

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Caroline Ferreira de Santana

**Análise da expressão de genes relacionados ao Sistema CRISPR/Cas em
isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***

Recife

2022

Caroline Ferreira de Santana

**Análise da expressão de genes relacionados ao Sistema CRISPR/Cas em
isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Coorientadora: Dra. Ana Carolina de Oliveira Luz

Recife

2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- S232a Santana, Caroline Ferreira de.
Análise da expressão de genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* / Caroline Ferreira de Santana. — Recife: [s.n.], 2022.
94 p. : il. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.
Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino; coorientadora: Ana Carolina de Oliveira Luz.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. Sistemas CRISPR-Cas. 2. Proteínas Associadas a CRISPR - genética. 3. *Pseudomonas aeruginosa* — genética. 4. Prófagos. I. Balbino, Tereza Cristina Leal. II. Luz, Ana Carolina de Oliveira. III. Título.

Caroline Ferreira de Santana

**Análise da expressão de genes relacionados ao Sistema CRISPR/Cas em
isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Aprovada em: 25 de março de 2022.

Banca Examinadora

Titular Externo: Dra. Lúcia Maria Almeida Braz
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Titular Interno: Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/Fiocruz

Dedico a minha mãe, minha melhor amiga.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e acima de todos, agradeço ao Deus que me deu a dádiva de permanecer. Tudo que tenho e que sou pertence a Ele.

Aos meus pais, Carlos e Valéria. Vocês são o que eu tenho de mais precioso nessa vida e sem o suporte de vocês, eu não chegaria a lugar algum.

A minha orientadora Tereza Cristina pelo suporte, incentivo e confiança, mesmo diante de circunstâncias tão inoportunas. Você é peça fundamental no meu crescimento profissional. Não me arrependo nem um pouco de ter aceitado o desafio de explorar o CRISPR/Cas.

A minha coorientadora por acreditar no meu trabalho e por sempre responder minhas muitas dúvidas com disposição e paciência. Carol foi essencial nos meus primeiros passos com a Biologia Molecular.

Aos meus irmãos Júnior e Calebe. Espero que minha jornada acadêmica inspire vocês a ir muito além.

Aos amigos que a Biomedicina me deu: Will, Danízia e Gabriel. A gente compartilha as lutas, as nórias e as conquistas também. Vocês vão longe e espero jamais perdê-los de vista.

Aos meus amigos da Igreja Presbiteriana das Graças e da IP Olinda. Controlar a ansiedade e o desânimo durante cada etapa do mestrado só foi possível com o apoio de vocês. Vocês me fizeram enxergar que nada está fora do controle de Deus, mesmo quando tudo parecia dar errado.

As minhas colegas do grupo CRISPR, especialmente Júlia. Vocês contribuíram ricamente com o amadurecimento do meu senso crítico e do meu raciocínio nas pesquisas.

Aos membros da banca examinadora de mestrado pela disponibilidade e pelas contribuições. Aos membros da banca de qualificação pela compreensão, incentivo e colaboração.

A Messias por colaborar com meu raciocínio e desenvolvimento dos dados estatísticos com o entusiasmo de quem ama o que faz, mesmo conhecendo pouco da área de biologia.

Aos técnicos e colegas do Departamento de Microbiologia da Fiocruz Pernambuco com a manutenção de um ambiente de pesquisa. A Carol, melhor

secretária, por sua animação e disposição contagiante. Aos colegas de turma no mestrado pela parceria dentro do caos de desenvolver uma dissertação inteiramente dentro de uma pandemia.

A Fiocruz Pernambuco por oferecer estrutura necessária. Agradeço também a CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsa e financiamentos. Essas instituições são a base na qual construí minha vida como cientista.

E a todos os demais que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

“Existe um provérbio indiano que diz: às vezes o trem errado te leva até a estação certa.”

Crash Landing on You

SANTANA, Caroline Ferreira de. **Análise da expressão de genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2022. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

RESUMO

O CRISPR/Cas é um sistema que confere defesa adaptativa a procariotos contra elementos genéticos móveis. Em contrapartida, os fagos codificam proteínas anti-CRISPR, capazes de bloquear a ação desse sistema. Dentre as principais bactérias de importância clínica, *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo associado a infecções hospitalares e a resistência a múltiplas classes de antimicrobianos. Estudos prévios permitiram a identificação do sistema CRISPR/Cas do tipo I-F e I-E em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, e o sequenciamento destes genomas permitiu a identificação de profagos, genes anti-CRISPR, espaçadores derivados de fagos e plasmídeos e de um gene bacteriano *hemN*. O mecanismo de ação destes genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas ainda necessita de elucidações. Diante disto, o atual estudo teve por objetivo avaliar a expressão destes genes relacionados ao CRISPR/Cas em quatro isolados clínicos de *P. aeruginosa* positivos para o sistema tipo-F, sob diferentes condições nutricionais, através das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR. Constatou-se no isolado Pae28 que os genes anti-CRISPR *acrIIE1*, *acrIIF3*, *acrIIF5* são mais expressos em condições nutricionais limitadas, enquanto no isolado Pae42 os níveis de expressão de *acrIIF7* são mais altos em condições ricas em nutrientes. A expressão de genes do fago phiCTX foi evidenciada em Pae28 e Pae42, que possuem espaçador contra este mesmo fago. Todos os isolados estudados apresentaram algum nível de expressão para o gene *hemN*, apesar da presença de um espaçador derivado desse gene dentro do locus CRISPR nos isolados Pae29 e Pae42. Embora estudos tenham mostrado uma função de regulador da expressão gênica, nossos resultados sugerem que o sistema CRISPR/Cas pode promover a indução de profagos em *P. aeruginosa*, como consequência de sua função primária, clivando material genético alvo.

Palavras-chave: Profagos; anti-CRISPR; espaçadores; expressão gênica.

SANTANA, Caroline Ferreira de. **Analysis of gene expression related to CRISPR/Cas system in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa***. 2022. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

ABSTRACT

CRISPR/Cas is a system that provides adaptive defense to prokaryotes against mobile genetic elements. In contrast, phages encode proteins known as anti-CRISPR, capable of blocking the action of this system. Among the leading bacteria of clinical concern, *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacillus associated with hospital infections and multi-class antimicrobial resistance. Previous studies allowed the identification of CRISPR/Cas system types I-F and I-E in *P. aeruginosa* obtained from public hospitals in the city of Recife-PE, and the genome sequencing of these isolates allowed recognizing this system's structure, presence of prophages, anti-CRISPR genes and spacers derived from phages and plasmids, as well as a spacer with a similar sequence to the bacterial gene *hemN*. The action mechanisms of these genes related to CRISPR/Cas are still in need of clarification. In this scenario, the current study aimed to evaluate the expression of genes associated with CRISPR/Cas system in four clinical isolates of *P. aeruginosa*, under different nutritional conditions, through RT-PCR and qRT-PCR. It was found in Pae28 that genes *acrIE1*, *acrIF3*, *acrIF5* are overexpressed under limited nutritional conditions. In Pae42, expression levels of *acrIF7* are higher in nutrient-rich conditions. The expression of genes encoding phiCTX's capsid protein and phage tail assembly protein, was found in Pae28 and Pae42, while there was no amplification in Pae70. All isolates studied showed some expression levels for the *hemN* gene, despite the presence of a spacer derived from this gene within the CRISPR locus of isolates Pae29 and Pae42. Although studies have shown a regulatory function of gene expression, our results suggest that the CRISPR/Cas system can promote prophages induction in *P. aeruginosa*, as a consequence of its primary function, by cleaving target genetic material.

Keywords: Prophages; anti-CRISPR; spacers; gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo de formação de biofilme e dispersão.....	19
Figura 2 - Mecanismos de resistência antimicrobiana em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 3 - Lista de patógenos de importância clínica que incluem <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figura 4 - O ciclo de vida lítico do fago e os sistemas anti-fágicos bacterianos.....	24
Figura 5 - A estrutura do Sistema CRISPR/Cas.....	27
Figura 6 - Esquema representativo do mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas.	29
Figura 7 - Pareamento de bases entre crRNA e DNA alvo.	31
Figura 8 - Sistemas CRISPR-Cas de classe 1 e classe 2: recursos principais, organização modular e embaralhamento de módulos.....	32
Figura 9 - Mecanismos caracterizados e previstos para a função da proteína anti- CRISPR.....	37
Quadro 1 - Características dos isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> comportando o sistema CRISPR/Cas do tipo I-F.	45
Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.....	47
Quadro 3 - Diferentes condições testadas para realização da qRT-PCR.	49
Quadro 4 - Comparações dos níveis de expressão de genes relacionados com o sistema CRISPR/Cas do tipo I-F em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sob diferentes condições.	50
Figura 10 - Géis representativos da expressão gênica dos genes anti-CRISPR <i>acrIE1</i> , <i>acrIF3</i> , <i>acrIF5</i> e <i>acrIF7</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52

Figura 11 - Géis representativos da expressão dos genes <i>CTXcap</i> e <i>CTXesp</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Figura 12 - Géis representativos da expressão qualitativa do gene <i>hemN</i> em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Figura 13 - Expressão relativa de genes anti-CRISPR <i>acrIE1</i> , <i>acrIF3</i> , <i>acrIF5</i> e <i>acrIF7</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sob diferentes condições nutricionais em três intervalos de tempo.	55
Figura 14. Expressão relativa de <i>CTXcap</i> em diferentes isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> positivos para o sistema CRISPR/Cas.	56
Figura 15. Expressão relativa de <i>hemN</i> em diferentes isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Figura 16. Síntese da expressão relativa de genes associados ao sistema CRISPR/Cas em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em três intervalos de tempo.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repetições Palindrômicas Curtas e Agrupadas Regularmente Interespaçadas)
DR	<i>Direct repeat</i> (Repetições diretas)
crRNA	RNA CRISPR
Acr	Anti-CRISPR
OMS	Organização Mundial de Saúde
dsDNA	DNA de dupla fita
Cas	<i>CRISPR-associated</i> (Proteína associada ao CRISPR)
Csy	<i>Cas subtype Yersinia pestis</i>
Csn	<i>Cas subtype Neisseria meningitidis</i>
Csd	<i>Cas subtype Desulfovibrio vulgaris</i>
Cst	<i>Cas subtype Thermotoga neapolitana</i>
Csh	<i>Cas subtype Haloarcula marismortui</i>
Csa	<i>Cas subtype Aeropyrium pernix</i>
Csm	<i>Cas subtype Micobacterium tuberculosis</i>
Cse	<i>Cas subtype Escherichia coli</i>
Cmr	<i>Cas module RAMP</i>
C _T	<i>Cycle Threshold</i>
pb	Pares de bases
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i> (Motivo Adjacente ao Protoespaçador)
Cascade	<i>CRISPR-associated complex for antiviral defence</i> (Complexo associado ao CRISPR para defesa antiviral)
tracrRNA	<i>trans-acting CRISPR</i>
hisS	histidil-tRNA sintetase
SpyCas9	<i>Streptococcus pyogenes Cas9</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i> (único RNA guia)
dCas	<i>Dead CRISPR-associated proteins</i> (Proteínas Cas mortas)

<i>aca</i>	<i>Gene Anti-CRISPR</i>
ICE	<i>Integrative conjugative elements</i> (Elementos integrativos e conjugativos)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Caldo Cérebro-Coração)
cDNA	DNA complementar
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.1.1	Resistência antimicrobiana	19
2.1.2	Alternativas terapêuticas	21
2.2	BACTERIÓFAGOS E A FAGOTERAPIA	22
2.2.1	Mecanismos de proteção bacterianos	23
2.3	O SISTEMA CRISPR/CAS	25
2.3.1	Mecanismo de ação	28
2.3.2	Classificação	31
2.3.3	Outras funções do sistema CRISPR/Cas	34
2.3.4	Anti-CRISPR: Mecanismos de inativação do sistema CRISPR/Cas	36
2.4	CRISPR/CAS EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
3	JUSTIFICATIVA	41
4	PERGUNTA CONDUTORA	42
5	HIPÓTESE	43
6	OBJETIVOS	44
6.1	OBJETIVO GERAL	44
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
7	METODOLOGIA	45
7.1	AMOSTRAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESTUDADAS	45
7.2	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL BACTERIANO E QUANTIFICAÇÃO	46
7.3	TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	46
7.4	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QRT-PCR)	48
7.1.1	Parâmetros analíticos da PCR em tempo real	50
8	ASPECTOS ÉTICOS	51
9	RESULTADOS	52
9.1	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA EXPRESSÃO DE GENES EM DE <i>P. aeruginosa</i> COMPORTANDO O SISTEMA CRISPR/CAS DO TIPO I-F	52
9.2	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE GENES EM DE <i>P. aeruginosa</i> COMPORTANDO O SISTEMA CRISPR/CAS DO TIPO I-F	54
9.2.1	Avaliação da eficiência da amplificação por PCR em tempo real	54

9.3	EXPRESSÃO DE GENES ANTI-CRISPR EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS.....	54
9.4	EXPRESSÃO DO GENE BACTERIANO <i>hemN</i> EM ISOLADOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
10	DISCUSSÃO	60
10.1	GENES ANTI-CRISPR EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
10.2	EXPRESSÃO DE GENES DO FAGO PHICTX	62
10.3	EXPRESSÃO DO GENE BACTERIANO <i>hemN</i>	63
11	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	APÊNDICE 1 – GRÁFICOS	76
	APÊNDICE 2 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO	78

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma das espécies de maior importância clínica de seu gênero, e consiste em bacilos Gram-negativos não fermentadores, estritamente aeróbios, oxidase positivos, não esporulados e flagelados. Esse microrganismo é um patógeno oportunista altamente versátil, sendo encontrado em ambientes bióticos e abióticos como solo, plantas e animais. O extenso repertório genético de *P. aeruginosa*, que inclui um genoma acessório com uma variedade de elementos genéticos móveis, contribui para o seu sucesso como patógeno.

Infecções por *P. aeruginosa*, em geral, são de difícil tratamento devido a sua resistência intrínseca a determinados medicamentos antimicrobianos, sua capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência, e sua considerável habilidade na formação de biofilmes. O surgimento cada vez mais frequente de isolados multirresistentes também é potencializado pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, sendo de suma importância a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos e outras alternativas terapêuticas, como a fagoterapia. Para garantir a especificidade e segurança do tratamento com bacteriófagos é necessário compreender melhor como as bactérias e fagos interagem entre si.

Um mecanismo de defesa adaptativa usado por procariotos contra elementos genéticos móveis (MGEs), tais como fagos e transposons, denominado sistema CRISPR/Cas é composto por dois elementos principais: o *locus* CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), formado por sequências de DNA repetitivo, chamadas de Repetições Diretas (DR), separadas por sequências variáveis, chamadas de espaçadores; e as proteínas *CRISPR-associated* (Cas), componentes da maquinaria efetora desse sistema, atuando como nucleases, integrases e proteínas ligantes de DNA.

O mecanismo de ação deste sistema apresenta, em geral, três etapas: a adaptação, onde novos espaçadores são adquiridos a partir de fragmentos de MGEs; a expressão e processamento do *locus* CRISPR para formar moléculas de RNA CRISPR (crRNA); e a interferência, onde o crRNA atua como um guia para que a maquinaria efetora reconheça e clive o material invasor. Além da imunidade, funções alternativas também foram reconhecidas, como a regulação gênica e a modulação de fatores de virulência.

A ocorrência, composição gênica, sequências, número e tamanho deste sistema e seus elementos é altamente variável. Em *P. aeruginosa*, já foi identificada a presença de sistemas CRISPR/Cas do tipo I, e mais recentemente o tipo IV, sendo os subtipos I-F e I-E os mais frequentes e os subtipos I-C e IV-A mais raros. Também existe a descrição de cepas que possuem mais de um tipo de sistema simultaneamente. Estudos anteriores realizados pelo presente grupo de pesquisa permitiram o reconhecimento de isolados positivos para os sistemas tipo I-F e I-E nos isolados de Pernambuco/Brasil.

O sistema CRISPR/Cas impõe uma pressão seletiva sobre fagos, de modo que é possível identificar genes capazes de codificar proteínas que inativam esse sistema, sendo chamadas de proteínas anti-CRISPR (Acr). A estrutura e mecanismo de ação das Acr é variável, porém a interação com as proteínas que participam da etapa de interferência do sistema é a mais frequentemente descrita na literatura. Mais de 80 famílias de proteínas totalmente distintas já foram associadas com a neutralização do sistema, porém a expressão e regulação de genes *acr* ainda são questões pouco exploradas.

Diante do cenário apresentado, este trabalho propõe-se investigar a expressão de genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas, a fim de ampliar o conhecimento sobre a relação entre isolados de *P. aeruginosa* circulantes no ambiente hospitalar e os fagos lisogênicos, além de buscar esclarecer o impacto da presença de espaçadores contra sequências presentes no próprio genoma bacteriano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* é composto por bacilos Gram-negativos não fermentadores, estritamente aeróbios, oxidase positivos, não esporulados e flagelados, pertencentes à família Pseudomonadaceae (MOORE et al., 2006). As espécies desse gênero possuem grande versatilidade metabólica, sendo capazes de colonizar ambientes bióticos e abióticos como solo, plantas e animais (JUN et al., 2016).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a de maior importância clínica do seu gênero, e pode ser diferenciada das demais espécies desse gênero, principalmente, pela sua capacidade de crescimento a 42°C (WU et al., 2014). Esse patógeno pode provocar infecções em plantas e animais, incluindo humanos, e é uma das principais causadoras de infecções hospitalares (BALASUBRAMANIAN et al., 2013; MORADALI; GHODS; REHM, 2017). As doenças causadas por *P. aeruginosa* incluem pneumonias, infecções do trato urinário, dermatites, bacteremias e diversos outros quadros infecciosos, além de ser um fator predominante de alta morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística ou imunocomprometidos (AZAM; KHAN, 2019; PARKINS; SOMAYAJI; WATERS, 2018).

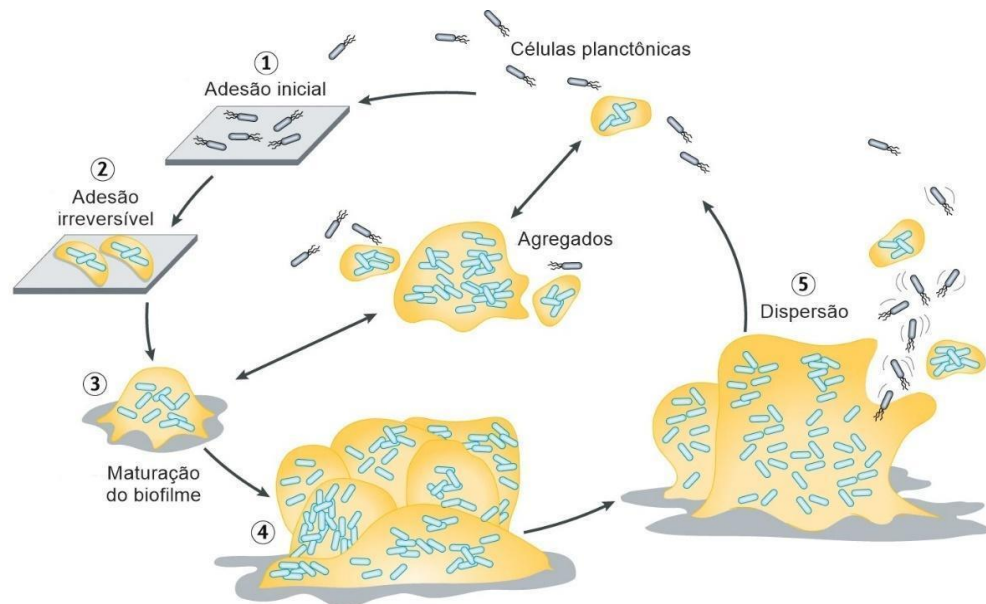
O sucesso de *P. aeruginosa* como um patógeno está baseado em seu amplo repertório genético. Os genomas já sequenciados até o momento evidenciam um extenso genoma, de cinco a sete mega pares de bases (Mpb), bem maior que os genomas de outras espécies de importância clínica como *Escherichia coli* (aproximadamente cinco Mpb) e *Staphylococcus aureus* (aproximadamente três Mpb) (AZAM; KHAN, 2019). O genoma completo de *P. aeruginosa* consiste em um conjunto conservado de pelo menos 4.000 genes, e um genoma acessório de mais de 10.000 genes, com uma diversidade alta de elementos genéticos móveis (MGEs), incluindo plasmídeos, fagos, transposons, entre outros (KLOCKGETHER et al., 2011).

As infecções por *P. aeruginosa* podem ser agudas ou crônicas e essa variação ocorre mediante ao estilo de vida adotado pela bactéria, podendo este ser planctônico ou sésil (KHAN et al., 2020). Células planctônicas são mais citotóxicas e provocam uma reação inflamatória aguda no hospedeiro, enquanto a formação de biofilme desempenha um importante papel em processos infecciosos persistentes

(VALENTINI et al., 2018). O termo biofilme é utilizado para nomear a estrutura tridimensional formada por uma comunidade microbiana envolta em uma matriz extracelular e fixada a uma superfície (LEE; YOON, 2017).

P. aeruginosa é o principal modelo para o estudo da formação de biofilme em bactérias Gram-negativas (SHARMA et al., 2014). A formação dessas estruturas favorece a sobrevivência do patógeno durante infecções, providenciando mecanismos de resistência a antibióticos, bacteriófagos, desinfetantes e ao sistema imune do hospedeiro (SKARIYACHAN et al., 2018). O desenvolvimento de biofilmes envolve etapas cíclicas de adesão, maturação e dispersão, como descrito na Figura 1.

Figura 1 - Esquema representativo de formação de biofilme e dispersão.



Fonte: Adaptado de Rumbaugh e Sauer, 2020.

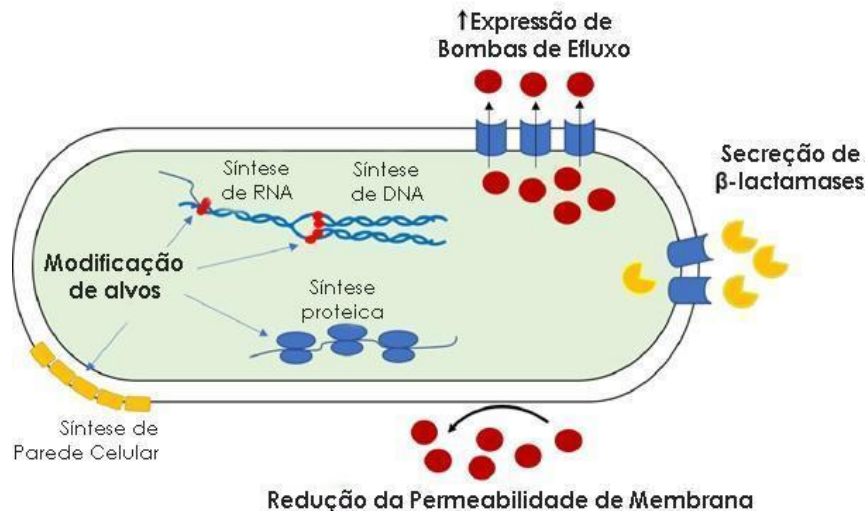
Legenda: A formação de biofilmes é um processo cíclico que ocorre de maneira específica e progressiva em cinco etapas. Durante o evento inicial no desenvolvimento do biofilme, as células planctônicas se ligam ao substrato (etapa 1); as células produzem matriz extracelular e formam aglomerados com todas as células em contato com o substrato (etapa 2); os aglomerados celulares amadurecem e formam várias camadas envoltas por matriz extracelular (etapa 3); biofilmes totalmente maduros em microcolônias que atingiram a máxima espessura (etapa 4); o ciclo se completa quando células sesséis convertem-se em o modo planctônico de crescimento e escapam ativamente do biofilme (etapa 5).

2.2.1 Resistência antimicrobiana

Um importante aspecto de *P. aeruginosa* é a sua resistência intrínseca a algumas classes de antimicrobianos e a sua habilidade de adquirir novos genes de resistência (Figura 2), resultando no aparecimento de cepas resistentes a múltiplas

drogas (MIYOSHI-AKIYAMA et al., 2017). Os mecanismos intrínsecos de resistência em *P. aeruginosa* incluem a baixa permeabilidade de membrana, a expressão de bombas de efluxo e a síntese de enzimas capazes de inativar antibióticos através de alterações bioquímicas ou hidrólise, como é o caso das beta-lactamases (AZAM; KHAN, 2019).

Figura 2 - Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de Chuli, 2018

Legenda: A concentração do fármaco dentro da célula pode ser reduzida pela diminuição da permeabilidade da membrana e/ou pelo aumento do efluxo. Enzimas secretadas, como beta-lactamases, podem degradar antimicrobianos antes que eles cumpram sua função. Os principais alvos, que incluem as vias de síntese de DNA, RNA e proteínas, podem ser modificados para evitar a ligação do fármaco ou reduzir a afinidade do alvo pelas moléculas tóxicas.

As bactérias podem desenvolver resistência através de mutações em seu genoma ou por aquisição de genes via transferência horizontal. As mutações podem modificar o sítio-alvo de antimicrobianos, inviabilizando sua ação, como é o caso das enzimas DNA girase (*gyrA-gyrB*) e topoisomerase IV (*parC-parE*) que são os alvos terapêuticos das fluoroquinolonas. A transferência horizontal de genes pode ocorrer através de transdução, transformação ou por conjugação e a aquisição de genes de resistência a betalactâmicos e aminoglicosídeos já foi reportada em *P. aeruginosa* (AZAM; KHAN, 2019; PANG et al., 2019).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos está entre as três espécies prioritárias para o estudo de novos antimicrobianos, caracterizando um grande desafio de saúde pública (PANG et al., 2019). Este microrganismo também compõe outras listas de patógenos importantes, como mostra a Figura 3. Fatores como o uso extensivo e

indiscriminado de antimicrobianos em humanos, animais, agricultura e no setor alimentício tem provocado uma forte pressão seletiva para o aparecimento de cada vez mais bactérias multirresistentes (BRINKAC et al., 2017; MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Figura 3 - Lista de patógenos de importância clínica que incluem *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de Azam e Khan, 2019.

Legenda: ESBL = β -lactamases de espectro estendido; CDC = Centers for Disease Control and Prevention.

2.1.2 Alternativas terapêuticas

As terapias com antimicrobianos são a principal forma de tratamento contra *P. aeruginosa* na prática clínica. O tratamento de infecções utilizando colistina e polimixina B, drogas consideravelmente tóxicas, tem sido cada vez mais frequente, devido a ascensão de cepas multirresistentes. Uma outra estratégia usada é a associação de antimicrobianos com inibidores de beta-lactamases, como é o caso do tratamento com ceftazidima-avibactam e ceftolozana-tazobactam. Além dos análogos

de classes de antimicrobianos bem conhecidas, drogas direcionadas a novos alvos terapêuticos também estão sendo investigadas (TÜMMLER, 2019).

Por outro lado, o desenvolvimento de novos antimicrobianos não tem sido suficiente para combater os problemas impostos pela resistência microbiana. Diante disso, comitês políticos e iniciativas globais vêm abordando o tema, e promovendo ações de incentivo ao desenvolvimento de novos tratamentos (THEURETZBACHER et al., 2019).

Segundo o *Preclinical Antibacterial Pipeline* e o *Clinical Antibacterial Pipeline* de 2020, publicados pela OMS, entre as terapias antimicrobianas em desenvolvimento, há uma forte tendência para abordagens não tradicionais, que incluem imunomodulação, vacinas, modificações da microbiota, bacteriófagos e enzimas derivadas de fagos (WHO, 2020). Terapias utilizando fagos são específicas para cada espécie e *P. aeruginosa* é o principal alvo dos projetos de pesquisas vigentes que investigam essa alternativa terapêutica (THEURETZBACHER et al., 2020).

2.2 BACTERIÓFAGOS E A FAGOTERAPIA

Os bacteriófagos, também chamados de fagos, são parasitas intracelulares obrigatórios que infectam especificamente bactérias, reconhecidos como os agentes biológicos mais abundantes no planeta (DÍAZ-MUÑOZ; KOSKELLA, 2014). Os fagos caracterizados até o momento apresentam uma morfologia e composição de ácidos nucleicos variada, mas sua grande maioria é composta de DNA de dupla fita (dsDNA) envolto por um capsídeo proteico com cauda, pertencentes a ordem Caudovirales (ACKERMANN, 2007; SALMOND; FINERAN, 2015).

Os fagos são denominados líticos ou temperados de acordo com o ciclo de replicação utilizado após a inserção do seu material genético em uma célula hospedeira (OLSZAK et al., 2017). Fagos líticos utilizam a maquinaria celular para sintetizar proteínas e replicar seu DNA ou RNA, gerando novas partículas virais. Após a formação de vários vírions, a célula é lisada através da produção de lisozimas, liberando estes fagos para então infectar novas células (AKSYUK; ROSSMANN, 2011).

Já os fagos temperados são capazes de alternar entre o ciclo lítico e o ciclo lisogênico, onde integram seu material genético ao genoma bacteriano e podem ser

transmitidos às células-filhas durante a reprodução bacteriana. O material genético do fago temperado integrado ao genoma bacteriano é chamado de profago (DÍAZ-MUÑOZ; KOSKELLA, 2014; ORLOVA, 2012). Em geral, o ciclo lisogênico é mantido pela repressão de genes líticos de fagos até que condições de estresse induzem a retomada do ciclo lítico (FEINER et al., 2015).

Alguns estudos descreveram que em condições ambientais desfavoráveis, os fagos podem apresentar um terceiro tipo de ciclo, chamado de pseudolisogenia. Nesse estado, ao entrar na célula hospedeira, o material genético do fago permanece inativo na forma de epissoma circular, semelhante a um plasmídeo, e se distribui assimetricamente durante a divisão celular bacteriana, resultando em linhagens celulares infectadas e não infectadas (CENENS et al., 2013; OLSZAK et al., 2017; DE SMET et al., 2017).

Devido ao potencial bactericida dos fagos líticos, e com o aumento da incidência de isolados bacterianos multirresistentes a antibióticos, a utilização desses fagos como alternativa terapêutica tem sido profundamente estudada (LIN; KOSKELLA; LIN, 2017; PATIL et al., 2020). Esses fagos são dotados de alta especificidade de hospedeiro, podem aumentar em número ao longo do tratamento, tendem a perturbar muito menos a microbiota do paciente e parecem ser capazes de interromper a formação e desenvolvimento de biofilmes (LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011).

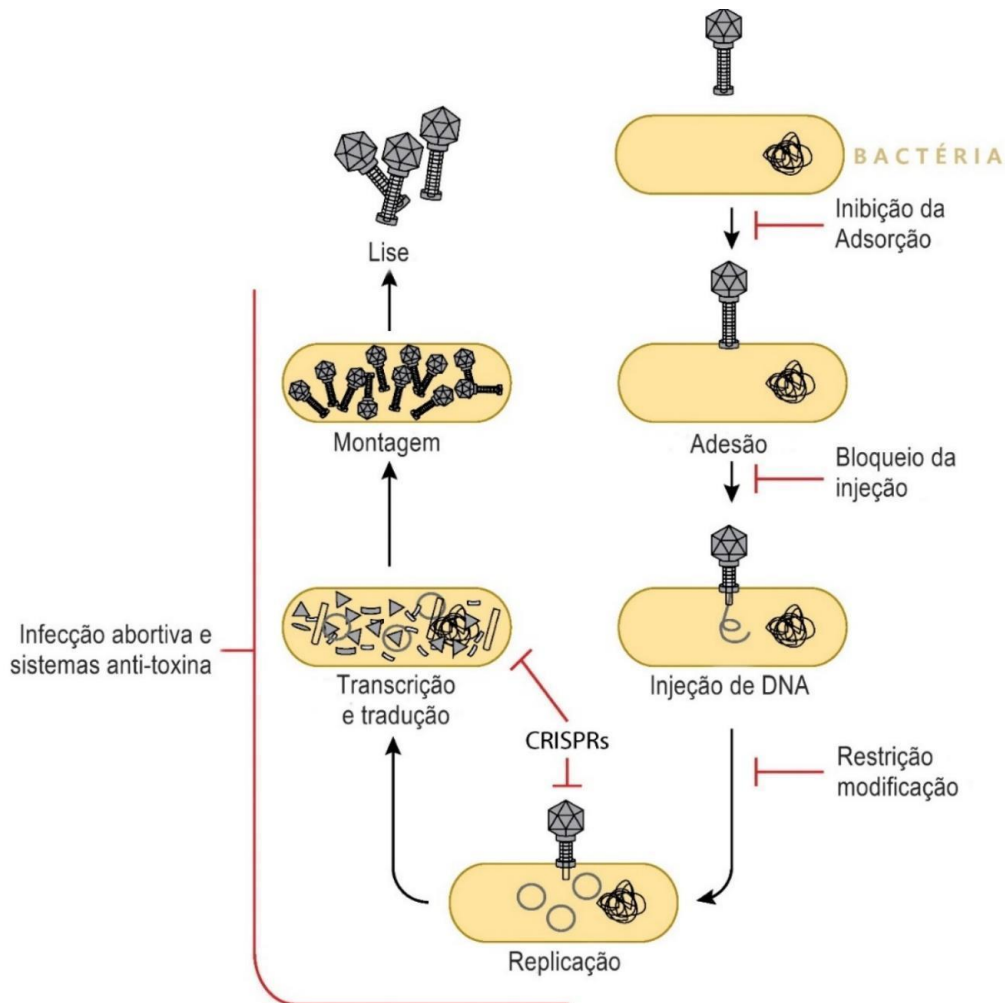
No entanto, a infecção por fagos pode ser favorável ao hospedeiro em casos de lisogenia, já que profagos e seus hospedeiros bacterianos têm interesses evolutivos parcialmente alinhados, uma vez que a proliferação do hospedeiro resulta em aumento da população viral (COSTA; MONTEIRO; AZEREDO, 2018). Os profagos podem promover proteção contra outros fagos, aumentar a tolerância a antibióticos, permitir a aquisição de novos fatores de virulência, além de contribuir para a evolução bacteriana através de transferência horizontal de genes (OLSZAK et al., 2017; PATIL et al., 2020; TOUCHON; BERNHEIM; ROCHA, 2016).

2.2.1 Mecanismos de proteção bacterianos

A infecção por fagos além de ser capaz de induzir a morte de seus hospedeiros bacterianos, também exige muitos recursos dos mesmos (DÍAZ-MUÑOZ; KOSKELLA, 2014). Em resposta, as bactérias desenvolveram uma variedade de

estratégias de defesa contra fagos que impedem a infecção em vários estágios, desde a prevenção da adsorção e degradação do material genético exógeno até a morte programada, conhecida como infecção abortiva (Figura 4) (BENLER; KOONIN, 2020; BONDY-DENOMY et al., 2016; LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010).

Figura 4 - O ciclo de vida lítico do fago e os sistemas anti-fágicos bacterianos.



Fonte: Dy et al., 2014.

Legenda: O bloqueio da adsorção ocorre quando as bactérias alteram ou bloqueiam receptores específicos de superfície celular reconhecidos pelos fagos. A produção de proteínas que bloqueiam a transferência do material genético do fago para o citoplasma bacteriano. Os sistemas de modificação de restrição e CRISPR-Cas degradam ácido nucleico após sua inserção no citoplasma. Infecções abortivas e sistemas anti-toxina induzem a morte celular, prevenindo a propagação de fagos.

Os mecanismos de bloqueio do processo de adsorção viral à célula hospedeira pode ocorrer de, pelo menos, três maneiras: bloqueio de receptores de fago (RIEDE; ESCHBACH, 1986), a produção de matriz extracelular (SUTHERLAND et al., 2004) e a produção de inibidores competitivos (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2005). A clivagem de ácidos nucleicos fágicos pode ocorrer por meio de sistemas

de Restrição-Modificação de modo inespecífico ou através do sistema CRISPR/Cas, conferindo imunidade adaptativa (KARGINOV; HANNON, 2010; PINGOUD et al., 2005).

Deste modo, fagos e seus hospedeiros estão envolvidos em ciclos contínuos de coevolução, onde mecanismos antivirais bacterianos exercem uma pressão seletiva sobre fagos que, por sua vez, desenvolvem táticas para evitar, contornar ou subverter esses mecanismos (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010). O risco de favorecer o surgimento de cepas resistentes a fagos é uma eventual desvantagem do seu uso para fins terapêuticos, porém estudos recentes já avaliam a aplicação de coquetéis com fagos de diferentes tipos, no intuito de preservar o potencial terapêutico da fagoterapia (KIM et al., 2020; KORF et al., 2020).

2.3 O SISTEMA CRISPR/CAS

O sistema CRISPR/Cas é constituído por componentes genéticos e protéicos que conferem defesa adaptativa contra elementos genéticos móveis (MGEs) em procariotos (BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014). O *locus* CRISPR consiste em sequências altamente conservadas, chamadas de repetições diretas (DR, do inglês *direct repeats*) separadas por sequências variáveis, chamados espaçadores, que possuem alta similaridade com sequências virais, plasmidiais ou mesmo bacterianas, agindo como uma memória genética para o sistema (BURMISTRZ; PYRĆ, 2015; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014). As proteínas associadas ao CRISPR (Cas, do inglês *CRISPR-associated*) são as efetoras deste sistema e os genes que as codificam frequentemente se encontram nas regiões que flanqueiam o *locus* CRISPR (HAFT et al., 2005).

A primeira descrição de um *locus* CRISPR na literatura foi feita por Ishino et al. em 1987, tendo sido descoberto na cepa K12 de *Escherichia coli*. Este foi, então, identificado como uma região incomum composta de cinco sequências altamente homólogas de 29 pares de bases (pb) espaçadas por quatro sequências distintas de 32 pb (ISHINO et al., 1987). Posteriormente, arranjos semelhantes foram descritos em outras espécies de bactérias e arqueas, e essas sequências de DNA repetitivo foram então denominadas como Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas – CRISPR, do inglês *Clustered Regularly Interspaced*

Short Palindromic Repeats (JANSEN et al., 2002; NIDHI et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

Sua função biológica, no entanto, permaneceu desconhecida até 2005, quando dois estudos independentes apontaram que muitas das sequências espaçadoras eram de origem viral, o que indicava uma possível função imune específica contra MGEs (BOLOTIN et al., 2005; JANSEN et al., 2002; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005). Essa hipótese foi confirmada por Barrangou et al. (2007) que demonstraram experimentalmente que a aquisição de novos espaçadores após contato com fagos conferia resistência a infecção pelos mesmos fagos (BARRANGOU et al., 2007).

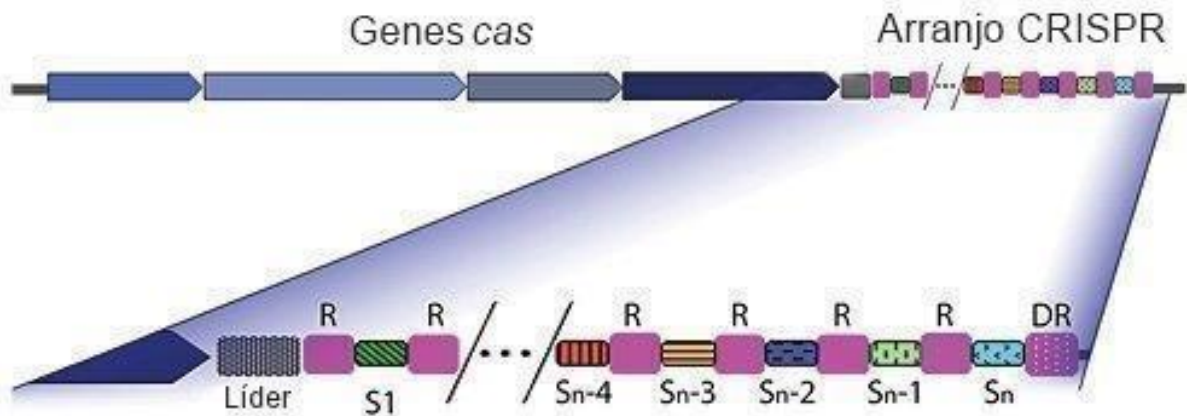
Com o aprofundamento no estudo desta região, também foram encontrados espaçadores correspondentes a regiões do genoma do próprio procaríoto, incluindo profagos, transposons, e genes essenciais (*housekeeping genes*), sugerindo que o sistema CRISPR/Cas pode desempenhar um papel na regulação de genes ou resultar em autoimunidade com subsequente inativação do sistema, remoção do alvo ou morte celular (GOMAA et al., 2014; SOREK; KUNIN; HUGENHOLTZ, 2008; STERN et al., 2010; VERCOE et al., 2013).

Segundo o CRISPRCas *database* (2021), o sistema CRISPR/Cas está presente e completo em cerca de 70% dos genomas de arqueas e 36% dos genomas bacterianos sequenciados, encontrando-se disponíveis neste banco de dados. Embora a grande maioria dos arranjos CRISPR estejam localizados no DNA cromossomal, alguns casos já foram identificados em plasmídeos e outros MGEs (KARGINOV; HANNON, 2010). A estrutura dos elementos que compõem esse sistema é altamente variável e difere em termos de ocorrência, tamanho, número e composição gênica (MAKAROVA et al., 2015).

A estrutura básica comum aos *loci* CRISPR inclui uma sequência líder seguida de DRs intercaladas com espaçadores (Figura 5). De modo geral, a sequência líder possui centenas de pares de bases, é rica em adenina e timina, e funciona como um promotor do *locus* e um guia para incorporação de novos espaçadores (BARRANGOU et al., 2007; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005). As DRs possuem entre 23 a 55 pb e sua natureza parcialmente palindrômica permite que os RNAs gerados formem estruturas secundárias importantes para o seu mecanismo de ação. Já os espaçadores possuem entre 21 a 72 pb (BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014). A sequência líder juntamente com as

DRs são regiões altamente conservadas em indivíduos da mesma espécie, mas não há homologia entre as espécies (JANSEN et al., 2002; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010).

Figura 5 - A estrutura do Sistema CRISPR/Cas.



Fonte: Butiuc-Keul et al., 2021.

Legenda: R = repetição direta; S = espaçador; n = número total de espaçadores. Um *locus* CRISPR pode ter pelo menos um espaçador flanqueado por duas repetições diretas. A última repetição, que geralmente sofre mutação, é chamada de repetição degenerada (DR).

As proteínas Cas são codificadas por um conjunto de genes localizados em regiões adjacentes ao *locus* CRISPR e possuem domínios que são característicos de nucleases, helicases, polimerases e outras proteínas ligadoras de DNA (MAKAROVA et al., 2011). Mais de 45 famílias de genes *cas* já foram identificadas e estão distribuídas em vários arranjos dentro dos genomas (HAFT et al., 2005). Existem pelo menos seis genes *cas* essenciais distribuídos em uma variedade de organismos, dentre os quais *cas1* e *cas2* estão presentes na grande maioria dos sistemas identificados (HAFT et al., 2005; TERNS; TERNS, 2011).

Esses genes essenciais se agrupam em subtipos que possuem adicionalmente módulos de genes específicos, nomeados segundo a espécie na qual aquele subtipo foi inicialmente estudado. Por exemplo, *cas subtype Escherichia coli*, ou genes *cse*, são um conjunto de genes não essenciais encontrados juntos em *E. coli*. Os demais subtipos incluem *Yersinia pestis* (*csy*), *Neisseria meningitidis* (*csn*), *Desulfovibrio vulgaris* (*csd*), *Thermotoga neapolitana* (*cst*), *Haloarcula marismortui* (*csh*), *Aeropyrium pernix* (*csa*) e *Mycobacterium tuberculosis* (*csm*) (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010). O sistema CRISPR/Cas também inclui um módulo que só foi

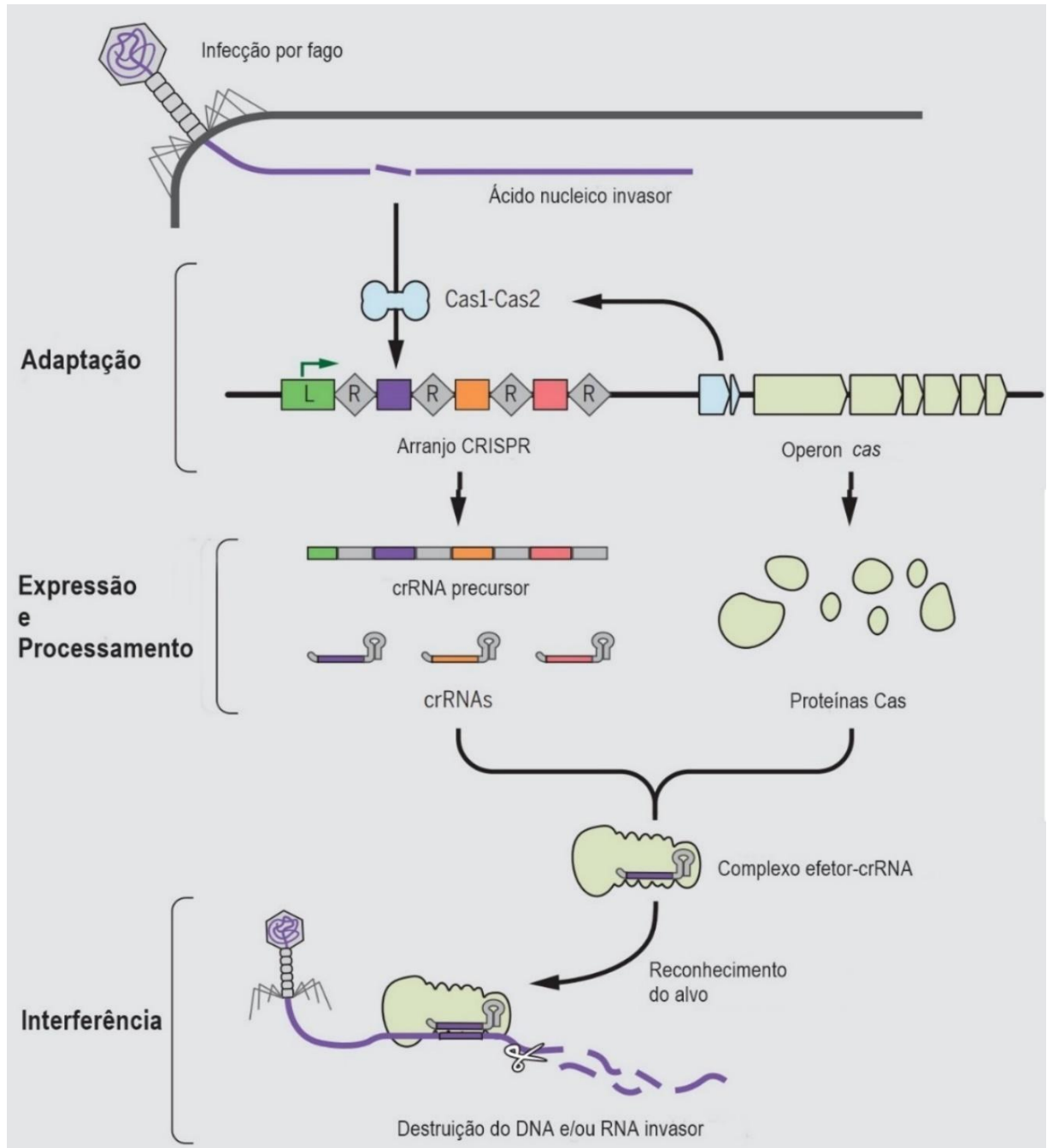
encontrado em genomas que já possuíam algum outro subtipo, chamado de *cas module RAMP (cmr)* (HAFT et al., 2005).

As proteínas Cas também podem ser organizadas em módulos funcionais: o módulo de adaptação é composto pelas proteínas Cas1 e Cas2, envolvidas na aquisição de novos espaçadores, enquanto o módulo efetor é necessário para o processamento de transcritos CRISPR primários (crRNA), interferência e degradação de ácidos nucleicos estranhos. O módulo de adaptação é amplamente uniforme entre os sistemas, enquanto o módulo efetor é altamente variável (KOONIN; MAKAROVA; ZHANG, 2017). Alguns sistemas CRISPR/Cas utilizam múltiplas proteínas para exercer essas funções, enquanto outros requerem uma única proteína multifuncional (BUTIUC-KEUL et al., 2021).

2.3.1 Mecanismo de ação

De modo geral, a função imune do sistema CRISPR/Cas envolve três etapas: a adaptação, onde novos espaçadores são adicionados ao *locus* CRISPR a partir de um fragmento de ácido nucleico exógeno; a expressão, na qual esse *locus* é transcrito e processado para gerar um RNA CRISPR (crRNA) contendo uma sequência espaçadora; e a interferência, onde o RNA gerado serve de guia para direcionar a clivagem do material genético invasor por endonucleases (MARRAFFINI, 2015) (Figura 6). A primeira etapa ocorre apenas quando a célula encontra novo material genético exógeno, enquanto as outras duas etapas acontecem sempre que a célula é infectada (BUTIUC-KEUL et al., 2021).

Figura 6 - Esquema representativo do mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas.



Fonte: Adaptado de Jackson et al., 2017.

Legenda: No exemplo ilustrado, uma célula bacteriana é infectada por um bacteriófago. Na etapa de adaptação, fragmentos de DNA do invasor são incorporados ao arranjo CRISPR. A segunda etapa envolve a transcrição do *locus* CRISPR e o processamento subsequente do transcrito precursor para gerar RNAs CRISPR (crRNAs). Durante a interferência, os crRNAs unem-se a proteínas efetoras Cas (em verde claro) para formar o complexo efetor responsável pelo reconhecimento específico da sequência e a destruição de elementos de DNA e/ou RNA estranhos.

Embora a etapa de adaptação possua características distintas entre os tipos de sistema CRISPR/Cas, as proteínas Cas1 e Cas2, juntamente com a sequência líder e a primeira repetição CRISPR parecem ser componentes conservados na

grande maioria dos sistemas identificados. O complexo Cas1-Cas2 catalisa a integração de espaçadores a jusante da sequência líder e cada evento de integração é acompanhado pela duplicação da DR adjacente, formando uma nova unidade espaçadora (AMITAI; SOREK, 2016; NUÑEZ et al., 2015). Esse posicionamento unilateral dos novos espaçadores gera um *locus* CRISPR cronologicamente ordenado, em que o espaçador adquirido mais recentemente é aquele mais próximo à sequência líder (MAKAROVA et al., 2011).

A aquisição de espaçadores provenientes do DNA do próprio hospedeiro é potencialmente deletéria para célula, sendo necessário que o sistema CRISPR/Cas seja capaz de distinguir o próprio material genético de um material invasor (STERN et al., 2010). Os fragmentos que são reconhecidos pelo sistema e incorporados ao *locus* CRISPR são chamados de protoespaçadores, e os mecanismos envolvidos no reconhecimento e processamento desses fragmentos ainda não foram bem descritos na literatura. Estudos com *Escherichia coli* têm apontado a participação do complexo de reparo RecBCD na fragmentação de extremidades livres de DNA de fita dupla até atingir um motivo de 8 pb, conhecido como sítio Chi, gerando substratos para a aquisição de espaçadores por Cas1-Cas2. Os sítios Chi são escassos em MGEs, o que pode justificar a predileção por espaçadores oriundos de material genético invasor (JACKSON et al., 2017; LEVY et al., 2015). Outros estudos também relatam o uso de fragmentos gerados pela ação de sistemas celulares de Restrição -Modificação (DUPUIS et al., 2013).

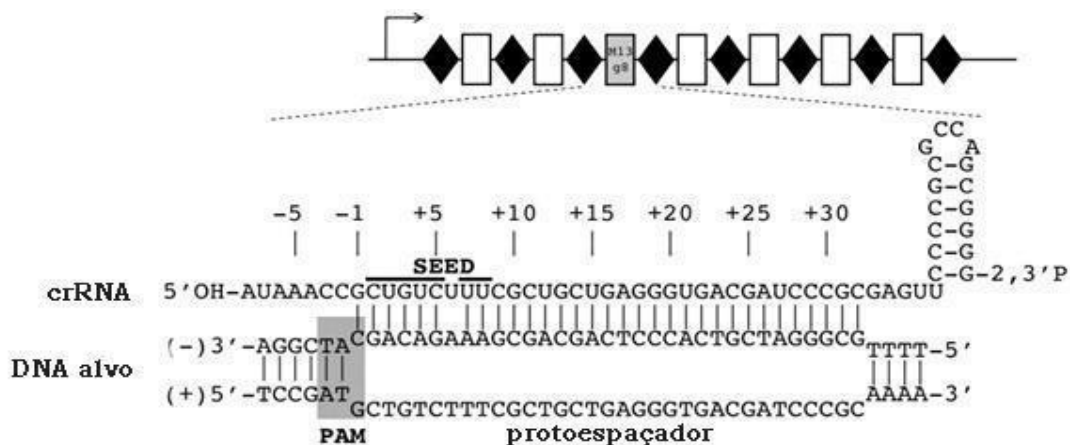
O sistema CRISPR/Cas seleciona os fragmentos adequados através da presença de uma região conservada de cerca de 2 a 5 pb próxima ao protoespaçador, denominada de PAM (do inglês, *Protospacer Adjacent Motif*). A sequência PAM pode ser importante tanto na etapa de aquisição de novos espaçadores, como no reconhecimento do alvo durante a etapa de interferência, permitindo que a bactéria seja capaz de discriminar sequências exógenas de seus próprios espaçadores. A região está localizada geralmente a montante ou a jusante do protoespaçador, e sua sequência é variável entre os tipos e subtipos do sistema CRISPR/Cas (LEENAY; BEISEL, 2017; MOJICA et al., 2009).

Durante a etapa de expressão, o *locus* CRISPR é transcrito a partir de um promotor localizado dentro da sequência líder, gerando uma longa molécula de crRNA precursora, conhecida como pré-crRNA. Em seguida, esse transcrito é clivado por endonucleases em regiões dentro das DRs, resultando em vários crRNAs compostos

por uma porção repetida reconhecida por proteínas Cas do complexo efetor e uma única sequência espaçadora. Em alguns casos, uma outra etapa de clivagem é necessária para gerar crRNAs maduros (CHARPENTIER et al., 2015).

No último estágio, a interferência, o complexo efetor formado pelo crRNA e proteínas Cas localiza o material invasor contendo um protoespaçador correspondente, através da complementaridade deste com o crRNA. Essa hibridização provoca uma mudança conformacional no complexo, recrutando nucleases que serão responsáveis pela clivagem do material genético invasor. A presença de um sítio PAM adjacente ao protoespaçador e sua ausência no *locus* CRISPR previne que o sistema ataque o material genético do próprio hospedeiro (HILLEt al., 2018). Além de PAM, estudos demonstraram que o pareamento perfeito de apenas alguns pares de bases proximais ao PAM, conhecidos como sequência *seed*, é suficiente para desencadear a degradação do MGE invasor (Figura 7) (SEMENOVA et al., 2011).

Figura 7 - Pareamento de bases entre crRNA e DNA alvo.



Fonte: Adaptado de Semenova et al., 2011.

Legenda: Retângulos representam espaçadores e losangos representam repetições diretas. PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) e a sequência *seed* estão em destaque. A estrutura mostrada se forma quando o complexo efetor guiado por crRNA reconhece material genético invasor, contendo o protoespaçador.

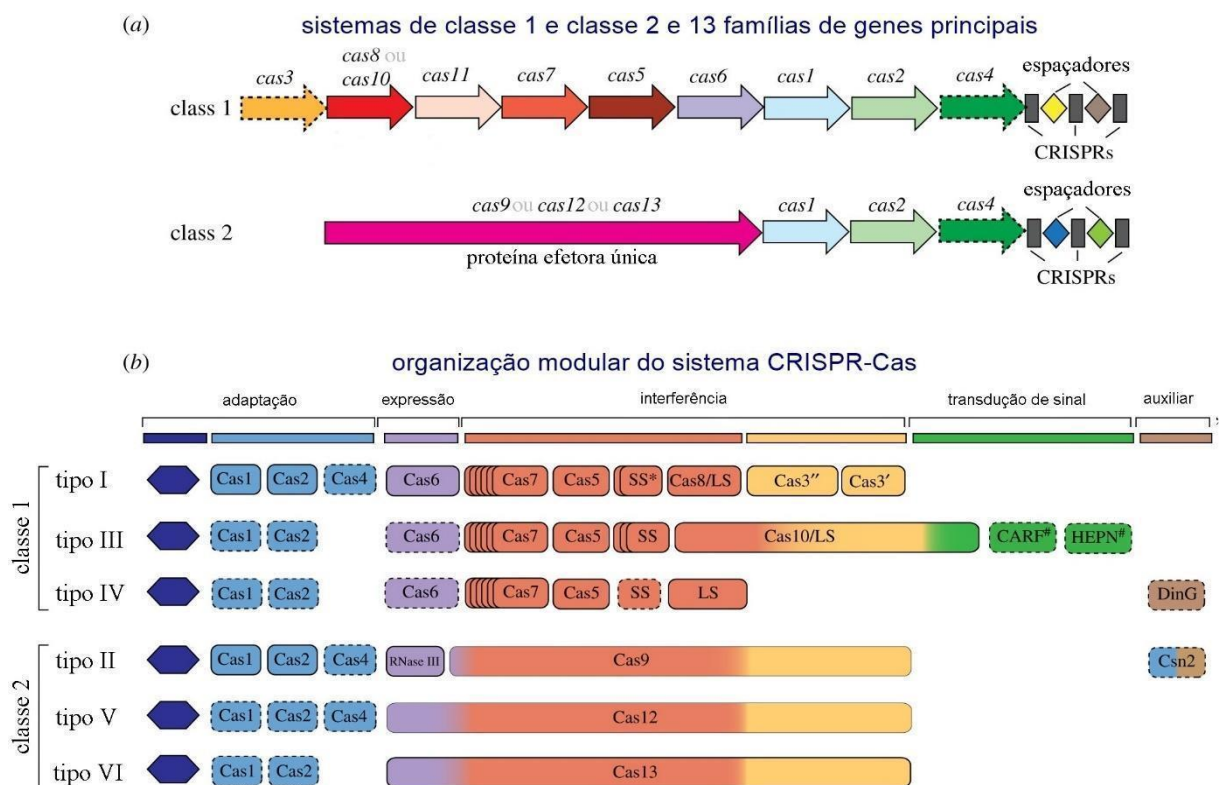
2.3.2 Classificação

A diversidade dos sistemas CRISPR/Cas encontrados em genomas de arqueas e bactérias é, possivelmente, consequência de uma rápida evolução dos sistemas imunes frente à pressão seletiva dinâmica imposta por MGEs invasores. A ausência de genes *cas* universais, e a frequente recombinação modular tornam

impraticável a tarefa de formular uma classificação simplificada desse sistema. Diante disso, o sistema CRISPR/Cas tem sido classificado a partir da análise de múltiplos fatores como as diferentes sequências CRISPR, o número e estrutura dos genes *cas*, a arquitetura do operon *cas*, entre outros (KOONIN; MAKAROVA; ZHANG, 2017; VAN DER OOST et al., 2014).

Todos os sistemas são divididos em duas grandes classes distintas, com base na estrutura dos seus complexos efetores de proteínas Cas (Figura 8). Os sistemas de classe 1, mais comum entre bactérias e arqueas, possuem complexos efetores com várias subunidades proteicas, como é o caso do Cascade (do inglês, *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) de sistemas tipo I, e os complexos Csm-Cmr de sistemas tipo III. Enquanto nos sistemas de classe 2, o complexo efetor é formado por uma única e grande proteína multidomínio (KOONIN; MAKAROVA, 2019; SHMAKOV et al., 2017).

Figura 8 - Sistemas CRISPR-Cas de classe 1 e classe 2: recursos principais, organização modular e embaralhamento de módulos.



Fonte: (KOONIN; MAKAROVA, 2019).

Legenda: (a) A arquitetura básica dos sistemas CRISPR-Cas de classe 1 e classe 2. Os genes são mostrados como setas; genes homólogos são mostrados pela mesma cor. (b) Os principais arranjos dos tipos de sistema CRISPR-Cas. Genes dispensáveis são indicados por um contorno tracejado. O locus CRISPR está destacada em azul escuro.

As duas classes de CRISPR/Cas são divididas em três tipos cada: os tipos I, III e IV fazem parte da classe 1, enquanto os tipos II, V e VI compõem a classe 2. Cada um desses tipos possui uma proteína Cas exclusiva, conhecida como “Cas assinatura”. Cada tipo é ainda classificado em vários subtipos que são distintos por diferenças sutis na organização do *locus* e, também, frequentemente, codificam proteínas Cas específicas do subtipo (KOONIN; MAKAROVA, 2019).

Os complexos efetores de classe 1 envolvidos nas etapas de expressão e interferência têm organizações semelhantes entre os tipos I, III e IV, embora as sequências gênicas sejam pouco conservadas entre esses tipos (MAKAROVA et al., 2020). A assinatura dos sistemas tipo I é a Cas3, uma proteína com domínios de helicase e DNase responsáveis pela degradação do elemento genético alvo. Em 2015, foram identificados sete subtipos dentro do sistema tipo I, nomeados de I-A até I-F e o subtipo I-U, que carece de mais estudos para sua caracterização (MAKAROVA et al., 2015; RATH et al., 2015).

Os sistemas de tipo III possuem o gene de assinatura *cas10* que codifica uma proteína multidomínio homóloga a polimerases. Esse sistema possui 5 subtipos, de III-A até III-D e a variante III-B. Em contraste com o tipo I que reconhece apenas DNA como alvo, os sistemas CRISPR/Cas pertencentes ao tipo III desencadeiam a degradação tanto de DNA, quanto de RNA (MAKAROVA et al., 2011; RATH et al., 2015). Por sua vez, o tipo IV abrange uma versão minimalista dos sistemas CRISPR/Cas, pois não possui módulo de adaptação (Cas1 e Cas2), com algumas exceções, e seu *locus* consiste apenas nos genes *cas5*, *cas7* e *cas8*, e em alguns casos, outro gene adicional (KOONIN; MAKAROVA, 2019).

Dentre os sistemas CRISPR/Cas de classe 2, o tipo II apresenta a proteína multidomínio Cas9 como assinatura. Cas9 contribui para a adaptação, junto com Cas1 e Cas2, participa do processamento do crRNA, e é responsável pela clivagem de DNA alvo durante a interferência. A biogênese do crRNA no tipo II possui um mecanismo bem distinto, onde o processamento é catalisado por uma enzima externa ao sistema, a RNase III, com a ajuda de um RNA adicional, o tracrRNA (do inglês, *trans-acting CRISPR*). Esse tipo de sistema é classificado em três subtipos, II-A, II-B e II-C. O tipo II é o principal grupo de sistemas CRISPR/Cas estudado devido ao desenvolvimento biotecnológico de componentes moleculares desse sistema como ferramentas para

edição gênica (KOONIN; MAKAROVA, 2019; MAKAROVA et al., 2015; RATH et al., 2015).

Nos sistemas de tipo V e VI, as proteínas de assinatura reconhecidas foram Cas12 e Cas13, respectivamente. Pesquisas mais recentes utilizando a ferramenta BLAST, resultaram na identificação de 10 subtipos de sistemas tipo V e quatro subtipos de sistemas tipo VI. Dentre todos os sistemas reconhecidos recentemente, o tipo VI é o único capaz de clivar exclusivamente RNA durante a etapa de interferência (MAKAROVA et al., 2020).

2.3.3 Outras funções do sistema CRISPR/Cas

A função imune do sistema CRISPR/Cas em arqueas e bactérias já está bem estabelecida. No entanto, análises comparativas utilizando ferramentas de bioinformática revelaram que esse sistema evoluiu de forma distinta em diferentes espécies e que uma taxa evolutiva mais lenta não é compatível com o seu papel imune, sugerindo assim a participação do sistema CRISPR/Cas em outras funções celulares (TOUCHON et al., 2011). De fato, várias outras funções já foram reportadas, sendo algumas delas aparentemente novas e distintas, enquanto outras parecem ser subprodutos da função imune do sistema CRISPR/Cas (HILLE et al., 2018).

Dentre as funções adicionais atribuídas ao sistema, a regulação gênica é a mais descrita na literatura. A presença de espaçadores com sequências comuns a genes do próprio cromossomo bacteriano sem que haja inativação do sistema ou algum efeito deletério à célula, fez surgir a hipótese de que a expressão desses espaçadores em crRNAs permitiria um “autodirecionamento” dos efetores do sistema para atuarem como elementos reguladores (SAMPSON; WEISS, 2014).

Esse mecanismo de regulação gênica foi observado por Aklujkar e Lovley (2010) ao apontarem como a evolução do genoma de *Pelobacter carbinolicus* pode ter sido influenciada por um espaçador dentro do *locus* CRISPR que corresponde a uma região do gene que codifica a enzima histidil-tRNA sintetase (*hisS*), resultando na eliminação de genes ancestrais que codificam várias histidinas próximas. A introdução desse espaçador no *locus* CRISPR de uma cepa transgênica de *G. sulfurreducens* contendo o gene alvo resultava na redução dos níveis de transcrição desse gene e, conseqüentemente, no crescimento defeituoso da bactéria (AKLUJKAR; LOVLEY, 2010).

O sistema CRISPR/Cas também foi descrito atuando como regulador gênico sem a participação de espaçadores complementares ao seu próprio cromossomo, como é o caso do sistema tipo II em espécies patogênicas de *Francisella novicida* e *Campylobacter jejuni*. A expressão da proteína Cas9 em espécies que não possuem o *locus* CRISPR aumentou a virulência deste patógeno, indicando a funcionalidade de uma proteína Cas independente dos transcritos CRISPRs (WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014). Em *F. novicida*, o mecanismo dessa regulação envolve a degradação de transcritos que codificam uma lipoproteína bacteriana (BLP), uma proteína de superfície celular reconhecida por receptores Toll-like tipo 2 do sistema imunológico hospedeiro, o que resulta na redução de sua expressão e consequente evasão imune (SAMPSON et al., 2013).

O reparo de DNA é uma outra função reconhecida para o sistema CRISPR/Cas. Por exemplo, Cas1 do sistema tipo I-E em *Escherichia coli* interage com importantes enzimas de reparo (como RecB, RecC e RuvB) e a deleção de *cas1* ou do *locus* CRISPR associado resulta no aumento da sensibilidade a danos no DNA e prejudica a segregação cromossômica (FAURE; MAKAROVA; KOONIN, 2019; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014).

Na última década, a maquinaria guiada por RNA de sistemas CRISPR/Cas foi transformada em importantes ferramentas biotecnológicas. A ferramenta de edição gênica baseada em CRISPR mais utilizada é a *S. pyogenes* Cas9 (SpyCas9) com um único RNA guia (sgRNA). A proteína multidomínio Cas9 atua como uma endonuclease de DNA de fita dupla, clivando ambas as fitas, após reconhecimento do alvo. Essa maquinaria é guiada pelo sgRNA que consiste em um RNA quimérico formado pela fusão de crRNA e tracrRNA, como também depende da presença de PAM na sequência alvo (LIU; FAN, 2014; NEWSOM et al., 2021).

A aplicação mais proeminente dessa ferramenta é a modificação de genes eucarióticos utilizando mecanismos de reparo de DNA de eucariotos para reparar a quebra de DNA induzida por Cas9. A edição de genes baseada em Cas9 em procariotos é limitada devido a mecanismos ineficientes de reparo de DNA; no entanto, a morte induzida pela clivagem de Cas9 de células não editadas pode ser usada para aumentar a eficiência de outros métodos de edição de genes bacterianos. Proteínas Cas desprovidas de atividade nucleolítica (dCas, do inglês *dead CRISPR-associated proteins*) também podem ser utilizadas na ativação e repressão da

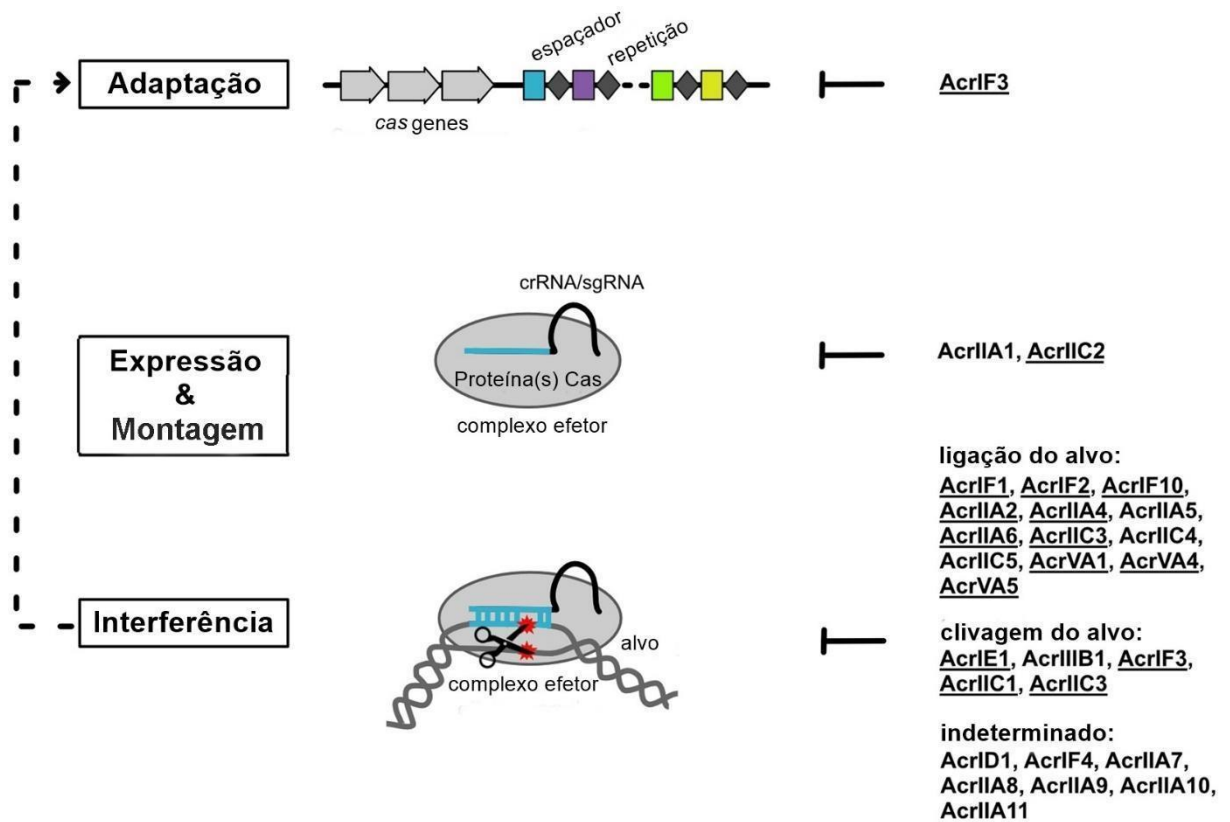
transcrição de genes e na remodelação epigenética BREZGIN et al., 2019; NEWSOM et al., 2021).

2.3.4 Anti-CRISPR: Mecanismos de inativação do sistema CRISPR/Cas

O sistema CRISPR/Cas proporciona aos procariotos um mecanismo de defesa baseado na complementaridade de sequência, logo, a forma mais simples de fagos escaparem desse sistema é através do acúmulo de mutações aleatórias nas bases da sequência PAM ou do protoespaçador, principalmente na região *seed*. No entanto, essa estratégia se mostra pouco eficiente contra sistemas que não dependem da sequência PAM, como é o caso dos sistemas tipo III, ou contra sistemas que possuem mecanismos de reimunização, onde as incompatibilidades desencadeiam a aquisição de novos espaçadores (HILLEt al., 2018; PAWLUK; DAVIDSON; MAXWELL, 2018).

Por outro lado, alguns fagos possuem um mecanismo mais sofisticado para contrapor a atividade do sistema CRISPR/Cas: as proteínas anti-CRISPR (Acr) (Figura 9). As Acr são pequenas proteínas capazes de inibir a maquinaria do sistema responsável pela ligação e clivagem de fagos (PAWLUK; DAVIDSON; MAXWELL, 2018). A descoberta dessas proteínas se deu através da observação de que bactérias lisogênicas comportando o sistema CRISPR/Cas eram sensíveis à infecção por determinado fago, apesar da presença de espaçadores contra ele. Estudos comparativos envolvendo os genomas dessas cepas permitiram a identificação de um *locus* gênico comum entre os fagos com atividade anti-CRISPR. Os primeiros genes *acr* foram identificados no genoma de cepas de *P. aeruginosa* comportando o sistema CRISPR/Cas do tipo I-F (BONDY-DENOMY et al., 2013).

Figura 9 - Mecanismos caracterizados e previstos para a função da proteína anti-CRISPR.



Fonte: Adaptado de Hardouin e Goulet, 2020. (HARDOUIN; GOULET, 2020).

Legenda: As proteínas anti-CRISPR podem atuar como inibidores ortostéricos ou alostéricos da maquinaria CRISPR–Cas, bem como enzimas que modificam irreversivelmente os componentes CRISPR–Cas. Grande maioria das proteínas identificadas inibe a etapa de interferência.

As proteínas Acr identificadas até o momento apresentam uma diversidade genética surpreendente com mais de 80 famílias de proteínas totalmente distintas e estão associadas com a inibição de sistemas do tipo I, II, III, V e VI (LI; BONDY-DENOMY, 2021). Essas famílias de Acr são nomeadas segundo o tipo de sistema que inibem e são numeradas segundo a sequência em que foram descobertas, logo, por exemplo, a primeira família Acr encontrada que bloqueia o funcionamento do sistema tipo I-E é chamada de AcrIE1 (DAVIDSON et al., 2020)

Apesar de não possuírem características comuns em relação a sequência ou a provável estrutura proteica, as proteínas Acr são geralmente codificadas em uma posição adjacente a um gene altamente conservado, conhecido como *aca* (do inglês, *anti-CRISPR associated*). O gene *aca* é um suposto regulador transcricional que só é encontrado em fagos que possuem proteínas Acr, servindo então como um importante alvo de reconhecimento para identificação de novos genes *acr*, através de

ferramentas de bioinformática em uma abordagem chamada de “*guilt-by-association*” (STANLEY et al., 2019).

As proteínas Acr podem promover a inativação do sistema CRISPR/Cas bloqueando uma ou mais etapas de seu funcionamento. No entanto, a grande maioria das Acrs caracterizadas até o momento interagem com proteínas do complexo efetor responsável pela etapa de interferência (Figura 9). Os mecanismos moleculares usados variam desde a oclusão dos sítios funcionais, a inibição alostérica ou até a modificação enzimática dos componentes do sistema CRISPR/Cas (HARDOUIN; GOULET, 2020). Alguns estudos já investigam as possíveis aplicações para as proteínas Acr na pesquisa e desenvolvimento de novas terapias contra bactérias multirresistentes. A inclusão de proteínas Acr no genoma de fagos, por exemplo, permite que o fago supere a imunidade mediada pelo CRISPR/Cas em bactérias, contribuindo para a eficácia da fagoterapia (VYAS, 2022).

2.4 CRISPR/CAS EM *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais organismos modelo para o estudo das interações entre o sistema CRISPR/Cas e os bacteriófagos (LEÓN et al., 2021). Nesse importante patógeno oportunista, já foi identificada a presença de sistemas do tipo I-F, I-E, I-C e mais recentemente o tipo IV-A, sendo os tipos I-F e I-E os mais frequentes (CADY et al., 2012; CROWLEY et al., 2019; VAN BELKUM et al., 2015). Também existe a descrição de cepas que possuem simultaneamente mais de um tipo de sistemas, porém esse é um fenômeno pouco reportado (LUZ et al., 2019; VAN BELKUM et al., 2015).

Ainda existem poucos estudos que descrevem os fatores que participam da regulação do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa*. Høyland-Kroghsbo et al. (2017) demonstraram que a comunicação célula-célula, conhecida como *quorum sensing*, promove um aumento da expressão do sistema em resposta à densidade celular e ao risco de infecção por fagos. Segundo outro estudo, temperaturas mais baixas aumentam a atividade do sistema CRISPR/Cas, especialmente na etapa de adaptação. Essa descoberta sugere que o sistema é crucial para a proteção da bactéria em ambientes que propiciam maior risco de infecção por fagos, como o solo,

quando comparados com o corpo humano (37 °C) (HØYLAND-KROGHSBO, Nina M. et al., 2017; HØYLAND-KROGHSBO, Nina Molin; MUÑOZ; BASSLER, 2018).

Devido a sua função protetiva contra MGEs, como plasmídeos e elementos conjugativos integrativos (ICE, do inglês *integrative conjugative elements*), estudos sugerem que o sistema CRISPR/Cas desempenha um papel importante restringindo a transferência horizontal de genes em *P. aeruginosa* e por consequência, genomas com CRISPRs intactos são menores quando comparados aos demais. A observação de que os genomas que possuem genes anti-CRISPR são maiores do que aqueles que não os possuem também apoia essa hipótese (VAN BELKUM et al., 2015; WHEATLEY; MACLEAN, 2021).

Além da função imune, alguns estudos têm associado o sistema CRISPR/Cas com outros papéis na célula bacteriana. Zegans et al. (2009) observaram que a presença simultânea do profago DMS3 e do sistema do tipo I-F no genoma de *P. aeruginosa* inibia a motilidade em grupo e a produção de biofilme pela bactéria. No entanto, certas mutações em alguns dos genes *cas* permitem que o fenótipo do biofilme seja restaurado. Este fenômeno se dá através da similaridade parcial entre um espaçador do *locus* CRISPR e o gene 42 do profago DMS3 (CADY; O'TOOLE, 2011; ZEGANS et al., 2009). Posteriormente, Heussler et al. demonstraram que a interação do sistema CRISPR/Cas com o protoespaçador DMS3 induz a expressão de genes relacionados a fagos regulados pela resposta SOS, resultando na morte celular durante a formação de biofilme (HEUSSLER et al., 2015).

Dentre as funções adicionais já reportadas, estudos relatam que fatores de virulência podem ser regulados pelo sistema em *P. aeruginosa*, promovendo a evasão das defesas de hospedeiros mamíferos. Segundo Li et al. (2016), o sistema do tipo I-F degrada mRNA de *lasR*, o principal ativador transcricional de genes envolvidos no *quorum sensing*, permitindo que a bactéria escape de uma das vias de reconhecimento do hospedeiro, diminuindo a resposta pró-inflamatória. Adicionalmente, um estudo de Wu et al. (2019) demonstrou que o sistema CRISPR/Cas também pode impactar a resposta imune do hospedeiro alterando a ativação do inflamassoma regulada por autofagia (LI et al., 2016; WU et al., 2019).

Apesar do intenso esforço dedicado ao conhecimento do sistema CRISPR/Cas nos últimos anos, ainda existe muito a ser explorado a respeito da

relação parasita-hospedeiro entre bactérias e fagos, especialmente entre isolados advindos do ambiente hospitalar. Essa compreensão pode implicar em fortes avanços no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas e no combate a crescente resistência microbiana, protagonizada por espécies como *Pseudomonas aeruginosa*.

3 JUSTIFICATIVA

Em estudos anteriores do grupo foram encontrados isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, comportando simultaneamente o sistema CRISPR/Cas, genes anti-CRISPR em seus genomas, profagos e espaçadores contra estes mesmos profagos (espaçadores auto-direcionados). Dezenas de genes anti-CRISPR já foram identificados e já existem muitos estudos dedicados na compreensão do mecanismo de ação de suas respectivas proteínas e da sua utilização como ferramenta de engenharia genética. Entretanto, o estudo da regulação da sua expressão e o impacto de sua presença na célula hospedeira ainda é muito recente e pouco explorado.

Nesses estudos, também foram encontrados dois isolados comportando um espaçador contra uma proteína própria do metabolismo bacteriano, a desidrogenase de coproporfirinogênio III independente de oxigênio. Um espaçador contra uma proteína do próprio microrganismo pode implicar em remodelagem genômica (VERCOE et al., 2013); levar à autoimunidade e eventual degradação, ou até perda de função do sistema CRISPR/Cas (STERN et al., 2010; MARINO et al., 2018); ou, potencialmente regular a expressão do gene em questão (LI et al., 2016). A presença de espaçadores contra fagos lisogênicos incluídos no genoma do hospedeiro bacteriano também tem o potencial de causar fenômenos semelhantes.

Estes achados denotam a incerteza sobre a real ação do sistema na proteção contra elementos genéticos móveis; se os genes anti-CRISPR nos genomas são continuamente expressos; e se a presença de espaçadores auto-direcionados no *locus* CRISPR alteram a expressão de seus produtos. Diante do exposto, o presente estudo propõe esclarecer tais questões, com o objetivo de compreender o funcionamento e a biologia do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa*.

4 PERGUNTA CONDUTORA

O sistema CRISPR/Cas interfere na expressão de genes de fagos e da proteína do metabolismo bacteriano HemN em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*? A expressão de genes anti-CRISPR é dependente de condições nutricionais?

5 HIPÓTESE

O sistema CRISPR/Cas atua como um regulador transcricional de produtos bacterianos e virais. Enquanto os genes que codificam proteínas anti-CRISPR são expressos constitutivamente e seus níveis de expressão são dependentes de condições nutricionais.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a expressão dos genes anti-CRISPR *acrE1*, *acrF3*, *acrF5* e *acrF7* em isolados de *P. aeruginosa*;
- b) Caracterizar a expressão de genes anti-CRISPR presentes no genoma de isolados de *P. aeruginosa* em diferentes condições nutricionais;
- c) Investigar a expressão de genes que codificam a proteína do capsídeo e a proteína montadora da cauda do fago phiCTX em isolados de *P. aeruginosa*;
- d) Quantificar a expressão do gene *hemN* que codifica a proteína desidrogenase de coproporfirinogênio III independente de oxigênio em isolados comportando o sistema CRISPR/Cas com diferentes características.

7. METODOLOGIA

7.1 AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ESTUDADAS

Quatro isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de diferentes sítios de infecção foram obtidos de dois hospitais da rede pública da cidade do Recife-PE entre os anos de 2015 e 2016. Os quatro isolados clínicos tiveram seus genomas sequenciados em estudos anteriores do grupo (LUZ et al., 2019; 2021) e comportam o sistema CRISPR/Cas do tipo I-F, com características diversas (Quadro 1). Além desses isolados, a cepa PAO1 foi selecionada como controle negativo por não possuir o sistema CRISPR/Cas.

Todas as amostras estão conservadas na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do IAM/Fiocruz. Os estoques foram preparados em criotubos contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol a 30% na proporção de 1:1, e congelados em freezer a -80°C para manutenção das amostras do estudo.

Quadro 1 - Características dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* comportando o sistema CRISPR/Cas do tipo I-F.

Isolados	Origem do espécime clínico	Características genéticas
Pae28	Material cirúrgico	- Profago phiCTX e espaçadores contra o mesmo - Genes anti-CRISPR (<i>acrIE1</i> , <i>acrIF3</i> e <i>acrIF5</i>)
Pae29	Cateter	- Espaçador auto-direcionado associado a <i>hemN</i>
Pae42	Cateter	- Fago phiCTX e espaçadores contra o mesmo - Gene anti-CRISPR (<i>acrIF7</i>) - Espaçador auto-direcionado associado a <i>hemN</i> - Profago phiCTX (com espaçador associado)
Pae70	Urina	- Profago phiCTX (sem espaçador associado)

Fonte: Adaptado de Luz et al., 2021.

7.2 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL BACTERIANO E QUANTIFICAÇÃO

Inicialmente, uma alíquota de cada isolado de *P. aeruginosa* foi semeada em ágar LB e incubada a 37°C por 24 horas. As colônias foram transferidas para 5mL de caldo BHI e novamente incubadas a 37°C por 24h. A extração do RNA total bacteriano foi realizada com a utilização do *SV Total RNA Isolation Systems* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, a partir de uma alíquota de um mL da cultura crescida em caldo BHI.

Posteriormente, todos os isolados foram crescidos novamente em meio sólido e as colônias foram então transferidas para 5mL de caldo LB (condições nutricionais ricas) e caldo M9 suplementado com 0,2% de glicose (condições nutricionais limitadas). Todas as amostras foram incubadas a 37°C durante três intervalos de tempo: T1 = 16h, T2 = 24h e T3 = 32h. O RNA total foi extraído segundo recomendações do fabricante do reagente Trizol[®] (Invitrogen).

Cada amostra de RNA foi tratada duas vezes com a enzima *DNase I Amplification Grade* (ThermoFisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante, para remoção de DNA cromossomal contaminante. Para mensurar a quantidade de RNA total extraído, 1µl da amostra pura foi submetido à quantificação em *NanoDrop 2000c* (ThermoFisher Scientific Inc.) e o grau de pureza foi estimado a partir da observação dos parâmetros de absorvância ($A_{260/280}$). Todas as amostras foram estocadas em freezer a -80°C até o momento de uso.

Para avaliação da integridade das amostras obtidas, uma alíquota do RNA total extraído foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) e corrido a 120 Volts e 150 mA durante 30 minutos, sendo posteriormente visualizados e fotografados em aparelho de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta.

7.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A técnica de RT-PCR foi realizada para verificar a transcrição de quatro genes anti-CRISPR (*acrI1E1*, *acrI1F3*, *acrI1F5* e *acrI1F7*), o gene *hemN* referente a desidrogenase de coproporfirinogênio III independente de oxigênio e dois genes do profago phiCTX. Nesse estudo, foi definido o nome *CTXcap* para se referir ao gene

que codifica a proteína do capsídeo do fago phiCTX e *CTXesp* para mencionar o gene que inclui em sua sequência uma região complementar a um espaçador adquirido pelo sistema CRISPR/Cas contra phiCTX em Pae28. O gene *CTXesp* codifica uma proteína montadora da cauda do fago phiCTX.

A reação de Transcrição Reversa (RT-PCR) foi realizada com a utilização do GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, na qual o RNA total foi utilizado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA). Um controle negativo foi incluído para todas as amostras de cDNA, no qual a enzima Transcriptase Reversa não foi adicionada, a fim de confirmar que as amostras obtidas não são resultado de escape de DNA pela DNase. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C, até utilização posterior.

Para este estudo, um conjunto de *primers* foi desenhado através do software A plasmid Editor (disponível em: <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>), a partir dos genomas sequenciados dos isolados clínicos selecionados. A viabilidade desses *primers* foi avaliada através da ferramenta OligoAnalyser e as sequências nucleotídicas utilizadas podem ser observadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência 'nucleotídica' (5'-3')	Tamanho do produto
<i>acrIE1</i>	AcrE1-F	CTGTCGCTTATCGTGATTCAGG	111 pb
	AcrE1-R	GATATTTTCGGCAGGCACCTT	
<i>acrIF3</i>	AcrF3-F	TCGATCCTGTGCGCTTATCGTGATTC	117 pb
	AcrF3-R	GATATTTTCGGCAGGCACCTTCA	
<i>acrIF5</i>	AcrF5-F	CCTCGCAGAACGTAGGTGTC	103 pb
	AcrF5-R	CATGCCTGTAGTTCCTCATACCG	
<i>acrIF7</i>	AcrF7-F	ATGACCACCTTTACCAGCATCG	117 pb
	AcrF7-R	GCTAACACCGTATGCCTCTTCATA	
<i>CTXesp</i>	CTXesp-F	ATCAGCCARCCGACCATCAC	109 pb
	CTXesp-R	CCTTCGCCCGCTTCTGYAGCAAA	
<i>CTXcap</i>	CTXcap-F	CTGAAGAACCTGTGCTCTACTG	101 pb
	CTXcap-R	TCRTTGCTGGACTCGTAGTTCTC	
<i>hemN</i>	HemN-F	AATTTCCAGGGCTACACCAC	108 pb
	HemN-R	GTTGATGTGCTGCTGTTCT	

Fonte: A autora.

Para otimização da amplificação, foram realizados testes de gradiente de temperatura de anelamento (50°C a 60°C) para cada um dos *primers* utilizados nesse estudo, utilizando amostras de DNA dos isolados Pae28 e Pae42. As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de dNTP na concentração de 2,5 mM; 1 µL de cada *primer* na concentração de 20nM; 2,5 µL de MgCl₂ a 25 mM; 1 µL de cDNA diluído 1:10 e 1 U de Taq DNA polimerase (Promega). As reações foram submetidas à termociclagem em *T3000 thermocycler* (Biometra), com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto em cada ciclo, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen™), corridos a 120V e 150mA durante 50 minutos, sendo posteriormente visualizados e fotografados em aparelho de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta.

7.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Para avaliar as possíveis diferenças nos níveis de expressão dos genes em estudo, a quantificação da transcrição foi realizada usando o Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados para as reações de amplificação são os mesmos apresentados no Quadro 2. Todas as reações foram realizadas em triplicata e submetidas a termociclagem no sistema de detecção ABI 7500 (Applied Biosystems), disponível no Núcleo de Plataforma Tecnológica do IAM/Fiocruz. Os dados de *threshold cycle* (C_T) calculados por meio do *7500 software v2.3* foram então exportados para o programa Microsoft® Excel para realizar os cálculos de desvio padrão, eficiência da amplificação e quantificação relativa.

As amostras de cDNA obtidas a partir da extração de RNA com Trizol foram submetidas à quantificação em *NanoDrop 2000c* (ThermoFisher Scientific Inc.) e diluídas a 150ng/µL, enquanto os *primers* foram diluídos a concentração de 2 nM, ambos em água DEPC. A fim de otimizar as concentrações de *primer* e cDNA usadas, foram realizadas reações de qPCR sob quatro condições, descritas no Quadro 3. A condição testada que produziu valores de C_T mais homogêneos entre as replicatas

(desvio padrão $\leq 0,3$) e sem amplificação inespecífica foi selecionada para cada alvo. O C_T é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza o limiar (*threshold*) fixado na fase exponencial da curva de amplificação. As condições escolhidas foram: condição 1 para os ensaios com os genes *CTXcap*; condição 2 para os genes *rpsL*, *acrIE1* e *acrIF7*; condição 3 para os genes *acrIF3* e *acrIF5*; e condição 4 para o gene *hemN*.

Quadro 3 - Diferentes condições testadas para realização da qRT-PCR.

Componente	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4
SYBR® Green Master Mix	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
Primer Forward	0,5 μ L	0,5 μ L	1 μ L	1 μ L
Primer Reverse	0,5 μ L	0,5 μ L	1 μ L	1 μ L
Água DEPC	3 μ L	2 μ L	2 μ L	1 μ L
cDNA	1 μ L	2 μ L	1 μ L	2 μ L
Total	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L

Fonte: A autora.

Legenda: Cada condição representa uma única reação de PCR em tempo real com volume constante de Master Mix SYBR® Green e concentração variável de *primers* e cDNA, para um volume final de 10 μ L.

Dois parâmetros de desempenho também foram considerados em associação aos ensaios de qPCR: eficiência da amplificação (E) em porcentagem e linearidade (coeficiente de determinação, R^2). Esses parâmetros foram estimados por meio da construção de uma curva padrão com o auxílio do Microsoft® Excel. Os dados C_T obtidos em cinco pontos de diluição do cDNA foram plotados em gráfico de regressão linear semi-log do valor C_T em comparação ao log da concentração inicial de ácido nucléico. A inclinação média (*slope*) da curva de eficiência de $-3,32$ indica uma reação de PCR com 100% de eficiência (E), segundo a fórmula $E = 10^{(-1/slope)} \times 100$. Foram considerados aceitáveis valores de eficiência de entre 90%-110% e $R^2 \geq 0,98$ (FDA, 2019). A curva gerada por cada par de *primers* e sua respectiva eficiência de amplificação está disponível no Apêndice A.

7.5 PARÂMETROS ANALÍTICOS DA PCR EM TEMPO REAL

O método escolhido para quantificação relativa da expressão gênica foi o método C_T comparativo proposto por Pfaffl (2001). Esse método baseia-se na comparação da expressão de um gene alvo em uma determinada amostra relativa à outra amostra controle, utilizando pelo menos um gene endógeno como calibrador. No atual estudo, foi utilizado o gene constitutivo *rpsL* de *P. aeruginosa*, que codifica a proteína estabilizadora do RNA ribossomal 30S (DUMAS, 2006). Os resultados são apresentados como razões de expressão gênica entre o gene alvo (alvo) e o gene de referência (*rpsL*), que foram obtidos de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{(E_{alvo})^{\Delta C_t(\text{controle-amostra})}}{(E_{ref})^{\Delta C_t(\text{controle-amostra})}}$$

Os valores brutos de C_T foram tabelados e as razões de expressão gênica calculadas com o auxílio do Microsoft® Excel. Para a análise estatística e construção de gráficos foi utilizado o *software* GraphPad Prism 9. Inicialmente, os dados foram avaliados quanto a sua distribuição normal por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi realizada uma análise de variância (*One Way ANOVA*) com pós-teste de Tukey, com o objetivo de avaliar as variações das razões de expressão entre amostras e entre os períodos de incubação, sendo aceito o nível de significância de $p < 0,05$. As comparações realizadas estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4 - Comparações dos níveis de expressão de genes relacionados com o sistema CRISPR/Cas do tipo I-F em *Pseudomonas aeruginosa* sob diferentes condições.

Gene	Condição 1		Condição 2
<i>acrIE1</i>	Pae28 em meio M9	<i>versus</i>	Pae28 em meio LB
<i>acrIF3</i>	Pae28 em meio M9	<i>versus</i>	Pae28 em meio LB
<i>acrIF5</i>	Pae28 em meio M9	<i>versus</i>	Pae28 em meio LB
<i>acrIF7</i>	Pae42 em meio M9	<i>versus</i>	Pae42 em meio LB
<i>CTXcap</i>	Pae28	<i>versus</i>	Pae42
<i>hemN</i>	PAO1	<i>versus</i>	Pae29
	PAO1	<i>versus</i>	Pae42

Pae28	<i>versus</i>	Pae42
-------	---------------	-------

Fonte: A autora.

Legenda: M9 = meio com pouco nutrientes; LB = meio rico em nutrientes.

8 ASPECTOS ÉTICOS

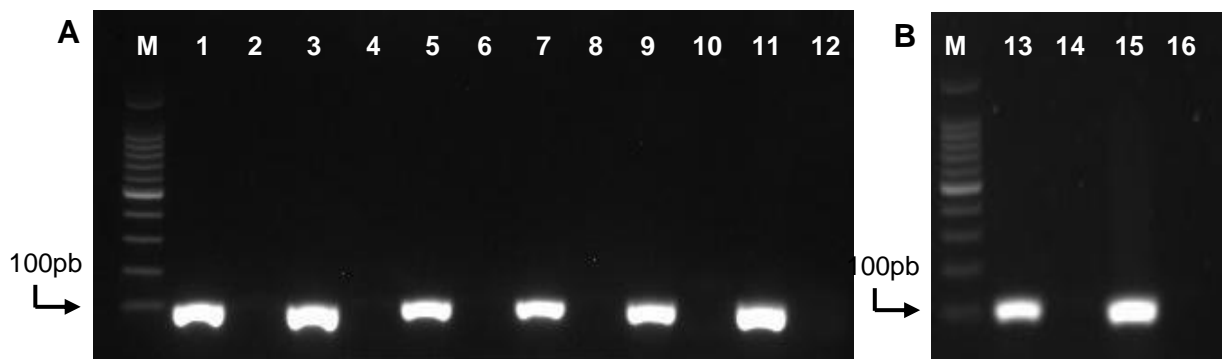
O projeto não apresenta implicações éticas considerando que, os resultados não foram vinculados ao nome dos pacientes, nem os hospitais foram identificados. Os isolados clínicos foram obtidos em projeto anterior (LUZ et al 2019) de pacientes por demanda espontânea, de hospitais da cidade do Recife e estão estocados na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães.

9 RESULTADOS

9.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA EXPRESSÃO DE GENES EM DE *P. aeruginosa* COMPORTANDO O SISTEMA CRISPR/CAS DO TIPO I-F

A técnica de RT-PCR permitiu a verificação de genes anti-CRISPR em dois dos isolados desse estudo, a partir da visualização de banda específica em géis de agarose. Foi possível constatar que os genes anti-CRISPR; *acrI E1*, *acrI F3* e *acrI F5* estão sendo expressos no isolado Pae28, enquanto o gene *acrI F7* está sendo expresso no isolado Pae42 (Figura 10).

Figura 10 - Géis representativos da expressão gênica dos genes anti-CRISPR *acrI E1*, *acrI F3*, *acrI F5* e *acrI F7* em *Pseudomonas aeruginosa*.

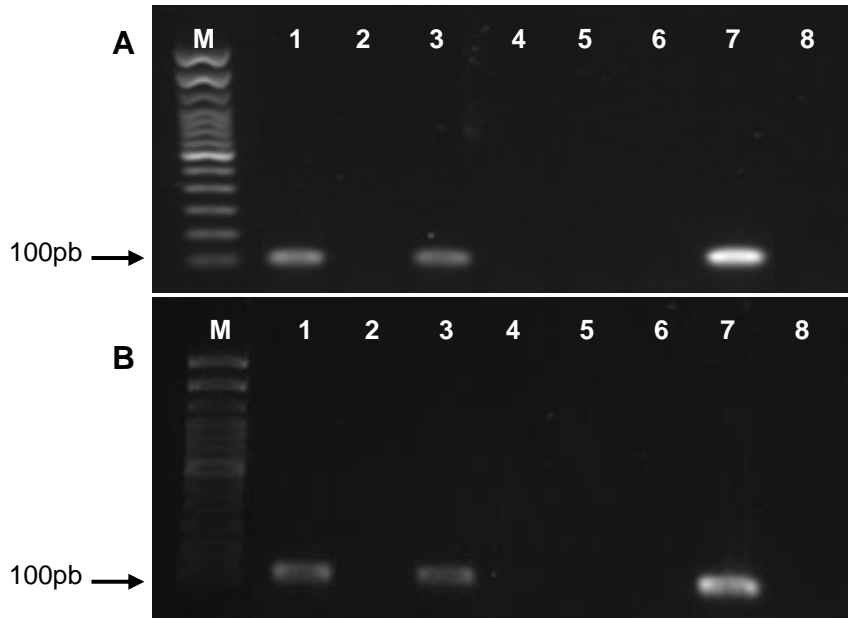


Fonte: A autora.

Legenda: Amplificação dos genes anti-CRISPR *acrI E1* (1), *acrI F3* (5), *acrI F5* (9) e *acrI F7* (13) em amostras de cDNA e DNA obtidas a partir do isolado Pae28 (A) e do isolado Pae42 (B). Para cada gene investigado, foram adicionadas outras três reações para confirmar ausência de amplificação nos controles negativos da transcrição reversa (colunas 2, 6, 10 e 14), amplificação do gene de interesse em DNA (colunas 3, 7, 11 e 15) e ausência de formação de dímeros de *primers* (colunas 4, 8, 12 e 16); M = marcador de peso molecular (100 pb).

Com relação ao fago phiCTX, foi avaliada a formação de transcritos dos genes: *CTXcap* que codifica uma proteína do capsídeo viral e *CTXesp* que codifica uma proteína de montagem da cauda do fago. Os resultados demonstraram que esses genes estão sendo expressos nos isolados Pae28 e Pae42. Ambos os isolados possuem ao menos dois espaçadores derivados do fago phiCTX dentro do *locus* CRISPR, dentre os quais está um espaçador que possui sequência complementar à região do gene *CTXesp* (Figura 11). Por outro lado, o isolado Pae70 não possui nenhum espaçador relacionado ao fago phiCTX (Figura 11).

Figura 11 - Géis representativos da expressão dos genes *CTXcap* e *CTXesp* em *Pseudomonas aeruginosa*.

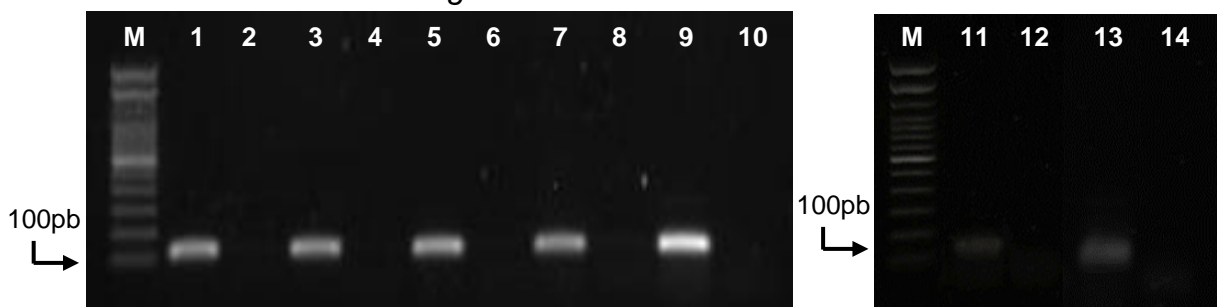


Fonte: A autora.

Legenda: Amplificação dos genes *CTXcap* (A) e o *CTXesp* (B) em amostras de cDNA obtidas a partir dos isolados Pae28 (1), Pae42 (3) e Pae70 (5). Para cada amostra de cDNA utilizada, foi adicionada uma reação para confirmar ausência de amplificação nos controles negativos da transcrição reversa (colunas 2, 4 e 6), amplificação do gene de interesse em DNA (CP) e ausência de formação de dímeros de *primers* (CN); M = marcador de peso molecular (100 pb).

Com relação ao gene *hemN*, que codifica a proteína bacteriana desidrogenase de coproporfirinogênio III independente de oxigênio, os isolados Pae29 e Pae42 possuem um espaçador auto-direcionado derivado desse gene nos *loci* CRISPR. A transcrição do gene *hemN* foi confirmada em todos os isolados desse estudo, incluindo Pae29 e Pae42 (Figura 12).

Figura 12 - Géis representativos da expressão qualitativa do gene *hemN* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: A autora.

Legenda: Amplificação de *hemN* em amostras de cDNA obtidas a partir de PAO1 (1), Pae28 (3), Pae42 (5), Pae70 (7) e Pae29 (11). Para cada amostra de cDNA utilizada, foi adicionada uma reação para confirmar ausência de amplificação nos controles negativos da transcrição reversa (colunas 2, 4, 6, 8

e 12), amplificação do gene de interesse em DNA (coluna 9 e 13) e ausência de formação de dímeros de *primers* (coluna 10 e 14); M = marcador de peso molecular (100 pb).

9.2 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE GENES EM DE *P. aeruginosa* COMPORTANDO O SISTEMA CRISPR/CAS DO TIPO I-F

9.2.1 Avaliação da eficiência da amplificação por PCR em tempo real

A eficiência da amplificação por qRT-PCR foi determinada para cada gene desse estudo e seus valores estão descritos na Tabela 1. Foram considerados aceitáveis valores de eficiência entre 90%-110% e $R^2 \geq 0,98$ (FDA, 2019). A relação gráfica entre valores de C_T (*cycle threshold*) e a concentração de cDNA gerada por cada par de *primers*, com quatro a cinco pontos de diluição da amostra está disponível no Apêndice A.

Tabela 1 - Eficiências das reações e R^2 (coeficiente de determinação) correspondentes à amplificação gerada por cada conjunto de *primers*.

Gene	cDNA	Eficiência	R^2
<i>acrIE1</i>	Pae28	108%	0,9887
<i>acrIF3</i>	Pae28	97%	0,9977
<i>acrIF5</i>	Pae28	103%	0,998
<i>acrIF7</i>	Pae42	107%	0,9922
<i>CTXcap</i>	Pae42	98%	0,9856
<i>hemN</i>	Pae29	103%	0,9814

Fonte: A autora.

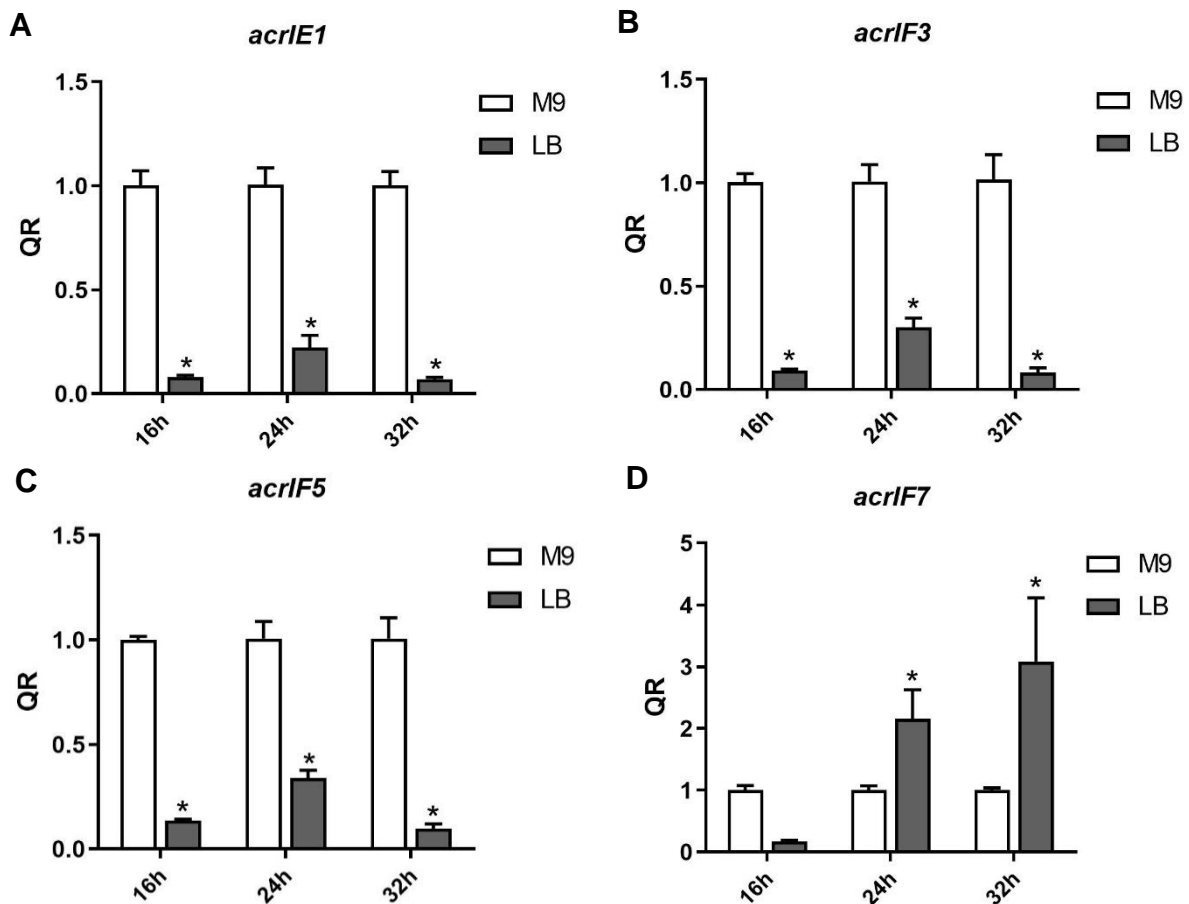
Legenda: Valor de eficiência (E), segundo a fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$, onde *slope* é a inclinação da curva padrão e R^2 representa a linearidade entre os seus pontos.

9.2.2 Expressão de genes anti-CRISPR em diferentes condições nutricionais

Para investigar o potencial impacto da disponibilidade de nutrientes na expressão de genes anti-CRISPR, foi realizada uma quantificação relativa dos níveis de expressão gênica por qRT-PCR. A análise comparativa da expressão do gene *acrIE1* em Pae28 sob as duas condições nutricionais utilizadas neste estudo, revelou que a expressão desse gene é, em média, 87,5% menor no meio LB, rico em nutrientes ($p < 0,0001$), como mostra a figura 13. Também foi possível observar, em

LB, o maior nível de expressão relativa que esse gene alcançou em 24 horas, com posterior redução, apresentando níveis semelhantes de expressão em 16h e 32h ($p=0,9749$). Os genes *acrIF3* e *acrIF5* também demonstraram os mesmos níveis de expressão, sendo 87% e 84%, respectivamente, menos expressos em meio LB (Figura 13).

Figura 13 - Expressão relativa de genes anti-CRISPR *acrIE1*, *acrIF3*, *acrIF5* e *acrIF7* em *Pseudomonas aeruginosa* sob diferentes condições nutricionais em três intervalos



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *acrIE1* (A), *acrIF3* (B) e *acrIF5* (C) no isolado Pae28; e *acrIF7* no isolado Pae42 (D). Ambos os isolados foram inoculados em meio de cultura escasso (M9) e rico (LB) em nutrientes, durante 16, 24 e 32 horas. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando o meio M9 como referência (QR=1.0). Os valores com um asterisco acima das barras são significativamente diferentes dentro de cada intervalo de crescimento ($P < 0,05$).

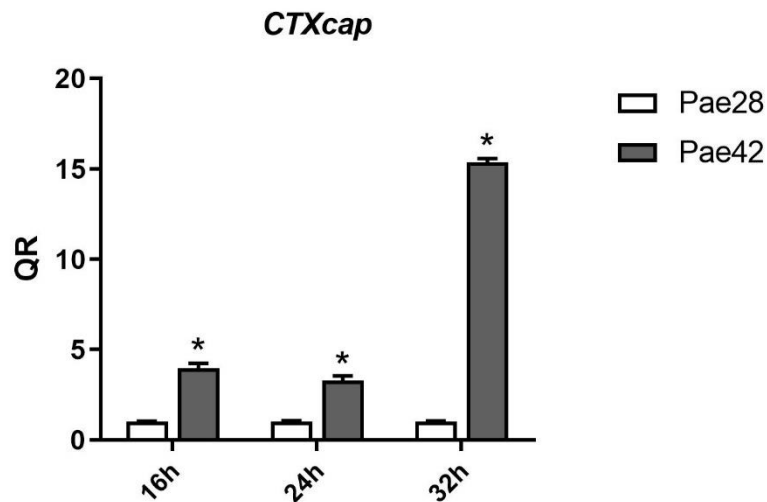
Ao avaliar a expressão do único gene anti-CRISPR presente no isolado Pae42, foi possível observar uma menor expressão de *acrIF7* em 16h no meio LB quando comparado ao meio M9 (Figura 13). No entanto, essa diferença não foi significativa ($p=0,3410$). Em intervalos maiores de tempo, constatou-se que os níveis de expressão relativa de *acrIF7* se elevaram no meio LB, alcançando valores

consideráveis até 210% maiores em 32h de incubação ($p=0,0086$). Essa diferença entre os períodos de incubação pode ser resultado da superexpressão em LB propriamente dita ou de uma subexpressão em M9.

9.2.3 Expressão do gene do capsídeo de phiCTX em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

A expressão do gene que codifica uma proteína do capsídeo do fago phiCTX (*CTXcap*) também foi quantificada nos três isolados que possuem esse profago incluso em seus genomas, no intuito de reconhecer uma possível influência do sistema CRISPR/Cas na expressão gênica de profagos, mediada por espaçadores complementares ao fago phiCTX. Não houve amplificação no isolado Pae70, confirmando a ausência de transcritos observada na reação de RT-PCR. Foi realizada, então, uma análise comparativa apenas entre os genes Pae28 e Pae42 (Figura 14).

Figura 14. Expressão relativa de *CTXcap* em diferentes isolados de *Pseudomonas aeruginosa* positivos para o sistema CRISPR/Cas.



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão do gene que codifica a proteína do capsídeo do fago phiCTX (*CTXcap*) nos isolados Pae28 e Pae42 e Pae70 (ausente), com 16, 24 e 32 horas de incubação. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando o isolado Pae28 como referência (QR=1.0). Os valores com um asterisco acima das barras são significativamente diferentes dentro de cada intervalo de crescimento ($P < 0,05$).

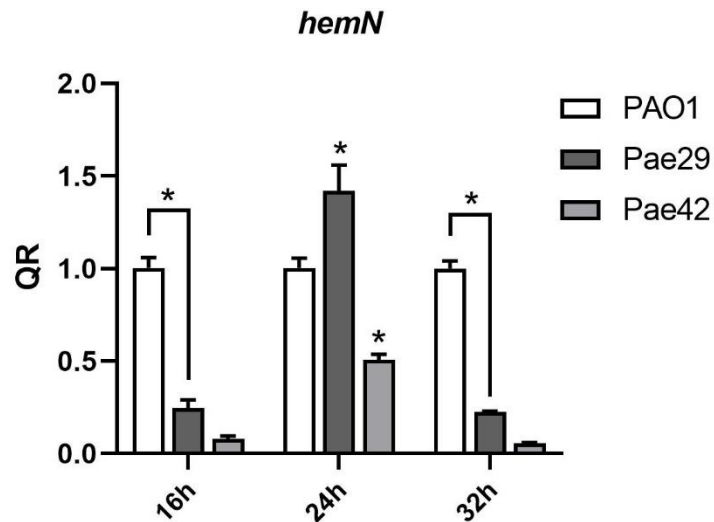
Os resultados obtidos demonstraram que *CTXcap* foi mais expresso no isolado Pae42 em todos os períodos de incubação ($p < 0,0001$). A quantificação relativa da expressão se mostrou semelhante em 16h e 24h de incubação, sendo em média 262%

maior em Pae42. Em 32h, foi observado um pico significativo na expressão de *CTXcap* em Pae42, mostrando um nível de expressão aproximadamente 15 vezes maior que o constatado em Pae28 ($p < 0,0001$). O isolado Pae28 possui 6 espaçadores identificados que possuem como alvo o fago phiCTX, enquanto o isolado Pae42 possui apenas dois espaçadores contra o mesmo fago (LUZ, 2021).

9.2.4 Expressão do gene bacteriano *hemN* em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

A expressão do gene *hemN*, que codifica a desidrogenase de coproporfirinogênio III em *P. aeruginosa* foi avaliada na cepa de referência PAO1 e nos isolados clínicos Pae29 e Pae42 (Figura 15). Os níveis de expressão foram comparados utilizando a cepa PAO1 como referência. Em 16 horas de incubação, a expressão de *hemN* é 75% e 92% menor em Pae29 e Pae42 do que em PAO1, respectivamente ($p < 0,0001$). Em 24 horas, os níveis de expressão de *hemN* em ambos isolados aumenta significativamente, de modo que a expressão em Pae29 se torna 42% maior que em PAO1 ($p = 0,0040$) e a expressão em Pae42 permanece menor, mas sofre um aumento 25% ($p = 0,0028$) quando comparado ao período de incubação anterior. No último período de incubação avaliado, os níveis de expressão retrocederam a valores semelhantes aos encontrados nas amostras incubadas por 16 horas ($p > 0,9999$), sendo 77% menor que PAO1 em Pae29 e 92% menor em Pae42 ($p < 0,0001$).

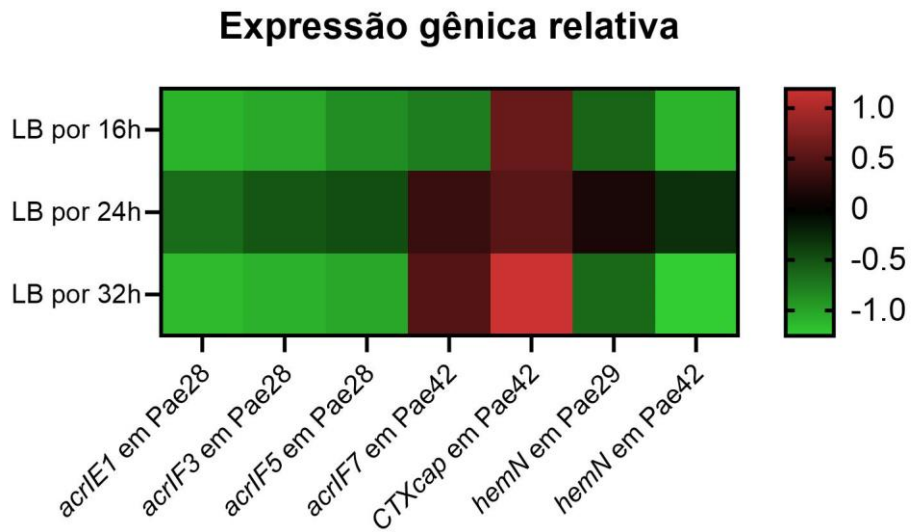
Figura 15. Expressão relativa de *hemN* em diferentes isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.



Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão de *hemN* nos isolados PAO1, Pae29 e Pae42, com 16, 24 e 32 horas de incubação. Os isolados Pae29 e Pae42 possuem espaçador contra *hemN* incluso no *locus* CRISPR. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando o isolado PAO1 como referência (QR=1.0). Os valores com um asterisco acima das barras são significativamente diferentes dentro de cada intervalo de crescimento ($P < 0,05$).

Em suma, a expressão de todos os genes investigados nesse estudo está expressa através de *heatmap* na Figura X. Foi observada a expressão de todos os genes anti-CRISPR em seus respectivos isolados clínicos e a análise quantitativa desses genes identificou que os genes *acrIE1*, *acrIF3* e *acrIF5* estão superexpressos no isolado Pae28 sob condições nutritivas limitadas, enquanto *acrIF7* possui sua expressão reprimida em Pae42 sob as mesmas condições. A expressão do gene que codifica a proteína do capsídeo do profago phiCTX foi observada em dois isolados. No isolado Pa42 este gene está superexpresso, quando comparado a Pae28. Com relação a *hemN*, ambos os isolados testados possuem a expressão desse gene reprimida na maioria dos tempos de incubação avaliados.

Figura 16. Síntese da expressão relativa de genes associados ao sistema CRISPR/Cas em *Pseudomonas aeruginosa* em três intervalos de tempo.



Fonte: A autora.

Legenda: A repressão dos níveis de expressão está representada em verde, enquanto a superexpressão está representada em vermelho. A expressão relativa dos genes anti-CRISPR foi quantificada usando amostras crescidas em M9 como controle. A expressão de *CTXcap* em Pae42 foi quantificada em relação a Pae28. Enquanto a expressão relativa de *hemN* foi quantificada utilizando a cepa PAO1 como controle.

10 DISCUSSÃO

10.1 GENES ANTI-CRISPR EM *Pseudomonas aeruginosa*

O CRISPR/Cas é sistema de defesa eficaz que confere imunidade contra MGEs em arqueas e bactérias. Apesar disso, esse sistema está presente em apenas um terço dos genomas sequenciados, e em cepas de uma mesma espécie frequentemente diferem no que diz respeito à presença, número e tamanho. Essa diversidade é fruto de fatores ambientais que determinam os custos e as vantagens da manutenção desse sistema (WESTRA; LEVIN, 2020). Desta forma, não é surpreendente que os quatro isolados clínicos investigados neste estudo, façam parte de um conjunto de 130 isolados, dos quais 73 não possuem o sistema CRISPR/Cas, 50 são positivos para o sistema do tipo I-F, cinco positivos para o tipo I-E e dois isolados possuem ambos os sistemas simultaneamente (LUZ et al., 2019).

Todos os isolados clínicos selecionados neste estudo possuem o sistema CRISPR/Cas do tipo I-F, dentre os quais, dois carregam genes anti-CRISPR em seus genomas, conhecidos por codificarem proteínas capazes de bloquear a ação da maquinaria efetora do sistema (LUZ et al., 2021; PAWLUK; DAVIDSON; MAXWELL, 2018). Neste estudo, foi observada a transcrição dos genes *acrE1*, *acrF3*, *acrF5* e *acrF7* sob condições convencionais de crescimento, sugerindo uma expressão constitutiva desses genes. A expressão rápida de altos níveis de proteínas anti-CRISPR no início da infecção, e sua posterior manutenção em níveis basais, é crucial para o sucesso de fagos contra o sistema CRISPR/Cas em procarionotos e o estudo dos mecanismos de regulação desses genes ainda é recente e pouco explorado (STANLEY et al., 2019).

A investigação da estrutura e função das proteínas *anti-CRISPR associated* (*Aca*), codificadas por genes adjacentes ao operon anti-CRISPR, tem um papel na regulação de sua expressão. Segundo Birkholz et al. (2019), a proteína *anti-CRISPR associated 2* (*Aca2*) atua como um repressor da expressão de genes anti-CRISPR. De modo semelhante, Stanley et al. (2019) estudaram a atividade da proteína *Aca1* e observaram que na sua ausência, a intensa expressão de genes anti-CRISPR, induzida por seu forte promotor, desencadeia um processo letal para a célula hospedeira, não sendo favorável a fagos lisogênicos (BIRKHOLZ et al., 2019; STANLEY et al., 2019). O atual estudo corrobora os achados da literatura,

demonstrando que esses genes estão em constante expressão e que, possivelmente, essa expressão é apenas suprimida diante do acúmulo da proteína Aca na célula.

Westra et al. (2015) avaliaram a relação entre as condições nutricionais e o mecanismo imune com maior atividade na cepa PA14 de *P. aeruginosa*. O sistema CRISPR/Cas se mostrou mais ativo sob condições nutricionais limitadas, em contraste com o acúmulo de mutações do receptor de fagos que foi o mecanismo de defesa prioritário em meio de cultura rico em nutrientes. Em outro estudo, Høyland-Kroghsbo et al. (2018) encontraram que o sistema é mais ativo em temperaturas mais baixas, propondo que uma taxa de crescimento menor, proporciona às bactérias um tempo crucial para adaptação, sendo um dos fatores reguladores de sua atividade.

Partindo do pressuposto de que o sistema CRISPR/Cas é o mecanismo de defesa preferencial em condições nutricionais limitadas, espera-se que a expressão de proteínas anti-CRISPR sigam esse mesmo padrão, a fim de produzir proteínas suficientes para bloqueio eficaz do sistema. Neste estudo, os genes anti-CRISPR *acrIE1*, *acrIF3* e *acrIF5* presentes em Pae28 corroboram tal hipótese, sendo mais expressos no meio M9 que no meio LB. A expressão de *acrIF7* em Pae42 também se mostrou inicialmente menor em LB, porém, com o decorrer do tempo, esse mesmo gene se tornou gradativamente mais expresso no meio LB, o que sugere que a regulação desse gene ocorre de maneira distinta.

A respeito das proteínas codificadas pelos genes anti-CRISPR avaliados neste estudo, já existem estudos que descrevem a estrutura e função de algumas delas. Wang et al. (2016) avaliaram a estrutura e função de AcrIF3, demonstrando que essa proteína bloqueia a ação do sistema CRISPR/Cas do tipo I-F, durante a etapa de interferência, através da interação com a nuclease Cas3 que, nos sistemas do tipo I-F, está fusionada à Cas2. Cas3 é responsável pela degradação do DNA reconhecido e ligado pelo complexo Csy (efetor de sistemas do tipo I-F). Segundo Pawluk et al. (2017), AcrIE1 atua de modo semelhante, inibindo a Cas3 nos sistemas do tipo I-E (PAWLUK et al., 2017; WANG et al., 2016).

Gabel et al. (2021) descreveram que AcrIF7, por sua vez, interage com Cas8f, uma das subunidades do complexo efetor, responsável pelo reconhecimento e ligação do DNA. Quando Cas8f está bloqueada, não há reconhecimento do elemento exógeno e, conseqüentemente, não há sua degradação (GABEL et al., 2021). Com relação a AcrIF5, até o momento não existe nenhuma descrição do seu possível mecanismo de inibição.

10.2 EXPRESSÃO DE GENES DO FAGO phiCTX

Fagos temperados podem se integrar ao genoma do hospedeiro e persistir como elementos genômicos herdados verticalmente, conhecidos como profagos. Durante a lisogenia, a expressão da maioria dos genes de profagos, como aqueles dedicados à produção de vírions e à lise da célula hospedeira, deve ser reprimida a nível transcricional (OWEN et al., 2020). No entanto, a expressão desses genes pode ser retomada sob condições de estresse em um mecanismo chamado de indução, mediado geralmente pela resposta SOS, responsável pela reparação do material genético do hospedeiro. Sob indução, grande parte dos profagos dá início ao ciclo lítico, formando novos vírions (LITTLE, 2014).

O profago phiCTX foi encontrado nos genomas de três isolados utilizados neste estudo, dos quais Pae28 e Pae42 possuem espaçadores contra este mesmo fago nos *loci* CRISPR, enquanto o isolado Pae70 não os possui. Este fago temperado foi reconhecido e isolado inicialmente em cepas de *P. aeruginosa*, e é conhecido por possuir um gene que codifica uma citotoxina, caracterizada como um fator de virulência em cepas lisogênicas (NAKAYAMA et al., 1999). Neste estudo, a expressão dos genes que codificam o capsídeo viral (*CTXcap*) e a proteína montadora da cauda (*CTXesp*) desse fago foi identificada por RT-PCR apenas em Pae28 e Pae42.

Alguns estudos apontam que a indução pode ocorrer de forma espontânea em uma fração de células bacterianas de uma população, desencadeando a formação de novas partículas virais, e esse fenômeno pode justificar a identificação de transcritos de genes estruturais de phiCTX no presente estudo (WALDOR; FRIEDMAN, 2005). No entanto, não é possível inferir porque não há essa mesma indução espontânea detectável pela formação de transcritos no isolado Pae70. Uma hipótese alternativa é a de que o sistema CRISPR/Cas possui atividade de interferência remanescente, mesmo sob a inibição de proteínas anti-CRISPR, e esse sistema é responsável pelo dano ao DNA que provoca a resposta SOS da célula hospedeira e a consequente indução do profago phiCTX em Pae28 e Pae42, o que não ocorre no isolado Pae70. Nossos resultados também podem sugerir que outro mecanismo, alheio ao sistema CRISPR/Cas, está interferindo na expressão desses genes.

Segundo Wimmer e Beisel (2020), a aquisição de espaçadores contra profagos pode ocorrer no início da infecção, antes de sua inserção no genoma, ou posteriormente, induzindo morte celular para que não haja propagação do MGE

invasor (WIMMER; BEISEL, 2020). No caso dos isolados Pae28 e Pae42, a presença de espaçadores contra elementos presentes no próprio genoma da bactéria, como é o caso de phiCTX, poderia resultar em autoimunidade, porém é possível que essas células tenham permanecido viáveis devido à presença de proteínas anti-CRISPR que impedem o funcionamento do sistema CRISPR/Cas.

Em contrapartida, Luo et al. (2015) observaram que o sistema CRISPR/Cas do tipo I-E também pode atuar na repressão de genes mediante a deleção de *cas3* experimentalmente e propuseram que esse fenômeno também pode ser aplicado a outros sistemas de classe I, como o tipo I-F (LUO et al., 2015). A atuação de AcrIF3 bloqueando Cas3 em Pae28 poderia mimetizar uma situação semelhante ao que foi proposto por Luo, porém a expressão de outras duas proteínas anti-CRISPR simultaneamente estabelece barreiras no reconhecimento da ação das proteínas do complexo efetor do sistema CRISPR/Cas como regulador transcricional nesse isolado.

Com relação a diferença nos níveis de expressão entre Pae28 e Pae42, esse gene está sendo mais expresso em Pae42, que possui apenas dois espaçadores no *locus* CRISPR contra phiCTX, enquanto Pae28 possui seis espaçadores (LUZ, 2021). Alguns estudos já relacionaram a presença de espaçadores auto-direcionados com mecanismos alternativos de funcionamento do sistema CRISPR/Cas, como a clivagem de mRNA. Ao avaliar a cepa UCBPP-PA14 de *P. aeruginosa*, Li e colaboradores em 2016 constataram que a presença de um espaçador parcialmente complementar ao gene *lasR*, regulador de *quorum sensing*, no *locus* CRISPR do sistema de tipo I-F resultou em clivagem de moléculas de mRNA. Dessa forma, a diferença da expressão de phiCTX poderia ser resultado de uma função secundária do sistema CRISPR/Cas clivando transcritos e essa atividade seria proporcional ao número de espaçadores presentes no seus respectivos *loci* CRISPR.

10.3 EXPRESSÃO DO GENE BACTERIANO *hemN*

Neste trabalho, os isolados Pae29 e Pae42 também possuem espaçadores contra *hemN* em seus respectivos *loci* CRISPR. O gene *hemN* codifica a desidrogenase de coproporfirinogênio III independente de oxigênio, envolvida na biossíntese de heme em várias espécies bacterianas (ROMPF et al., 2002). A expressão de *hemN* foi detectada em todos os isolados clínicos testados, incluindo Pae29 e Pae42, o que indica que o sistema CRISPR/Cas não impede sua expressão.

Contudo, a análise quantitativa através de qRT-PCR demonstrou que há alterações nos níveis de expressão, com possível supressão da transcrição de *hemN*, de modo que os isolados Pae29 e Pae42 expressaram menos esse gene quando comparados a cepa PAO1, que não possui sistema-CRISPR.

De acordo com Levy et al. (2015), a maquinaria envolvida na etapa de adaptação do sistema CRISPR/Cas prioriza a aquisição de novos espaçadores a partir de DNA invasor, refletindo sua função imune. Adicionalmente, espera-se que a interferência guiada por crRNA complementar ao próprio genoma do hospedeiro, resulte em clivagem do alvo e posterior morte celular. No entanto, a identificação de espaçadores auto-direcionados é recorrente, e alguns estudos descrevem que esse fenômeno pode ser tolerado, por meio de mutações no sítio-alvo ou até mutações e deleção do próprio *locus* CRISPR (LEVY et al., 2015; WIMMER; BEISEL, 2020).

Uma outra maneira usada por procariotos para contornar o problema da autoimunidade é a utilização de mecanismos intrínsecos de reparo, como recombinação homóloga e união de extremidades não homólogas (NHEJ) (WIMMER; BEISEL, 2020). Ao avaliar o sistema CRISPR/Cas do tipo I-B em *Haloflex volcanii*, uma arquea halofílica, Stachler e colaboradores em 2017 encontraram que a síntese de crRNA auto-direcionado não é capaz de provocar danos detectáveis ao crescimento das células. Essa tolerância aos danos de DNA provocados pelo complexo efetor do sistema é mediada por recombinação homóloga entre as múltiplas cópias do cromossomo presentes na célula (STACHLER et al., 2017).

A expressão de genes anti-CRISPR dentro do genoma bacteriano também está associada ao escape dos efeitos deletérios da autoimunidade. A hipótese de que espaçadores auto-direcionados são um indicativo da presença de proteínas anti-CRISPR possibilitou a identificação de muitas dessas proteínas em diferentes estudos descritos na literatura (RAUCH et al., 2017; MARINO et al., 2018; WATTERS et al., 2018). No presente estudo, o isolado Pae42 carrega, simultaneamente no genoma, um espaçador contra um gene endógeno (*hemN*) e o gene anti-CRISPR *acrIF7*, logo, a expressão de AcrIF7 pode ser responsável pela manutenção da viabilidade celular desse isolado.

Adicionalmente, não foi reconhecida a sequência PAM adjacente ao protoespaçador incluso no gene *hemN* em Pae29 e Pae42. A sequência PAM é necessária para o reconhecimento e clivagem do sítio-alvo pelo complexo efetor do sistema (LUZ et al., 2021). Essa ausência de PAM pode ser resultado de mutações

ou da atividade de sistemas de reparo, prevenindo as células dos efeitos deletérios da autoimunidade. O sistema CRISPR/Cas também possui o potencial de regular a transcrição de genes através do bloqueio espacial de regiões promotoras, resultando na repressão da expressão desses genes (LUO et al., 2015; RATNER et al., 2019; SAMPSON et al., 2019).

No presente estudo, foi possível identificar variações nos níveis de expressão entre isolados que comportam ou não o sistema CRISPR/Cas em seu genoma. No entanto, não é possível inferir se essa mudança é resultado da ação do sistema como regulador transcricional ou se existe outro mecanismo bacteriano envolvido na regulação desse gene. A ausência de PAM adjacente ao protoespaçador de *hemN* no genoma bacteriano contribui para a premissa de que o sistema do tipo I-F nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* estudados atua apenas em sua função primária como um mecanismo de proteção contra elementos genéticos móveis antes da possível integração desses elementos no genoma.

11 CONCLUSÕES

- a) A transcrição dos genes anti-CRISPR em condições convencionais de crescimento sugerem uma expressão constitutiva desses genes, com consequente inativação constante do sistema CRISPR/Cas;
- b) As condições nutricionais possuem um impacto no perfil de expressão de genes anti-CRISPR. No entanto, as alterações provocadas nos níveis de expressão gênica não são uniformes entre os diferentes genes;
- c) Podemos sugerir que a regulação da expressão de genes do profago phiCTX ocorre por outro mecanismo alheio ao sistema CRISPR/Cas, devido à ausência de espaçador contra este profago no *locus* CRISPR de isolados sem transcrição detectável de genes de phiCTX.
- d) Alternativamente, o sistema CRISPR/Cas pode estar envolvido na indução da expressão de genes do profago phiCTX, através de danos ao DNA que ativam a resposta SOS, responsável pela indução de profagos;
- e) O gene bacteriano *hemN* é menos expresso em isolados que possuem o sistema CRISPR/Cas, porém estudos adicionais são necessários para identificar se o sistema CRISPR/Cas é o responsável por esta repressão na transcrição gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMAN/N, H. W. **5500 Phages examined in the electron microscope. Archives of Virology.** 2007
- ACKERMANN, H. W. 5500 Phages examined in the electron microscope. **Archives of Virology**, v. 152, n. 2, p. 227–243, 6 fev. 2007.
- AKLUJKAR, M.; LOVLEY, D. R. Interference with histidyl-tRNA synthetase by a CRISPR spacer sequence as a factor in the evolution of *Pelobacter carbinolicus*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 230, 2010.
- AKSYUK, A. A.; ROSSMANN, M. G. Bacteriophage assembly. **Viruses**, 2011.
- AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, 2016.
- AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 350–359, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>>.
- BALASUBRAMANIAN, D. et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research.**2013
- BARRANGOU, R. al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, 2007.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell.**2014
- BENLER, S.; KOONIN, E. V. Phage lysis-lysogeny switches and programmed cell death: Danse macabre. **BioEssays**, 2020.
- BIRKHOLZ, N. et al. The autoregulator Aca2 mediates anti-CRISPR repression. **Nucleic acids research**, 2019.
- BOLOTIN, A. et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, 2005.
- BONDY-DENOMY, J. et al. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 429–432, 17 jan. 2013.
- BONDY-DENOMY, J. et al. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. **ISME Journal**, 2016.
- BREZGIN, S. et al. Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 6041, 30 nov. 2019.
- BRINKAC, L. et al. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome.

Microbial Ecology.2017

BROUNS, S. J.J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**, 2008.

BURMISTRZ, M.; PYRĆ, K. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. **Polish Journal of Microbiology**, 2015.

BUTIUC-KEUL, A. et al. CRISPR-Cas System: The Powerful Modulator of Accessory Genomes in Prokaryotes. **Microbial Physiology**, p. 1–16, 2021.

CENENS, W. et al. Expression of a Novel P22 ORFan Gene Reveals the Phage Carrier State in Salmonella Typhimurium. **PLoS Genetics**, 2013.

CHARPENTIER, E. al. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 3, p. 428–441, 2015.

CHULI, K. **Examining the Distribution of the Extracellular Polymeric Substances in the Biofilms of the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa***. 2018. Thesis (Master of Science) – Molecular and Cellular Biology. University of Guelph, 2018.

COSTA, A. R.; MONTEIRO, R.; AZEREDO, J. Genomic analysis of Acinetobacter baumannii prophages reveals remarkable diversity and suggests profound impact on bacterial virulence and fitness. **Scientific Reports**, 2018.

DAVIDSON, A. R. et al. Anti-CRISPRs: Protein Inhibitors of CRISPR-Cas Systems. **Annual Review of Biochemistry**, v. 89, n. 1, p. 309–332, 20 jun. 2020.

DAVIS, B. M. et al. Convergence of the secretory pathways for cholera toxin and the filamentous phage, CTX ϕ . **Science**, v. 288, n. 5464, p. 333-335, 2000.

DE SMET, J. et al. *Pseudomonas* predators: Understanding and exploiting phage-host interactions. **Nature Reviews Microbiology**.2017

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. al. The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: Role of the microcin Val11-Pro16 β -hairpin region in the recognition mechanism. **Biochemical Journal**, 2005.

DÍAZ-MUÑOZ, S. L.; KOSKELLA, Britt. Bacteria-Phage interactions in natural environments. **Adv. Appl. Microbiol.** 2014.

DUMAS, J.-L. et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 2, p. 217–225, jan. 2006.

DUPUIS, M. È. al. CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. **Nature Communications**, 2013.

DY, R. L. et al. Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. **Annual Review of Virology**, v. 1, n. 1, p. 307–331, 3 nov. 2014.

FAURE, G.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. CRISPR–Cas: Complex Functional Networks and Multiple Roles beyond Adaptive Immunity. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 1, p. 3–20, jan. 2019.

FEINER, R. et al. A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**.2015

GABEL, C. et al. Structural basis for inhibition of the type I-F CRISPR-Cas surveillance complex by AcrIF4, AcrIF7 and AcrIF14. **Nucleic Acids Research**, 2021.

GOMAA, A. A. et al. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-cas systems. **mBio**, 2014.

HAFT, D. H. et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/cas subtypes exist in prokaryotic genomes. **PLoS Computational Biology**, 2005.

HARDOUIN, P.; GOULET, Adeline. Diversity of molecular mechanisms used by anti-CRISPR proteins: The tip of an iceberg? **Biochemical Society Transactions**. 2020.

HILLE, F. et al. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239–1259, 2018.

HØYLAND-KROGHSBO, N. M. et al. Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2017.

HØYLAND-KROGHSBO, N. M.; MUÑOZ, K. A.; BASSLER, B. L. Temperature, by controlling growth rate, regulates CRISPR-cas activity in *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2018.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, 1987.

JACKSON, S. A. et al. CRISPR-Cas: Adapting to change. **Science**, 2017.

JANSEN, R. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, 2002.

JUN, S. R. et al. Diversity of *Pseudomonas* genomes, including populus-associated isolates, as revealed by comparative genome analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 375–383, 2016.

KARGINOV, F. V.; HANNON, G. J. The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea. **Molecular Cell**.2010

- KHAN, F. et al. Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**.2020
- KIM, H. J. et al. Bacteriophage cocktail for the prevention of multiple-antibiotic-resistant and mono-phage-resistant *Vibrio coralliilyticus* infection in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. **Pathogens**, 2020.
- KLOCKGETHER, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. **Frontiers in Microbiology**, 2011.
- KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**.2019
- KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ZHANG, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**.2017
- KORF, I. H. E. et al. In Vitro Evaluation of a Phage Cocktail Controlling Infections with *Escherichia coli*. **Viruses**, 2020.
- LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**.2010
- LEE, K.; YOON, S. S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **Journal of Microbiology and Biotechnology**.2017
- LEENAY, R. T.; BEISEL, C. L. Deciphering, Communicating, and Engineering the CRISPR PAM. **Journal of Molecular Biology**.2017
- LEVY, A. et al. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 505–510, 23 abr. 2015.
- LI, Y.; BONDY-DENOMY, J. Anti-CRISPRs go viral: The infection biology of CRISPR-Cas inhibitors. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 5, p. 704–714, maio 2021.
- LIN, D. M; KOSKELLA, B.; LIN, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, 2017.
- LITTLE, J. W. Lysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion. In: WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA, S. L. (Eds.). **Phages**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 37–54.
- LIU, L.; FAN, X.-D. CRISPR–Cas system: a powerful tool for genome engineering. **Plant Molecular Biology**, v. 85, n. 3, p. 209–218, jun. 2014.
- LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, Stephen T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, 2011.
- LUO, M. L. et al. Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 674–681, 9

jan. 2015.

LUZ, A. C. O. et al. Analysis of direct repeats and spacers of CRISPR/Cas systems type I-F in Brazilian clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Genetics and Genomics**, Springer Verlag, 2019

LUZ, A. C. O. et al. Genetic characteristics and phylogenetic analysis of Brazilian clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* harboring CRISPR/Cas systems. **Current Genetics**, v. 67, n. 4, p. 663–672, 1 ago. 2021.

MAKAROVA, K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, 2015.

MAKAROVA, K. S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**.2011

MARINO, N. D. et al, Discovery of widespread type I and type V CRISPR-Cas inhibitors, **Science**, v. 362, n. 6411, p. 240–242, 2018.

MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**.2015

MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. **Nature Reviews Genetics**.2010

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**. 2018.

MCLEOD, S. M. et al. CTX ϕ and *Vibrio cholerae*: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship: The CTX ϕ life cycle. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 347–356, jul. 2005.

MIYOSHI-AKIYAMA, T. et al. Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Genome Biology and Evolution**, 2017.

MOJICA, F. J.M. et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Microbiology**, 2009.

MOORE, E. R B et al. Nonmedical: *Pseudomonas*. **The Prokaryotes**. p. 646–703, 2006.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. Fev, 2017.

NAKAYAMA, K. et al. The complete nucleotide sequence of phiCTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 399–419, jan. 1999.

NEWSOM, S. et al. The CRISPR-Cas Mechanism for Adaptive Immunity and Alternate

Bacterial Functions Fuels Diverse Biotechnologies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 619763, 28 jan. 2021.

NIDHI, S. et al. Novel crispr–cas systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**.2021

NUÑEZ, J. K. et al. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. **Nature**, 2015.

OLSZAK, T. et al. Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. **Current Medicinal Chemistry**, 2017.

ORLOVA, E.V. Bacteriophages and Their Structural Organisation. **Bacteriophages**. 2012.

OWEN, S. V. et al. A window into lysogeny: revealing temperate phage biology with transcriptomics. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 2, 1 fev. 2020.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**. 2019

PARKINS, M. D.; SOMAYAJI, Ranjani; WATERS, Valerie J. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–38, 2018.

PATIL, A. et al. Bacteriophages for ESKAPE: Role in pathogenicity and measures of control. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 2020.

PAWLUK, A. et al. Disabling a type I-E CRISPR-Cas nuclease with a bacteriophage-encoded anti-CRISPR protein. **mBio**, 2017.

PAWLUK, A.; DAVIDSON, A. R.; MAXWELL, K. L. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 12–17, jan. 2018.

PINGOUD, A. et al. Type II restriction endonucleases: Structure and mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**.2005

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–445, 1 maio 2001.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, 2005.

RATH, D. et al. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, v. 117, p. 119–128, out. 2015.

RATNER, H. K. et al. Catalytically Active Cas9 Mediates Transcriptional Interference

to Facilitate Bacterial Virulence. **Molecular Cell**, v. 75, n. 3, p. 498- 510.e5, ago. 2019.

RAUCH, B. J. et al, Inhibition of CRISPR-Cas9 with Bacteriophage Proteins, **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 150-158.e10, 2017.

RIEDE, I.; ESCHBACH, Marie Luise. Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, 1986.

ROMPF, A. et al. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* hemF and hemN by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 985–997, ago. 1998.

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, Karin. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, 2020

SALMOND, G. P.C.; FINERAN, Peter C. A century of the phage: Past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**.2015

SAMPSON, T. R. et al. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 254–257, 9 maio 2013.

SAMPSON, T. R.; WEISS, D. S. CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 4 abr. 2014.

SAMPSON, T. R. et al. Author Correction: A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. **Nature**, v. 570, n. 7760, p. E30–E31, jun. 2019.

SEMENOVA, E. et al. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2011.

SERRA, C. et al, MexXY Multidrug Efflux System Is More Frequently Overexpressed in Ciprofloxacin Resistant French Clinical Isolates Compared to Hospital Environment Ones, **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 366, 2019.

SHARMA, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**.2014

SHMAKOV, S. et al. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. **Molecular Cell**, 2015.

SKARIYACHAN, S. et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia Microbiologica**.2018

SOREK, R.; KUNIN, V.; HUGENHOLTZ, P. CRISPR - A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology**, 2008.

STACHLER, A. et al, High tolerance to self-targeting of the genome by the endogenous CRISPR-Cas system in an archaeon, **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 9, p. 5208–5216, 2017.

STANLEY, S. Y. et al. Anti-CRISPR-Associated Proteins Are Crucial Repressors of Anti-CRISPR Transcription. **Cell**, v. 178, n. 6, p. 1452- 1464.e13, set. 2019.

STANLEY, S. Y. et al. Anti-CRISPR-Associated Proteins Are Crucial Repressors of Anti-CRISPR Transcription. **Cell**, 2019.

STERN, A. et al. Self-targeting by CRISPR: Gene regulation or autoimmunity? **Trends in Genetics**.2010

TERNS, M. P.; TERNS, R. M. CRISPR-based adaptive immune systems. **Current Opinion in Microbiology**.2011

THEURETZBACHER, U. et al. Analysis of the clinical antibacterial and antituberculosis pipeline. **The Lancet Infectious Diseases**.2019

THEURETZBACHER, U. et al. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**.2020

TOUCHON, M. et al. CRISPR Distribution within the *Escherichia coli* Species Is Not Suggestive of Immunity-Associated Diversifying Selection. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 10, p. 2460–2467, 15 maio 2011.

TOUCHON, M.; BERNHEIM, A.; ROCHA, E. P.C. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. **ISME Journal**, 2016.

TÜMMLER, B. Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. **F1000Research**, v. 8, p. 1371, 7 ago. 2019.

Food and Drug Administration (EUA). Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products. 1st ed. **FDA**, 2019.

VALENTINI, M. et al. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Opinion in Microbiology**.2018

VAN BELKUM, A. et al. Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, 2015.

VAN DER OOST, J. et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**.2014

VERCOE, R. B. et al. Cytotoxic Chromosomal Targeting by CRISPR/Cas Systems Can Reshape Bacterial Genomes and Expel or Remodel Pathogenicity Islands. **PLoS Genetics**, 2013.

VYAS, P.; HARISH. Anti-CRISPR proteins as a therapeutic agent against drug-

resistant bacteria. **Microbiological Research**, v. 257, p. 126963, abr. 2022.

WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, David I. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 4, p. 459-465, 2005.

WANG, X. et al. Structural basis of Cas3 inhibition by the bacteriophage protein AcrF3. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2016.

WATTERS, K. E. et al, Systematic discovery of natural CRISPR-Cas12a inhibitors, **Science**, v. 362, n. 6411, p. 236–239, 2018.

WESTRA, E. R.; BUCKLING, Angus; FINERAN, Peter C. CRISPR-Cas systems: Beyond adaptive immunity. **Nature Reviews Microbiology**, 2014.

WESTRA, E. R. et al. Parasite Exposure Drives Selective Evolution of Constitutive versus Inducible Defense. **Current Biology**, v. 25, n. 8, p. 1043–1049, abr. 2015.

WESTRA, E. R.; LEVIN, B. R. It is unclear how important CRISPR-Cas systems are for protecting natural populations of bacteria against infections by mobile genetic elements. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 45, p. 27777–27785, 10 nov. 2020.

WHEATLEY, R. M.; MACLEAN, R. C. CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. **ISME Journal**, 2021.

WIMMER, F.; BEISEL, C. L. CRISPR-Cas Systems and the Paradox of Self-Targeting Spacers. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3078, 22 jan. 2020.

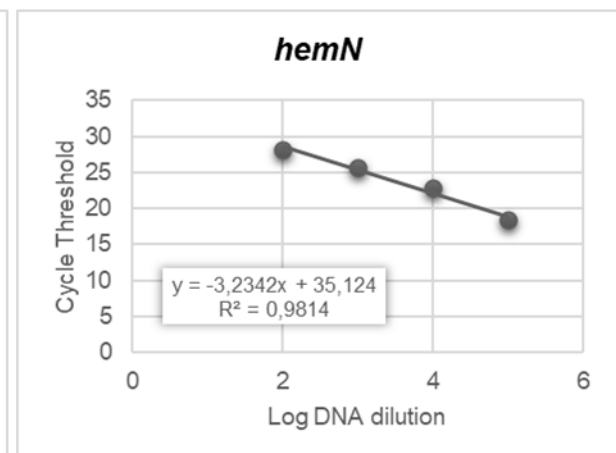
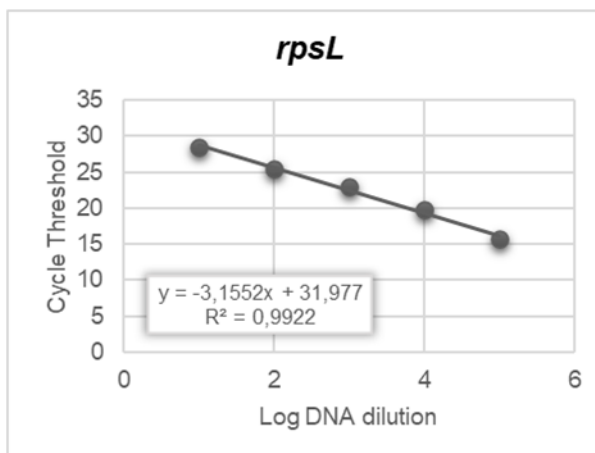
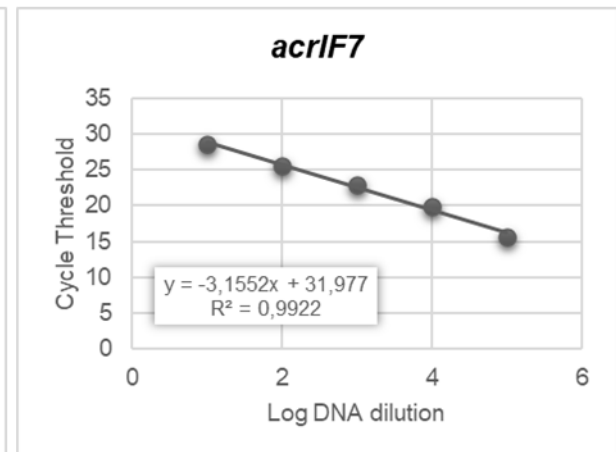
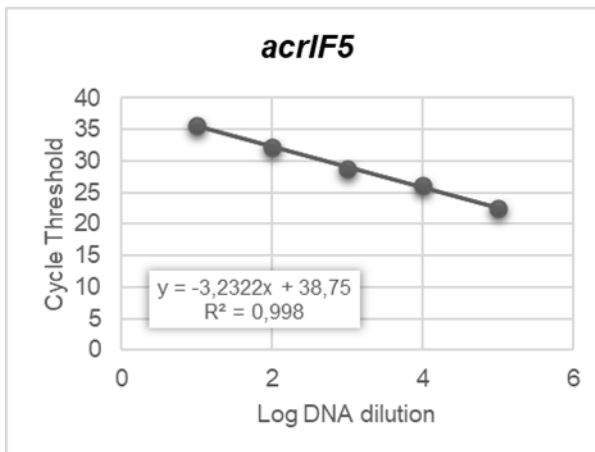
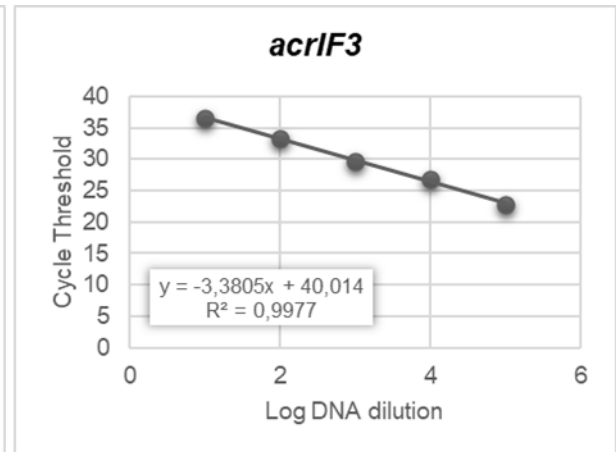
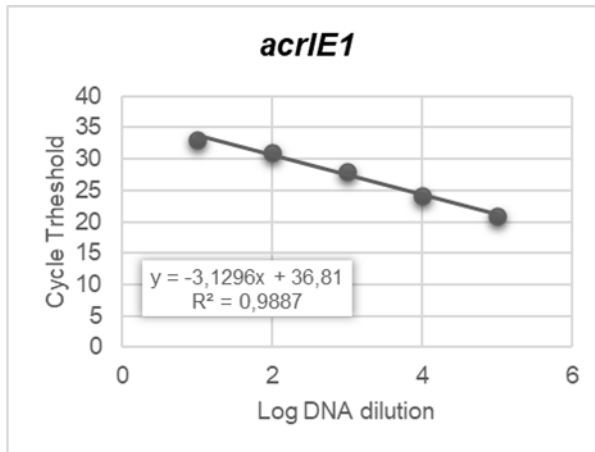
WU, W. et al. *Pseudomonas aeruginosa*. **Elsevier Ltd**, 2014. v. 2–3. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>>.

ZHANG, D. et al. **CRISPR/Cas**: A powerful tool for gene function study and crop improvement. **Journal of Advanced Research**.2021.

APÊNDICE 1 – GRÁFICOS DE EFICIÊNCIA

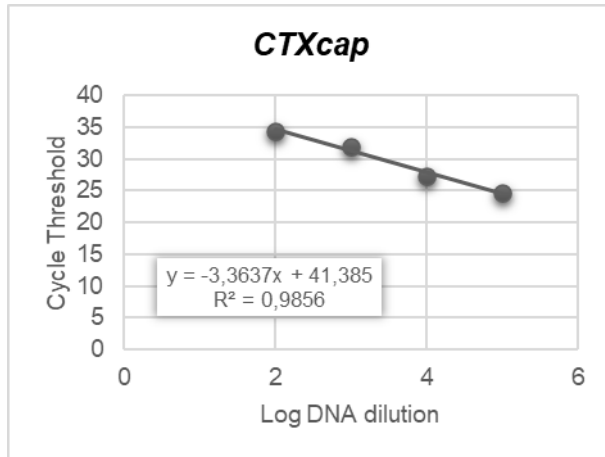
Relação gráfica entre os valores de CT obtidos e logaritmo da concentração de DNA complementar utilizada durante a qRT-PCR para cada gene utilizado nesse estudo.

(continua)



Relação gráfica entre os valores de CT obtidos e logaritmo da concentração de DNA complementar utilizada durante a qRT-PCR para cada gene utilizado nesse estudo.

(conclusão)



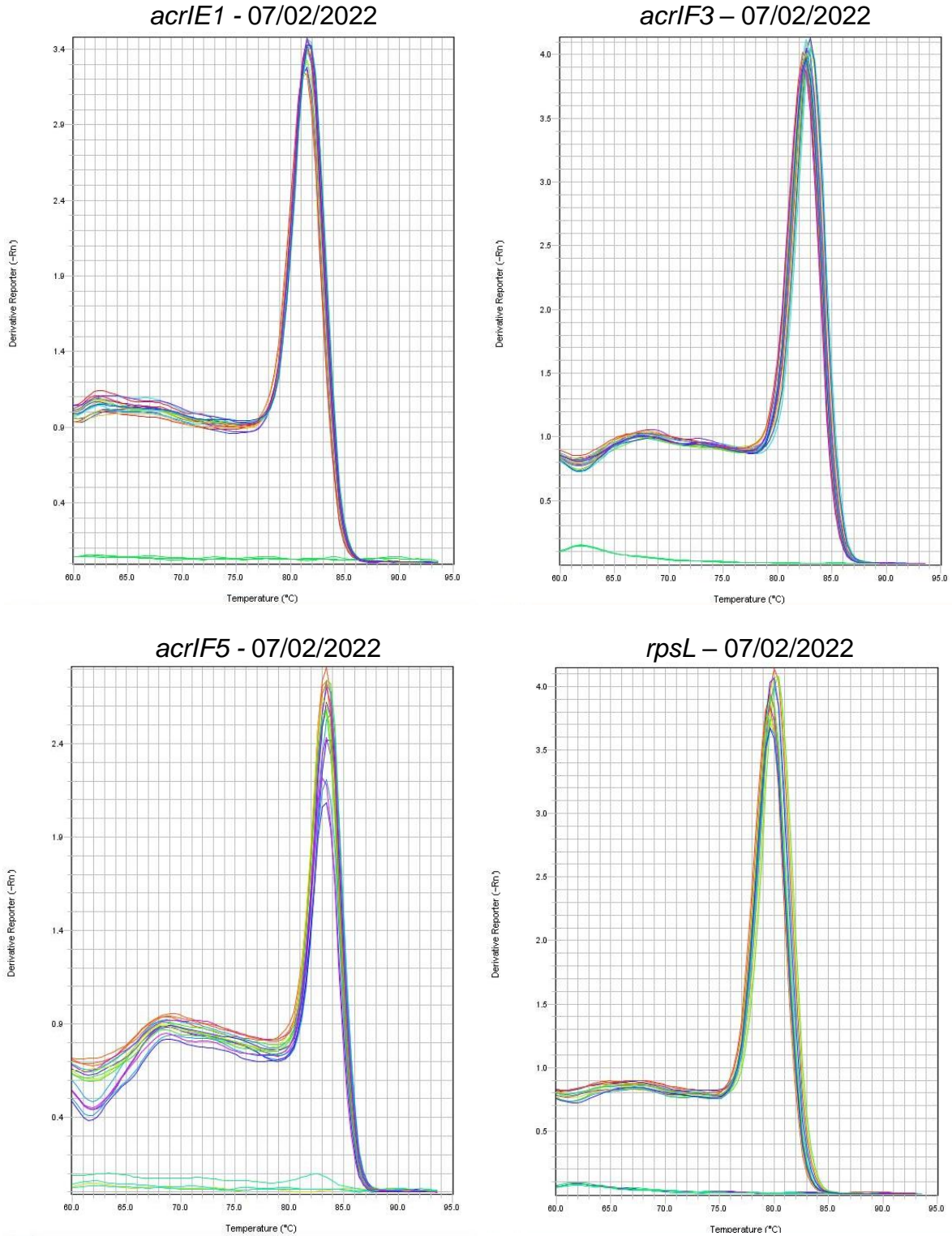
Fonte: A autora.

Legenda: Cada gráfico foi obtido a partir de ensaios de qRT-PCR utilizando cada amostra em quatro a cinco diluições seriadas, seguindo uma relação de 1:10. Os pontos marcados no plano cartesiano criam uma tendência de linha reta, conhecida como regressão linear, representada pela equação $y = ax + b$, onde a e y é a inclinação (*slope*) e b é a interceptação (onde a linha cruza o eixo y). O valor do *slope* foi utilizado para cálculo das eficiências de amplificação dos primers.

APÊNDICE 2 – CURVAS DE DISSOCIAÇÃO

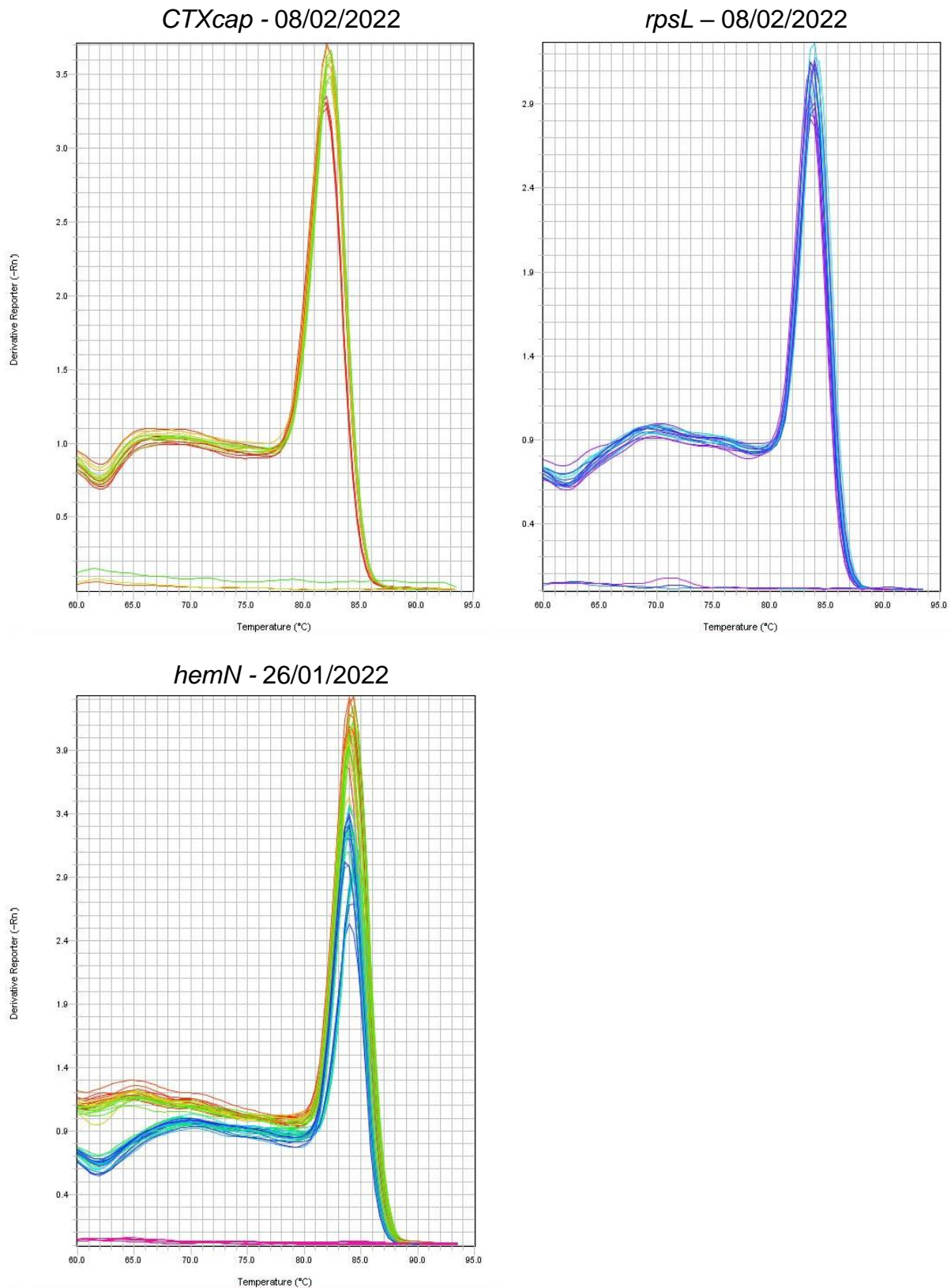
Gráficos de curvas de dissociação geradas em cada ensaio de qRT-PCR.

(continua)



Gráficos de curvas de dissociação geradas em cada ensaio de qRT-PCR.

(conclusão)



Fonte: A autora.

Legenda: O repórter derivado, exibido no eixo y, é calculado como a primeira derivada negativa da fluorescência normalizada (Rn) gerada pelo repórter durante a amplificação por PCR.