

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

## 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 fotolases. Curiosamente, em esporos bacterianos, é encontrada outra enzima, a liase de fotoprodutos de esporos (SP liase), que realiza a reversão direta de um fotoproduto 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.

## 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 metabólitos 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*.

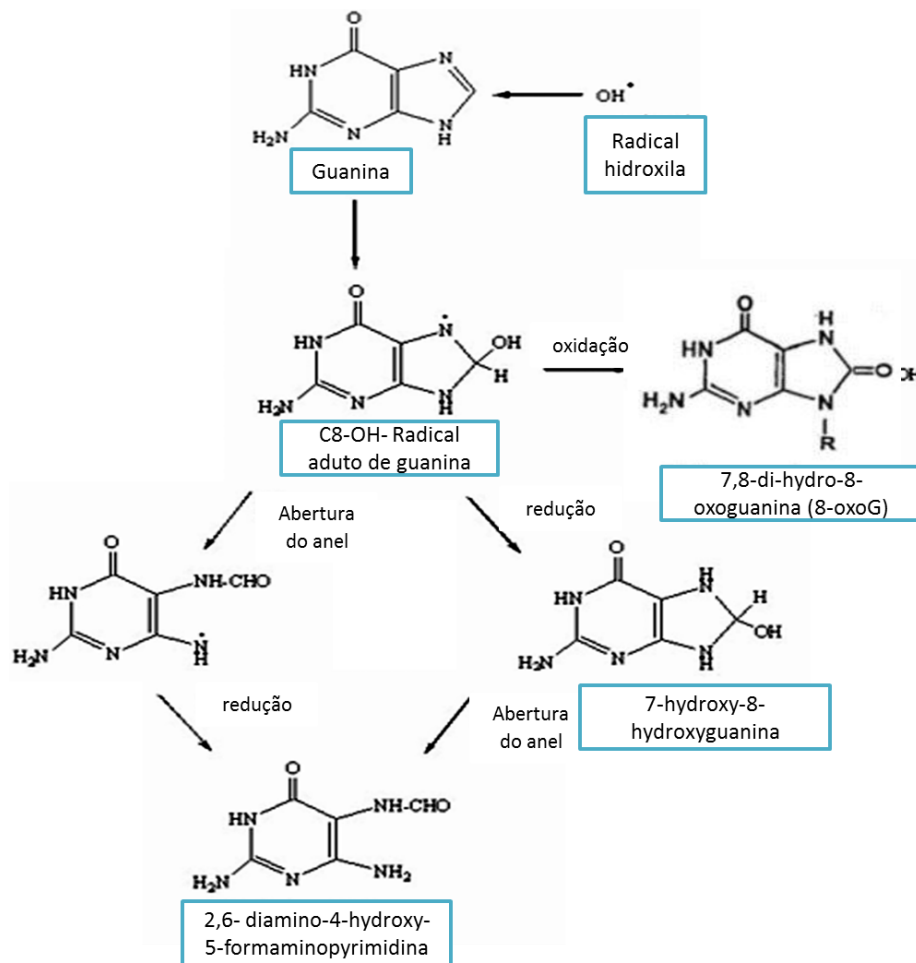
## **1.2. Danos oxidativos no DNA do tipo 8-oxoguanina.**

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.**

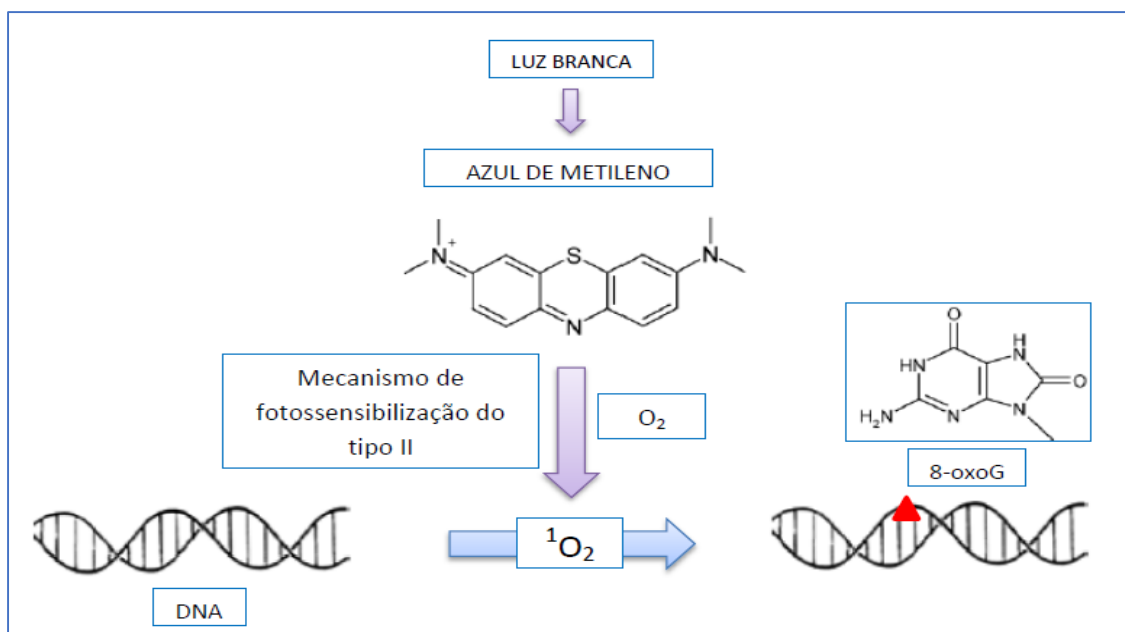


Radicais hidroxila originados após estresse oxidativo celular podem reagir com o carbono 8 da guanina e resultar em um radical de guanina C8-OH, que pode ser oxidado a 8-oxoguanina. Fonte: modificado de (LOVELL; MARKESBERY, 2007)

O oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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. Consequentemente, 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).

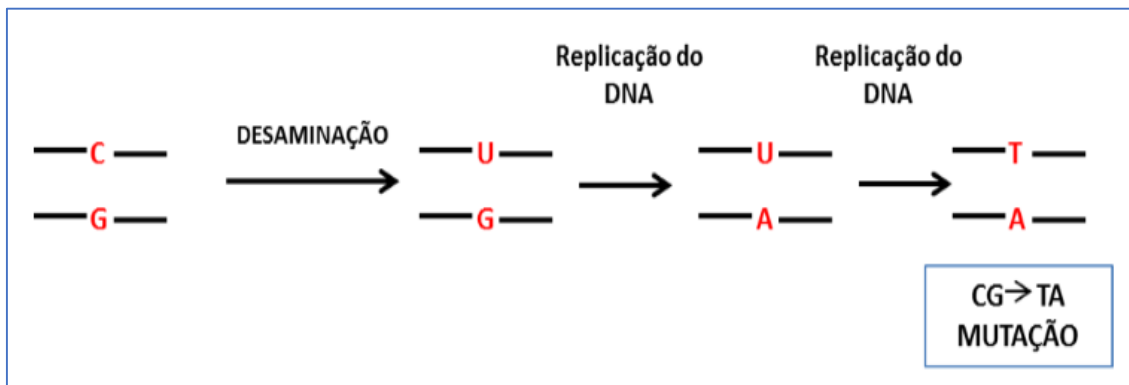
Os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona, (6-4 PPs) são formados pela ligação covalente entre a posição C-6 de uma pirimidina 5' e a posição C-4 da pirimidina 3' adjacente. Este tipo de lesão introduz uma distorção proeminente na estrutura dupla helicoidal do DNA porque os planos das pirimidinas dentro 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 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.**

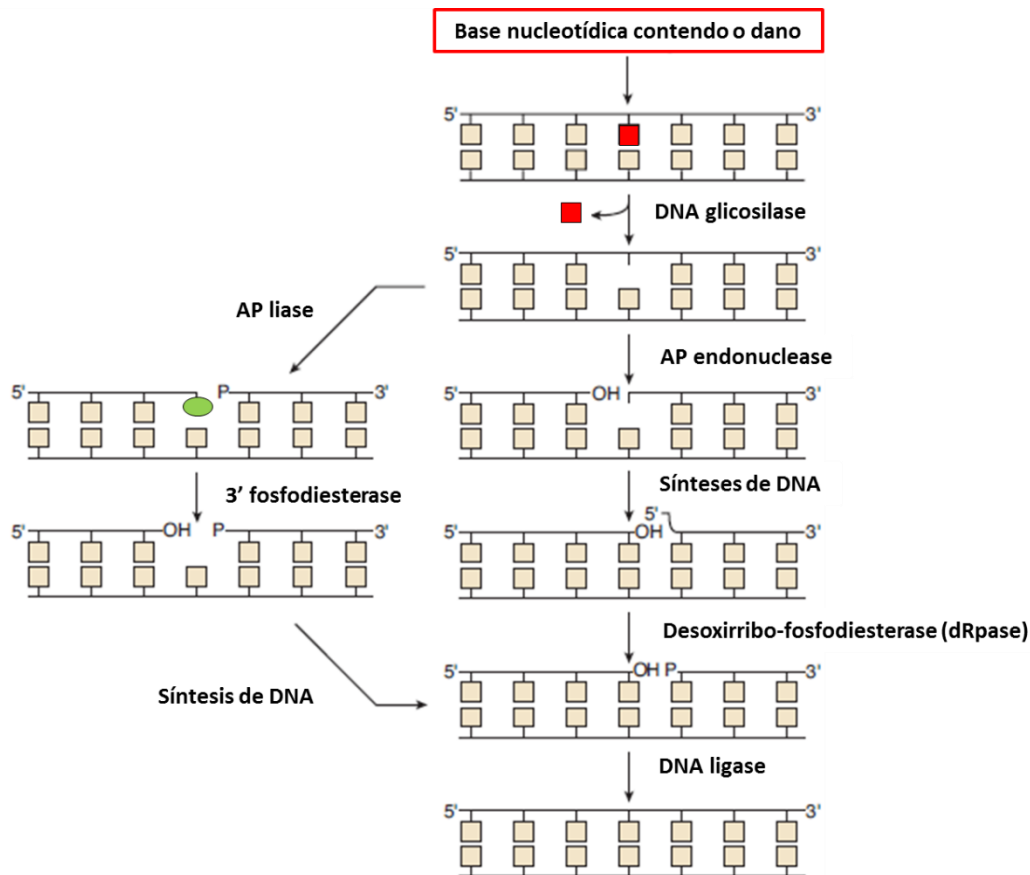


## 1.5. Sistemas de reparo de DNA.

### 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 (dRpases) (BARAJAS-ORNELAS et al., 2014). As glicosilases com atividade AP liase incisam o sítio AP no DNA por uma reação de  $\beta$ -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*.**

<b>Gene de <i>E.coli</i></b>	<b>Locus em <i>C. crescentus</i></b>	<b>Nome</b>	<b>Características</b>
<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>	<b><u>(CCNA_02355)</u></b> (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,N<sup>4</sup>-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  $\alpha$ -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).

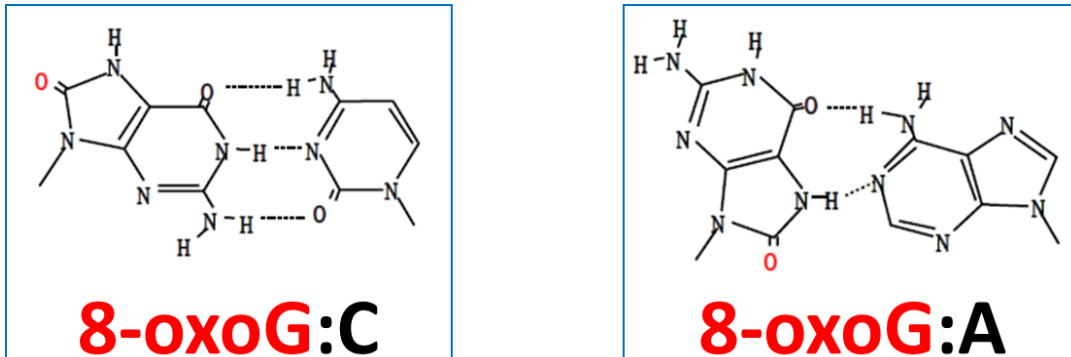
### 1.5.2. Sistema de reparo GO.

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 transversões 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.**

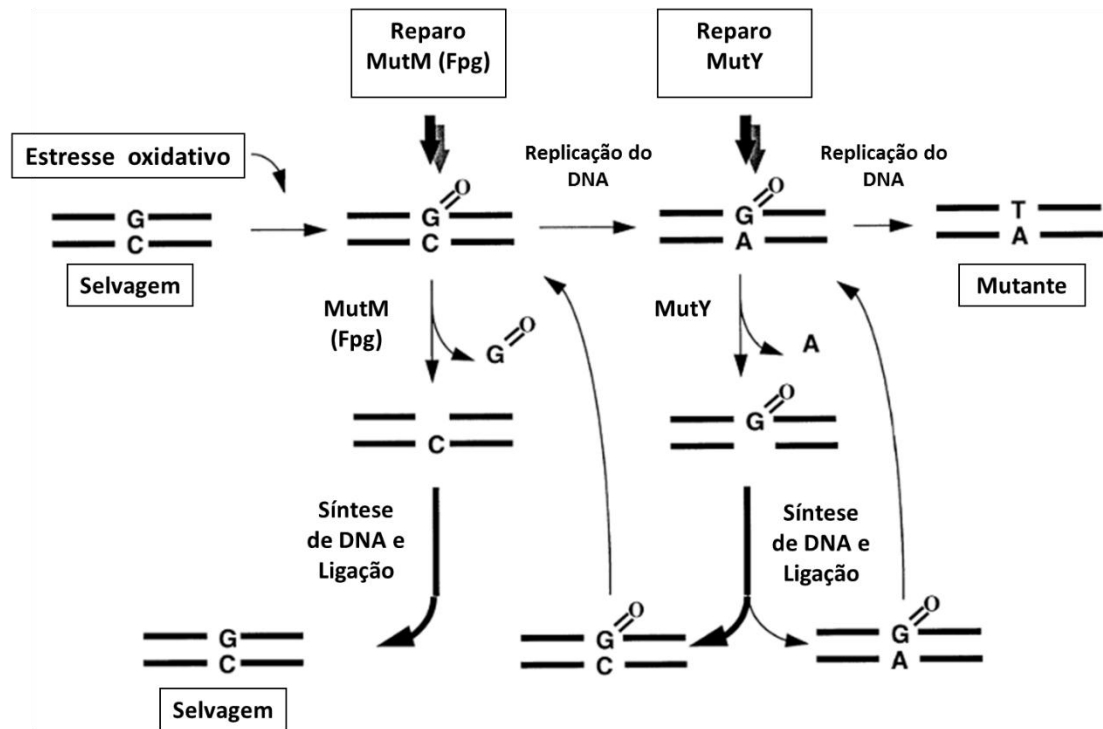


A 8-oxoG prefere a forma *syn* no DNA e pode emparelhar-se com adenina ou citosina com a mesma eficiência, enquanto a guanina no DNA toma principalmente uma forma *anti* e emparelha-se exclusivamente com citosina. Fonte: modificado de (NAKABEPPU, 2014).

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.**

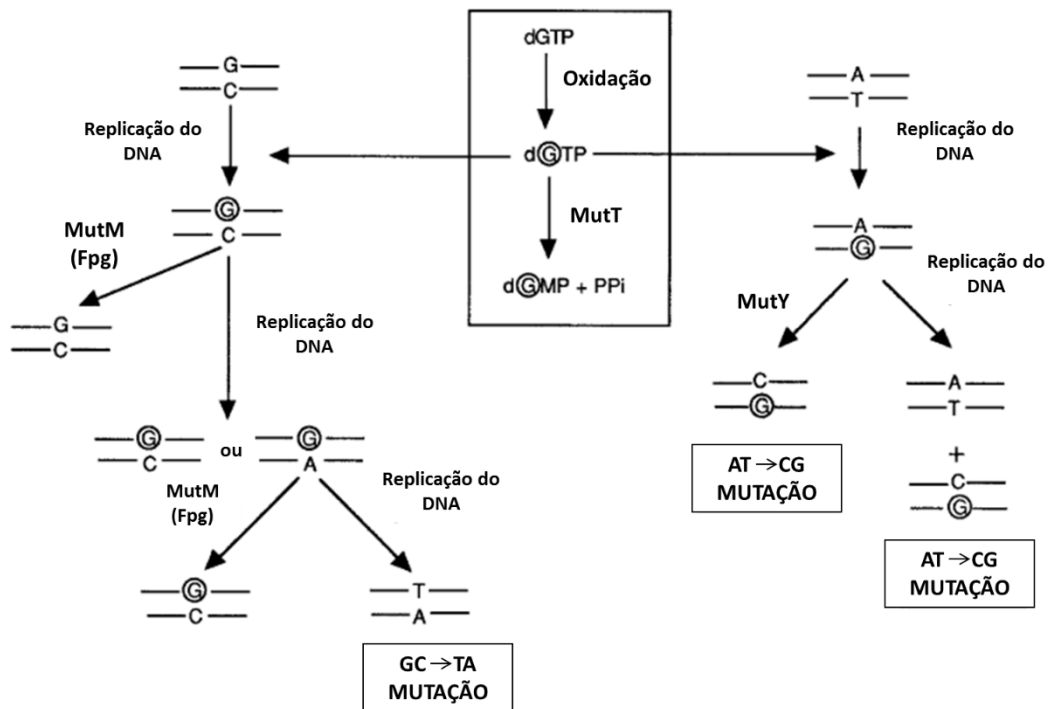


O estresse oxidativo pode resultar em danos do tipo 8-oxoG. A base oxidada 8-oxoG pode ser removida pela glicosilase MutM, e o reparo subsequente pela via BER pode restaurar o emparelhamento original G:C. Caso eventos de replicação ocorram antes do reparo por MutM, polimerases replicativas podem incorporar 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<sub>i</sub> (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.

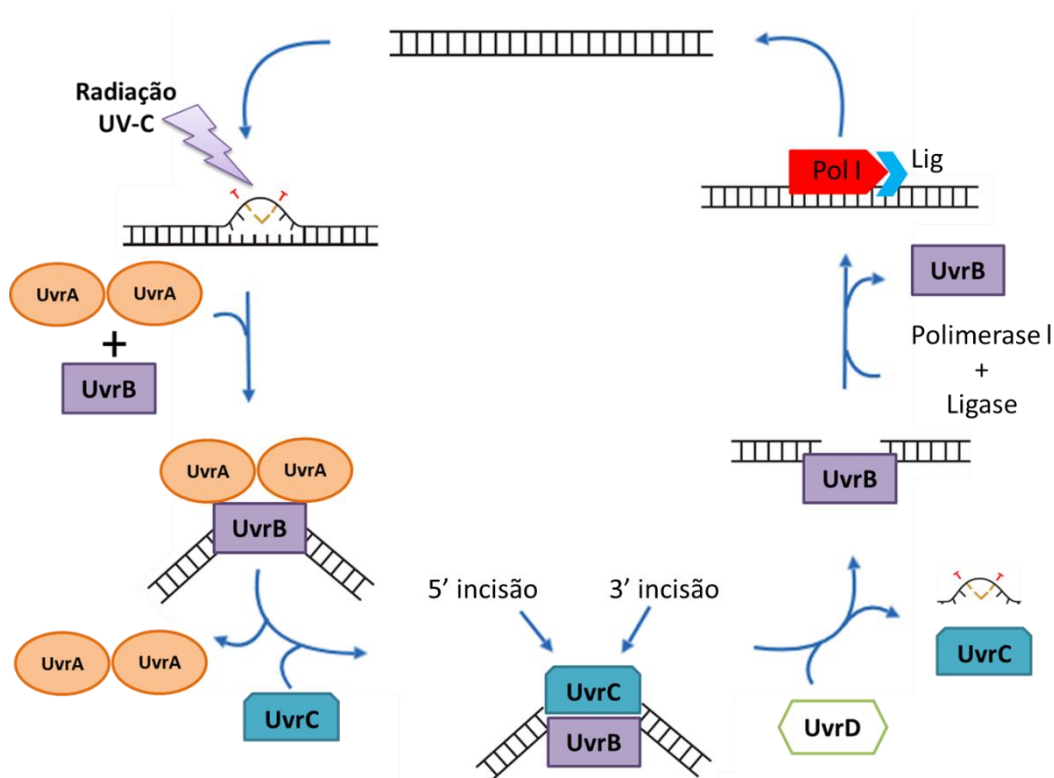
O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é considerado um dos mais versáteis e flexíveis, por atuar no reparo de uma grande variedade de lesões que resultam em distorções significativas na dupla-hélice da molécula de DNA. Dentre os danos mais relevantes reparados pela via NER, destacam-se 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 (UvrA<sub>2</sub>UvrB) ou heterotetrâmero (UvrA<sub>2</sub>UvrB<sub>2</sub>) 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 endonuclease 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)<sub>2</sub> em presença de ATP. (UvrA)<sub>2</sub> interage com UvrB resultando no complexo UvrA<sub>2</sub>B, 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 MutS<sub>2</sub>), MutL (como dímero MutL<sub>2</sub>), 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 N<sup>6</sup> 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

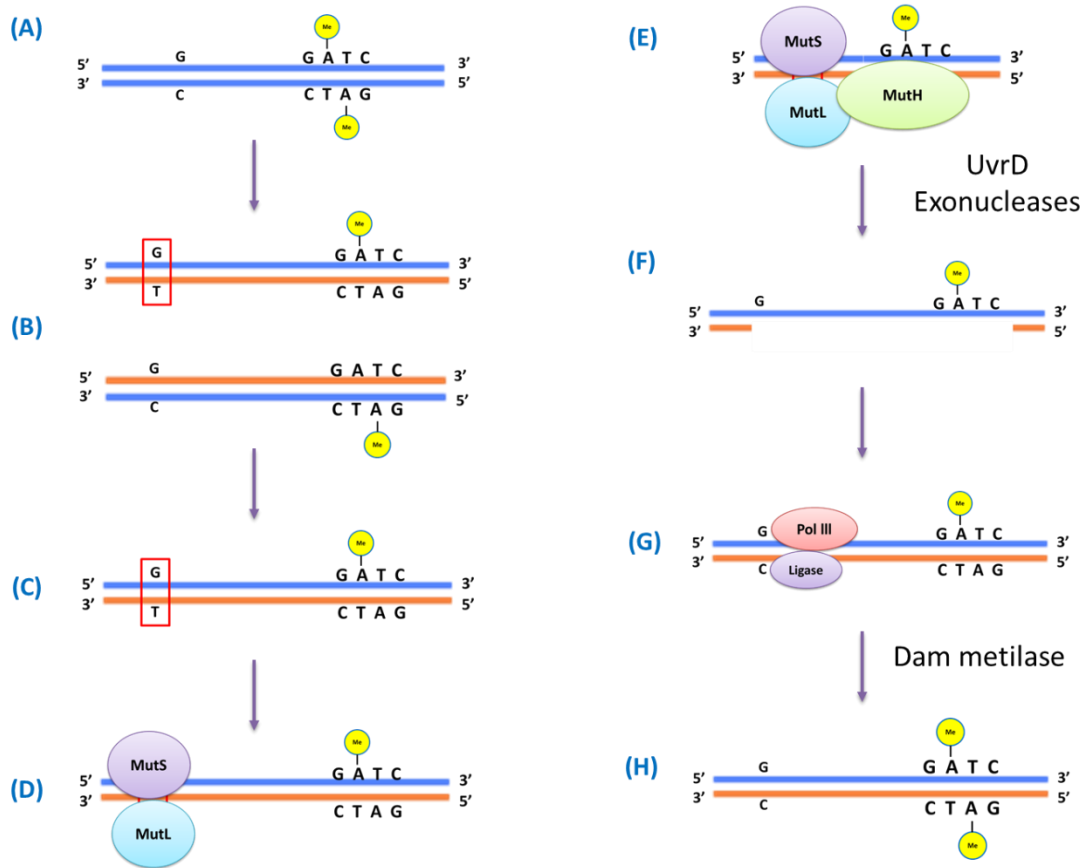
as fitas do DNA na direção da base mal emparelhada (YAMAGUCHI; DAO; MODRICH, 1998). Durante o a dissociação das fitas, uma exonuclease degrada a fita de DNA onde houve a clivagem. Diferentes exonucleases são usadas, dependendo se a enzima precisa viajar na direção 5'→3' ou 3'→5' ao longo do DNA (LI, 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 reconhecida pela enzima MutS e forma um complexo com MutL, que varre bidirecionalmente 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 fotolases.**

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 fotolases, 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 fotolases 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 fotolases 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<sup>-</sup>), 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 fotolase para regenerar pirimidinas monoméricas e FADH<sup>-</sup>. (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 fotolase 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).

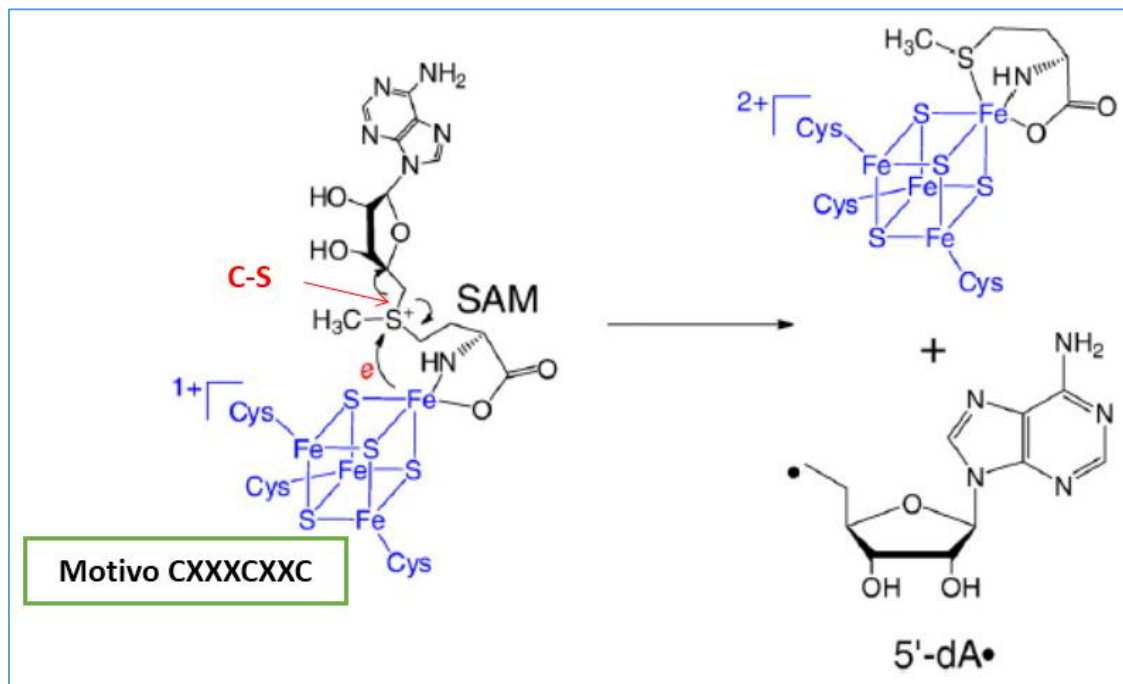
SP liase é de grande interesse devido ao seu mecanismo de reparo do DNA exclusivo e sua capacidade de conferir alta resistência UV aos esporos, incluindo as de espécies patogênicas, como *Bacillus anthracis* e *Clostridium botulinum*. Revisado em (BENJDIA, 2012; BENJDIA et al., 2012; YANG; LI, 2015). 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.**

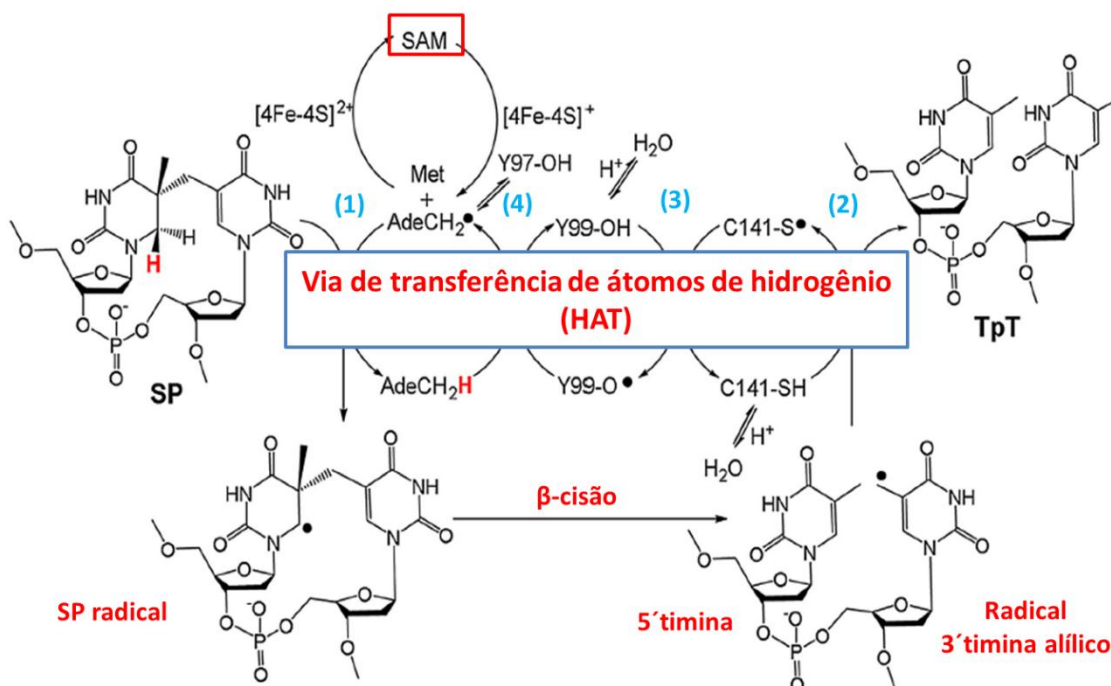




A Reação de clivagem redutiva de SAM para produzir o radical 5'-dA•. Fonte: modificado de (LI, 2012).

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  $\beta$ -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).

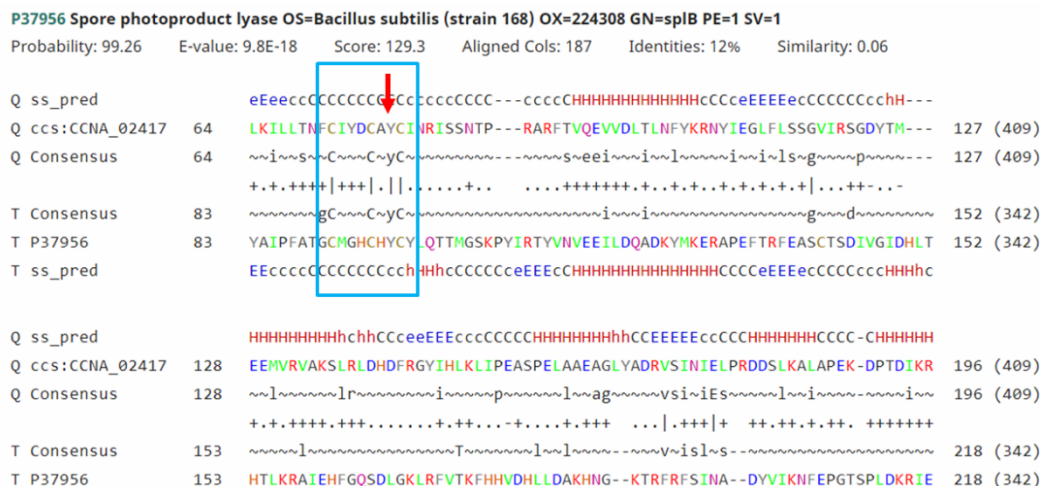
*Neisseria gonorrhoeae* é uma exceção, já que não possui um sistema semelhante ao SOS que é induzido em resposta a danos no DNA (BLACK; FYFE; DAVIES, 1998).

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 fidelidade (*dnaE2*, *imuB* e *imuA*) e um inibidor da divisão celular, *sula*, que causa a filamentação celular (CIRZ et al., 2006).

Em *C. crescentus* a repetição direta GTTCN<sub>7</sub>GTTC é o operador SOS presente nos promotores de 37 genes regulados de maneira dependente da proteína LexA. Curiosamente, cerca de metade desses genes são anotados como genes de função desconhecida. (DA ROCHA et al., 2008). Nosso grupo já caracterizou alguns destes genes, como *mmcA* e *mmcB*, envolvidos na defesa contra danos no DNA causados pela mitomicina C (MMC), mas não contra lesões induzidas por outros agentes danificadores comuns do DNA (LOPES-KULISHEV et al., 2015).

Além disso, em *C. crescentus*, trabalhos prévios identificaram dois genes que tem função desconhecida, *CCNA\_02417* e *CCNA\_02418*, que fazem parte do regulon SOS (DA ROCHA et al., 2008; MODELL et al., 2014). O gene *CCNA\_02417* codifica uma proteína da superfamília "Radical SAM", com similaridade distante com a SP liase de *Bacillus subtilis* como mostrado na Figura 12, utilizando o software HHPRED (ZIMMERMANN et al., 2018).

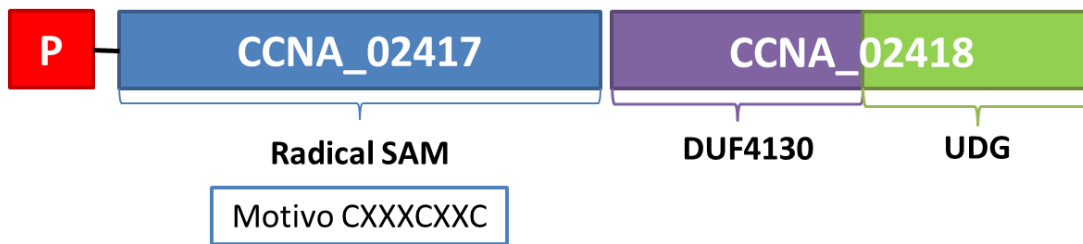
**Figura 12 – Alinhamento da estrutura secundária da proteína CCNA\_02417 com a SP liase de *B. subtilis*.**



A análise dos alinhamentos usando o software HHPRED. Dentro do quadro azul celeste os três resíduos de cisteína estritamente conservados geralmente incluídos no motivo CxxxCxxC que apresentam as proteínas da superfamília "Radical SAM". A seta em vermelho mostra que *C. crescentus* apresenta uma das tirosinas (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*.

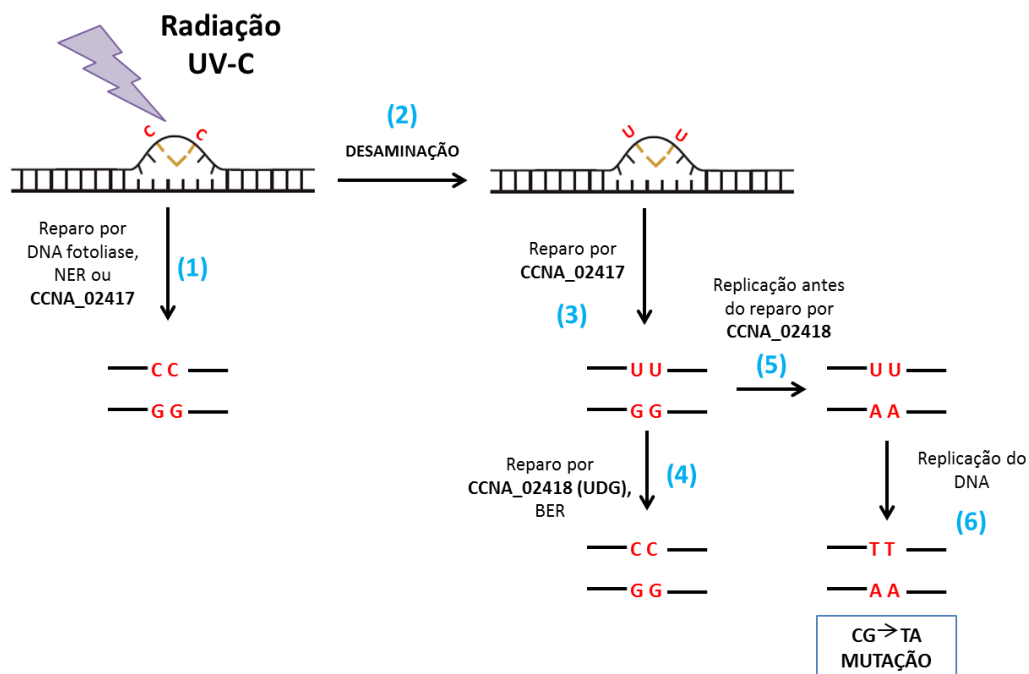
O gene *CCNA\_02417* é parte de um operon com o gene *CCNA\_02418*, que codifica uma proteína com dois domínios distintos como se mostra na Figura 13. Um domínio de função desconhecida (DUF4130) que frequentemente está em operon com proteínas da família "radical SAM" em genomas bacterianos, e outro domínio 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/UmuD<sub>2</sub> (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) (BOSHOF 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 (BOSHOF 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. CONCLUSÕES.

### 2.1. 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.

### 2.2. 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  $\sigma_T$  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 DHPNO<sub>2</sub> 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.

HANAHAH, 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  $\sigma$ -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  $\beta$ - and  $\delta$ -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<sup>2</sup>- 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.