. crescentus*.

- Linhagens de *C. crescentus* com deficiência nas glicosilases do sistema GO exibem um fenótipo mutador leve quando comparado com *E. coli* de mesmo genótipo.
- A baixa mutagênese espontânea na ausência do sistema GO não se deve à participação de outras vias de reparo de DNA.
- *C. crescentus* possui dois homólogos de *nth*, que não atuam no reparo de 8-oxoguanina, mas que estão envolvidos no reparo de lesões oxidativas citotóxicas.
- O estresse oxidativo promove altos níveis de mutagênese em células mutantes *mutM mutY*, porém os genes *mutM mutY* não são regulados em resposta a danos oxidativos.
- *C. crescentus* em crescimento exponencial tem menores níveis basais de 8-oxodGuo no DNA do que *E. coli*. Este fator deve contribuir pelo menos em parte para a menor dependência do sistema GO para a manutenção da estabilidade genética.

- As diferentes temperaturas ótimas de crescimento de *C. crescentus* e *E. coli* (30°C X 37°C) também tem uma pequena influência na diferença de mutagênese espontânea em células deficientes no sistema GO.

6.2. Caracterização funcional do envolvimento do operon *CCNA_02417/CCNA_02418* no reparo de fotoprodutos.

- O operon *CCNA_02417/CCNA_02418* codifica proteínas que estão envolvidas na proteção contra os efeitos citotóxicos da luz UV -C. Mutantes em ambos os genes são sensíveis a este agente genotóxico.
- A complementação destes mutantes pela re-introdução dos respectivos genes em vetor plasmidial não foi completa, sugerindo uma possível alterações nos níveis do mRNA do operon na ausência das regiões codificantes.
- A ausência de *CCNA_02418* ocasiona um aumento da mutagênese induzida por luz UV-C em *C. crescentus*, sugerindo que há a formação de resíduos de uracila no DNA de células irradiadas com luz UV.
- O componente independente de TLS da mutagênese induzida por UV-C é suprimido na ausência de *CCNA_02417*.
- Dados preliminares do ensaio de imuno *slot blot* mostram que estes genes estão envolvidos no reparo de fotoprodutos tipo CPDs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S. et al. The coordinated functions of the *E. coli* MutS and MutL proteins in mismatch repair. **Molecular cell**, v. 12, n. 1, p. 233–246, 2003.

AGNEZ-LIMA, L. F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms Lucymara. **Mutation Research**, v. 751, p. 15–28, 2012.

ALHAMA, J. et al. Formation of 8-oxoguanine in cellular DNA of *Escherichia coli* strains defective in different antioxidant defences. **Mutagenesis**, v. 13, n. 6, p. 589–594, 1998.

ALLEN, D. J. et al. MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. **EMBO Journal**, v. 16, n. 14, p. 4467–4476, 1997.

ALVAREZ-MARTINEZ, C. E. et al. The ECF sigma factor σ_T is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1240–1255, 2007.

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, n. June, p. 20–26, 2017.

AU, K. G. et al. *Escherichia coli* mutY gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 22, p. 8877–8881, 1989.

AU, K. G.; WELSH, K.; MODRICH, P. Initiation of methyl-directed mismatch repair. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 17, p. 12142–8, 1992.

BAI, H.; LU, A. L. Physical and functional interactions between *Escherichia coli* MutY glycosylase and mismatch repair protein MutS. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 902–910, 2007.

BARAJAS-ORNELAS, R. del C. et al. Error-prone processing of apurinic/aprimidinic (AP) sites by polX underlies a novel mechanism that promotes adaptive mutagenesis in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 16, p. 3012–3022, 2014.

BARAK, Y.; COHEN-FIX, O.; LIVNEH, Z. Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. Significance for UV light mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 41, p. 24174–24179, 1995.

BARRETT, T. E. et al. Crystal Structure of a G:T/U Mismatch-Specific DNA Glycosylase. **Cell**, v. 92, p. 117–129, 1998.

BENJDIA, A. DNA photolyases and SP lyase: Structure and mechanism of light-dependent and independent DNA lyases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, n. 6, p. 711–720, 2012.

BENJDIA, A. et al. Structural insights into recognition and repair of UV-DNA damage by Spore Photoproduct Lyase, a radical SAM enzyme. v. 40, n. 18, p. 9308–9318, 2012.

BERRA, C. M. et al. Plasmid DNA damage induced by singlet molecular oxygen released from the naphthalene endoperoxide DHPNO₂ and photoactivated methylene blue. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 279–283, 2010.

BERTEAU, O.; BENJDIA, A. DNA Repair by the Radical SAM Enzyme Spore Photoproduct Lyase: From Biochemistry to Structural Investigations. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 1, p. 67–77, 2017.

BHATNAGAR, S. K.; BULLIONS, L. C.; BESSMAN, M. J. Characterization of the mutT nucleoside triphosphatase of *Escherichia coli*. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9050–4, 1991.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BLACK, C. G.; FYFE, J. A. .; DAVIES, J. K. Absence of an SOS-like system in *Neisseria gonorrhoeae*. **Gene**, v. 208, n. 1, p. 61–66, 1998.

BLATTNER, F. R. et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453–1462, 1997.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179–194,

2003.

BOITEUX, S.; COSTE, F.; CASTAING, B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 179–201, 2017.

BOITEUX, S.; GELLON, L.; GUIBOURT, N. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 12, p. 1244–1253, 2002.

BOITEUX, S.; RADICELLA, J. P. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. **Biochimie**, v. 81, n. 1–2, p. 59–67, 1999.

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, 2003.

BRASH, D. E.; HASELTINE, W. A. UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. **Nature**, v. 298, n. 5870, p. 189–192, 1982.

BRAZ, V. S. et al. CztR, a LysR-type transcriptional regulator involved in zinc homeostasis and oxidative stress defense in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 20, p. 5480–5488, 2010.

BRUSKOV, V. I. et al. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 6, p. 1354–1363, 2002.

BUCHKO, G. W. et al. Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. **BBA - Gene Structure and Expression**, v. 1263, n. 1, p. 17–24, 1995.

BURDETT, V. et al. In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 12, p. 6765–6770, 2002.

BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to

Strand Scission. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109–1152, 1998.

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, 2011.

BUTALA, M.; ŽGUR-BERTOK, D.; BUSBY, S. J. W. The bacterial LexA transcriptional repressor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 1, p. 82–93, 2009.

CABRERA, M.; NGHIEM, Y.; MILLER, J. H. mutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 11, p. 5405–5407, 1988.

CADET, J. et al. Singlet Oxygen Oxidation of Isolated and Cellular DNA: Product Formation and Mechanistic Insights. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1219–1225, 2006.

CADET, J. et al. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 13–34, 2017.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: Mechanistic aspects and formation in cells. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 8, p. 1075–1083, 2008.

CAMPOY, S. et al. Expression of canonical SOS genes is not under LexA repression in *Bdellovibrio bacteriovorus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 15, p. 5367–5375, 2005.

CANFIELD, G. S. et al. Evolution in fast forward: A potential role for mutators in accelerating *Staphylococcus aureus* pathoadaptation. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 615–628, 2013.

CHRISTEN, B. et al. The essential genome of a bacterium. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 528, p. 1–7, 2011.

CHUNG, J. H. et al. A novel uracil-DNA glycosylase family related to the helix-hairpin-helix DNA glycosylase superfamily. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 8, p. 2045–2055,

2003.

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.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.

COLLIER, J. Plasmid Regulation of chromosomal replication in *Caulobacter crescentus*. **Plasmid**, v. 67, n. 2, p. 76–87, 2012.

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, 2001.

COX, M. M. Regulation of bacterial RecA protein function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 41–63, 2007.

CUPPLES, C. G.; MILLER, J. H. A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 14, p. 5345–5349, 2006.

CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the Loop : Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. v. 74, n. 1, p. 13–41, 2010.

CZECZOT, H. et al. *Escherichia coli* Fpg protein and UvrACB endonuclease repair DNA damage induced by methylene blue plus visible light *in vivo* and *in vitro*. **J.Bacteriol.**, v. 173, n. 11, p. 3419–3424, 1991.

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

DA SILVA, M. S. et al. Consequences of acute oxidative stress in *Leishmania amazonensis*: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 1, p. 138–150, 2017.

DA SILVA NETO, J. F. et al. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense

in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 14, p. 4812–4825, 2009.

DEMPLE, B.; HARRISON, L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. **Annual review of biochemistry**, v. 63, p. 915–948, 1994.

DESNOUS, C.; GUILLAUME, D.; CLIVIO, P. Spore photoproduct: A key to bacterial eternal life. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 3, p. 1213–1232, 2010.

DUWAT, P. et al. Repair of oxidative DNA damage in Grampositive bacteria: The *Lactococcus lactis* Fpg protein. **Microbiology**, v. 141, n. 2, p. 411–417, 1995.

ERILL, I. et al. Differences in LexA regulon structure among Proteobacteria through *in vivo* assisted comparative genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 22, p. 6617–6626, 2004.

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, 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, 2007.

EVINGER, M.; AGABIAN, N. Envelope associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. **Journal of Bacteriology**, v. 132, n. 1, p. 294–301, 1977.

FAJARDO-CAVAZOS, P.; SALAZAR, C.; NICHOLSON, W. L. Molecular Cloning and Characterization of the *Bacillus subtilis* Spore Photoproduct Lyase (spl) Gene, Which Is Involved in Repair of UV Radiation-Induced DNA Damage during Spore Germination. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 6, p. 1735–1744, 1993.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database, p. D281–D288, 2007.

FOREMAN, R.; FIEBIG, A.; CROSSON, S. The lovK-lovR two-component system is a regulator of the general stress pathway in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3038–3049, 2012.

- FOWLER, R. G. et al. Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways. **DNA Repair**, v. 2, n. 2, p. 159–173, 2003.
- FOWLER, R. G.; SCHAAPER, R. M. The role of the mutT gene of *Escherichia* cell in maintaining replication fidelity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 43–54, 1997.
- FREY, P. a; HEGEMAN, A. D.; RUZICKA, F. J. The Radical SAM Superfamily. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 63–88, 2008.
- FRIEDBERG, E. C. et al. DNA repair and mutagenesis. **ASM Press**, p. 1118, 2006.
- FUCHS, R. P.; FUJII, S.; WAGNER, J. Properties and functions of *Escherichia coli*: Pol IV and Pol V. **Advances in Protein Chemistry**, v. 69, p. 229–264, 2004.
- FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, n. c, p. 1–16, 2010.
- 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.
- GEDIK, C. M.; COLLINS, A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 1, p. 82–84, 2004.
- GIESE, K. C.; MICHALOWSKI, C. B.; LITTLE, J. W. RecA-Dependent Cleavage of LexA Dimers. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 1, p. 148–161, 2008.
- GLICKMAN, B. W. et al. The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 18, p. 6945–9, 1986.
- GOOSEN, N.; MOOLENAAR, G. F. Repair of UV damage in bacteria. **DNA Repair**, v. 7, n. 3, p. 353–379, 2008.
- GROOTHUIZEN, F. S.; SIXMA, T. K. The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures. **DNA Repair**, v. 38, p. 14–23, 2016.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 2007.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.

HASSIM, F. et al. A combinatorial role for MutY and Fpg DNA glycosylases in mutation avoidance in *Mycobacterium smegmatis*. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 779, p. 24–32, 2015.

HITOMI, K.; IWAI, S.; TAINER, J. A. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair. **DNA Repair**, v. 6, n. 4, p. 410–428, 2007.

HOSEKI, J. et al. Crystal structure of a family 4 uracil-DNA glycosylase from *Thermus thermophilus* HB8. **Journal of Molecular Biology**, v. 333, n. 3, p. 515–526, 2003.

HSIEH, P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. **Mutat Res**, v. 486, n. 2, p. 71–87., 2001.

IPPOLITI, P. et al. Multiple Strategies for Translesion Synthesis in Bacteria. **Cells**, v. 1, n. 4, p. 799–831, 2012.

JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. **Chromosoma**, v. 121, p. 1–20, 2012.

JEONG, C. et al. MutS switches between two fundamentally distinct clamps during mismatch repair. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 379–385, 2011.

JOHNSON, N. A. et al. 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine Is Removed by a Nucleotide Excision Repair-Like Mechanism in *Porphyromonas gingivalis* W83. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 22, p. 7697–7703, 2004.

KAVLI, B. et al. hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39926–39936,

2002.

KIM, J.-E. et al. 8-Oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 556, n. 1–3, p. 104–110, 2004.

KIM, M.; HUANG, T.; MILLER, J. H. Competition between MutY and mismatch repair at A x C mispairs In vivo. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 15, p. 4626–9, 2003.

KIM, Y.-J.; WILSON III, D. M. Overview of Base Excision Repair Biochemistry. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 3–13, 2012.

KISKER, C.; KUPER, J.; VAN HOUTEN, B. Prokaryotic nucleotide excision repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, p. a012591, 2013.

KOSAKA, H. et al. Crystal Structure of Family 5 Uracil-DNA Glycosylase Bound to DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, n. 4, p. 839–850, 2007.

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

KULISHEV, C. O. L. **Papel da resposta SOS no reparo de danos induzidos por mitomicina C e na resposta aos antibióticos beta-lactâmicos em *Caulobacter crescentus***. 2014. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

KULUNCSICS, Z. et al. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: Involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 71–80, 1999.

KURTHKOTI, K. et al. A distinct physiological role of MutY in mutation prevention in mycobacteria. **Microbiology**, v. 156, p. 88–98, 2010.

LAHUE, R. S.; AU, K. G.; MODRICH, P. DNA mismatch correction in a defined system. **Science**, v. 245, n. 4914, p. 160–164, 1989.

LEE, Y. A. et al. Oxidation of guanine in G, GG, and GGG sequence contexts by aromatic pyrenyl radical cations and carbonate radical anions: Relationship between kinetics and

- distribution of alkali-labile lesions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 6, p. 1834–1844, 2008.
- LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 85–98, 2008.
- LI, L. Mechanistic studies of the radical SAM enzyme spore photoproduct lyase (SPL). **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 11, p. 1264–1277, 2012.
- LITTLE, J. W. Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. **Biochimie**, v. 73, n. 4, p. 411–421, 1991.
- LIU, Z.; WANG, L.; ZHONG, D. Dynamics and mechanisms of DNA repair by photolyase. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 18, p. 11933–11949, 2015.
- LOPES-KULISHEV, C. O. et al. Functional characterization of two SOS-regulated genes involved in mitomycin C resistance in *Caulobacter crescentus*. **DNA Repair**, v. 33, p. 78–89, 2015.
- LOURENÇO, R. F.; GOMES, S. L. The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the σ -ChrR system in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 1159–1170, 2009.
- LOVELL, M. A.; MARKESBERY, W. R. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7497–7504, 2007.
- LU, a L. et al. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 35, n. 2, p. 141–170, 2001.
- MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. **Nature**, v. 355, n. 6357, p. 273–275, 1992.
- MANDSBERG, L. F. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2483–2491, 2009.

- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D200–D203, 2017.
- MARINUS, M. G. Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 128, n. 3, p. 853–854, 1976.
- MARKS, M. E. et al. The Genetic Basis of Laboratory Adaptation in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 14, p. 3678–3688, 2010.
- MARQUES, R. C. P. **Identificação de genes de reparo de DNA em *Caulobacter crescentus* através da seleção de clones sensíveis a agentes genotóxicos**. 2008. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- MARTINS-PINHEIRO, M. et al. Molecular characterization of *Caulobacter crescentus* mutator strains. **Gene**, v. 626, n. May, p. 251–257, 2017.
- MARTINS-PINHEIRO, M.; MARQUES, R. C. P.; MENCK, C. F. M. Genome analysis of DNA repair genes in the alpha proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 17, 2007.
- MATSUMOTO, Y. et al. Escherichia coli Nth and human hNTH1 DNA glycosylases are involved in removal of 8-oxoguanine from 8-oxoguanine/guanine mispairs in DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 1975–1981, 2001.
- MCKENZIE, R. L. et al. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 218–231, 2007.
- MCKIBBIN, P. L. et al. Repair of hydantoin lesions and their amine adducts in DNA by base and nucleotide excision repair. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 37, p. 13851–13861, 2013.
- MENCK, C. F. M. et al. Genetic deleterious effects of singlet oxygen. **Quimica Nova**, v. 16, n. 4, p. 328–336, 1993.

MENCK, C. F. M. Shining a light on photolyases. **Nature Genetics**, v. 32, p. 338–339, 2002.

MICHAELS, M. L. et al. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 7022–7025, 1992.

MITCHELL, D. L.; KARENTZ, D. The Induction and Repair of DNA Photodamage in the Environment. In: **Environmental UV Photobiology**. Boston, MA: Springer US, 1993. p. 345–377.

MODELL, J. W. et al. A DNA Damage-Induced , SOS-Independent Checkpoint Regulates Cell Division in *Caulobacter crescentus*. v. 12, n. 10, p. e1001977, 2014.

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. 1328–43, 2011.

MOELLER, R. et al. Role of pigmentation in protecting *Bacillus sp.* endospores against environmental UV radiation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 231–236, 2005.

MOHANA, D.; THIPPESWAMY, S.; ABHISHEK, R. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus spp.* **Radiation Protection and Environment**, v. 36, n. 4, p. 168, 2014.

MOHR, S. C. et al. Binding of small acid-soluble spore proteins from *Bacillus subtilis* changes the conformation of DNA from B to A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 1, p. 77–81, 1991.

MONASTIRIAKOS, S. K. et al. Functional interactions between the MutL and Vsr proteins of *Escherichia coli* are dependent on the N-terminus of Vsr. **DNA Repair**, v. 3, n. 6, p. 639–647, 2004.

MOOLENAAR, G. F. et al. Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 99, n. 3, p. 1467–1472, 2002.

MORERO, N. R.; ARGARAÑA, C. E. *Pseudomonas aeruginosa* deficient in 8-oxodeoxyguanine repair system shows a high frequency of resistance to ciprofloxacin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 290, n. 2, p. 217–226, 2009.

NAKABEPPU, Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12543–12557, 2014.

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

NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 491–505, 2006.

NGHIEM, Y. et al. The mutY gene: A mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 8, p. 2709–13, 1988.

NI, T. T.; MARSISCHKY, G. T.; KOLODNER, R. D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 4, n. 3, p. 439–444, 1999.

NICHOLSON, W. L.; SETLOW, B.; SETLOW, P. Binding of DNA in vitro by a small, acid-soluble spore protein from *Bacillus subtilis* and the effect of this binding on DNA topology. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6900–6, 1990.

NICHOLSON, W. L.; SETLOW, B.; SETLOW, P. Ultraviolet irradiation of DNA complexed with alpha/beta-type small, acid-soluble proteins from spores of *Bacillus* or *Clostridium* species makes spore photoproduct but not thymine dimers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 19, p. 8288–8292, 1991.

NIERMAN, W. C. et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **PNAS**,

v. 98, n. 7, p. 4136–4141, 2001.

O'NEILL, R. J. et al. Mismatch uracil glycosylase from *Escherichia coli*. A general mismatch or a specific DNA glycosylase? **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20526–20532, 2003.

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

ORDONEZ, H.; USON, M. L.; SHUMAN, S. Characterization of three mycobacterial DinB (DNA polymerase IV) paralogs highlights DinB2 as naturally adept at ribonucleotide incorporation. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 17, p. 11056–11070, 2014.

ÖZTÜRK, N. et al. Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. **Biochemistry**, v. 47, n. 39, p. 10255–10261, 2008.

PEARL, L. H. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 460, n. 3–4, p. 165–181, 2000.

PFEIFER, G. P. et al. In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 4, p. 1374–8, 1991.

PIETTE, J. Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 11, p. 241–260, 1991.

POLOSINA, Y. Y. et al. *The Escherichia coli* mismatch repair protein MutL recruits the Vsr and MutH endonucleases in response to DNA damage. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 12, p. 4041–4043, 2009.

PRAT, F.; HOUK, K. N.; FOOTE, C. S. Effect of guanine stacking on the oxidation of 8-oxoguanine in B-DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 4, p. 845–846, 1998.

RADCHENKO, E. A. et al. Quantitative analysis of the rates for repeat-mediated genome instability in a yeast experimental system. **Methods in molecular biology**, v. 1672, p. 421–438, 2018.

RAVANAT, J. L.; CADET, J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. **Chemical research in toxicology**, v. 8, n. 3, p. 379–388, 1996.

REBEIL, R. et al. Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4879–4885, 1998.

ROBERTS, R. C. et al. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding hrcA, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene grpE. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1829–1841, 1996.

ROCHA, R. P. da. **A resposta SOS de *Caulobacter crescentus* e relações dos mecanismos de reparo com a progressão do ciclo celular**. 2011. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ROSCHE, W. A.; FOSTER, P. L. Determining Mutation Rates in Bacterial Populations. **Methods**, v. 20, n. 1, p. 4–17, 2000.

SAITO, Y. et al. Characterization of endonuclease III (nth) and endonuclease VIII (nei) mutants of *Escherichia coli* K-12. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 11, p. 3783–3785, 1997.

SANCAR, A. Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 30, p. 8502–8527, 2016.

SANCAR, A.; RUPP, W. D. A Novel Repair Enzyme : UVRABC Excision Nuclease of *Escherichia coli* Cuts a DNA Strand on Both Sides of the Damaged Region. **cell**, v. 33, p. 249–260, 1983.

SANCAR, G. B.; SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyases. **Trends in**

Biochemical Sciences, v. 12, p. 259–261, 1987.

SANDERS, L. H.; SUDHAKARAN, J.; SUTTON, M. D. The GO system prevents ROS-induced mutagenesis and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, n. 1, p. 89–96, 2009.

SANDIGURSKY, M.; FRANKLIN, W. A. Thermostable uracil-DNA glycosylase from *Thermotoga maritima*, a member of a novel class of DNA repair enzymes. **Current Biology**, v. 9, n. 10, p. 531–534, 1999.

SASSANFAR, M.; ROBERTS, J. W. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. **Journal of Molecular Biology**, v. 212, n. 1, p. 79–96, 1990.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA Mismatch Repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 579–608, 2004.

SCHORMANN, N.; RICCIARDI, R.; CHATTOPADHYAY, D. Uracil-DNA glycosylases - Structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes. **Protein Science**, v. 23, n. 12, p. 1667–1685, 2014.

SCOTT, D. C. et al. Complete Genome Sequence of a Wild-Type Isolate of *Caulobacter vibrioides* Strain CB2. **Microbiology Resource Announcements**, v. 7, n. 17, p. e01215-18, 2018.

SETLOW, B.; HAND, A. R.; SETLOW, P. Synthesis of a *Bacillus subtilis* small, acid-soluble spore protein in *Escherichia coli* causes cell DNA to assume some characteristics of spore DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1642–1653, 1991.

SETLOW, P. Mechanisms for the Prevention of Damage to DNA in Spores of *Bacillus* Species. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 29–54, 1995.

SETLOW, P. Resistance of Spores of *Bacillus* Species to Ultraviolet Light. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 97–104, 2001.

SETLOW, R. B.; CARRIER, W. L. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. **Journal of Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 237–254, 1966.

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**, v. 349, n. 6308, p. 431–434, 1991.

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**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

SINHA, R. P.; HÄDER, D.-P. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 225–236, 2002.

SKERKER, J. M.; LAUB, M. T. CELL-CYCLE PROGRESSION AND THE GENERATION OF ASYMMETRY IN CAULOBACTER CRESCENTUS The period of time in the cell cycle before DNA replication starts and during which the cell contains only one copy of its genome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 325–337, 2004.

SOFIA, H. J. et al. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 5, p. 1097–1106, 2001.

SOWLATI-HASHJIN, S.; WETMORE, S. D. Quantum mechanical study of the β - and δ -lyase reactions during the base excision repair process: application to FPG. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 17, n. 38, p. 24696–706, 2015.

STOJIC, L.; BRUN, R.; JIRICNY, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. **DNA Repair**, v. 3, n. 8–9, p. 1091–1101, 2004.

STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959–64, 2000.

TANG, M. et al. UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 8919–24, 1999.

THANBICHLER, M.; INIESTA, A. A.; SHAPIRO, L. A comprehensive set of plasmids for vanillate - And xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 20, p. e137, 2007.

TODO, T. Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 434, n. 2, p. 89–97, 1999.

TONG, Y.; LIGHTHART, B. Solar radiation is shown to select for pigmented bacteria in the ambient outdoor atmosphere. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. 1, p. 103–106, 1997.

TRUGLIO, J. J. et al. Prokaryotic Nucleotide Excision Repair : The UvrABC System. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p. 233–252, 2006.

TSAI, J. W.; ALLEY, M. R. K. Proteolysis of the *Caulobacter* McpA chemoreceptor is cell cycle regulated by a ClpX-dependent pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 17, p. 5001–5007, 2001.

VAN HOUTEN, B. et al. “Close-fitting sleeves”: DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. **Mutation Research**, v. 577, n. 1–2, p. 92–117, 2005.

VAN HOUTEN, B.; EISEN, J. A.; HANAWALT, P. C. A cut above: Discovery of an alternative excision repair pathway in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 2581–2583, 2002.

VENKATESH, J. et al. Importance of Uracil DNA Glycosylase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium smegmatis*, G+C-rich Bacteria, in Mutation Prevention, Tolerance to Acidified Nitrite, and Endurance in Mouse Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24350–24358, 2003.

VERHOEVEN, E. E. A. et al. The C-terminal region of *Escherichia coli* UvrC contributes to the flexibility of the UvrABC nucleotide excision repair system. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 11, p. 2492–500, 2002.

WADE, J. T. et al. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. **Genes &**

development, v. 19, n. 21, p. 2619–2630, 2005.

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

WALLACE, S. S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases,. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 1, p. 1–14, 2002.

WANG, F.; YANG, W. Structural Insight into Translesion Synthesis by DNA Pol II. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1279–1289, 2009.

WARNER, D. F. et al. Essential roles for *imuA*'- and *imuB*-encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 29, p. 13093–13098, 2010.

WIBLEY, J. E. A. et al. Structure and Specificity of the Vertebrate Anti-Mutator Uracil-DNA Glycosylase SMUG1. **Molecular Cell**, v. 11, n. 6, p. 1647–1659, 2004.

WYATT, M. D. et al. 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. **BioEssays**, v. 21, n. 8, p. 668–676, 1999.

WYRZYKOWSKI, J.; VOLKERT, M. R. The Escherichia coli Methyl-Directed Mismatch Repair System Repairs Base Pairs Containing Oxidative Lesions. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 5, p. 1701–1704, 2003.

YAMAGUCHI, M.; DAO, V.; MODRICH, P. MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 15, p. 9197–9201, 1998.

YANG, L. et al. A radical transfer pathway in spore photoproduct lyase. **Biochemistry**, v. 52, n. 18, p. 3041–3050, 2013.

YANG, L. et al. Spore photoproduct within DNA is a surprisingly poor substrate for its designated repair enzyme—The spore photoproduct lyase. **DNA Repair**, v. 53, p. 31–42, 2017.

YANG, L.; LI, L. Spore photoproduct lyase: The known, the controversial, and the unknown. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 7, p. 4003–4009, 2015.

YANG, W. Structure and function of mismatch repair proteins. **Mutation research**, v. 460, n. 3–4, p. 245–56, 2000.

YOKOYAMA, H.; MIZUTANI, R. Structural biology of DNA (6-4) photoproducts formed by ultraviolet radiation and interactions with their binding proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20321–20338, 2014.

ZHANG, M.; WANG, L.; ZHONG, D. Photolyase: Dynamics and Mechanisms of Repair of Sun-Induced DNA Damage. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 1, p. 78–92, 2017.

ZHARKOV, D. O. Base excision DNA repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 10, p. 1544–1565, 2008.

ZIMMERMANN, L. et al. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 15, p. 2237–2243, 2018.