

TESIS DOCTORAL

**ANALISIS DEL ROL DE MUTS EN LA REGULACIÓN DEL
ACCESO A LA REPLICACIÓN DE LA ADN POLIMERASA DE
BAJA FIDELIDAD IV EN *Pseudomonas aeruginosa***

TESISTA: Biol. Lucia Malvina Margara

DIRECTORA: Dra. Mariela R. Monti

LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto-
Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, Facultad de Ciencias
Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

AÑO: 2019

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
MAQUINARIA ENCARGADA DE LA REPLICACIÓN DEL ADN	5
<i>Composición del replisoma</i>	5
<i>El funcionamiento del replisoma</i>	7
<i>El factor de procesividad β clamp</i>	8
REPLICACIÓN DEL ADN CON LESIONES	10
<i>ADN Polimerasas Alternativas</i>	11
<i>Pol IV</i>	14
<i>β clamp en la regulación de Pol IV</i>	15
MECANISMO DE REPARACIÓN DE BASES APAREADAS INCORRECTAMENTE	18
<i>Mecanismo molecular del MMR</i>	19
<i>MutS</i>	20
<i>β clamp en el MMR</i>	22
<i>Consecuencias de la deficiencia del MMR</i>	23
MODELO DE ESTUDIO: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
<i>El replisoma en <i>P. aeruginosa</i></i>	24
<i>ADN polimerasas alternativas</i>	24
<i>Pol IV</i>	24
<i>MMR</i>	25
ANTECEDENTES DEL LABORATORIO	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
MODELO PROPUESTO	31
RESULTADOS- CAPITULO I - Estudio de la asociación entre MutS, β clamp, Pol IV mediante ensayos <i>in vitro</i>	33
<i>Ia- Caracterización de las interacciones bimoleculares entre MutS, β clamp y Pol IV</i>	33
<i>Pol IV se une a β clamp, aunque con menor afinidad que MutS</i>	34
<i>El sitio conservado de unión a β clamp presente en Pol IV constituye el principal sitio de interacción con el factor de procesividad</i>	38
<i>MutS no interacciona directamente con Pol IV</i>	39
<i>Ib- Análisis de la unión de Pol IV a β clamp en presencia de MutS</i>	40
<i>MutS inhibe la interacción entre Pol IV y β clamp compitiendo por bolsillo hidrofóbico presente en β clamp</i>	40
<i>Ic- Efecto de diferentes sustratos de ADN sobre las interacciones entre MutS, β clamp y Pol IV</i>	45
<i>Efecto de las estructuras de ADN sobre las asociaciones Pol IV-β clamp y MutS-βclamp</i>	45
<i>Diferentes estructuras del ADN pueden modular la habilidad de MutS para inhibir la interacción Pol IV-β clamp</i>	46
<i>Efecto de los sustratos de ADN en la migración de MutS en geles nativos</i>	49

RESULTADOS - CAPÍTULO II Análisis del rol la interacción MutS-β clamp en la replicación dependiente de Pol IV en células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	55
<i>II a – Mutagénesis espontánea dependiente de Pol IV en células bajo condiciones de crecimiento normales.....</i>	<i>55</i>
La expresión ectópica de Pol IV induce un aumento significativo de los niveles de mutagénesis cuando MutS no interacciona con β clamp.....	55
Pol IV constituye un factor clave para la mutagénesis espontánea en la cepa <i>mutSβ</i>	59
La mutagénesis producida por la incorporación de 8-oxo-GTP se encuentra incrementada en la cepa <i>mutSβ</i>	64
Consecuencias a nivel fenotípico de la acción de Pol IV en el contexto genético <i>mutSβ</i>	66
MutS no controla a Pol IV cuando realiza síntesis de translesión libre de error.....	70
<i>II b- Estudio de la mutagénesis inducida por Pol IV en condiciones de estrés.....</i>	<i>71</i>
Exposición a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina.....	72
Mutagénesis en cepas que expresan constitutivamente la Respuesta SOS.....	75
Niveles de expresión de MutS y Pol IV.....	76
DISCUSIÓN.....	81
<i>Pol IV de P. aeruginosa interacciona con β clamp, aunque con menor afinidad que MutS.....</i>	<i>81</i>
<i>La asociación entre el motivo conservado QLxLF presente en Pol IV y el bolsillo hidrofóbico de β clamp corresponde al principal contacto entre ambas proteínas.....</i>	<i>82</i>
<i>MutS inhibe la interacción Pol IV-β clamp.....</i>	<i>84</i>
<i>Diferentes estructuras de ADN modulan esta función de MutS.....</i>	<i>85</i>
<i>MutS limita a Pol IV cuando realiza replicación mutagénica, mientras que no la controla cuando lleva a cabo replicación libre de errores en condiciones normales de crecimiento.....</i>	<i>88</i>
<i>MutS no controlaría la acción de Pol IV en condiciones de estrés.....</i>	<i>90</i>
<i>Sitios de control de MutS sobre la actividad de Pol IV.....</i>	<i>92</i>
<i>La nueva función de MutS podría estar presente en otras especies bacterianas y eucariotas....</i>	<i>94</i>
<i>El rol de Pol IV y MutS en la adaptación de bacterias patógenas como P. aeruginosa.....</i>	<i>96</i>
<i>¿Cómo separa MutS sus funciones en la regulación del acceso de Pol IV a la replicación de su función más conservada en la vía del MMR?</i>	<i>97</i>
<i>Conclusión final.....</i>	<i>98</i>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
<i>Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....</i>	<i>101</i>
<i>Medios de cultivos y condiciones de crecimiento</i>	<i>104</i>
<i>Enzimas y reactivos químicos.....</i>	<i>105</i>
<i>Técnicas utilizadas en el clonado molecular.....</i>	<i>105</i>
<i>Clonados de plásmidos.....</i>	<i>107</i>
<i>Construcción cepas mutantes de P. aeruginosa.....</i>	<i>110</i>
<i>Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....</i>	<i>112</i>
<i>Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)</i>	<i>114</i>
<i>Ensayos bioquímicos.....</i>	<i>115</i>
<i>Medición de mutagénesis.....</i>	<i>119</i>
<i>Aislamiento de clones con diferente grado de inactivación de <i>nfxB</i>.....</i>	<i>121</i>
<i>Medición de luminiscencia.....</i>	<i>122</i>
<i>Ensayo de correlación entre niveles de luminiscencia y resistencia a Cip.....</i>	<i>122</i>

<i>Medición de sensibilidad de P. aeruginosa a diferentes agentes</i>	123
<i>Ensayos de Western blot.....</i>	124
<i>Tratamiento de los residuos patológicos</i>	125
ANEXO.....	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

ABREVIATURAS

aa: aminoácido

2-AP: 2-Aminopurina

ADNsc: ADN simple cadena

ADNdc: ADN doble cadena

ADNp: ADN "primeado"

GT-ADNdc: ADN doble cadena con un mal apareamiento GT

GT-ADNp: ADN "primeado" con un mal apareamiento GT

Ak: Amikacina

BET: Bromuro de Etidio

Cip: Ciprofloxacina

Cip_{SI}: Concentración subinhibitoria de ciprofloxacina (0.02 µg/ml)

CBM: Clamp Binding Motif o Motivo conservado de unión a β clamp

DA: Damage Avoidance o Mecanismos de prevención al daño

DDT: DNA Damage Tolerance pathways o vías de Tolerancia al Daño en el ADN

DSB: Double Strand Break o Doble corte en el ADN

ENU: N-etil-N-nitrosourea

FW: far Western

InDels: Mutaciones de tipo Inserciones o Deleciones de nucleótidos

kb: kilo base

MBP: Maltose Binding Protein o Proteína de Unión a la Maltosa

MMR: Mismatch Repair System o Mecanismo de Reparación de Bases Apareadas
Incorrectamente

MM: Mismatch o mal apareamiento

MNNG: N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina

MMS: metil-metasulfonato

NFZ: nitrofurazona

4-NQO: 4-nitroquinolona

PAGE: electroforesis de geles nativos de poliacrilamida

Pol: ADN Polimerasa

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PQ: Paraquat

Rif: Rifampicina

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

RU: Unidades de Respuesta

SPR: Surface Plasmon Resonance o Resonancia de Superficie de Plasmón

TLS: Translesion Synthesis o Síntesis de Translesión

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se caracterizó a nivel molecular y funcional un nuevo mecanismo presente en la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*, el cual interrelaciona dos de los principales procesos metabólicos del ADN: la replicación y la reparación. Particularmente, se estudiaron tres proteínas: MutS del “Sistema de reparación de bases apareadas en forma incorrecta” (Mismatch Repair ó MMR) y dos proteínas replicativas, el factor de procesividad β clamp y la ADN Polimerasa (Pol) IV. Por un lado, MutS inicia el proceso de reparación ya que reconoce y se une a la base mal apareada (MM) reclutando los factores involucrados en las etapas subsiguientes. Por otro lado, β clamp es un anillo que envuelve al ADN y mantiene unidas a las Pols aumentando su procesividad. Mientras que Pol IV es una Pol alternativa de baja fidelidad capaz de aliviar bloqueos en la replicación debido a la presencia de lesiones en el sustrato de ADN (Síntesis de Translesión, TLS), MMs o ciertos contextos de secuencia. Previamente, en el laboratorio se observó una clara asociación entre la proteína MutS y β clamp de *P. aeruginosa*, la cual no posee un rol importante en las funciones que al momento han sido asignadas a MutS en bacterias. Las evidencias al inicio de esta Tesis indicaban que la función de la interacción MutS- β clamp podría ser regular el acceso de Pol IV a los sitios de replicación, lo cual corresponde a un nuevo mecanismo para mantener la fidelidad de la replicación. Sin embargo, no había evidencias de cuáles podrían ser las bases moleculares del mismo, por lo cual el objetivo general fue describir el mecanismo molecular que utiliza MutS para regular el acceso de Pol IV a la replicación. El trabajo se dividió en dos secciones, la primera consistió en ensayos bioquímicos utilizando proteínas recombinantes y en la segunda se estudió este nuevo rol en la mutagénesis de células de *P. aeruginosa*.

En conjunto, los resultados nos llevaron a plantear un modelo molecular mediante el cual MutS regularía el acceso de Pol IV a la replicación. En condiciones normales de crecimiento, Pol IV accede a la replicación mediante su interacción con β clamp cuando Pol III se detiene, aliviando la parada de replicación. Sin embargo, si introduce una base incorrectamente, la interacción MutS - β clamp está favorecida, desplazando a Pol IV de la replicación. Por el contrario, en condiciones estresantes, donde se acumula ADN simple cadena (ADNsc), MutS no controlaría el acceso de Pol IV, promoviendo la posible aparición de mutaciones beneficiosas. Brevemente, las principales evidencias de esta Tesis que

apoyan dicho modelo son: (i) Pol IV interacciona mediante el motivo conservado QLxLF con β clamp con menor afinidad que MutS; (ii) MutS no interacciona directamente con Pol IV; (iii) MutS es capaz de desplazar a Pol IV del anillo de β clamp compitiendo por la unión al bolsillo hidrofóbico de β clamp; (iv) Diferentes estructuras de ADN modulan esta función de MutS: MutS mostró un control más estricto sobre la unión de Pol IV a β clamp en presencia de ADN “primeados” (ADNp), mientras que la afinidad de la interacción MutS- β clamp aumenta en presencia de ADNp conteniendo un MM de tipo GT; (v) En condiciones normales de crecimiento, MutS limita a Pol IV cuando realiza replicación mutagénica (ADN no dañado), mientras que no la controla cuando lleva a cabo replicación libre de errores (TLS); (vi) En condiciones de inducción de estrés, MutS no controlaría la acción de Pol IV.

Los resultados de este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas:

Margara Lucía M., Fernandez, M., Malchiodi, E. Argaraña Carlos E. and Monti Mariela R. “MutS regulates access of error-prone DNA polymerase Pol IV to replication sites: a novel mechanism for maintaining replication fidelity”. June 1, 2016. Nucleic Acids Research.

Ibáñez Milagros, Margara Lucía M., Miguel Virginia Oliveira Rafael, Fernández Marisa M., Argaraña Carlos E. and Monti. Mariela R. “Structures of MutS complexed with replication DNA substrates”. Manuscrito en preparación.

INTRODUCCIÓN

El material genético de la célula, conformado por las moléculas de ADN, contiene toda la información necesaria para que los procesos celulares funcionen adecuadamente. Por lo cual, aquellas reacciones que afecten a esta molécula, en su conjunto referidos como “metabolismo del ADN”, inciden directamente en las diferentes funciones celulares. Así, el ADN se duplica en la división celular, proceso denominado replicación, o actúa como molde para la síntesis de ARN durante la transcripción. Asimismo, esta molécula es sustrato de otros procesos como la recombinación y la reparación del ADN. Como resultado de estas reacciones de procesamiento pueden producirse cambios en el ADN y, en consecuencia, en la información contenida. En esta Tesis Doctoral se analizó la interacción entre dos mecanismos relacionados con el metabolismo del ADN: la replicación y la reparación. Específicamente, se estudió un nuevo rol de la proteína MutS, perteneciente al mecanismo de reparación de bases apareadas incorrectamente (Mismatch Repair System ó MMR), en la regulación del acceso a la replicación de la ADN polimerasa (Pol) de baja fidelidad IV.

A continuación, en la sección introducción se realizará una descripción de los conocimientos actuales del proceso de replicación y del MMR en bacterias, con especial énfasis en los factores motivo del presente estudio. Luego se presentará el modelo de estudio, la bacteria patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, y los estudios referidos a la replicación y reparación en este organismo. Finalmente, se nombrarán los resultados previos del laboratorio donde se realizó este trabajo de Tesis Doctoral.

MAQUINARIA ENCARGADA DE LA REPLICACIÓN DEL ADN

Composición del replisoma. En la mayoría de las bacterias, el genoma está constituido por un cromosoma de ADN doble cadena circular cerrado (Figura I1A). La replicación del cromosoma bacteriano comienza en un único origen de replicación (*oriC*) donde se produce la apertura de la doble cadena para permitir la formación de dos horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas [1-3] (Figura I1 A Y B). En ambas horquillas se ensambla un complejo proteico denominado replisoma, el cual está conformado por numerosos factores que actúan coordinadamente para duplicar la molécula de ADN con gran eficiencia. En la cadena denominada adelantada, la síntesis de

ADN se realiza de manera continua en la misma dirección que avanza la horquilla. Por el contrario, la cadena retardada se sintetiza como una serie de fragmentos cortos denominados de Okazaki en dirección contraria al avance de la horquilla. Esto debe a que la síntesis de la nueva hebra de ADN ocurre en dirección 5' a 3' y a que el replisoma se mueve en una sola dirección (Figura I1C) [2, 4].

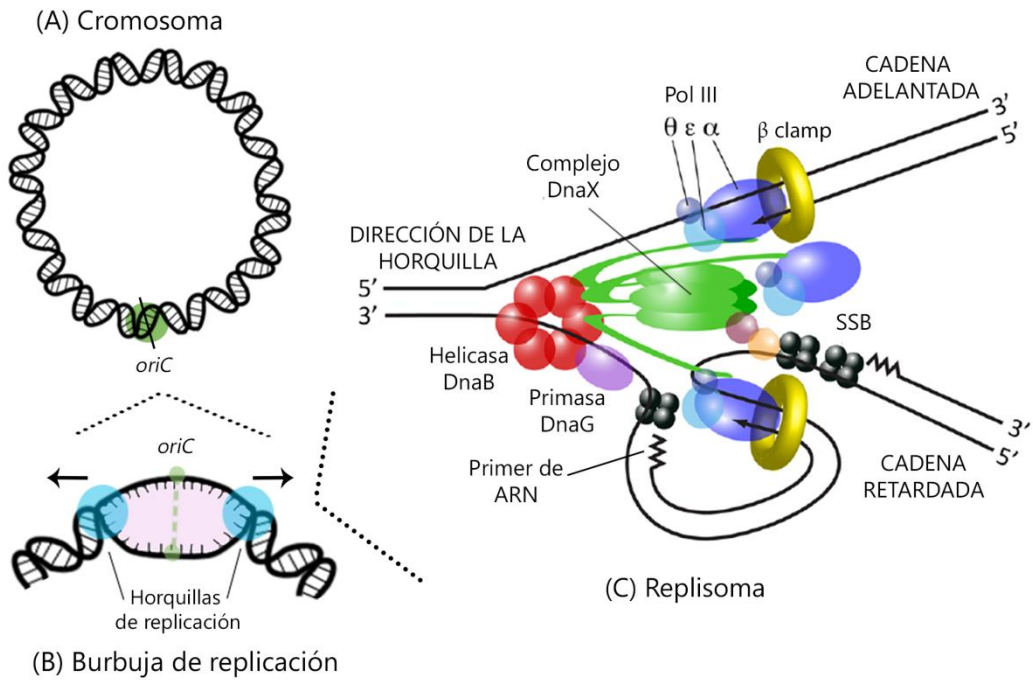


Figura I1. Arquitectura del replisoma en *E. coli*. La figura representa el cromosoma (A), la burbuja de replicación que se forma por la apertura del *oriC* (B) y el replisoma ensamblado en una horquilla de replicación presente en el ADN (C). Esquema adaptado de [2].

La estructura y composición del replisoma ha sido estudiada extensamente en la bacteria modelo *Escherichia coli*, donde cada uno de los componentes y las interacciones entre los mismos han sido caracterizados tanto *in vitro* e *in vivo* [2, 4] (Figura I1C). Dentro de los factores que componen este complejo se encuentra la helicasa DnaB, la primasa DnaG y la holoenzima (HE) Pol III, complejo formado por Pol III core ($\alpha\epsilon\theta$), β clamp y DnaX ($\tau_3\delta\delta'\psi\chi$). Pol III core consiste en tres subunidades: α , que posee actividad ADN polimerasa; ϵ , que tiene actividad correctora exonucleasa 3' a 5'; y θ , cuya función exacta no se conoce, aunque las evidencias sugieren que favorece la actividad de ϵ y que tendría un rol estructural [5]. Por otro lado, β clamp, conocido como el factor de procesividad, es el encargado de mantener a las Pols unidas a su sustrato aumentando su procesividad [6]. Este factor es posicionado en los extremos 3' del primer de ARN gracias al complejo

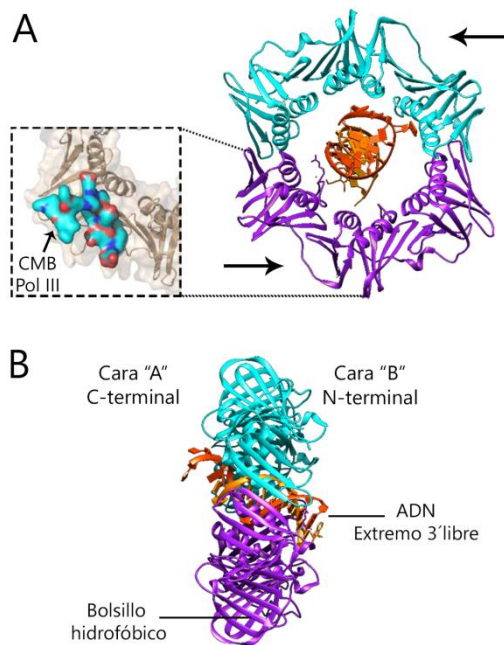
proteico DnaX o “clamp loader”, el cual cumple una función adicional manteniendo la arquitectura del replisoma [2, 7]. La subunidad τ de DnaX interacciona con α y la Helicasa DnaB de tal manera que mantiene unidos los Pol III core que operan simultáneamente y acopla la apertura de la doble cadena con la síntesis de ADN [2].

La composición del replisoma en otras bacterias Gram-negativas tal como *P. aeruginosa* es similar al complejo caracterizado para *E. coli* [8, 9], sin embargo dicho complejo exhibe diferencias importantes con respecto a la maquinaria de replicación presente en *Bacillus subtilis*, el segundo replisoma más estudiado en bacterias [2]. Este organismo, así como otras bacterias Gram positivas, posee dos Pols replicativas esenciales, DnaE y Pol C. DnaE, homóloga a Pol III α , es la encargada de extender el primer de ARN en la cadena retardada, para que luego PolC tome el primer y prosiga la síntesis [10, 11]. PolC replica ADN con alta fidelidad ya que posee una actividad exonucleasa intrínseca. Por el contrario, DnaE carece de actividad correctora por lo cual no puede corregir los nucleótidos que incorpora [11, 12]. Estudios recientes demostraron que la asociación de DnaE con la helicasa DnaC, la primasa DnaG o β clamp aumenta su fidelidad de síntesis, a la vez que los nucleótidos erróneos introducidos por DnaE serían removidos por la actividad correctora de PolC [13, 14].

El funcionamiento del replisoma. Durante el inicio de la replicación, la helicasa es cargada en el origen de replicación para comenzar a desenrollar la doble cadena de ADN parental mientras la enzima primasa sintetiza un cebador o “primer” de ARN. En la cadena adelantada, la primasa sintetiza un primer mientras que esta enzima actúa constantemente en la cadena retardada sintetizando un primer cada 1-2 kb. A medida que actúan la helicasa y la primasa, la cadena retardada es cubierta por la proteína de unión a ADN simple cadena (Single Strand Binding Protein ó SSB) a fin de prevenir su degradación. El complejo DnaX desplaza a la primasa del primer y localiza una molécula de β clamp en el extremo 3' de la unión primer de ARN-ADN templado donde posteriormente se asocia la Pol replicativa para iniciar la incorporación de nucleótidos en dirección 5'a 3'. En la cadena adelantada, la síntesis de ADN llevada a cabo por esta enzima procede sin interrupciones y en la misma dirección que avanza la horquilla. Por el contrario, la cadena retardada se sintetiza como una serie de fragmentos cortos denominados de Okazaki en dirección contraria al avance de la horquilla. En esta cadena, la Pol replicativa se asocia a β clamp iniciando la síntesis de un fragmento de Okazaki mientras desplaza a SSB para luego

disociarse cuando termina la síntesis del fragmento y unirse a otra molécula de β clamp posicionada sobre el siguiente primer [15]. Finalmente, se produce la maduración de los fragmentos de Okazaki mediante la escisión del primer de ARN y síntesis de ADN simultáneamente para que luego la ADN ligasa catalice la formación del enlace fosfodiéster entre los fragmentos de Okazaki. Recientemente, se demostró que el replisoma puede contener tres Pol III core donde uno funciona en la síntesis de la cadena adelantada y otro en la síntesis de la cadena retardada, mientras que la tercera Pol core sería una reserva para sintetizar eficientemente la cadena retardada [2]. La disposición simétrica de las Pols a través de su interacción con el clamp loader asegura el desenrollamiento y la síntesis de manera ininterrumpida. Esto se debe a que el replisoma permite la acumulación transitoria de bucles (loops) de ADN simple cadena (ADNsc) entre la Pol y la helicasa en la cadena retardada. Los sucesivos ciclos de acoplamiento, crecimiento y desacoplamiento de estos bucles, junto a la síntesis de cada fragmento de Okazaki, ha sido comparado con el deslizamiento de un trombón, por lo cual este modelo es conocido como “modelo del trombón” [2, 3] (Figura I1C).

El factor de procesividad β clamp. β clamp es una proteína que pertenece a una familia de proteínas denominadas “Sliding clamps” ya que envuelve al ADN, independientemente de la secuencia, y deslizan libremente a lo largo de dicha molécula. La primera estructura cristalina de un sliding clamp se obtuvo a partir de β clamp de *E. coli* [16]. En dicha estructura, se observó que esta molécula está conformada por dos subunidades donde los monómeros se posicionan de manera alternada cabeza-cola formando un anillo con un diámetro interno suficiente para acomodar la doble cadena de ADN (Figura I2 A). Esta disposición genera dos caras de la proteína (A y B): la cara “A” es plana y está cargada más negativamente donde emergen los extremos C-terminal mientras que la cara “B” se caracteriza por presentar varios bucles pertenecientes al N-terminal (Figura I2B) [7, 16, 17]. La posterior dilucidación de la estructura de este factor unida a una molécula de ADN, demostró que β clamp se asocia en una orientación específica: la cara B se posiciona en el extremo 3' libre donde se incorporarían los nucleótidos durante la replicación [16, 17]. Al presente, se han determinado la estructura tridimensional de otros factores de procesividad en diferentes especies bacterianas, entre las que se incluyen a *P.aeruginosa* y *B. subtilis* así como en eucariotas. Si bien la identidad de secuencia de los aminoácidos entre los β clamp presentes en las distintas especies es de un 50% o menor, la estructura tridimensional se encuentra ampliamente conservada entre las especies estudiadas [18, 19].



La función principal asignada a β clamp es mantener a las Pols unidas al ADN molde, aumentando su procesividad. Las Pols tienen una baja afinidad por el ADN y se caracterizan por poseer actividad distributiva, es decir, se unen a su sustrato, sintetizan pocos nucleótidos y se disocian [20]. En cambio β clamp tiene una alta afinidad por ADN “primeado” (ADN_p), es decir, ADN que tiene un extremo 3' libre donde se pueden incorporar nucleótidos durante la síntesis de ADN, así como es capaz de unirse con baja afinidad a ADN doble cadena (ADN_{dc}) [17]. Es por ello, que las Pols necesitan asociarse a β clamp para ser capaces de replicar ADN con un alto grado de procesividad, lo cual es esencial para cumplir su función de una manera continua y en un período de tiempo corto [20]. Igualmente, β clamp interacciona y modula la actividad de numerosas proteínas involucradas en otros procesos metabólicos del ADN, tales como otros factores replicativos, de reparación y recombinación [2, 7, 21-23]. Por ejemplo, se ha reportado que β clamp se asocia con las proteínas MutS y MutL del MMR así como participa en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki interaccionando con la ADN ligasa y la ADN Pol I [21].

Un dato interesante es que las proteínas que interaccionan con el sliding clamp en bacterias contienen el motivo conservado QL[SD]LF (Clamp Binding Motif ó CBM) que se une a un bolsillo hidrofóbico presente en la región C-terminal del anillo (Figura 12A). Así, teniendo en cuenta su naturaleza dimérica, el anillo β clamp cuenta con dos sitios de unión disponibles por molécula. Diferentes estudios *in vitro* demostraron que el factor

replicativo puede asociarse simultáneamente con las proteínas que contienen el CBM o dichas proteínas compiten por la unión al anillo [6]. Sin embargo, y dado que el número de moléculas de β clamp es limitado en relación con la cantidad de los factores con que interacciona dentro de la célula, se postula que existiría una competencia entre estos factores por la unión al factor replicativo *in vivo* [21]. En este sentido, estudios microscópicos demostraron que se acumulan aproximadamente 200-300 anillos de β clamp detrás del replisoma en células de *E. coli* y *B. subtilis* [24, 25]. Así, los sliding clamps actuarían como una plataforma para el reclutamiento de numerosas proteínas del metabolismo del ADN, cuya asociación a este factor es un punto crítico para la regulación de su actividad.

REPLICACIÓN DEL ADN CON LESIONES

La replicación del genoma es un proceso rápido y preciso ya que las Pols replicativas son enzimas altamente eficientes para sintetizar ADN. Sin embargo, estas Pols generalmente fallan para insertar nucleótidos cuando el ADN templado posee ciertos tipos de daños tal como bases modificadas [26]. En este sentido, y dado que las células están expuestas frecuentemente a agentes físicos y químicos tanto endógenos como exógenos que dañan el ADN, existen mecanismos de reparación encargados de remover los nucleótidos dañados de la doble cadena [27]. No obstante, algunas lesiones escapan a la reparación y por lo tanto estos daños pueden ser encontrados por la maquinaria de replicación e interferir con el proceso de síntesis de ADN. Ante la presencia de lesiones en el ADN molde, se ha postulado que en bacterias, la síntesis por la ADN Pol replicativa se detiene en el sitio de la lesión mientras la helicasa prosigue separando la doble cadena o alternativamente, la ADN Pol se disocia de β clamp para asociarse a un nuevo β clamp posicionado en un primer sintetizado por la primasa [28-30]. En ambos casos, se generan regiones de ADN simple cadena (ADNsc), lo cual es potencialmente nocivo para la célula ya que pueden ser convertidas en dobles cortes de ADN (Double-Strand Breaks ó DSB) que inducen aberraciones cromosómicas o conducen a la muerte celular [27, 30, 31].

Existen mecanismos que permiten continuar con el proceso de replicación a pesar de la presencia de lesiones en el ADN molde, denominados en su conjunto vías de Tolerancia al Daño en el ADN (DNA Damage Tolerance ó DDT) [32-34]. Es importante aclarar que estas vías de DDT son frecuentemente considerados como mecanismos de reparación aunque estrictamente no lo son ya que no remueven las lesiones del ADN sino que permiten que la

lesión quede en el contexto del ADN doble cadena donde puede ser reparada. De esta manera, los DDT permiten que prosiga el avance de la replicación sin mayores consecuencias. Se conocen dos vías principales de DDT: (1) Prevención del daño (Damage Avoidance o DA), la cual utiliza la información de la cromátida hermana para sintetizar la nueva molécula de ADN mediante recombinación homóloga; y (2) la Síntesis de Translesión (Translesion Synthesis o TLS) donde llevan a cabo la replicación Pols especializadas en catalizar la incorporación de nucleótidos utilizando ADN con bases dañadas como templado. Al presente se asume que la vía de DA es no mutagénica mientras que la TLS puede generar mutaciones (Ver sección ADN Pols alternativas) [34].

En condiciones normales de crecimiento, la horquilla de replicación puede ocasionalmente encontrar lesiones en el ADN dando lugar a regiones simple cadena que no persisten mucho tiempo debido al funcionamiento de los mecanismos previamente expuestos [31]. Por el contrario, la presencia de una gran cantidad de lesiones en el cromosoma, tal como ocurre cuando se trata las células con un agente exógeno que daña el ADN o en condiciones de estrés que provocan disturbios en la replicación, se produce una acumulación de ADNsc que excede la capacidad de la célula para revertirlo. El ADNsc es recubierto en principio por la proteína SSB para evitar su degradación, pero si la acumulación de esta estructura persiste en el cromosoma, SSB es desplazada por la recombinasa RecA. El nucleofilamento RecA-ADN facilita el auto clivaje del represor transcripcional LexA, provocando la desrepresión de genes involucrados en la reparación, recombinación y TLS [31]. Dicha respuesta al daño en el ADN se conoce como Respuesta SOS y corresponde a un mecanismo ampliamente distribuido en bacterias [35, 36].

ADN Polimerasas Alternativas. Las Pols replicativas, como Pol III HE de *E. coli* y PolC de *B. subtilis*, se encargan de sintetizar la mayoría del ADN cromosomal con una alta fidelidad. Esta propiedad se debe a que poseen una tasa de incorporación de nucleótidos incorrectos baja, un sitio activo pequeño, y una actividad correctora intrínseca [37]. Asimismo, la mayoría de los organismos poseen Pols alternativas que pueden utilizar como templado ADN con lesiones durante la TLS (Tabla I1). A diferencia de las Pols replicativas, las Pols alternativas pueden incorporar nucleótidos utilizando como molde ADN dañado ya que su sitio activo es más abierto permitiéndole acomodar la estructura voluminosa que presentan los nucleótidos modificados [30, 38].

Tabla I1. ADN Polimerasas bacterianas

<i>E. coli</i>	Pol III	Pol I	Pol II	Pol IV	Pol V
Gen	<i>dnaE</i>	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>dinB</i>	<i>umuDC</i>
Actividades	Pol, exonucleasa	Pol, exonucleasa	Pol, exonucleasa	Pol	Pol
Rol fisiológico	Replicación del cromosoma, TLS	Fragmentos de Okazaki, reparación del ADN	Reinicio de replicación, TLS	TLS	TLS
SOS inducible	No	No	Si	Si	Si
<i>P. aeruginosa</i>	Pol III	Pol I	Pol II	Pol IV	ImuABC*
Gen	<i>dnaE</i>	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>dinB</i>	<i>imuA-imuB-dnaE2</i>
Actividades	Pol, exonucleasa	Pol, exonucleasa**	nd***	Pol	Pol
Rol fisiológico	Replicación del cromosoma	TLS de ciertas lesiones	nd***	TLS	TLS
SOS inducible	No	No	No	Si	Si
<i>B. subtilis</i>	Pol C	DnaE	Pol I	Pol IV	Pol V
Gen	<i>polC</i>	<i>dnaE</i>	<i>polA</i>	<i>yqjH</i>	<i>yqjW</i>
Actividades	Pol, exonucleasa	Pol	Pol	Pol	Pol
Rol fisiológico	Replicación del cromosoma	Extensión de primers de ARN, TLS	TLS	TLS	TLS
SOS inducible	No	Si	No	No	Si

*ImuCD no es homóloga a Pol V pero está presente en bacterias carentes de esta Pol, tal como *P. aeruginosa*.

**Actividad en base a predicción de secuencia. No demostradas experimentalmente.

***nd: no determinado. Las bases de datos confirman la existencia del gen, pero no hay estudios sobre su actividad y/o función.

Actualmente, se han propuestos dos modelos mediante el cual ocurre la TLS cuando el replisoma encuentra una lesión en la cadena molde. En el primero, se produce un intercambio de Pols donde la Pol alternativa sustituye temporalmente a la Pol replicativa (Figura I3A). Una vez que la Pol alternativa incorpora nucleótidos utilizando como molde el ADN dañado, la Pol replicativa retoma el control del primer y la síntesis procesiva. Cabe mencionar que este modo de acción de las Pols alternativas para catalizar la TLS corresponde al modelo aceptado actualmente. Sin embargo, se ha postulado que estas enzimas pueden rellenar los gaps que quedan cuando la Pol replicativa encuentra la lesión y abandona el primer para asociarse a un nuevo primer que se encuentra aguas arriba (Figura I3B) [30].

Estudios bioquímicos y genéticos han demostrado que durante la TLS, estas enzimas pueden incorporar el nucleótido con la complementariedad correcta o incorrecta. En el primer caso, la TLS será libre de error. Por el contrario, si la Pol alternativa incorpora un

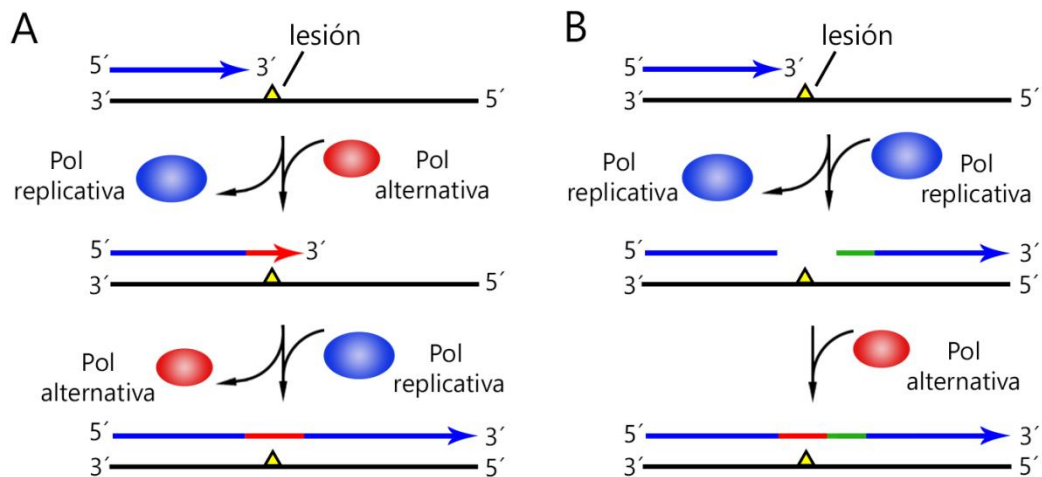


Figura 13. Modelos de la reacción de TLS. Durante la replicación del ADN pueden aparecer lesiones (triángulo amarillo) sobre la cadena molde (en negro). En verde se esquematiza el primer de ARN aguas arriba de la replicación. (A) En presencia de daño en el ADN, la Pol alternativa reemplaza a la Pol replicativa para realizar la TLS. Luego, la Pol replicativa retoma la síntesis procesiva. (B) Alternativamente, ante la presencia de una lesión en la cadena molde, la Pol replicativa se asocia a un nuevo primer aguas arriba para continuar la replicación del ADN dejando un gap en el sitio de la lesión que luego es rellenado por una Pol alternativa. La nueva cadena sintetizada por la Pol replicativa y la Pol alternativa están coloreadas en azul y rojo respectivamente.

nucleótido incorrectamente, se produce un mal apareamiento (MisMatch o MM) que si no es reparado, puede fijarse como una mutación durante la siguiente ronda de duplicación del ADN [26, 27]. Asimismo, las Pols alternativas exhiben una baja fidelidad de síntesis cuando replican ADN no dañado *in vitro* [26]. De la misma manera, la sobreexpresión de estas enzimas en bacterias generalmente produce un incremento en la mutagénesis en ausencia de daño en el ADN, confirmando que estas Pols pueden replicar ADN no dañado de forma errónea *in vivo* [39-44]. La capacidad de estas enzimas para provocar mutagénesis se debe a que poseen una tasa alta de incorporación de nucleótidos incorrectos y carecen de actividad correctora de proofreading [26]. Actualmente, se postula que las Pols alternativas contribuyen a la supervivencia celular de dos maneras diferentes. Por un lado, aseguran que continúe la replicación del cromosoma aliviando los bloqueos de la replicación y por otro, su actividad mutagénica aumenta la diversidad genética de las poblaciones bacterianas permitiendo la adaptación a condiciones de estrés [30, 45, 46].

Pol IV. Esta Pol alternativa ha sido ampliamente estudiada en los últimos años ya que se encuentra conservada en todos los organismos y participa en diversas transacciones biológicas [47, 48]. Los estudios estructurales muestran que Pol IV de *E. coli* presenta cuatro dominios que han sido nombrados en base a su similitud con una mano: la palma, los dedos, el pulgar y el meñique. Si bien los residuos implicados en la actividad catalítica (Asp 8, Asp 103 y Glu 104) se encuentran en la palma, el sitio activo de Pol IV está formado por residuos pertenecientes a tres dominios diferentes (palma, dedos y meñique) que interactúan al mismo tiempo con la cadena molde de ADN y el dNTP que será incorporado (Figura I4). La estructura de esta proteína acomplejada con ADN dañado muestra que posee un canal extendido entre el meñique y los dedos que evita que las bases dañadas voluminosas interfieran con la superficie del sitio activo. Asimismo, el residuo S42 es esencial para estabilizar la base modificada en el sitio catalítico en una conformación activa para síntesis [49, 50].

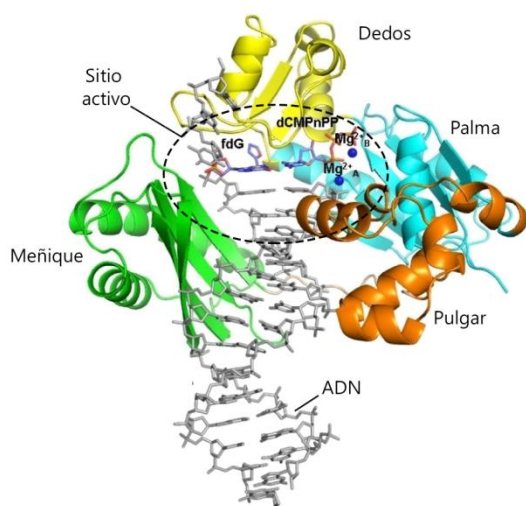


Figura I4. Estructura cristalina del complejo de Pol IV-ADN con una lesión. Pol IV está conformada por cuatro dominios: la palma (en cian), los dedos (en amarillo), el pulgar (en naranja) y el meñique (en verde). Se destaca el sitio activo de esta Pol, en el cual se encuentra envolviendo a un sustrato de ADN doble cadena con la lesión N2-furfuril-deoxiguanosina (fdG), análogo estructural del aducto formado por el antibiótico nitrofurazona (NFZ) apareado con el nucleótido dCMPnPP. El ion Mg^{2+} , representado con esferas azules, actúa como cofactor de esta enzima [50].

Como se mencionó, Pol IV cumple diferentes roles fisiológicos en variados procesos celulares. Esta Pol, y su homólogo en humanos, Pol κ , incorporan nucleótidos correctamente durante la TLS de bases alquiladas y aductos de guanina (N2-dG), sin embargo cometen errores durante la TLS de bases oxidadas y la replicación de ADN no dañado [51-53]. Asimismo, Pol IV es capaz de incorporar 7,8-dihidro-8-oxo-desoxiguanina (8-oxodG) exclusivamente frente a una adenina y 1,2-dihidro-2-oxo-desoxiadenina (2-oxo-dA) opuesta a una guanina o timina [52, 54, 55]. Además, se postula que Pol IV puede aliviar paradas de la horquilla de replicación asistiendo a Pol III HE de *E. coli* cuando introduce un nucleótido incorrecto generando MMs que inhiben su actividad de síntesis [39]. Por otro lado, existe evidencia de que Pol IV está implicada en otras vías

independientes del replisoma. Por ejemplo, esta Pol es capaz de rellenar los gaps producidos durante la reparación por escisión de nucleótido (Nucleotide Base Repair o NER) así como aquellos que se producen cuando hay paradas de la maquinaria de transcripción [30, 56, 57].

Pol IV posee una expresión basal en células bajo condiciones normales de crecimiento que aumenta durante diferentes situaciones de estrés [35, 47, 58]. Los niveles basales de Pol IV no contribuyen a la mutagénesis espontánea [40, 42, 44], por lo cual se postula que su acceso a los sitios de replicación debe estar limitado bajo condiciones normales de crecimiento. Por el contrario, Pol IV es un factor clave en la mutagénesis inducida bajo condiciones de estrés [35]. En células expuestas a agentes que dañan el ADN, Pol IV aumenta su expresión vía la respuesta SOS, promoviendo su participación en la replicación [43, 58, 59]. Además, se ha reportado que en este contexto, Pol IV es reclutada a sitios de recombinación donde puede replicar ADN no dañado de manera mutagénica [60, 61]. La expresión de Pol IV también está incrementada en condiciones de limitación de nutrientes o en fase estacionaria, vía la respuesta general de estrés controlada por el factor sigma RpoS. En ambos casos, la transcripción del gen de Pol IV se induce como parte de los genes requeridos para la supervivencia durante esas situaciones de estrés [42, 46, 55, 62].

En los últimos años, se han llevado a cabo estudios tendientes a investigar los mecanismos que controlan la actividad y acceso a la replicación de Pol IV, ya que si bien esta enzima permite aliviar las paradas de replicación, su actividad debe ser estrictamente regulada para evitar la mutagénesis innecesaria generada por su baja fidelidad [49, 63]. En este sentido, la asociación de Pol IV a β clamp, se ha propuesto como un punto crítico de su regulación [21, 26].

β clamp en la regulación de Pol IV. Numerosos trabajos se han centrado en estudiar el rol de β clamp en el control de las Pols alternativas. Esto se debe a que, como se mencionó previamente, una de las funciones más conocidas de β clamp es mantener las Pols unidas a su sustrato aumentando su procesividad. Particularmente, Pol IV se asocia a β clamp a través de un motivo CBM presente en su región C-terminal, dentro del dominio meñique [6, 64, 65]. Asimismo, dicha Pol contiene un sitio secundario que interacciona con la interfase entre monómeros de β clamp con una baja afinidad [65]. La asociación vía su CBM con el anillo de β clamp es esencial para las actividades de Pol IV relacionadas a la

TLS e inducción de la mutagénesis por sobreexpresión *in vivo* en bacterias como *E. coli* y *B. subtilis* [44, 64].

El acceso de Pol IV a β clamp ha sido ampliamente estudiado en ensayos de replicación de Pol III HE ya que, como se mencionó previamente, se postula que las Pols alternativas sustituyen temporalmente a las Pols replicativas en el replisoma [30]. Mediante estos sistemas reconstituidos *in vitro* es posible discernir cual Pol accede a la replicación en base a sus diferencias en la velocidad de síntesis (Pol III HE: 750 nt/s vs Pol IV: 5 nt/s) [66, 67]. Utilizando dichos ensayos se observó que la síntesis procesiva por Pol III HE puede ser detenida por la presencia de la lesión alquilante N²-furfuril-dG o como consecuencia de la omisión de dos de los cuatro nucleótidos. En esta última condición, Pol III HE comienza un ciclo fútil de síntesis y degradación, ya que al omitir dos nucleótidos inserta nucleótidos incorrectamente formando MMs que son sustrato de su actividad correctora de proofreading. Asimismo, Pol IV es capaz de asociarse a β clamp con mucho menor eficiencia cuando Pol III HE replica activamente ADN no dañado [68-70]. La adición de Pol IV alivia el bloqueo debido a que esta enzima accede al primer y β clamp y puede catalizar la reacción de síntesis. Luego de la acción de Pol IV, Pol III HE recupera rápidamente el control del ADN primeado y β clamp reanudando la replicación procesiva por esta enzima [68, 69, 71, 72].

Al presente se han planteado dos modelos para explicar el mecanismo molecular por el cual Pol IV accede a la replicación (Figura 15). A relaciones de Pol IV/Pol III HE similares a las encontradas en células durante crecimiento exponencial, el intercambio entre ambas Pols procedería a través de un intermediario donde Pol III core y Pol IV se unen a la misma molécula de β clamp [68, 69]. Pol III core presenta un CBM de alta afinidad en la subunidad catalítica α y un CBM de baja afinidad en la subunidad exonucleasa ϵ [73, 74]. Cuando ambos sitios en β clamp están ocupados simultáneamente por las CBMs de Pol III core se forma un complejo óptimo para la replicación procesiva [75]. Diferentes estudios bioquímicos sugieren que Pol IV se une inicialmente a β clamp en un estado inactivo contactando un sitio secundario y luego, interacciona con el bolsillo hidrofóbico donde se unía débilmente el CBM de ϵ . A la vez Pol III core permanece unido a β clamp mediante el contacto con el CBM de α en una conformación inactiva (Figura 15A). Así se ha postulado que Pol IV es capaz de interactuar con moléculas de β clamp asociadas al replisoma sin interferir con la síntesis catalizada por Pol III HE durante el crecimiento normal. Esto

permitiría un intercambio rápido con Pol IV ante paradas de replicación, tales como la aparición de lesiones en la cadena molde [68, 72, 73].

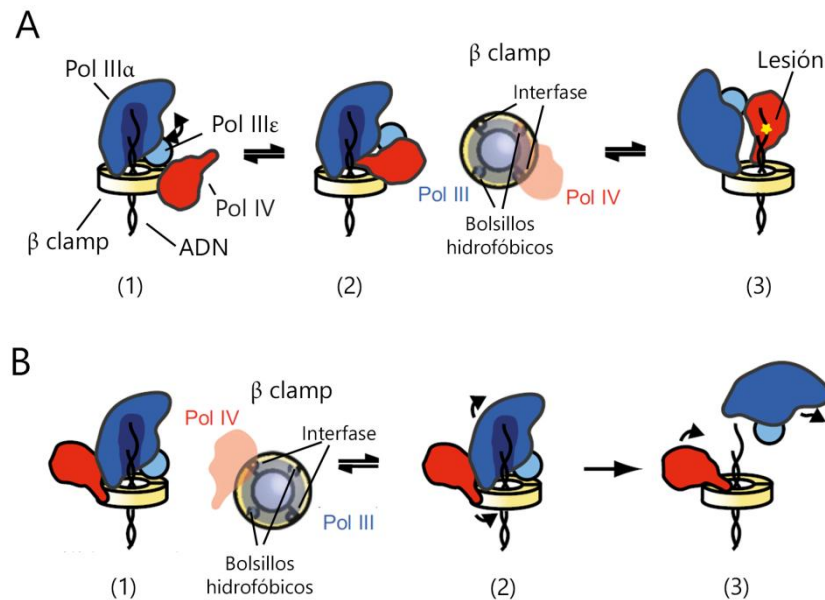


Figura 15. Modelo de intercambio de Pol IV por Pol III core en los sitios de replicación. (A) Se postula que Pol IV, a concentraciones relativamente bajas durante el crecimiento normal ($[\text{Pol IV}]/[\text{Pol III}] = 10:1$), es capaz de asociarse al complejo β clamp Pol III $\alpha\epsilon$ mediante un sitio secundario que interacciona con la interfase entre los monómeros de β clamp (A1). Así, dicha pol puede competir con la subunidad ϵ , que se encuentra débilmente unida al bolsillo hidrofóbico de β clamp (A2). En estas condiciones, Pol IV en su forma inactiva se encuentra disponible para un rápido intercambio con Pol III cuando aparecen bloqueos en la replicación, como por ejemplo una lesión. Luego de que Pol IV lleva a cabo su actividad, Pol III $\alpha\epsilon$ retoma la síntesis procesiva (A3). (B) Durante la respuesta SOS, la relación $[\text{Pol IV}]/[\text{Pol III}]$ se incrementa a 100:1, por lo que se propuso que podría haber un mayor grado de ocupación por parte de Pol IV del segundo sitio presente en β clamp (B1). Pol IV se posiciona de modo tal que es capaz de desplazar dinámicamente el CMB de alta afinidad α cuando ocurren disociaciones transitorias de dicha subunidad (B2), desplazando a Pol III y ocupando su lugar (B3).

El segundo modelo propone que a relaciones de Pol IV/Pol III HE altas, similares a las encontradas en situaciones de estrés, la Pol alternativa es capaz de desplazar a la Pol replicativa *in vitro* independientemente de la presencia de un bloqueo. El modelo propone que en este contexto podría haber un mayor grado de ocupación del sitio secundario presente en β clamp por parte de Pol IV. Así, Pol IV está posicionada estratégicamente para que cuando ocurran disociaciones transitorias del CBM de alta afinidad presente en α , pueda acceder al bolsillo hidrofóbico tomando el control de la replicación. Sin esta interacción esencial, Pol III deja de interactuar con β clamp, permitiendo que Pol IV

ocupe su sitio (Figura 15B) [68]. Este modelo concuerda con los estudios *in vivo* de sobreexpresión de Pol IV, en donde se observó una reducción de la viabilidad celular [76]. Se postula que este efecto se debe a que en condiciones de sobreexpresión, dicha Pol tiene un mayor acceso al replisoma, incluso en ausencia de daño, por lo cual la velocidad de replicación es menor. Esto podría inducir DSB en el cromosoma disminuyendo la viabilidad celular [55, 76-78]. Este efecto no fue observado en la sobreexpresión de una mutante de Pol IV que tiene deletado el CBM, indicando que esta toxicidad es dependiente de la interacción con β clamp [76].

Actualmente, la participación de Pol IV en el replisoma bacteriano *in vivo* es controversial. Los primeros estudios de microscopía no fueron capaces de detectar a esta Pol en crecimiento exponencial, pero sí en presencia de daño en el ADN, como los DSBs, donde Pol IV forma focos que colocalizan con proteínas implicadas en la replicación [79]. Asimismo, mediante ensayos de microscopía de molécula única se demostró que Pol IV se encuentra distribuida en toda la célula y que la exposición a compuestos que dañan el ADN tal como los agentes alquilantes metilmetasulfonato (MMS) y nitrofurazona (NFZ) inducen la formación de focos de dicha Pol. Sin embargo, se observó que la distribución de estos focos en la célula varía según el tratamiento. En presencia de MMS, Pol IV colocalizó con la proteína SSB de manera dependiente de su asociación con β clamp, indicando que actuaría en las regiones cercanas al replisoma. Por el contrario, la exposición a NFZ indujo la formación de focos en sitios alejados de la replicación de manera independiente de la interacción con el factor de procesividad [59]. Cabe mencionar que estos ensayos fueron realizados en cepas deficientes en *lexA* con el fin de obtener una mayor expresión de Pol IV y así poder detectarla. Finalmente, un estudio reciente de microscopía de molécula única observó que en condiciones normales de crecimiento, Pol IV se encuentra distribuida en toda la célula. Al igual que los trabajos previos, se encontró que la exposición a condiciones de estrés genotóxico como a radiación UV, el antibiótico ciprofloxacina y el MMS, forma focos dentro de la célula. Sin embargo, la localización de dichos focos fueron detectados principalmente en regiones alejadas de los sitios de replicación, indicando que esta enzima podría tener una importante actividad no-replisomal [80].

MECANISMO DE REPARACIÓN DE BASES APAREADAS INCORRECTAMENTE

Durante la replicación se pueden generar “apareamientos de bases del tipo no-Watson-Crick” (MMs) o pequeños bucles producto del deslizamiento de una hebra respecto a la

otra (referidos como Inserciones/Deleciones o InDels). Estas lesiones representan un tipo particular de “Daño en el ADN” debido a que técnicamente el ADN no está modificado y a que son transitorios, ya que desaparecen cuando la doble cadena se abre [81]. Si los MMs o Indels no son reparados, pueden fijarse como mutaciones durante el siguiente ciclo de replicación [26, 27]. Por ello, además de la actividad correctora de la Pol replicativa, las células poseen una segunda vía de control de la fidelidad de la replicación que corresponde al mecanismo de reparación de bases apareadas incorrectamente (Mismatch Repair ó MMR). Por ejemplo, la tasa de error de Pol III α es de 10^{-5} y se reduce a 10^{-7} debido a la actividad de la subunidad ϵ , mientras que la acción del MMR baja la tasa de error a 10^{-9} [82]. Este sistema de reparación no solo corrige los errores que escapan a la actividad correctora de la Pol replicativa, sino que también reconoce bases mal apareadas formadas durante la recombinación de secuencias de ADN divergentes [83].

Mecanismo molecular del MMR. En las últimas décadas se han llevado a cabo diversos estudios orientados a dilucidar los factores básicos y las diferentes reacciones involucrados en la reparación. De estos trabajos fue evidente que el proceso general está conservado en la mayoría de los organismos e incluye las siguientes etapas: detección del MM o InDel, discriminación de la cadena recién sintetizada e incisión, degradación hasta remover la base errónea y re-síntesis de la cadena con la complementariedad correcta [84, 85] (Figura 16). Asimismo, en eucariotas y la mayoría de las bacterias, el MMR está compuesto por dos proteínas principales denominadas MutS y MutL, junto a distintos factores que se comparten con otros procesos biológicos [83]. Diferentes estudios bioquímicos y estructurales han demostrado que MutS reconoce y se une al MM/InDel para luego interactuar con MutL formando un complejo que recluta los factores encargados de llevar a cabo las siguientes etapas del proceso de reparación. Así, MutS inicia la reparación mientras MutL coordina las diferentes etapas del proceso de reparación [83-86].

La principal diferencia a nivel mecanístico del MMR entre los organismos corresponde a cómo se lleva a cabo la discriminación de la cadena recién sintetizada e incisión (Figura 16) [83, 86, 87]. En *E. coli* y un número pequeño de bacterias relacionadas (enterobacterias), el complejo MutS-MutL activa la endonucleasa MutH, la cual produce un corte en un sitio dGATC cercano presente en la cadena recién sintetizada. Estos sitios dGATC normalmente se encuentran metilados en la adenina debido a la actividad

metiltransferasa de la enzima Dam, sin embargo, luego de la replicación, la nueva cadena se encuentra transitoriamente no metilada. Así, la presencia de sitios dGATC hemimetilados sería la señal molecular que identifica la cadena recién sintetizada de la parental. Por el contrario, la mayoría de las bacterias y eucariotas no poseen metilación Dam ni homólogos a MutH. En esos organismos, MutL presenta actividad endonucleasa que produce la incisión en la cadena que contiene el error (Figura I6). En relación a la señal de discriminación de la cadena recién sintetizada, se ha postulado que los terminales del ADN que surgen como intermediarios durante la replicación y la interacción de los factores del MMR con la maquinaria de replicación podrían direccionar la reparación [83, 85, 87].

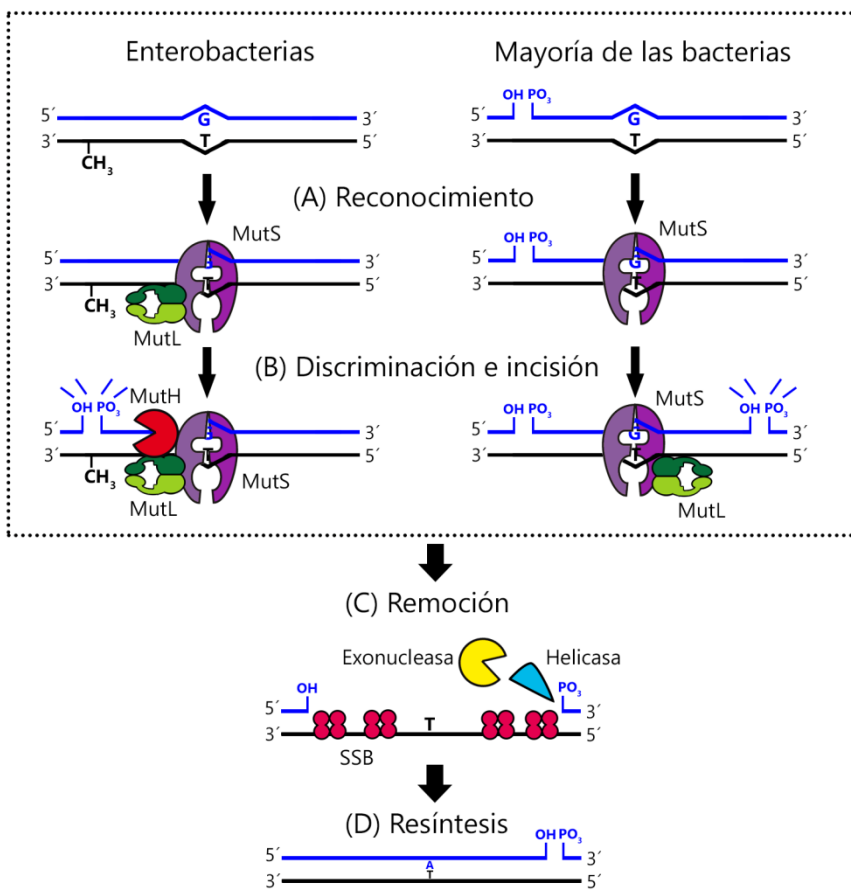


Figura I6. Mecanismo del MMR en bacterias. (A) Reconocimiento del MM y unión por MutS. (B) Discriminación de la cadena recién sintetizada, vía la hemimetilación de los sitios dGATC o la presencia de discontinuidades, e incisión por las endonucleasas MutH o MutL. (C) Remoción de la cadena con la base errónea a partir de la incisión mediante la acción de helicasas y exonucleasas mientras la cadena parental es protegida por la unión de SSB. (D) La reparación se completa cuando enzimas con actividad ADN Pol re-sintetizan la cadena con la complementariedad correcta y la ADN ligasa sella los extremos libres del ADN [83, 85, 87].

MutS. Esta proteína está ampliamente conservada en la evolución tanto en su función como en su estructura [88]. MutS es una proteína de gran tamaño (~95 kDa) y complejidad que se encuentra en un equilibrio entre dímeros y tetrámeros en solución [89]. Actualmente, se asume que el dímero, pero no el tetrámero, sería esencial para su función en el MMR. Si bien no se conoce exactamente la función del tetrámero, podría cumplir un rol en otras funciones de MutS, como en su actividad anti-recombinogénica

[90]. Los datos cristalográficos de MutS revelaron que el dímero forma una pinza que encierra al ADNdc (Figura I7). A su vez, cada monómero está conformado por seis dominios estructurales (I al VI) que le permiten llevar a cabo las diferentes funciones [83, 91-93]. El dominio I corresponde al dominio de unión al MM o InDel; el dominio II o “dominio conector” es el que interacciona con MutL, aunque esta función no se encuentra conservada en todas las especies; el dominio III representa el dominio “core” que separa el dominio I del sitio de unión nucleótidos (ATP o ADP); el dominio IV forma el exterior de la pinza que envuelve al ADN; el dominio V o hélix-turn-helix (HTH) contiene los sitios de actividad ATPasa y de la dimerización; finalmente, el dominio VI o C-ter es requerido para la dimerización y tetramerización [90, 91, 93, 94].

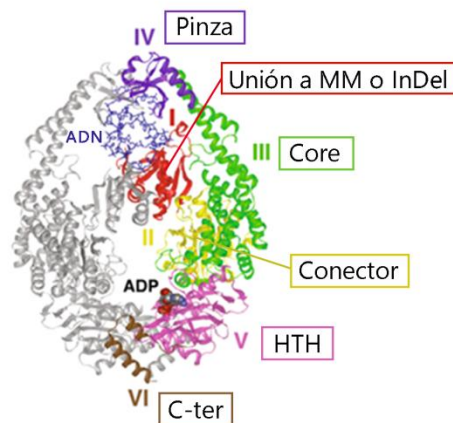


Figura I7. Estructura de MutS. Estructura cristalina de MutS de *E. coli* unida a un ADNdc con un MM tipo GT (PDB ID: 1E3M). En una de las subunidades del dímero se diferenciaron los dominios I, II, III, IV, V y VI en rojo, amarillo, verde, violeta, rosa y marrón, respectivamente. El ADNdc está representado en azul y el nucleótido ADP como esferas [83].

Como se mencionó, una de las características funcionales de MutS es la capacidad de reconocer y unirse a ADNdc que contengan un MM o InDel, así como bases modificadas [83]. En este último caso, no se conoce cuál sería la función de dicha interacción ya que no se desencadena la reacción de reparación [95]. La actividad de MutS está coordinada por la unión e hidrólisis de ATP. Los nucleótidos ADP y ATP se unen al dominio V de MutS con diferente grado de afinidad los dos monómeros. Los estudios bioquímicos y de molécula única *in vitro* demostraron que MutS unida a ADP interacciona de forma inespecífica al ADN y se mueve por difusión a lo largo de esta molécula hasta que encuentra un MM. Aquí sufre un cambio conformacional que la mantiene unida en este sitio formando el complejo de reconocimiento inicial del MMR. Luego, intercambia ADP por ATP, lo cual produce el cambio conformacional necesario para moverse por el ADN a fin de reclutar los otros factores del MMR [95]. Este intercambio ocurre de manera dependiente de su co-factor, el ion Magnesio [96]. Luego de la reparación, MutS hidroliza ATP y se disocia de la molécula de ADN para comenzar nuevamente con el escaneo [95-97].

β clamp en el MMR. Estudios previos demostraron que las proteínas MutS y MutL en bacterias y sus homólogos en eucariotas pueden asociarse a sliding clamps, por lo cual se propuso que dicha interacción podría tener un rol importante en el MMR [21], sin embargo, su función no se encuentra completamente definida y varía según el organismo en estudio.

La interacción MutS- β clamp es crucial para el correcto funcionamiento del MMR en las bacterias Gram-positivas del género *Bacillus*, ya que se postula que direcciona a MutS hacia las áreas de replicación activas y ayuda en la detección eficiente del MM [98, 99]. Mediante microscopía se encontró que MutS en esta bacteria forma focos que colocalizan con el replisoma, comportamiento que no fue observado en células que expresan la mutante MutS800 de delección del dominio C-terminal donde reside el CBM de unión a β clamp. Igualmente esta mutante posee graves defectos para reparar ya que presenta una menor actividad ATPasa y afinidad por ADN, así como su estado oligomérico cambia de tetrámero a dímero [98, 100]. En *E. coli*, la función de la interacción MutS- β clamp no está completamente definida. MutS presenta dos sitios de unión a β clamp en esta especie: un CBM presente en su C-terminal y un sitio alternativo en el N-terminal [6, 101, 102]. Los estudios *in vitro* demostraron que sólo el CBM del C-terminal es necesario para la unión al factor replicativo [103]. No obstante, no fue posible definir acabadamente la función de estos dos sitios de interacción *in vivo*, ya que la mutante del sitio N-terminal es inestable mientras que las mutantes en el C-terminal arrojaron resultados diferentes según las condiciones. Por ejemplo, la mutante de delección del C-terminal (MutS799) no afecta el correcto funcionamiento del MMR en condiciones normales de crecimiento [101, 102] mientras que tendría relevancia sólo en condiciones de estrés mutagénico [102]. En eucariotas, los estudios tampoco aportan evidencia clara de la función de dicha interacción en el MMR. Si bien las mutantes de MSH (homólogo de MutS) que carecen del motivo de interacción con PCNA (homólogo de β clamp) presentan una menor actividad de reparación *in vivo*, no se puede descartar que la deficiencia en el MMR se deba a que estas mutantes presentan bajos niveles de expresión [104-106].

En *E. coli*, la disrupción de la unión MutL- β clamp sólo provoca un leve aumento de la mutagénesis, indicando que no es esencial para el correcto funcionamiento del MMR [107]. Como se mencionó previamente, en las enterobacterias como *E. coli*, MutL recluta a MutH estimulando su actividad endonucleasa para cortar la nueva cadena de ADN no metilada y continuar con la reparación [108]. Sin embargo, en la mayoría de las especies

bacterianas, MutL es la encargada de cortar la nueva cadena, por lo que se postula que la unión a β clamp podría direccionar la actividad endonucleasa hacia dicha cadena. En este sentido, por ejemplo en *B. subtilis*, la actividad de MutL es estimulada por β clamp, a la vez que la disrupción de esta asociación provoca una marcada deficiencia en el MMR *in vivo* [107, 109]. En otras bacterias, los diferentes estudios sugieren que la actividad endonucleasa de MutL durante el MMR puede ser dependiente o independiente de la interacción con β clamp según la especie. Así, las proteínas MutL han sido clasificadas en tres subfamilias. La subfamilia I se caracteriza por contener el CBM y tener actividad endonucleasa dependiente de la interacción con β clamp, mientras que MutL de las subfamilias II y III carecen de CBM y su actividad es independiente de la asociación con el factor replicativo [110]. Finalmente, en eucariotas la interacción directa de PCNA con MLH (homólogo a MutL) participa en la discriminación de la cadena recién sintetizada ya que el factor replicativo ayuda a direccionar la incisión hacia dicha hebra [111-113]. Este hecho podría deberse a que PCNA, al igual que β clamp, tiene dos caras no equivalentes y se une al ADN con una orientación específica [114], facilitando la unión asimétrica de MLH al ADNdc con el MM y ayudando a discriminar la cadena nueva.

Consecuencias de la deficiencia del MMR. El MMR controla la fidelidad de la replicación del ADN, a la vez que modula la recombinación entre secuencias divergentes de ADN con el objeto de mantener la integridad estructural del genoma y controlar la transferencia horizontal en procariotas y eucariotas. Defectos de este sistema produce un incremento de 100-1000 veces en la tasa de mutaciones espontáneas y recombinación entre secuencias divergentes [84, 115]. Así, un mal funcionamiento de este sistema está directamente asociado a la iniciación y promoción de la carcinogénesis en humanos mientras que produce un fenotipo hipermutador en bacterias [116, 117]. Los estudios epidemiológicos muestran una alta frecuencia de subpoblaciones de células hipermutadoras en aislados clínicos de bacterias patógenas. Este fenotipo hipermutador podría acelerar la evolución del patógeno permitiendo su adaptación a las diferentes situaciones de estrés impuestas por las defensas del huésped y el tratamiento con antibióticos [118].

MODELO DE ESTUDIO: *Pseudomonas aeruginosa*

Nuestro laboratorio lleva a cabo el estudio de cómo se interrelacionan los procesos de replicación y reparación del ADN utilizando como modelo de estudio la bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa*. Esta especie habita en el suelo y en ambientes con superficies acuosas así como es capaz de infectar eucariotas superiores siendo un reconocido patógeno oportunista de humanos. Debido a su gran adaptabilidad y su resistencia intrínseca a múltiples compuestos antimicrobianos, *P. aeruginosa* es capaz de sobrevivir en un amplio rango de condiciones tanto naturales como artificiales, incluso dentro de los dispositivos presentes en establecimientos médicos [119]. De hecho, las infecciones más graves con esta bacteria ocurren frecuentemente de manera intrahospitalaria, y en su mayoría afectan a pacientes inmunocomprometidos como personas con neutropenia, quemaduras severas o Fibrosis Quística (FQ) [119, 120]. Las opciones terapéuticas son limitadas debida a la continua emergencia y dispersión de cepas resistentes a antibióticos, por lo cual, las infecciones con *P. aeruginosa* muestran una alta morbilidad y mortalidad. En consecuencia, *P. aeruginosa* pertenece al grupo de mayor prioridad para el desarrollo de nuevos antibióticos según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Debido a esta problemática, resulta de interés estudiar cuáles son los mecanismos que llevan a la resistencia a antibióticos como así también buscar nuevos blancos para el desarrollo de antimicrobianos [119].

El replisoma en *P. aeruginosa*. El replisoma nativo fue purificado desde extractos de células de *P. aeruginosa* [9]. La composición de dicho complejo es similar al replisoma de *E. coli*, sin embargo presenta ciertas diferencias tal como que Pol III core está compuesto por las subunidades α y ϵ , pero no se detectó una proteína equivalente a θ . Asimismo, ha sido reconstituido *in vitro* un complejo de replicación activo utilizando los componentes individuales α , ϵ , β clamp y $\tau\beta\delta\delta'$ [8].

ADN polimerasas alternativas. En el genoma de *P. aeruginosa* existen genes homólogos a los genes que codifican Pol I, Pol II, Pol III y Pol IV de *E. coli* (Tabla I1). Además, posee el operón *ImuABC* cuyos genes han sido asociados a la mutagénesis inducida por estrés en bacterias. ImuC e ImuB conforman un complejo donde ImuC posee actividad ADN polimerasa mientras ImuB, la cual es inactiva, interacciona con β clamp [26, 121].

Pol IV. Esta enzima en *P. aeruginosa*, al igual que en *E. coli*, tiene actividad distributiva y carece de actividad correctora *in vitro*. En tanto que *in vivo*, Pol IV no contribuye a la

mutagénesis espontánea en el gen *rpoB*, ya que su inactivación no disminuye la tasa de mutación de resistencia al antibiótico rifampicina [43]. No obstante, Pol IV está involucrada en la mutagénesis espontánea del gen *mucA*, cuya inactivación produce un fenotipo mucoide, característica esencial para la adaptabilidad de *P. aeruginosa* al pulmón FQ [122]. Asimismo, Pol IV provoca un aumento en la mutagénesis cuando sus niveles son altos tal como ocurre en células sobreexpresantes así como en células expuestas a agentes que dañan el ADN [43, 122, 123]. En este último caso, los estudios demostraron que su expresión está inducida por dichos agentes como el compuesto mitomicina C [43] y las concentraciones subinhibitorias de Cip en el marco de la respuesta general al estrés SOS [124].

Pol IV de *P. aeruginosa* es una polimerasa clave en la TLS de las lesiones producidas por la exposición a diferentes compuestos, tales como los agentes alquilantes N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, metil-metasulfonato, nitrofurazona y 4-nitroquinolona; el agente oxidante peróxido de hidrógeno y la radiación UV. Los estudios de exposición a agentes alquilantes muestran que no existe un aumento en la frecuencia de mutación en células tratadas con dichas sustancias. No obstante, las células deficientes en Pol IV son más sensibles al tratamiento, indicando que Pol IV llevaría a cabo la TLS libre de error de los aductos de dG inducidos por dichos agentes alquilantes [43, 121, 125]. Asimismo, esta Pol es capaz de llevar a cabo TLS libre de error de las lesiones provocadas por la radiación UV tanto *in vitro* como *in vivo* [125]. Por el contrario, la exposición al daño oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno aumenta la frecuencia de mutaciones de manera dependiente de Pol IV a la vez que las células deficientes en esta enzima son más sensibles a dicho agente oxidante [125].

MMR. *P. aeruginosa* posee genes que codifican homólogos a MutS y MutL de *E. coli*, sin embargo no fue posible detectar homólogos a la metiltransferasa Dam ni a la endonucleasa MthH [126]. Estudios previos corroboraron la ausencia de la actividad Dam en *P. aeruginosa*, a la vez que demostraron que MutL presenta actividad endonucleasa, la cual no es estimulada por β clamp [127, 128]. Cabe destacar que el estudio del MMR presente en *P. aeruginosa* presenta una gran relevancia debido a que se detectó una alta proporción de aislados hipermutadores (20-53%) provenientes de pacientes con FQ crónicamente infectados, principalmente debido a defectos en el gen *mutS* [129], constituyendo

actualmente uno de los modelos por excelencia para el estudio del rol de la hipermutabilidad en la adaptación de bacterias durante procesos de infección crónica.

ANTECEDENTES DEL LABORATORIO

Los estudios de nuestro grupo de investigación se han centrado en la proteína MutS del MMR presente en *P. aeruginosa*. En principio, nuestro laboratorio abordó una investigación tendiente a caracterizar el estado oligomérico de MutS funcional para la reparación de errores replicativos. Inicialmente, se determinó que el estado oligomérico de MutS (855 aa) en solución corresponde al tetrámero, especie activa para unir ADNdc con un MM e hidrolizar ATP. La deleción de los 57 aa finales de la región C-terminal impide la formación de tetrámeros de MutS mientras la fusión de estos residuos a la proteína monomérica de unión a la maltosa (Maltose Binding Protein ó MBP) induce su tetramerización. Estos resultados demostraron que esta región actuaría como un dominio responsable de la oligomerización de MutS. El modelado por homología de los 34 aa finales, utilizando la estructura cristalina obtenida para la región C-terminal de MutS de *E. coli*, permitió predecir que los residuos R842 y K852 estarían involucrados en las interacciones dímero-dímero y monómero-monómero, respectivamente. Efectivamente, la mutación R842E en MutS impide la tetramerización mientras que la mutación K852A produce una formación de tetrámeros dependiente de la concentración. El análisis de la actividad ATPasa y la unión a ADNdc conteniendo un MM demostró que ambas mutantes poseen niveles de actividad similares *in vitro* aunque significativamente menores comparado con la proteína salvaje. La introducción de estas mutaciones puntuales en el gen *mutS* presente en el cromosoma de *P. aeruginosa* demostró que la mutante MutSK852A posee una capacidad para reparar *in vivo* equivalente a MutS mientras la mutante MutSR842E es significativamente menos eficiente en condiciones de alta mutagénesis. Así, estos resultados demuestran que el estado oligomérico de MutS activo para la reparación sería el tetrámero en *P. aeruginosa* [130].

Luego, se inició un nuevo trabajo de investigación donde se abordó el análisis del MMR presente en *P. aeruginosa* utilizando técnicas de proteómica funcional con el objeto de obtener información relacionada a la interacción de los componentes de este sistema con otros procesos celulares. Con tal fin, se expresó MutS o dominios de la misma fusionados a péptidos de afinidad y luego, se purificó dichas fusiones por cromatografía de afinidad en condiciones suaves a fin de preservar los factores asociados. En estos ensayos se copurificaron una serie de proteínas que fueron identificadas por espectrometría de masas.

Dichos factores, o sea proteínas que potencialmente interactúan con MutS directa o indirectamente, cumplen funciones en la replicación constituyendo un primer indicio de que esta proteína del MMR podría desempeñar funciones en otros procesos metabólicos del ADN. Posteriormente, se estudió la interacción de MutS con una de las proteínas aisladas, el factor de procesividad β clamp, ya que en ese momento se había postulado que dicha asociación cumple un papel importante en la iniciación de la reparación en aquellos organismos que poseen un MMR independiente de la metilación *dam*, tal como *P. aeruginosa*. Con tal fin se realizó la caracterización funcional de dos versiones mutantes de MutS que no interaccionan con el factor replicativo: una mutante de delección del dominio C-terminal (MutS798) y una mutante puntual del motivo ⁸¹⁶QSDLF⁸²⁰ de unión a β clamp (MutS ^{β}). Ambas versiones mutantes son capaces de complementar el fenotipo hipermutador de cepas de *P. aeruginosa* deficientes en *mutS*. Asimismo, el reemplazo del gen cromosomal *mutS* por la versión mutada que codifica MutS ^{β} (cepa *mutS* ^{β}) no altera la tasa de mutación espontánea al antibiótico Rifampicina, a la vez que esta cepa mutante presenta un comportamiento similar a la cepa parental (cepa WT) en condiciones de saturación del MMR dadas por la presencia de un mutágeno. Ensayos bioquímicos demostraron que MutS ^{β} presenta un estado oligomérico, afinidad por ADN e interacción con MutL similares a MutS. Esos resultados demostraron claramente que la interrupción de la interacción MutS- β clamp no altera la reparación de errores replicativos en *P. aeruginosa*, demostrando por primera vez que la asociación entre MutS y el factor de procesividad no cumple una función crítica en un MMR bacteriano independiente de la metilación *dam*. Luego, se determinó que dicha asociación tampoco cumple una función en la inhibición de la recombinación entre secuencias divergentes, indicando que la asociación entre MutS y β clamp no posee un rol importante en las funciones que al momento habían sido asignadas a MutS en bacterias [131].

Posteriormente, y con el objeto de caracterizar más en detalle el funcionamiento de MutS ^{β} *in vivo*, se determinó la especificidad mutacional en la cepa *mutS* ^{β} para lo cual se desarrolló un sistema reportero que permite caracterizar las mutaciones que ocurren en el genoma de *P. aeruginosa* basado en el gen *nfxB*. En nuestro laboratorio, a partir del análisis de las bases moleculares de la resistencia a diferentes concentraciones del antibiótico ciprofloxacina, se observó que a bajas concentraciones de este antimicrobiano, la resistencia está asociada a la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexCD-OprJ producida por mutaciones en el gen *nfxB* que codifica un represor transcripcional que controla su

expresión [132]. Este gen permite detectar un amplio rango de mutaciones, que incluye todas las sustituciones de bases y pequeñas deleciones e inserciones, dado que debe inactivarse para que las células adquirieran resistencia a ciprofloxacina. El análisis del espectro de mutación en cepas deficientes en distintos sistemas de reparación así como en la cepa WT expuesta a mutágenos demostró que la especificidad de mutación coincide con aquella previamente caracterizada para dichos contextos genéticos y mutágenos. Además, es posible analizar “hotspots” y contextos de secuencia preferidos para las sustituciones de bases utilizando el programa iMARS. De acuerdo a lo expuesto, el gen *nfxB* constituye un sistema efectivo para el estudio de mutaciones espontáneas e inducidas en el cromosoma de *P. aeruginosa* ya que permite detectar un amplio rango de mutaciones así como censar cambios en la calidad de las mismas [133]. El análisis molecular utilizando el gen *nfxB* reveló que la cepa *mutS^β* presenta un incremento significativo de la frecuencia de la transversión AT>CG comparado con la cepa WT. Estudios previos indicarían que este tipo de mutación es introducida por Pol IV como resultado de la incorporación del nucleótido oxidado 8-oxodG opuesta a la adenina presente en la cadena templado [49, 125]. Estos antecedentes nos llevaron a postular que la interacción MutS-β clamp podría tener un rol en la regulación de la actividad o acceso de Pol IV en la replicación, hipótesis que derivó en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se mencionó, nuestra hipótesis al inicio de esta Tesis Doctoral fue que la proteína de reparación MutS podría regular la actividad y/o el acceso a la replicación de la ADN polimerasa mutagénica Pol IV a través de su interacción con el factor replicativo β clamp. Por ello, el objetivo general de esta Tesis fue determinar el mecanismo molecular que utiliza MutS en este nuevo rol por el cual mantiene la fidelidad de la replicación. Así, el presente trabajo se dividió en dos secciones:

CAPÍTULO I. Estudio de la asociación entre MutS, β clamp y Pol IV mediante ensayos *in vitro*.

Para abordar esta primera parte se plantearon los siguientes objetivos específicos:

I.a – Caracterizar las interacciones bimoleculares entre MutS, β clamp y Pol IV;

I.b – Analizar la unión de Pol IV a β clamp en presencia de MutS;

I.c - Investigar el efecto de diferentes sustratos de ADN sobre las interacciones entre MutS, β clamp y Pol IV;

CAPÍTULO II. Análisis del rol la interacción MutS- β clamp en la replicación dependiente de Pol IV en células de *Pseudomonas aeruginosa*. Los objetivos específicos fueron:

II.a – Determinar la mutagénesis espontánea dependiente de Pol IV en células bajo condiciones de crecimiento normales;

II.b- Estudiar la mutagénesis inducida por Pol IV en condiciones de estrés;



MODELO PROPUESTO

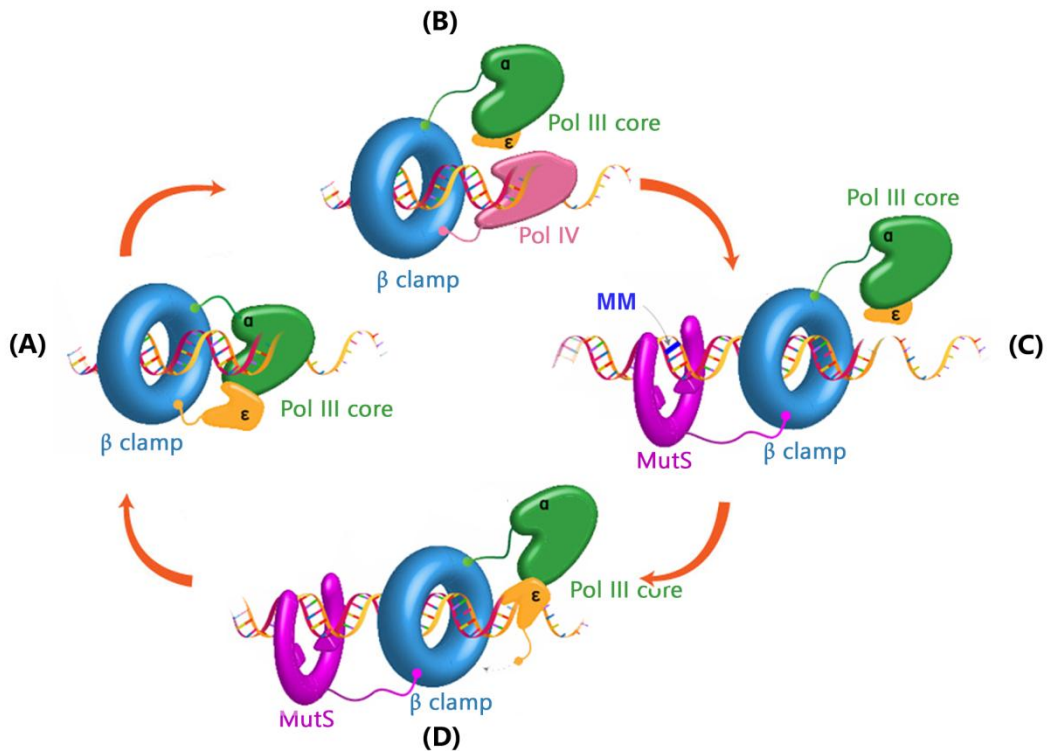


Figura M1. Mecanismo propuesto para el control de Pol IV por MutS. Las ilustraciones han sido adaptadas del diseño de Jeremías Di Pietro, CCT-CONICET.

En base a las evidencias obtenidas en este trabajo de Tesis, y de acuerdo con los estudios previos, se propone el siguiente mecanismo por el cual MutS controla la acción de Pol IV. Diagrama A: Pol III core realiza la síntesis procesiva del ADN ocupando ambos sitios en β clamp por los CBM presentes en las subunidades α y ϵ . Diagrama B: Paradas de replicación propician el reclutamiento de Pol IV al replisoma. Esta Pol gana acceso al terminal primeado desde Pol III core, uniéndose al bolsillo donde residía ϵ , mientras que Pol III core continúa unido al segundo bolsillo por el CBM de α . Diagrama C: Si la actividad de Pol IV genera un mal apareamiento (MM), ya sea introduciendo una base incorrectamente o extendiendo un terminal con un mal apareamiento, MutS es reclutada ya que su afinidad por β clamp aumenta en presencia de un MM. MutS es capaz de competir con Pol IV por β clamp, desplazándola del anillo. Diagrama D: La subunidad ϵ podría acceder al terminal primeado, resultando en la escisión del nucleótido incorrecto. Luego de la remoción del MM, MutS pierde afinidad por β clamp y se disocia del factor

replicativo. Finalmente, Pol III core retoma el control del sitio primeado y continúa con la replicación procesiva. Es importante mencionar que dicho mecanismo funcionaría en el contexto del replisoma, aunque por simplicidad sólo se esquematiza al Pol III core presente en este complejo proteico.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis apoyan particularmente las etapas B y C del modelo. Dichas evidencias son:

1- Pol IV interacciona mediante el motivo conservado QLxLF con β clamp con menor afinidad que MutS;

2- MutS no interacciona directamente con Pol IV.

3- MutS es capaz de desplazar a Pol IV del anillo de β clamp compitiendo por la unión al bolsillo hidrofóbico de β clamp.

4- Diferentes estructuras de ADN modulan esta función de MutS: MutS mostró un control más estricto sobre la unión de Pol IV a β clamp en presencia de ADN "primeados", mientras que la afinidad de la interacción MutS- β clamp aumenta ADNp-GT.

5- En condiciones normales de crecimiento, MutS limita a Pol IV cuando realiza replicación mutagénica (ADN no dañado), mientras que no la controla cuando lleva a cabo replicación libre de errores (TLS).

6- En condiciones de inducción de estrés, MutS no controlaría la acción de Pol IV.

RESULTADOS - CAPITULO I - ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE MUTS, β CLAMP, POL IV MEDIANTE ENSAYOS *IN VITRO*

Los resultados previos del laboratorio sugerían que MutS podría regular la acción de Pol IV a través de su interacción con β clamp. Sin embargo, hasta el momento no existía ningún conocimiento acerca de las bases moleculares del mecanismo utilizado por MutS para cumplir dicho rol. Al comienzo de esta Tesis, se plantearon dos posibles modelos de acción de MutS: MutS podría regular la interacción de Pol IV con β clamp, o bien, la proteína de reparación podría unirse simultáneamente y regular tanto el acceso de Pol IV al primer de ADN y/o modular su fidelidad de síntesis (Figura R1 A y B). Por ello, en esta primera parte del trabajo, se realizaron estudios bioquímicos con el fin de analizar las asociaciones entre estos factores, así como la regulación de dichas interacciones proteicas por diferentes estructuras de ADN. Con tal fin, se aplicaron tres metodologías diferentes: electroforesis de geles nativos de poliacrilamida (PoliacrylamideGel Electrophoresis ó PAGE), Far Western (FW) y Resonancia de Superficie de Plasmón (Surface Plasmon Resonance ó SPR). Los ensayos de SPR fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Emilio Malchiodi en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires.

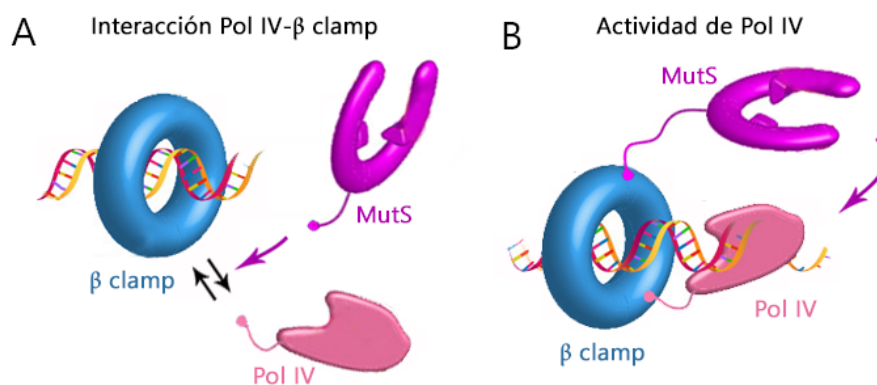


Figura R1. Posibles modelos de acción de MutS en la regulación de Pol IV. (A) MutS impide la asociación entre Pol IV y β clamp. (B) MutS y Pol IV se unen simultáneamente a un anillo de β clamp, donde MutS puede regular la actividad de Pol IV relacionada a su acceso al primer de ADN y/o fidelidad de síntesis.

I.a- Caracterización de las interacciones bimoleculares entre MutS, β clamp y Pol IV

Pol IV se une a β clamp, aunque con menor afinidad que MutS

Como se mencionó en la introducción, MutS de *P. aeruginosa* (855 aminoácidos) interacciona con β clamp mediante el motivo ⁸¹⁶QSDLF⁸²⁰ localizado en su dominio C-terminal. En un estudio previo del laboratorio, se mutó dicho motivo a ASDAA generando una versión mutante denominada MutS ^{β} , la cual es incapaz de interactuar con el factor replicativo [131]. Por el contrario, la interacción entre Pol IV y β clamp de *P. aeruginosa* hasta el momento no había sido analizada.

En primer lugar, se caracterizó la interacción de Pol IV y MutS con β clamp mediante PAGE para lo cual se incubó una concentración constante de β clamp con concentraciones crecientes de Pol IV o MutS y los productos de reacción fueron analizados por la técnica mencionada. Como se observa en la Figura R2 A y B, la intensidad de la banda correspondiente a β clamp libre disminuyó a medida que se aumentó la cantidad de MutS o Pol IV (carriles 2-8) en relación al control donde no se añadieron estas proteínas (carril 1). La intensidad de dicha banda fue cuantificada para obtener un gráfico de respuesta donde el eje de las Y corresponde a la fracción de β clamp unida y el eje de las X la concentración Pol IV o MutS libre (Figura 1 E y F). Para Pol IV, la curva se ajustó a una hipérbola rectangular, indicando que la interacción con los sitios de β clamp es independiente. La constante de disociación estimada (K_D) fue $6,22 \pm 0,51 \mu\text{M}$. En cuanto a MutS, la K_D fue $1,66 \pm 0,09 \mu\text{M}$ y la curva se ajustó a una sigmoidea, lo cual indica que existe una cooperatividad positiva entre los sitios de unión de β clamp a MutS (Figura R2 E y F).

En segundo lugar, estas asociaciones fueron estudiadas mediante SPR. Brevemente, esta técnica consiste en inmovilizar una molécula en la superficie de un chip de oro y pasar la otra molécula por un sistema microfluídico. Para detectar si estas moléculas interactúan, un haz de luz polarizada incide sobre la superficie del chip, reflejándose en un ángulo determinado (ángulo de SPR), cuya magnitud depende de la masa de las moléculas que se encuentran próximas a la superficie del chip. La diferencia en el ángulo de SPR en relación a la celda control donde no se inyecta ninguna molécula se traduce en unidades de respuesta (Response Units o RU) que se grafican en un sensograma. En estos ensayos, se inmovilizó a β clamp a la superficie del chip y por el sistema microfluídico se pasaron diferentes concentraciones de Pol IV o MutS. Como se observa en el sensograma (Figura R3A), las RU incrementaron cuando se inyectó Pol IV (etapa de asociación)

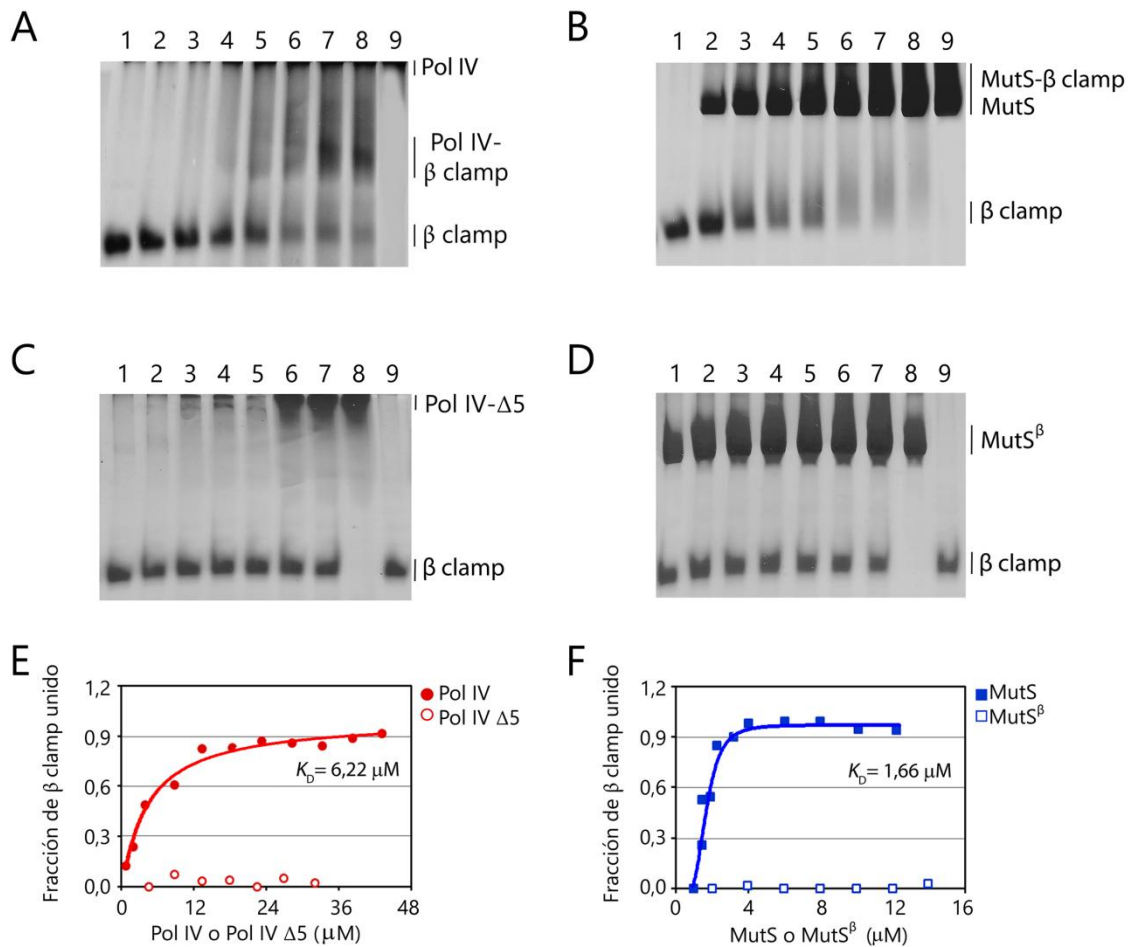


Figura R2. Análisis de las Interacciones Bimoleculares de MutS y Pol IV con β clamp mediante PAGE.

Se incubó una concentración fija de β clamp con Pol IV (A), MutS (B), Pol IV- $\Delta 5$ (C) o MutS $^{\beta}$ (D). Los productos de reacción fueron analizados en un gel nativo de poliacrilamida en gradiente 4-16% (P/V) en las condiciones de corrida descritos en la sección de Materiales y Métodos. Cabe mencionar que dado que el punto isoeléctrico estimado de Pol IV ($pI=8$) es similar al pH del buffer de corrida del gel ($pH=8,4$), esta proteína no ingresó en el gel. Sin embargo, se observó una banda correspondiente al complejo Pol IV- β clamp, cuya identidad fue corroborada por Western blot (Ver Figura R7). En el caso de MutS, no fue posible separar las bandas de MutS y MutS- β clamp debido a que tienen pesos moleculares similares ($\approx 400kDa$ y $\approx 480kDa$, respectivamente). Se cuantificó la intensidad de la banda correspondiente a β clamp libre y se calculó la fracción de β clamp unido [$\text{Fracción de } \beta \text{ clamp}_{\text{unido}} = (\beta \text{ clamp}_{\text{total}} - \beta \text{ clamp}_{\text{libre}}) / \beta \text{ clamp}_{\text{total}}$] (Eje Y) en función de la concentración de Pol IV y Pol IV- $\Delta 5$ (E) ó MutS y MutS $^{\beta}$ (F) libre (Eje X). Las concentraciones mezcladas con β clamp ($2,0 \mu M$) fueron $1,0$; $2,5$; $5,0$; $10,0$; $15,0$; $20,0$; y $25,0 \mu M$ de Pol IV (panel A, carriles 2-8); $1,0$; $2,0$; $2,5$; $3,0$; $4,0$; $5,0$; y $6,0 \mu M$ de MutS (panel B, carriles 2-8); $4,5$; $9,0$; $13,5$; $18,0$; $22,5$; $27,0$; y $32,0 \mu M$ de Pol IV- $\Delta 5$ (panel C, carriles 1-7); $2,0$; $4,0$; $6,0$; $8,0$; $10,0$; $12,0$; y $14,0 \mu M$ de MutS $^{\beta}$ (panel D, carriles 1-7). Las reacciones controles de proteínas solas son: β clamp ($2,0 \mu M$, carril 1 en paneles A y B, carril 9 en paneles C y D), Pol IV ($15,0 \mu M$, carril 9, panel A), MutS ($8,0 \mu M$, carril 9, panel B), Pol IV- $\Delta 5$ ($32,0 \mu M$, carril 8 en panel C) o MutS $^{\beta}$ ($4,5 \mu M$, carril 8 en panel D).

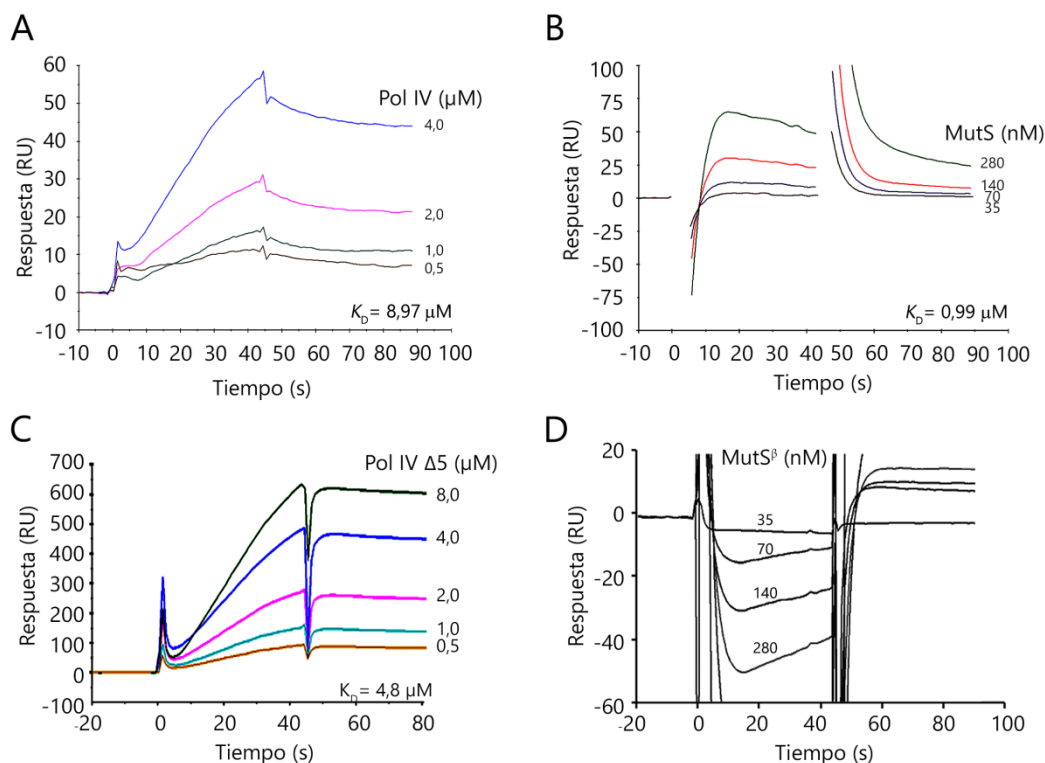


Figura R3. Análisis de las interacciones bimoleculares de MutS y Pol IV con β clamp mediante SPR.

(A) Sensograma para el ensayo de Pol IV y β clamp. β clamp fue inmovilizado a la superficie de un chip, seguido de la inyección de Pol IV (0,5-4,0 μM) en el sistema microfluídico. El primer pico ($t=0$) corresponde a la inyección de Pol IV en el sistema microfluídico, donde comienza la etapa de asociación en la cual las RU incrementan en base a una constante cinética de asociación ($k_{ON} = 5,80 \pm 0,10 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Una vez alcanzado el equilibrio, se inyectó buffer ($t=45\text{s}$) dando lugar a la etapa de disociación cuya cinética está definida por la constante cinética de disociación ($k_{OFF} = 5,20 \pm 0,20 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). (B) Sensograma para el ensayo de MutS y β clamp. β clamp fue capturado mediante la unión con un anticuerpo, seguido de la inyección de MutS (35-280 nM). Las constantes cinéticas esta unión fueron $k_{ON} = 1,12 \pm 0,08 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_{OFF} = 1,11 \pm 0,04 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$. (C) Sensograma para el ensayo de Pol IVΔ5 y β clamp. β clamp fue inmovilizado a la superficie de un chip CM5, seguido de la inyección de Pol IVΔ5 (0,5-8,0 μM) en el sistema microfluídico. (D) Sensograma para el ensayo de MutSβ y β clamp. MutSβ (35-280 nM) fue inyectada a un chip donde β clamp fue previamente capturado mediante un anticuerpo inmovilizado a la superficie. No se observaron aumentos en las RU. Los sensogramas representan las RU (eje Y) en función del tiempo en segundos (eje X). Se muestran curvas representativas de una réplica ($n=3$).

mientras que dichos valores disminuyen durante la inyección de buffer (etapa de disociación). En base a estos datos fue posible calcular la constante cinética de asociación (k_{ON}) y disociación (k_{OFF}), que permitió obtener la K_D aplicando el cociente $K_D = k_{OFF}/k_{ON}$. De este ensayo se determinó que Pol IV se une específicamente a β clamp inmovilizado en el

chip con una K_D de $8,57 \mu\text{M}$ (Figura R3A). Contrariamente, en estas condiciones, MutS fue capaz de unirse a β clamp pero no se disoció, por lo cual no fue posible calcular su k_{OFF} y en consecuencia la K_D (dato no mostrado). Para analizar la interacción de MutS con el factor replicativo, se procedió a capturar β clamp al chip utilizando un anticuerpo que reconoce el péptido de afinidad His₆ el cual está fusionado esta proteína. La K_D calculada para MutS fue de $0,99 \mu\text{M}$, $\approx 8,5$ veces menor a la K_D de Pol IV (Figura R3B).

Los ensayos de interacción también fueron realizados utilizando la técnica de FW. En estos experimentos, distintas concentraciones de Pol IV y MutS fueron inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa y se incubó con β clamp en solución (Figura R4A). La unión de este factor a las proteínas inmovilizadas en la membrana se reveló con un anticuerpo que reconoce al His₆ presente en β clamp. El gráfico expuesto en la Figura R4B representa la cantidad de proteína inmovilizada en el eje de las X vs la intensidad relativa del “spot” en el eje de las Y, que se relaciona directamente con la cantidad de β clamp unido. De este ensayo fue evidente que Pol IV es capaz de interactuar con β clamp, no obstante, presenta una menor afinidad en relación a MutS.

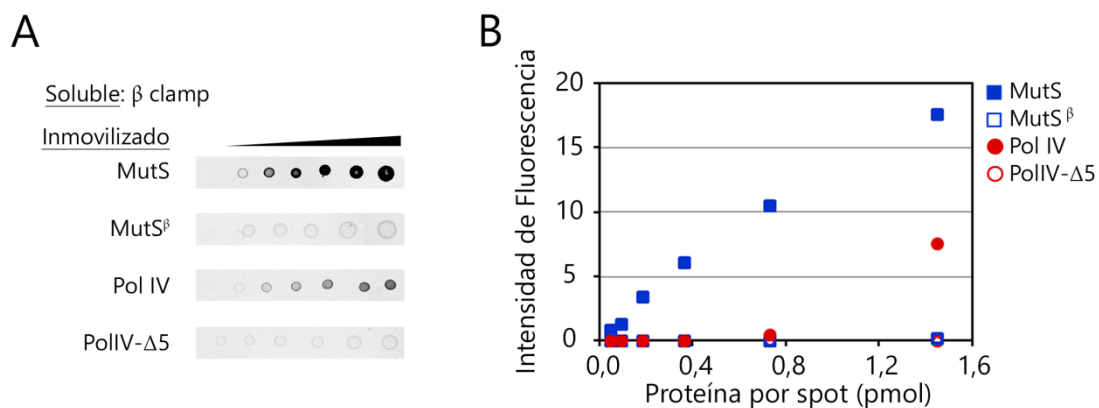


Figura R4. Análisis de las interacciones bimoleculares de MutS y Pol IV con β clamp mediante FW. (A) Membrana representativa de los ensayos de FW. Cantidades crecientes de MutS, MutS $^{\beta}$, Pol IV y Pol IV $\Delta 5$ fusionadas al péptido de afinidad StrepII (0,05; 0,09; 0,18; 0,36; 0,73; y 1,45 pmol) fueron inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa y luego incubadas con una solución que contenía β clamp-His₆ ($0,25 \mu\text{M}$). La interacción entre β clamp y las proteínas inmovilizadas fue revelada mediante un anticuerpo que reconoce el His₆ presente en β clamp. (B) El gráfico representa en el eje de las X la cantidad de proteína inmovilizada (pmol) en función de la intensidad de fluorescencia (eje Y) por spot.

En resumen, mediante tres técnicas bioquímicas diferentes se observó que Pol IV de *P. aeruginosa* interacciona con el factor de procesividad con una afinidad significativamente menor a la asociación MutS- β clamp.

El sitio conservado de unión a β clamp presente en Pol IV constituye el principal sitio de interacción con el factor de procesividad

Pol IV (349 aa) de *P. aeruginosa* contiene el péptido hidrofóbico³⁴⁵QLRLF³⁴⁹ en su extremo C-terminal que corresponde al motivo consenso de unión a β clamp identificado previamente por análisis bioinformáticos en proteínas de unión a β clamp [6]. Con el objeto de determinar si el CBM presente en Pol IV es importante para la unión a β clamp, se analizó si la versión mutante denominada Pol IV Δ 5 es capaz de asociarse al factor de procesividad. En dicha mutante, se delecionaron los últimos 5 aminoácidos de la región C-terminal que comprenden a dicho motivo. Este análisis se realizó comparativamente con la mutante MutS β que posee alterado el sitio conservado de unión a β clamp. La interacción de Pol IV Δ 5 con β clamp no fue detectada en los ensayos de PAGE y FW. Así, no se observó una disminución en la intensidad de la banda de β clamp libre en el gel nativo a medida que se adicionaron concentraciones crecientes de Pol IV Δ 5 (Figura R2C y E). Igualmente, cuando se incubó con β clamp soluble con membranas donde se inmovilizó esta mutante no se detectó la unión de dicho factor (Figura R4). Del mismo modo, la mutante MutS β no fue capaz de asociarse a β clamp cuando dicha interacción fue evaluada por ambas metodologías (Figuras R2D y F; R4).

Finalmente, la asociación de β clamp con las mutantes Pol IV Δ 5 y MutS β fue evaluada por SPR. Se observó un incremento de las RU cuando se inyectó Pol IV Δ 5 en un chip donde se había inmovilizado β clamp (Figura R3C). Dicho resultado contrasta con aquellos obtenidos mediante PAGE y FW, lo cual puede deberse a que Pol IV de *P. aeruginosa* posee un sitio secundario de interacción de baja afinidad que sería revelado por el análisis cinéticos de SPR pero que no se detecta en condiciones de equilibrio. Este resultado coincide con lo reportado en los estudios de Pol IV de *E. coli*, donde es capaz de asociarse a β clamp en un sitio secundario presente en la interfase entre monómeros del factor de procesividad [68, 72]. Otra posibilidad es que en las condiciones del ensayo SPR, la delección del CBM deje expuesto otros residuos que podrían interactuar con β clamp, pero que normalmente no están accesibles. En relación a MutS β , no se encontraron

cambios en los valores de RU cuando se inyecta esta proteína, confirmando que no interacciona con β clamp (Figura R3D).

En conclusión, estos ensayos sugieren que el péptido $^{345}\text{QLRLF}^{349}$ es el principal sitio de interacción de Pol IV con β clamp, a la vez que se corroboró que la mutante MutS $^{\beta}$ es incapaz de unirse al factor de procesividad, tal como había sido previamente descrito [131].

MutS no interacciona directamente con Pol IV

Antes de proceder a realizar los ensayos de unión Pol IV- β clamp en presencia de MutS, se investigó por SPR y FW si existe interacción directa entre Pol IV y MutS (Figura R5). En el primer caso, se inmovilizó a Pol IV al chip para luego inyectar MutS por el sistema microfluídico (Figura R5A). De la misma manera, se inmovilizó MutS a la superficie del chip y Pol IV fue inyectada en el sistema microfluídico (Figura R5B). En ambos casos, no se detectó un aumento de las RU cuando se inyectó MutS o Pol IV, respectivamente, indicando que estos factores no se asocian. Por el contrario, se observó un incremento de las RU cuando se inyectó a β clamp, que fue utilizado como control positivo de que las proteínas inmovilizadas preservaban su actividad (Figura R5A y B). Posteriormente, en los experimentos de FW, se inmovilizó MutS y MutS $^{\beta}$ en membranas de nitrocelulosa y se incubaron independientemente con una solución que contenía Pol IV, Pol IV $\Delta 5$, o β clamp (Figura R5C y D). De la misma manera, se inmovilizó a Pol IV, Pol IV $\Delta 5$ y β clamp y se incubó con una solución que contenía MutS (Figura R5E). Como se observó en los ensayos de SPR, no se detectó interacción entre MutS y Pol IV pero sí entre MutS- β clamp y Pol IV- β clamp. Finalmente, se probó si MutS interacciona con la subunidad α de la Pol replicativa Pol III mediante FW (Figura R5C). No se detectó asociación entre ambos factores en estas condiciones. Por lo tanto, estos resultados indicarían que MutS no se asocia a las ADN polimerasas Pol III α y Pol IV.

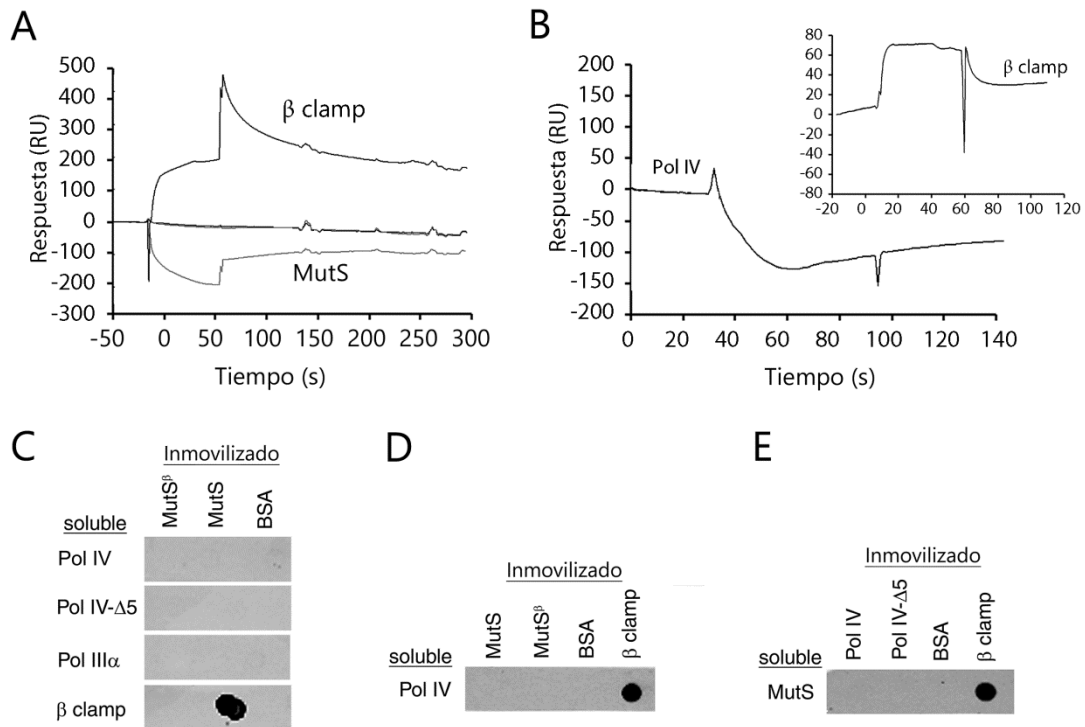


Figura R5. Análisis de las interacciones bimoleculares entre MutS y las ADN polimerasas mediante SPR y FW. (A-B) Sensogramas para el ensayo de Pol IV y MutS. En A, Pol IV fue inmovilizada a la superficie de un chip, seguida de la inyección de MutS (0,5 μ M) o β clamp (0,5 μ M). En B, MutS fue inmovilizada en la superficie del chip, seguida de la inyección de Pol IV (2 μ M) o β clamp (0,25 μ M). Se muestran curvas representativas de una réplica (n=3). (C-E) Las proteínas purificadas fusionadas a His₆ (D) o Strep II (C y E) fueron inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa, y luego incubadas con las proteínas solubles purificadas Strep III (D) y His₆ (C y E). Las interacciones proteicas fueron detectadas utilizando anticuerpos anti-His o anti-Strep según corresponda, los cuales reconocen a las proteínas agregadas en solución. Como control negativo se inmovilizó albumina sérica bovina (BSA). Las concentraciones utilizadas fueron: 2 pmol de proteína purificada por spot; y 0,25; 2,0; y 0,5 μ M de proteínas solubles en los paneles C, D y E respectivamente. Se muestran experimentos representativos en cada caso.

I.b- Análisis de la unión de Pol IV a β clamp en presencia de MutS

MutS inhibe la interacción entre Pol IV y β clamp compitiendo por el bolsillo hidrofóbico presente en β clamp.

Con el fin de determinar si MutS es capaz de modular la asociación de Pol IV a β clamp, se realizaron ensayos donde se analizó la interacción Pol IV- β clamp en presencia de MutS. En el caso de SPR, se inmovilizó Pol IV a la superficie del chip y luego se inyectó β clamp solo o pre-incubado con concentraciones crecientes de MutS. Tal como se muestra en la

Figura R6A, β clamp fue capaz de interactuar con Pol IV ya que se observa un incremento de las RU cuando se inyecta esta proteína (curva 0 nM de MutS). Sin embargo, dicha asociación fue inhibida por la presencia de MutS, observándose una disminución de las RU a medida que aumenta la concentración de MutS (curvas 0-250 nM de MutS). Contrariamente, la unión Pol IV- β clamp no fue inhibida por la pre-incubación con la mutante MutS $^{\beta}$ (Figura R6B). Este resultado indicaría que Pol IV no es capaz de asociarse a β clamp cuando MutS se encuentra unida a este factor, descartando además la posible formación de un triple complejo MutS- β clamp-Pol IV.

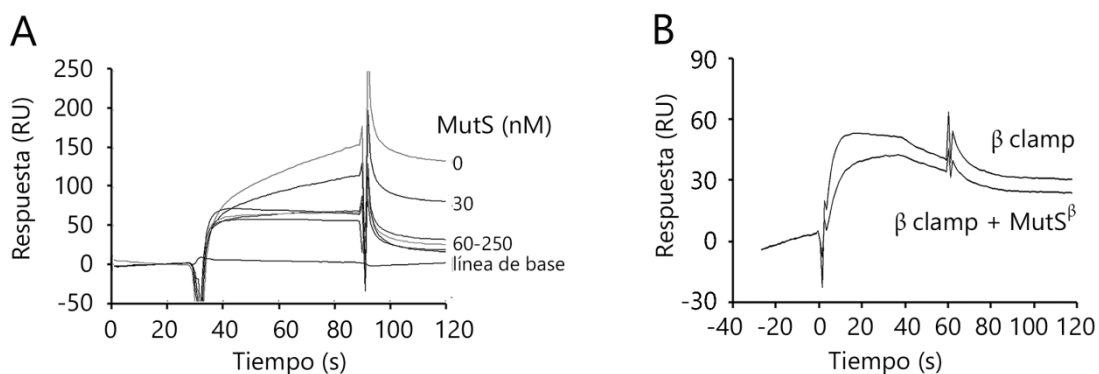


Figura R6. Análisis de la unión de Pol IV- β clamp en presencia de MutS mediante SPR. (A) Interacción de Pol IV con β clamp en presencia de MutS. Pol IV fue inmovilizado a un chip, seguido de la inyección de β clamp (0,25 μ M) sólo o pre-incubado con MutS (30, 60, 125, 190 y 250 nM). (B) Interacción de Pol IV con β clamp en presencia de MutS $^{\beta}$. Pol IV fue inmovilizado a la superficie del chip CM5, seguido de la inyección de β clamp (0,25 μ M) sólo o pre-incubado con MutS $^{\beta}$ (250 nM). Se muestran sensogramas representativos (n=3).

De la misma manera, se examinó la formación del complejo Pol IV- β clamp en presencia de MutS cuando se mezclaron simultáneamente los tres factores. Con tal fin, se analizaron los productos de reacción por el método de PAGE y luego, se cuantificó la intensidad de la banda correspondiente al complejo Pol IV- β clamp. Como control, se utilizó la mutante MutS $^{\beta}$. En la Figura R7A y 7B, se muestra que la proteína MutS, pero no la mutante MutS $^{\beta}$, inhibió la unión de Pol IV y β clamp, ya que se observó una disminución de la intensidad de la banda correspondiente al complejo Pol IV- β clamp a medida que aumentó la concentración de MutS. A 1 μ M de MutS, la cantidad del complejo Pol IV- β clamp disminuyó un 55% en relación al control en ausencia de MutS, mientras que no fue detectado a 3 μ M de MutS (Figura R7B). Estas reacciones fueron analizadas mediante ensayos Western blot

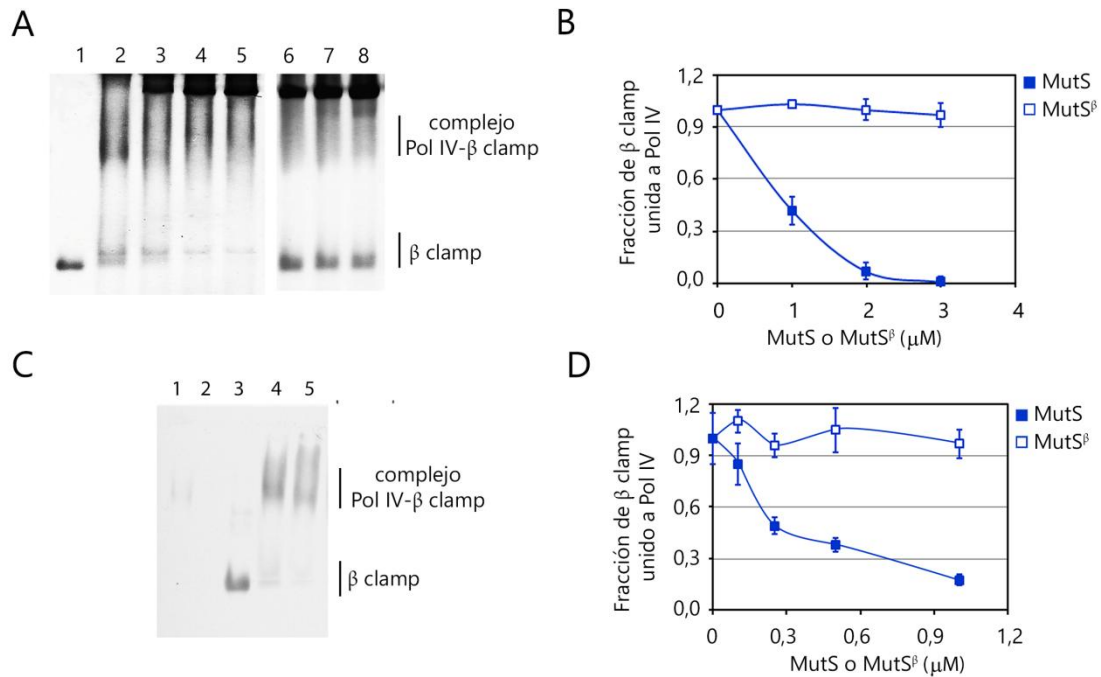


Figura R7. Ensayos de competencia entre Pol IV y MutS por β clamp mediante PAGE y FW. (A) Ensayo de competencia mediante PAGE. Pol IV (20 μ M), β clamp (2 μ M) y concentraciones crecientes de MutS o MutS ^{β} (1, 2 y 3 μ M, carriles 3-5 y 6-8 respectivamente) fueron incubados simultáneamente. Los productos de la reacción fueron analizadas en geles nativos de poliacrilamida 8-16% (P/V). Reacciones de control: β clamp solo (carril 1) o incubado con Pol IV (carril 2). (B) Cuantificación de los ensayos de competencia por PAGE. El eje de las X representa la concentración de MutS o MutS ^{β} en la reacción y el eje de las Y representa la fracción de β clamp unido a Pol IV obtenido a partir de la cuantificación de la intensidad de la banda del complejo Pol IV- β clamp. El valor 1 corresponde a la intensidad de banda en la reacción control donde se incubó Pol IV y β clamp en ausencia de MutS o MutS ^{β} . (C) Ensayo de Western Blot. Se analizaron mezclas de Pol IV (20 μ M), β clamp (2 μ M) y MutS (1 μ M) de manera simultánea tal como se describió en el panel A. Luego, se detectó a β clamp-His₆ mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti His₆. Los carriles corresponden a las siguientes reacciones: 1) Pol IV-Strep III; 2) MutS-Strep III; 3) β clamp-His₆; 4) Pol IV-Strep III y β clamp-His₆; 5) Pol IV-Strep III, β clamp-His₆ y MutS-Strep III. (D) Ensayo de competencia por FW. Se inmovilizó Pol IV-Strep III (3 pmol) en una membrana de nitrocelulosa, que luego fue incubada con una solución que contenía β clamp-His₆ (0,25 μ M) solo o mezclado simultáneamente con concentraciones crecientes de MutS-Strep III o MutS ^{β} -Strep III (0,10; 0,25; 0,50; y 1,00 μ M). La interacción de β clamp con Pol IV fue detectada utilizando un anticuerpo anti His₆. El grafico muestra la fracción de β clamp unido en función de la concentración de MutS o MutS ^{β} , donde 1 corresponde a la intensidad del spot control en ausencia de MutS (β clamp solo). Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

donde se detectó a β clamp con el fin de confirmar la identidad de la banda correspondiente al complejo Pol IV- β clamp (Figura R7C). En el carril 3 se observa la migración correspondiente a β clamp, la cual es menor ante el agregado de Pol IV, revelando la presencia del complejo Pol IV- β clamp (carril 4). En presencia de MutS (1 μ M,

carril 5), la intensidad de dicha banda fue reducida un 51%, valor que es similar al obtenido a partir del ensayo PAGE (Figura R7B). Así, este ensayo nos permitió confirmar la identidad del complejo Pol IV- β clamp. Cabe mencionar que el complejo MutS- β clamp no pudo ser detectado ya que no fue posible realizar la transferencia de las proteínas con alto peso molecular desde el gel nativo a la membrana de nitrocelulosa. Resultados similares fueron observados mediante FW, donde se inmovilizó a Pol IV a una membrana de nitrocelulosa y se incubó con una solución que contenía β clamp o la mezcla de este factor con concentraciones crecientes de MutS. La interacción de β clamp soluble con Pol IV inmovilizada disminuyó a medida que se incrementó la concentración de MutS en solución, efecto que no fue detectado con la mutante MutS^B (Figura R7D). Estos ensayos demostraron que Pol IV no es capaz de asociarse al factor de procesividad cuando MutS se encuentra presente.

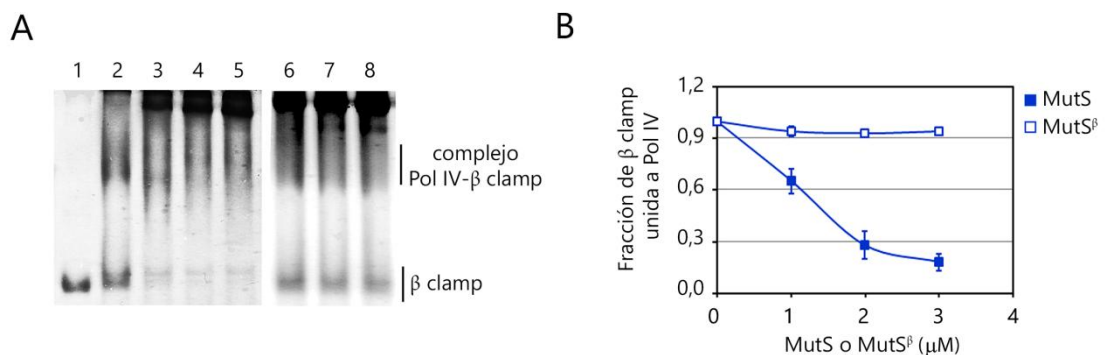


Figura R8. Ensayos de desplazamiento de Pol IV del anillo de β clamp por MutS mediante PAGE.(A). Se llevaron a cabo reacciones donde se pre-incubó a Pol IV (20 μ M) y β clamp (2 μ M) y luego, se agregaron concentraciones crecientes de MutS o MutS^B (1, 2 y 3 μ M, carriles 3-5 y 6-8, respectivamente). Los productos de la reacción fueron analizados en geles nativos de poliacrilamida 8-16% (P/V). Reacciones de control: β clamp solo (carril 1) o incubado con Pol IV (carril 2). (B) Cuantificación de los ensayos de desplazamiento por PAGE. Se graficó la concentración de MutS o MutS^B (eje de las X) vs la fracción de β clamp unido a Pol IV (eje de las Y) obtenido a partir de la cuantificación de la intensidad de la banda correspondiente a Pol IV- β clamp considerando como 1 la intensidad de banda en la reacción control donde se incubó Pol IV y β clamp. Las barras de error representan el desvío estándar (n=3).

Finalmente, se determinó si MutS es capaz de desplazar a Pol IV cuando esta enzima se encuentra formando un complejo con β clamp, para lo cual se incubó Pol IV y β clamp a fin de preformar el complejo y luego, se agregaron concentraciones crecientes de MutS (Figura R8A). Mediante el análisis de las mezclas de reacción por PAGE se encontró que la fracción de β clamp unida a Pol IV disminuyó a medida que se agregaron concentraciones

crecientes de MutS, alcanzando un valor de 0,18 a 3 μ M de MutS (Figura R8B). Por el contrario, la versión MutS ^{β} no interrumpió la interacción Pol IV- β clamp. En resumen, estos resultados demuestran que MutS inhibe la formación del complejo Pol IV- β clamp, así como es capaz de desplazar a esta Pol del factor replicativo.

Como se mencionó en la Introducción, estudios previos demostraron que los factores que interaccionan con β clamp utilizan un motivo conservado (CBM) que se une al bolsillo hidrofóbico presente en el anillo [6]. Por ello, se evaluó si MutS y Pol IV interaccionan con β clamp a través del mismo sitio, es decir, del bolsillo hidrofóbico. Con tal fin, se analizó si el péptido MQSDLFA, que corresponde al motivo conservado de interacción de MutS con β clamp localizado en el C-terminal, es capaz de inhibir la interacción Pol IV- β clamp. Para ello, se mezclaron simultáneamente Pol IV, β clamp (a una concentración donde la mayoría de Pol IV se encuentra asociada a β clamp) y concentraciones crecientes del péptido. Luego, se analizaron las reacciones por PAGE y se cuantificó la intensidad de la banda correspondiente al complejo β clamp-péptido, la cual migra a la misma altura que β clamp debido al bajo peso molecular del péptido (Figura R9A y B). Como se observa en la Figura R9C, el péptido inhibió la interacción Pol IV- β clamp. Como se esperaba, la adición del péptido interrumpe también la interacción MutS- β clamp, aunque en menor medida. Esto puede deberse a que la dicha interacción posee una mayor afinidad que la asociación Pol IV- β clamp. Así, estos experimentos aportan evidencia de que MutS y Pol IV comparten un mismo sitio de interacción en β clamp, que correspondería al bolsillo hidrofóbico [6, 7].

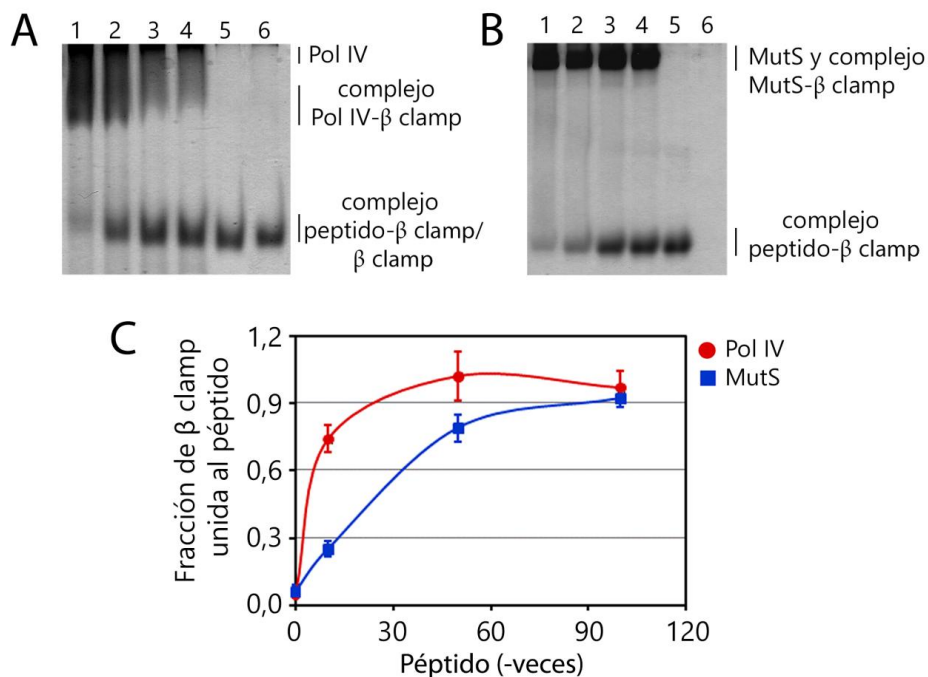


Figura R9. Estudio de la interacción entre MutS o Pol IV y β clamp en presencia del péptido MQSDLFA mediante PAGE. Pie de figura en la siguiente página.

Figura R9. Estudio de la interacción entre MutS o Pol IV y β clamp en presencia del péptido MQSDLFA mediante PAGE. (A-B) β clamp (2 μ M) fue incubado con Pol IV (20 μ M) o MutS (6 μ M) respectivamente, en ausencia (carril 1, paneles A y B) o presencia del péptido MQSDLFA, y luego fueron analizados en geles nativos de poliacrilamida al 8-16%. Las concentraciones del péptido agregadas a las reacciones fueron 10, 50 y 100 veces más altas que las concentraciones de Pol IV y MutS (carriles 2 a 4, paneles A y B). Los controles fueron: β clamp incubado con el péptido (100 veces más, carril 5, paneles A y B), β clamp solo (carril 6, panel A) y péptido solo (carril 6, panel B). Cabe destacar que la banda correspondiente al complejo β clamp-péptido migra de forma similar a la banda de β clamp libre, por lo cual asumimos que la banda a la altura de β clamp, cuya intensidad aumenta cuando se agregó péptido a las reacciones de Pol IV- β clamp y MutS- β clamp, corresponde al complejo β clamp-péptido. (C) Cuantificación del ensayo. El eje de las X representa la concentración de péptido agregada en relación a la concentración de Pol IV o MutS y el eje de las Y representa la fracción de β clamp unida al péptido, correspondiendo 1 al valor en la condición en ausencia de Pol IV o MutS (carril 5).

Ic- Efecto de diferentes sustratos de ADN sobre las interacciones entre MutS, β clamp y Pol IV

Dado que las proteínas objeto de estudio en este trabajo participan en el metabolismo del ADN, se ha demostrado que son capaces de interactuar con dicha molécula. Por ejemplo, β clamp tiene una alta afinidad por ADN “primeado” (ADNp), es decir, ADN que tiene un extremo 3' libre donde se pueden incorporar nucleótidos durante la síntesis de ADN, mientras que se une con baja afinidad a ADN doble cadena (ADNdc) [17]. Por otro lado, Pol IV tiene baja afinidad por ADN por lo cual necesita unirse a β clamp para su actividad [67], mientras que MutS tiene gran afinidad por sustratos ADNdc que contengan MMso InDels y se une débilmente a ADNdc [131, 134]. Además, hay diversos trabajos que encontraron que el ADN puede modificar la afinidad de las interacciones de β clamp con los factores que se unen a esta molécula o bien la competencia entre dichas proteínas por el anillo [135]. Por ello, el objetivo de esta sección es analizar si diferentes estructuras de ADN afectan ya sea las interacciones bimoleculares o la competencia entre MutS y Pol IV por β clamp.

Efecto de las estructuras de ADN sobre las asociaciones Pol IV- β clamp y MutS- β clamp

De acuerdo a lo expuesto, se determinó en primer lugar si la presencia de distintas estructuras de ADN modifica la afinidad de Pol IV y MutS por β clamp. Con tal finalidad, se

mezclaron concentraciones constantes de Pol IV- β clamp y MutS- β clamp en presencia de diferentes sustratos de ADN. Los sustratos utilizados fueron ADN simple cadena (ADNsc), ADNdc, ADNdc con un MM GT (GT-ADNdc), ADNp y ADNp con un MM GT (GT-ADNp). Luego, dichas mezclas se analizaron mediante PAGE (Figura R10A) y se cuantificó la intensidad de la banda correspondiente a β clamp libre, la cual se utilizó para calcular la fracción de β clamp unido a Pol IV o MutS (Figura R10B). En el caso de Pol IV, la presencia de ADN no afecta significativamente su unión a β clamp. Esto puede deberse a que en estas condiciones Pol IV interacciona débilmente con los sustratos de ADN mientras que no se detectó asociación entre β clamp y dichas estructuras (Figura R12C). Por el contrario, la fracción unida de β clamp a MutS fue 3,5 veces mayor en presencia específicamente de GT-ADNp. Este efecto podría deberse a que dicho sustrato de ADN aumenta la afinidad entre ambos factores o bien, podría estar causado por un mayor acercamiento de las proteínas favorecido por la estructura GT-ADNp, ya que MutS reconoce el GT mientras que β clamp tiene una alta afinidad por ADNp. Para descartar la última hipótesis, se realizaron ensayos de PAGE donde se mezclaron concentraciones crecientes de MutS $^{\beta}$ con una concentración constante de β clamp en presencia de GT-ADNp con el fin de determinar la interacción de MutS $^{\beta}$ - β clamp en estas condiciones. Cabe destacar que MutS $^{\beta}$ posee una afinidad por el GT-ADNdc similar a la proteína salvaje [131]. MutS $^{\beta}$ no fue capaz de asociarse a β clamp en presencia de GT-ADNp, ya que no se observaron cambios en la intensidad de banda correspondiente a β clamp libre (Figura R10C y 10D), sugiriendo que dicho sustrato de ADN podría modificar la afinidad de la interacción MutS- β clamp. En este sentido, resultados preliminares indicarían que la afinidad de MutS por β clamp esta incrementada en presencia de este sustrato ya que la K_D estimada mediante PAGE fue $1.09 \pm 0.48 \mu\text{M}$ (1,5 veces menor a la K_D en ausencia de ADN). En conclusión, la presencia de los sustratos de ADN estudiados no altera la interacción entre Pol IV y β clamp, mientras que MutS tendría una mayor afinidad por el anillo en presencia del sustrato GT-ADNp.

Diferentes estructuras del ADN pueden modular la habilidad de MutS para inhibir la interacción Pol IV- β clamp

A continuación, se examinó si la habilidad de MutS para inhibir la unión de Pol IV a β clamp está modulada por estas estructuras de ADN. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de FW en donde se inmovilizó Pol IV y en solución se agregó β clamp solo, β clamp y MutS, ó bien β clamp y MutS en presencia de los sustratos de ADN. El gráfico de la Figura R11 A representa la fracción de β clamp unida a Pol IV, donde se considera 1 la intensidad del

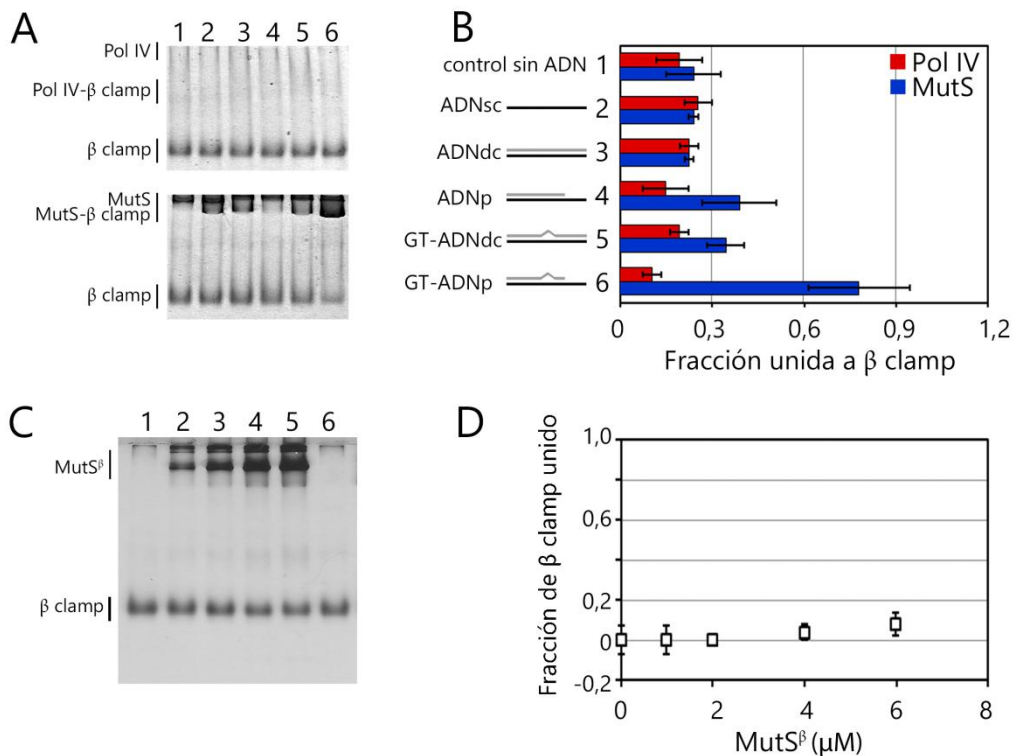


Figura R10. Efecto de diferentes sustratos de ADN sobre las interacciones de β clamp con Pol IV y MutS mediante PAGE. (A-B) Interacciones Pol IV- β clamp y β clamp-MutS, respectivamente. Pol IV (2 μ M) y MutS (1 μ M) fueron individualmente mezcladas con β clamp (2 μ M) en presencia de diferentes sustratos de ADN (15 μ M). Las reacciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 8-16% (A) y se cuantificaron las bandas correspondientes a β clamp libre para calcular la fracción de β clamp unido (B). Los sustratos utilizados fueron ADN simple cadena (ADNsc), ADN doble cadena (ADNdc), ADN doble cadena con un MM GT (GT-ADNdc), ADN primeado (ADNp) y ADN primeado con un MM GT (GT-ADNp) (carriles 2 al 6, respectivamente). Además se incluyó una reacción control sin ADN (carril 1). Cabe mencionar que en estas condiciones, un 10-20% de β clamp se encuentra asociado a Pol IV o MutS. (C-D) Ensayo de interacción de MutS $^{\beta}$ - β clamp en presencia de GT-ADNp. Se incubó una concentración fija de β clamp (2 μ M) con concentraciones crecientes de MutS $^{\beta}$ (1,0; 2,0; 4,0; 6,0 μ M, carriles 2 a 5) en presencia de GT-ADNp (15 μ M). Luego, se examinaron los productos de reacción en geles de poliacrilamida (C) y se calculó la fracción de β clamp unido en función de la concentración de MutS $^{\beta}$ (D). Además, se agregaron dos reacciones controles: β clamp (carril 1) y β clamp mezclado con GT-ADNp (carril 6).

spot (proteína inmovilizada) en presencia de β clamp. Los resultados muestran que cuando se agregó MutS, la fracción soluble de β clamp unido a Pol IV fue de 0,59, indicando que MutS inhibe la interacción Pol IV- β clamp. Las estructuras ADNdc y GT-ADNdc no afectaron en la capacidad de MutS para competir por el factor de procesividad, ya que la fracción de β clamp unido a Pol IV no varió significativamente (0,56 y 0,60, respectivamente). En tanto que la fracción de β clamp unido a Pol IV en presencia de

ADNsc fue de 1,04, indicando que esta estructura suprime la capacidad de MutS para prevenir la formación del complejo Pol IV- β clamp. Por otro lado, en presencia de los ADN primeados (ADNp y GT-ADNp) MutS inhibió en mayor medida la interacción Pol IV- β clamp ya que la fracción de β clamp unido a Pol IV se redujo (0,30 y 0,45, respectivamente). Este último resultado fue confirmado utilizando ensayos de SPR (Figura R11B), en los cuales Pol IV fue inmovilizada a la superficie del chip y se inyectó al sistema microfluídico β clamp solo o pre-incubado con MutS (30 o 60 nM) en presencia o ausencia de los sustratos ADNp y GT-ADNp. En ausencia de MutS y los sustratos de ADN, β clamp se unió a Pol IV ya que se observó un aumento en las RU. Cuando este factor fue pre-incubado con MutS a una concentración de 60 nM, la unión a Pol IV fue inhibida (respuesta negativa), mientras que la proteína de reparación no fue capaz de impedir la asociación Pol IV- β clamp a 30 nM. En esta última condición, la interacción Pol IV- β clamp fue inhibida cuando se agregaron los sustratos de ADN independientemente, confirmando que ADNp y GT-ADNp mejoran la capacidad de MutS para competir con Pol IV por el factor de procesividad.

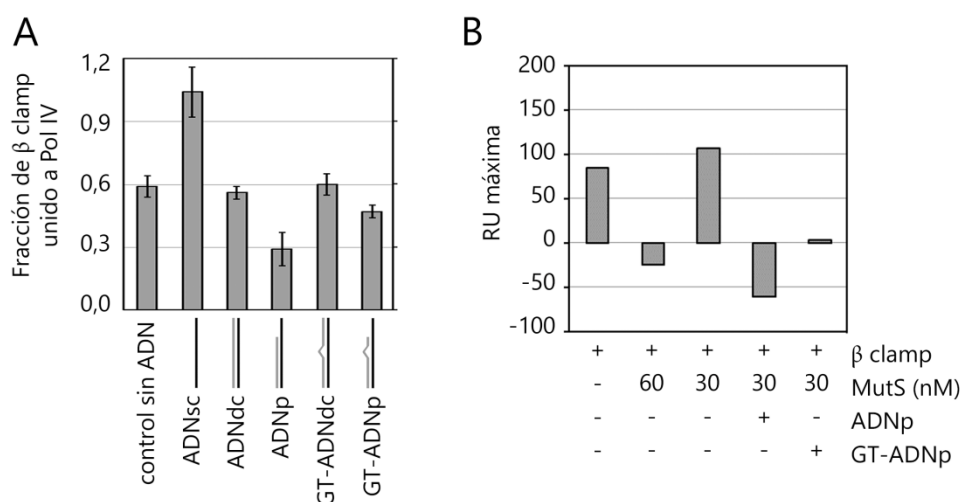


Figura R11. Efecto de diferentes sustratos de ADN sobre la inhibición de la interacción Pol IV- β clamp por MutS. (A) Ensayo de FW. Pol IV-Strep III (3 pmol) fue inmovilizada en una membrana de nitrocelulosa y posteriormente incubada con una solución conteniendo β clamp-His₆ (0,25 μ M) mezclado con MutS-Strep III (0,50 μ M) y diferentes sustratos de ADN (15 μ M). La unión de Pol IV a β clamp fue detectada mediante un anticuerpo que reconoce el His₆ presente en β clamp. Luego, se cuantificó la intensidad de los spots de Pol IV para calcular la fracción de β clamp unido a Pol IV (Eje Y del gráfico), tomando como 1 la intensidad de los spots en la condición control correspondiente a β clamp soluble en ausencia de MutS. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). (B) Ensayo de SPR. Pol IV fue inmovilizada en la superficie del chip. β clamp (0,25 μ M) solo o preincubado con MutS (30 or 60 nM) y ADN (15 μ M) fue inyectado sobre la superficie del chip. En el gráfico se representa los valores máximos de unión (RU) de una de las réplicas (n=3).

Como conclusión general, estos resultados indicarían que cada sustrato impone una regulación específica sobre la capacidad de MutS para competir con Pol IV por la interacción con β clamp.

Efecto de los sustratos de ADN en la migración de MutS en geles nativos

En los experimentos de PAGE, se observó que las bandas correspondiente a MutS y/o el complejo MutS- β clamp exhibían una mayor migración en presencia de GT-ADNp (Figura R10A, panel inferior, comparar carril 1 con carril 6). Cabe recordar que por esta metodología no fue posible separar las bandas correspondientes a MutS y MutS- β clamp, por lo cual a priori no se conoce si el efecto de este sustrato ocurre sobre la proteína de reparación sola o sobre el complejo. Entonces, se estudió mediante PAGE si los sustratos de ADN modifican la migración de las proteínas individuales, β clamp y MutS. Para el caso de β clamp no se observaron cambios en la migración (Figura R12A), mientras que la incubación de MutS con los sustratos de ADN mostró marcados cambios en la migración de dicha proteína (Figura R12 B). El ADNsc no produjo cambios significativos en la migración de MutS. Por el contrario, en presencia de los sustratos ADNdc, ADNp y GT-ADNdc, se observó una banda difusa más retardada con respecto a la banda de MutS en ausencia de ADN. De manera interesante, en presencia de GT-ADNp, MutS forma una banda bien definida que presentó una mayor movilidad en el gel nativo. A modo de control, se realizaron geles nativos que luego fueron teñidos con Bromuro de Etidio (BEt) para corroborar que ambas proteínas formaran un complejo con los sustratos de ADN. En el caso de MutS, se observó asociación entre la proteína y las estructuras de ADN (Figura R12D). Sin embargo, la banda de β clamp no mostró marca con BEt, indicando que el anillo no fue capaz de interactuar con los sustratos de ADN en las condiciones estudiadas (Figura R12C).

A continuación, se estudió el efecto sobre MutS de extender el extremo 3' libre en el sustrato GT-ADNp hasta obtener un GT-ADNdc (Figura R12E). Es decir, se generaron sustratos de ADN donde incrementó el número de nucleótidos existente entre el GT y el extremo 3' libre desde 8 pb (GT-ADNp) a 18 pb (GT-ADNdc). Luego estas estructuras fueron incubadas con MutS y las mezclas se analizaron mediante PAGE. En presencia de los sustratos GT-ADNp que poseen entre 8 a 13 nucleótidos entre el GT y el extremo 3' (Figura R12E, Carriles 2-7), MutS presentó una migración mayor en relación a la proteína

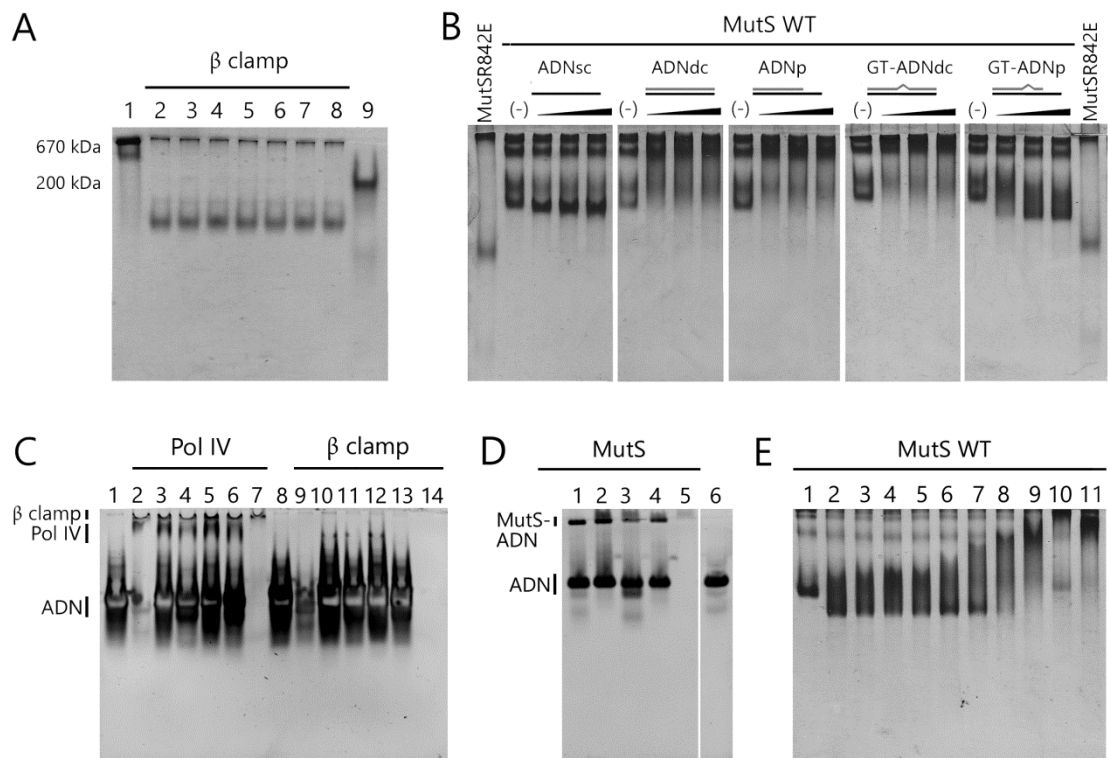


Figura R12. Efecto de diferentes sustratos de ADN sobre la migración de MutS en geles nativos (PAGE). (A) β clamp ($4 \mu\text{M}$) fue incubado con los sustratos ($8 \mu\text{M}$) ADN simple cadena (ADNsc), ADN doble cadena (ADNdc), ADN doble cadena con un MM GT (GT-ADNdc), ADN primeado (ADNp) y ADN primeado con un MM GT (GT-ADNp) (carriles 3-7 respectivamente). Como control, se realizó por duplicado una reacción en ausencia de ADN, indicada con el símbolo (-) (carriles 2-8). Se agregaron dos marcadores de peso molecular: Tiroglobulina (670kDa , carril 1) y β amilasa (200kDa , carril 9). Las muestras fueron analizadas en geles nativos de poliacrilamida 7% teñidos con Coomassie blue. (B) MutS ($2 \mu\text{M}$) fue mezclada con concentraciones crecientes de diferentes sustratos de ADN ($2, 4$ y $8 \mu\text{M}$). En cada condición, se agregó una reacción control sin ADN, indicada con el símbolo (-). El primer y último carril corresponde a la mutante dimérica MutSR842E. Las reacciones fueron analizadas en geles nativos de poliacrilamida 5% teñidos con Coomassie blue. (C) Pol IV ($7.5 \mu\text{M}$) o β clamp ($2 \mu\text{M}$) fue incubado con los sustratos de ADNsc, ADNdc, GT-ADNdc, ADNp y GT-ADNp ($15 \mu\text{M}$) (carriles 2-6 y 9-13, respectivamente). Se añadieron las siguientes reacciones de control: ADNdc (carril 1), ADNp (carril 8), Pol IV (carril 7) y β clamp (carril 14). Las muestras fueron analizadas en gel nativo de poliacrilamida 10% teñidos con bromuro de etidio. Se indican las bandas correspondientes a β clamp, Pol IV y ADN. (D) Incubación de MutS ($2\mu\text{M}$) con diferentes sustratos de ADN (ADNdc, GT-ADNdc, ADNp y ADNp, carriles 2-5 respectivamente). Se agregó una reacción control conteniendo MutS (carril 1) y una con ADN (carril 6) Las muestras fueron analizadas en gel nativo de poliacrilamida 10% teñidos con bromuro de etidio. Se indican las bandas correspondientes al complejo MutS-ADN y ADN. (E) Efecto de la longitud del primer respecto al GT. MutS ($2\mu\text{M}$) fue incubada con sustratos GT-ADNp ($8 \mu\text{M}$) que tienen diferente longitud de nucleótidos a partir del MM GT (8 a 16 pb, Carriles 2 a 10). Se agregó además una reacción control sin ADN (carril 1) y una reacción en presencia de GT-ADNdc (carril 11). Las muestras fueron analizadas en geles nativos de poliacrilamida 5% teñidos con Coomassie blue.

en ausencia de ADN. Por el contrario, aquellos sustratos que poseen 14, 15 o 16 nucleótidos entre el GT y el extremo 3' (Figura R12E, Carriles 8-10) indujeron una migración similar a la observada para GT-ADN_{dc} (Figura R12E, Carril 11). Estos resultados sugieren que MutS podría sufrir una compactación o bien un cambio de su estado oligomérico en presencia de un MM próximo al extremo 3' libre, que producirían una mayor migración en geles nativos.

En solución MutS de *P. aeruginosa* se encuentra principalmente como tetrámero y su capacidad de oligomerización depende de su región C-terminal [130]. Con el propósito de determinar si el cambio en la movilidad de MutS inducido por GT-ADN_p se debe a un cambio en el estado oligomérico de tetrámero a dímero, se comparó la migración del complejo MutS-GT-ADN_p con la versión mutante dimérica MutSR842E (Figura R12B). Esta versión mutante presenta una sustitución de la arginina por un ácido glutámico en la posición 842 del C-terminal de MutS, lo cual previene la tetramerización [130]. Como se observa en la Figura R12B, la migración de MutS en presencia de GT-ADN_p es menor que la observada para MutSR842E. Asimismo, cuando la mutante MutSR842E fue incubada con las diferentes especies de ADN, así como aquellos sustratos GT-ADN_p donde se aumentó la distancia entre el GT y el extremo 3', se encontró que dichos sustratos tienen el mismo efecto sobre la migración que el descrito previamente para MutS (Figura R13A-B). Los resultados indicarían que el efecto particular de la estructura de ADN es independiente del estado oligomérico de MutS ya que se observa el mismo comportamiento para el tetrámero de MutS y el dímero de MutSR842E. De la igual manera, se observó el mismo fenómeno en la mutante MutS^β, indicando que el motivo conservado de unión a β clamp tampoco está implicado en los efectos mencionados (Figura R13C).

Igualmente, se testeó si esta estructura de ADN produce un cambio de migración en los dominios involucrados en la dimerización y tetramerización de MutS, HTH/C-ter y C-ter, respectivamente. El dominio C-ter (57 aa) corresponde a un péptido que comprende los residuos 799 a 855 de MutS mientras que el HTH/C-ter (92 aa) abarca los residuos 764-855 de la proteína. Las fusiones de dichos dominios a la proteína monomérica de unión a la maltosa (Maltose Binding Protein ó MBP) son capaces de inducir su tetramerización *in vitro*. Contrariamente, la mutante HTH/C-ter R842E-MBP no es capaz de formar tetrámeros, por lo que se encuentra en estado dimérico [130]. En los siguientes ensayos se incubaron los sustratos de ADN con C-ter-MBP, HTH/Cter-MBP y HTH/CterR842E-MBP de

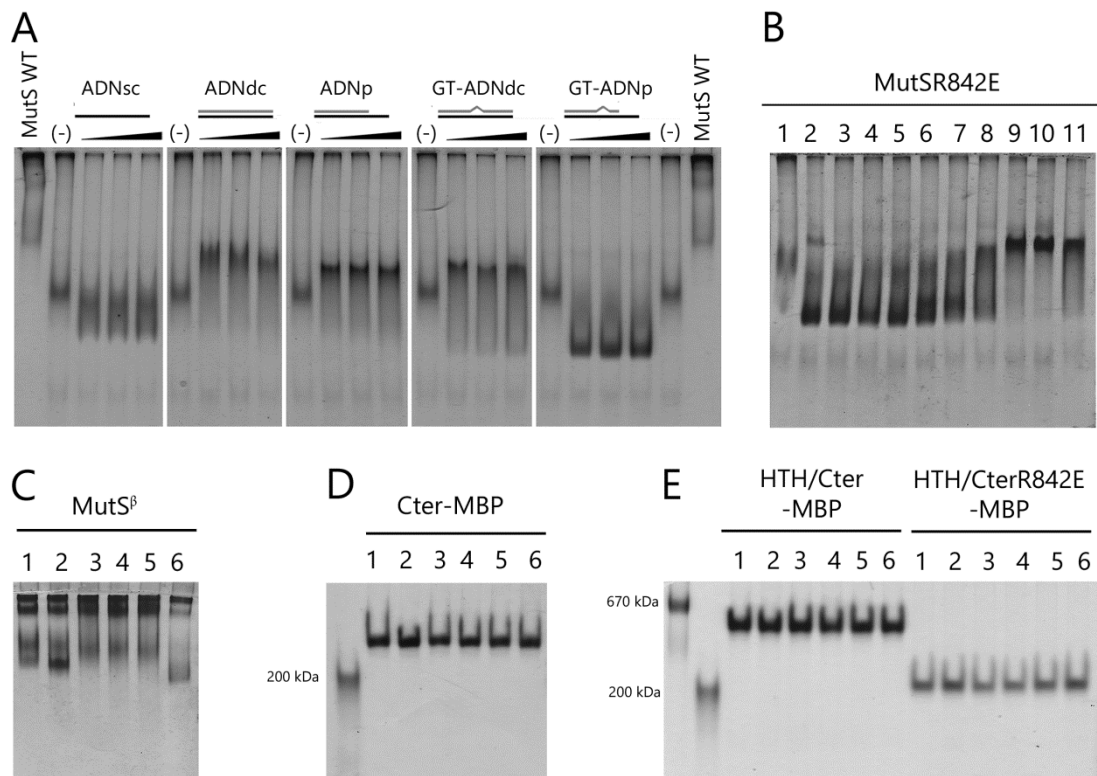


Figura R13. Efecto de diferentes sustratos de ADN sobre la migración de MutSR842E, MutS β y las fusiones C-ter-MBP, HTH/C-ter-MBP y HTH/C-terR842E-MBP en geles nativos (PAGE). (A) MutSR842E (2 μ M) fue mezclada con concentraciones crecientes de diferentes sustratos de ADN (2, 4 y 8 μ M). En cada condición, se agregó una reacción control sin ADN, indicada con el símbolo (-). El primer y último carril corresponde a MutS WT. (B) Efecto de la longitud del primer respecto al GT sobre la mutante MutSR842E. 2 μ M de proteína fue incubada con sustratos GT-ADNp (8 μ M) que tienen diferente longitud de nucleótidos a partir del MM GT (8 a 16 pb, Carriles 2 a 10). Se agregó además una reacción control sin ADN (carril 1) y una reacción en presencia de GT-ADNdc (carril 11). (C) MutS β (2 μ M), (D) C-ter-MBP (2 μ M), (E) HTH/C-ter-MBP (2 μ M) y HTH/C-terR842E-MBP (2 μ M) fueron mezcladas con diferentes sustratos de ADN (15 μ M). Los sustratos utilizados fueron ADNsc, ADNdc, GT-ADNdc, ADNp y GT-ADNp (Carriles 2-6). Se agregaron además reacciones de control sin ADN (en cada caso, carril 1) y marcadores de peso molecular (Tiroglobulina -640 kDa- y β amilasa -200 kDa-). En todos los ensayos, las reacciones fueron analizadas en geles nativos de poliacrilamida 5% teñidos con Coomassie blue.

forma independiente y se analizó su migración mediante por PAGE. En ninguno de los casos se encontraron cambios en la migración de las fusiones en relación al control sin ADN, indicando que es necesaria la proteína completa para observar dicho fenómeno (Figura R13D-E).

En síntesis, estos experimentos muestran que la presencia de diferentes estructuras de ADN modifica la migración de MutS en geles nativos. Las evidencias sugieren que este

efecto se debe a modificaciones conformacionales y no a cambios en el estado oligomérico de MutS. Particularmente, la presencia de un MM de tipo GT próximo al extremo 3' libre en un sustrato ADNp produce un cambio en la migración de MutS en geles nativos indicando que la proteína podría adquirir una conformación más compacta. Las implicancias de estos resultados en el modelo planteado se analizan en la sección de discusión. Actualmente, se están llevando a cabo diferentes estudios estructurales y bioquímicos para dilucidar el rol de los sustratos de ADN sobre la estructura de MutS. Asimismo, se está caracterizando detalladamente las interacciones Pol IV- β clamp y MutS- β clamp en presencia de los sustratos mencionados mediante SPR.



RESULTADOS - CAPÍTULO II. ANÁLISIS DEL ROL DE LA INTERACCIÓN MUTS- β CLAMP EN LA REPLICACIÓN DEPENDIENTE DE POL IV EN CÉLULAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Si bien los resultados bioquímicos del primer capítulo indicarían que MutS inhibe la interacción entre Pol IV y β clamp, a la vez que las estructuras de ADN presentes en los sitios de replicación mejoran significativamente esta acción de MutS, nuestra intención fue corroborar si esta competencia ocurre *in vivo*. Así, el objetivo del presente capítulo es determinar cuál es la relevancia de esta nueva función de MutS en la bacteria *P. aeruginosa* en condiciones normales de crecimiento (sección II.a) así como en condiciones de estrés (sección II.b). Con este propósito, en este capítulo se realizaron diferentes estudios comparativos utilizando dos cepas de *P.aeruginosa*: la mutante *mutS β* , en el cual se realizó el intercambio alélico del gen *mutS* por el gen *mutS β* que codifica la versión mutante MutS β incapaz de interactuar con β clamp [131], y la cepa parental (WT) en condiciones donde Pol IV se encuentra ausente, posee una expresión basal o se sobreexpresó ectópicamente.

II.a – Mutagénesis espontánea dependiente de Pol IV en células bajo condiciones de crecimiento normales

La expresión ectópica de Pol IV induce un aumento significativo de los niveles de mutagénesis cuando MutS no interacciona con β clamp

Estudios previos demostraron que la sobreexpresión de Pol IV en las bacterias *E. coli* [39-41], *B. subtilis* [44], *P. pútida* [42] y *P. aeruginosa* [43] causan un leve aumento de la frecuencia de mutación en genes cromosomales. Particularmente, se ha determinado que dicho efecto es dependiente de la interacción de Pol IV con β clamp para células de *E. coli* y *B. subtilis*. Se postula que bajo estas condiciones Pol IV accede a los sitios de replicación mediante su asociación al factor de procesividad favoreciendo la síntesis de ADN no dañado con una baja fidelidad [64].

Con el objeto de determinar si MutS es capaz de controlar la interacción entre Pol IV y β clamp *in vivo*, y en consecuencia, el acceso de esta Pol a los sitios de replicación, en primer

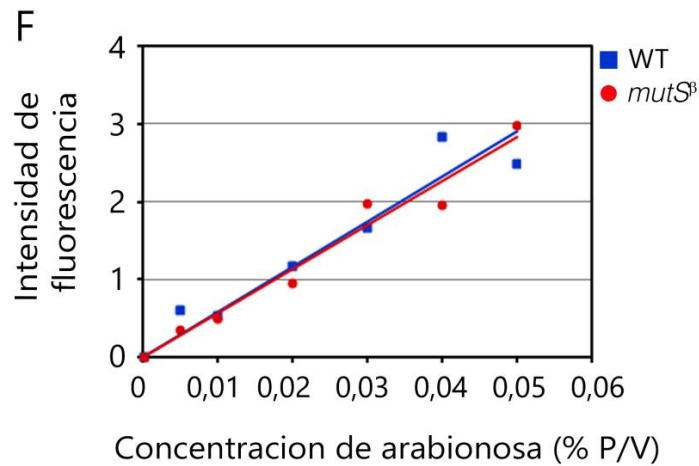
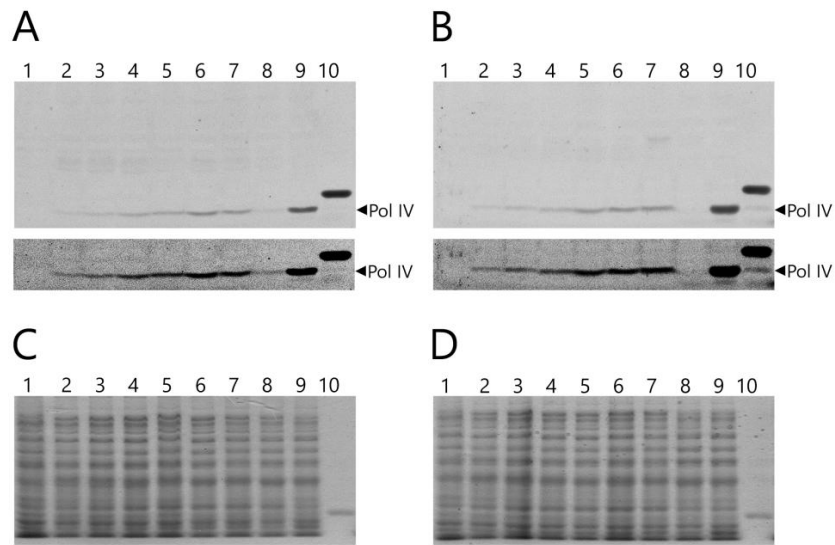


Figura R14. Detección de la expresión ectópica de Pol IV mediante Western blot. Pol IV fue expresada fusionada al péptido de afinidad His₆ utilizando el plásmido inducible por arabinosa p5BAD. La sobreexpresión de Pol IV, cuyo peso molecular predicho a partir de la secuencia de nucleótidos es de 38,9 kDa, fue monitoreada mediante un anticuerpo anti His₆. Los paneles A y B corresponden a las membranas de Western blot (parte superior: imagen de la membrana no saturada, parte inferior: imagen de la membrana saturada) mientras que los paneles C y D corresponden a los geles de proteína total perteneciente a las cepas WT y *mutS*^β, respectivamente. Carril 1: control de células que contienen el vector vacío (p5BAD) inducido con 0,050% de arabinosa; carriles 2 a 7: células que contienen p5BAD-*dinB* luego de la inducción con 0,005, 0,010, 0,020, 0,030, 0,040 y 0,050% de arabinosa, respectivamente; carril 8 y 9: células conteniendo p5BAD-*dinBD8A* y p5BAD-*dinBD5*, respectivamente, luego de la inducción con 0,050% de arabinosa; carril 10: control 100 ng de β clamp-His (≈40,6 kDa). (E) Curva de dosis-respuesta para la expresión de Pol IV-His₆. La señal de fluorescencia (eje Y) fue medida a partir de los carriles 2-7 y graficada en función de la concentración de arabinosa (eje X) utilizada para la inducción de la expresión. Se muestra un experimento representativo.

lugar se estudió el efecto de la sobreexpresión de Pol IV sobre la mutagénesis espontánea en células creciendo exponencialmente de las cepas *mutS^β* y WT. Para determinar los niveles de mutagénesis espontánea se estimó la tasa de mutación de resistencia a los antibióticos Ciprofloxacina (Cip^R), Amikacina (Amk^R) y Rifampicina (Rif^R). Dado que la resistencia a cada antibiótico está mediada por mutaciones en diferentes genes cromosomales fue posible examinar si la mutagénesis observada es particular de un gen o un fenómeno global que se produce en el cromosoma de la bacteria. En *P. aeruginosa*, los genes involucrados en cada resistencia son: *nfxB*, *gyrA* y *parC* para Cip^R, *mexZ* para Amk^R y *rpoB* para Rif^R [132, 133, 136, 137]. Para sobreexpresar de Pol IV, se clonó el gen que codifica esta polimerasa, denominado *dinB*, en un plásmido de expresión inducible por arabinosa (p5BAD) donde Pol IV fue expresada como una fusión al péptido His₆. La expresión ectópica del gen *dinB* fue detectada en las cepas *mutS^β* y WT conteniendo el vector p5BAD-*dinB* mediante Western blot donde se utilizó un anticuerpo anti His₆ (Figura R14). Los niveles de expresión de Pol IV fueron similares en ambas cepas, los cuales aumentan linealmente en función de la concentración de arabinosa (0,005- 0,050%, Figura R14, paneles A y B, carriles 2-7). Por el contrario, Pol IV no fue detectada en células que contenían el vector vacío p5BAD (Figura R14, paneles A y B, carril 1).

La sobreexpresión de Pol IV a partir del plásmido p5BAD-*dinB* incrementó la tasa de mutación en las cepas WT y *mutS^β* respecto al control con el plásmido vacío p5BAD (Figura R15B). Cabe mencionar que la tasa de mutación de células que contienen el plásmido p5BAD no mostró diferencias significativas con la tasa de mutación de las cepas WT y *mutS^β* (Figura R15B). La cepa WT exhibió un aumento de 4-, 3- y 2- veces en la tasa de mutación a Cip^R, Amk^R y Rif^R, respectivamente, independientemente de los niveles de expresión de Pol IV (Figura R15A). Esto es, si bien la concentración más alta de arabinosa (0,050 %) resulta en un aumento de la expresión de Pol IV de 10 veces respecto a la menor concentración (0,005%), no se encontraron diferencias significativas en la tasa de mutación en todas las concentraciones de arabinosa testeadas. Por el contrario, en la cepa *mutS^β* se observó un incremento de la mutagénesis concomitante con la expresión de Pol IV, alcanzando un máximo de 22, 15 y 17 veces en las tasas de mutación a Cip^R, Amk^R y Rif^R, respectivamente, respecto al control con el plásmido p5BAD (Figura R15A).

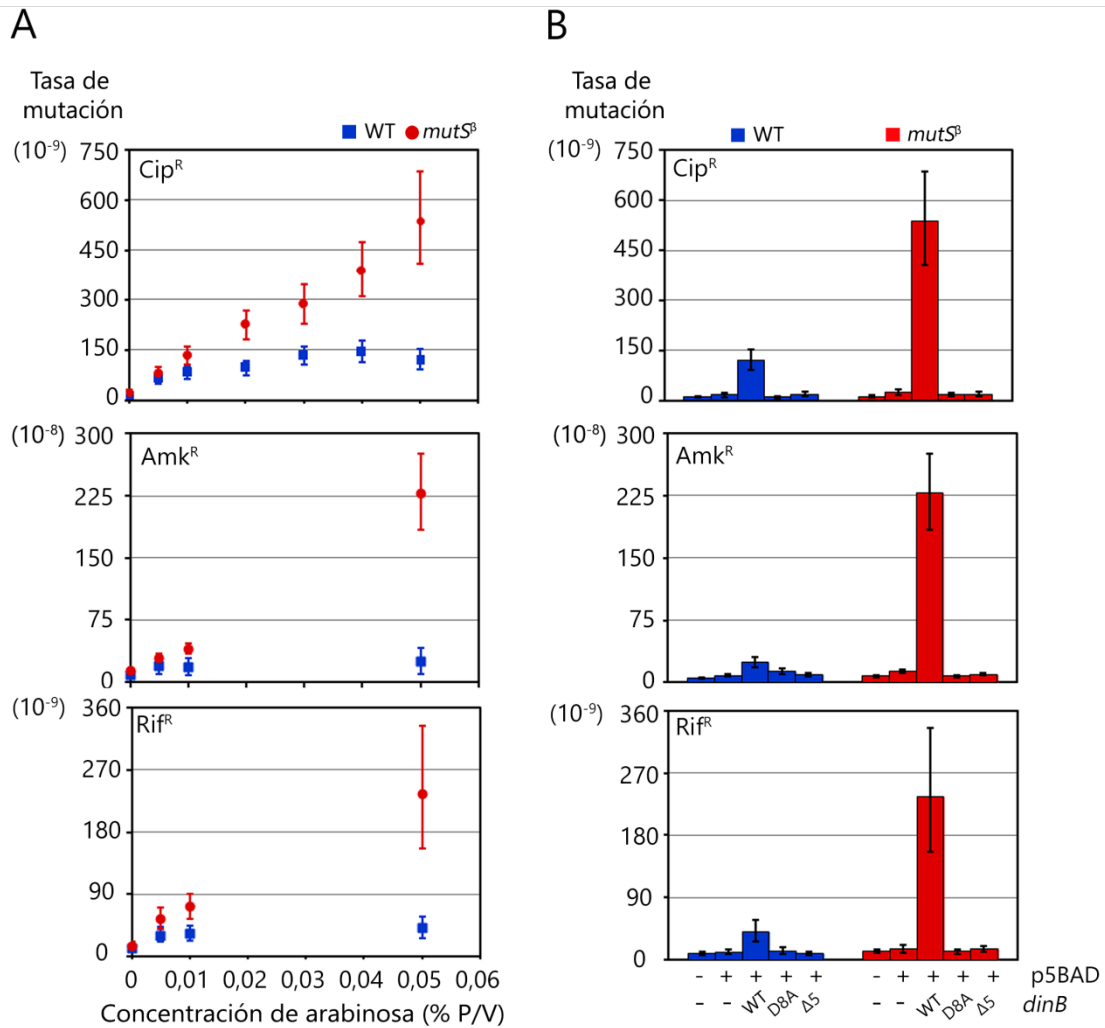


Figura R15. Efecto de la sobreexpresión de Pol IV, Pol IV D8A y Pol IV Δ5 sobre la mutagénesis espontánea. (A) Tasa de mutación a la resistencia a Ciprofloxacina (Cip^R), Amikacina (Amk^R) y Rifampicina (Rif^R) de las cepas WT y *mutS*^Δ que sobreexpresan Pol IV a partir del plásmido p5BAD-*dinB* en función de diferentes concentraciones de arabinosa (0,005-0,050 %). Cada punto corresponde al valor de tasa de mutación con su intervalo de confianza del 95%. (B) Tasa de mutación a Cip^R, Amk^R y Rif^R de las cepas WT y *mutS*^Δ que contienen los plásmidos p5BAD, p5BAD-*dinB*, p5BAD-*dinBD8A* o p5BAD-*dinBΔ5* luego de la inducción con 0,050% de arabinosa. Se incluye la tasa de mutación de ambas cepas sin plásmido. Se indican las tasas de mutación con sus intervalos de confianza del 95 %.

Con el fin de determinar si la actividad mutagénica de Pol IV depende de su interacción con β clamp y actividad catalítica, se midió la tasa de mutación en células que poseen el plásmido p5BAD conteniendo versiones mutantes del gen *dinB* que codifican Pol IV Δ5 y Pol IV D8A. La mutante Pol IV Δ5 posee una delección de los últimos cinco aminoácidos que corresponde al principal sitio de interacción con β clamp. La mutante Pol IV D8A contiene una sustitución del residuo ácido aspártico por una alanina presente en el sitio catalítico I, por la cual no posee actividad polimerasa [43]. No se observó un incremento significativo en la tasa de mutación de las cepas WT y *mutS*^Δ cuando la sobreexpresión de estos alelos

presentes en el plásmido p5BAD fue inducida a una concentración de arabinosa del 0,050%, (Figura R15 B). El ensayo de Western blot reveló que los niveles de expresión a 0,050% de arabinosa de ambas mutantes no fueron comparables con los niveles de Pol IV. Pol IV $\Delta 5$ presentó una expresión 4 y 6 veces mayor mientras que Pol IV D8A, 4 y 10 veces menor en las cepas WT y *mutS β* , respectivamente (Figura14, paneles A y B, carriles 8 -D8A- y 9 - $\Delta 5$ -). Cabe destacar, que los niveles de Pol IV D8A fueron similares a los observados de Pol IV a bajas concentraciones de arabinosa (0,005% y 0,010%), donde la mutagénesis estaba aumentada.

En resumen, estos resultados demuestran que la expresión ectópica de Pol IV a partir de un plásmido produce mutaciones en el cromosoma de *P. aeruginosa*, y que esta mutagénesis dependiente de Pol IV es considerablemente mayor en la cepa *mutS β* que en la cepa WT. Asimismo, la interacción de Pol IV con β clamp y su actividad ADN polimerasa son necesarias para la inducción de mutagenésis por esta enzima.

Pol IV constituye un factor clave para la mutagénesis espontánea en la cepa mutS β

Dado que las tasas de mutación a los diferentes antibióticos de las cepas WT y *mutS β* no difieren significativamente (Figura R16A, R15A y B), se caracterizó el espectro de mutación con el fin de estudiar la especificidad mutacional en detalle de la cepa *mutS β* comparado con la cepa WT. Para ello, se utilizó como reportero el gen *nfxB*, que permite detectar un amplio rango de mutaciones y analizar si existe diferencias en los niveles de mutagénesis entre ambas cadenas de ADN (Strand bias) y el contexto de secuencia preferido de mutación[133].

Mediante el secuenciamiento de la región codificante de *nfxB* y su región promotora, se observaron los seis tipos de sustituciones de base, deleciones e inserciones de un nucleótido (1pb-del y 1pb-ins) y deleciones de 2-100 nucleótidos (>1bp-del) en todas las cepas analizadas. Cuando se compararon los espectros entre las cepas WT y *mutS β* , se encontró que la tasa de la sustitución de base AT>CG es significativamente mayor (2 veces) en la cepa *mutS β* (Figura R15B). Para determinar si esta transversión se debe a la actividad de Pol IV, se generaron células deficientes en esta enzima mediante la deleción del gen *dinB* en las cepas *mutS β* y WT. La deficiencia de Pol IV disminuyó significativamente la tasa de las sustituciones AT>CG (2 veces), CG>AT (2 veces) y AT>GC

(3 veces) en el contexto *mutS^β* (cepas *mutS^β* vs *mutS^βΔdinB*). Notablemente, la delección de *dinB* no modificó la tasa de ninguna de las mutaciones en el contexto WT (cepas WT vs *dinB*) (Figura R15B). Asimismo, y con la finalidad de corroborar que las mutaciones AT>CG, CG>AT y AT>GC son generadas por la actividad de Pol IV, se analizó el espectro de *nfxB* en condiciones donde esta Pol provoca un aumento significativo de la mutagénesis tal como en las células que sobreexpresan esta enzima. Efectivamente, la sobreexpresión de Pol IV en las cepas *mutS^β* y WT provoca un incremento de las mutaciones AT>GC, AT>CG, CG>GC y >1pb-del respecto al control de células sin plásmido. La tasa de estas mutaciones fue 13, 9, 3 y 6 veces más alta en la cepa *mutS^β* respecto a lo observado en la cepa WT (Tabla R1).

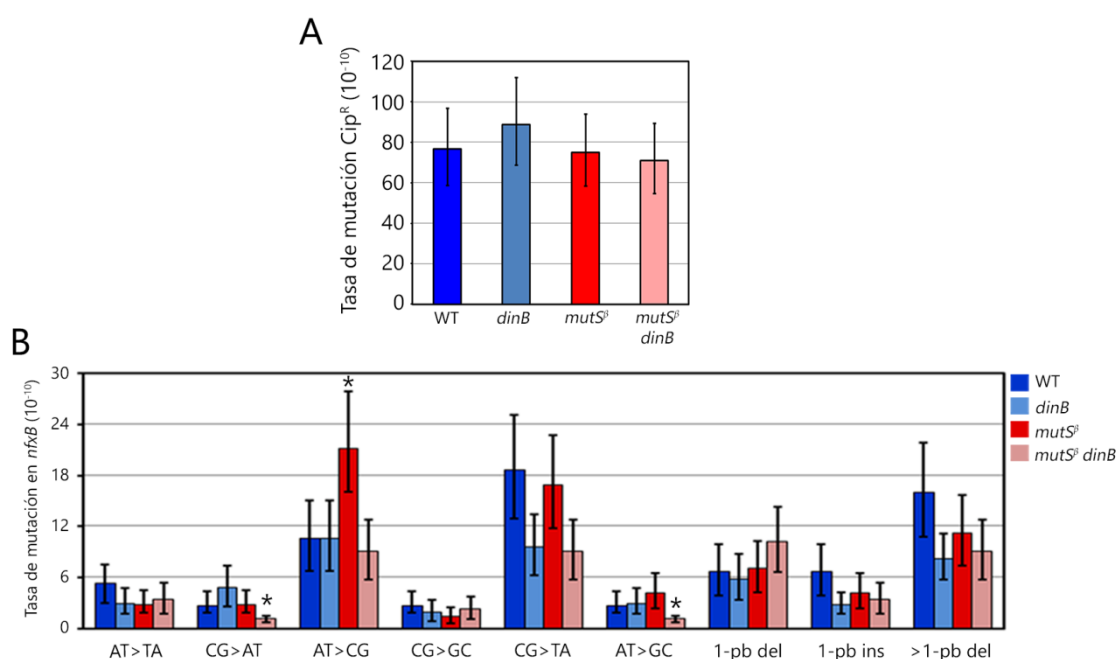


Figura R16. Contribución de Pol IV a la mutagénesis espontánea. (A) Tasa de mutación basal de resistencia a Ciprofloxacina (Cip^R) de las cepas WT, *dinB*, *mutS^β*, y *mutS^βΔdinB*. (B) Las tasas de mutación para cada tipo de mutación detectada en *nfxB* de clones Cip^R fueron comparadas entre las cepas WT, *mutS^β*, *dinB* y *mutS^βΔdinB*. Las barras de error indican los intervalos de confianza del 95%. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas en las tasa de mutación.

En resumen, el análisis de los tipos de mutación indicaría que Pol IV no contribuye a la mutagénesis espontánea en células de *P. aeruginosa* creciendo exponencialmente ya que la inactivación de *dinB* no modificó el espectro de mutación en el contexto WT. Por el contrario, una proporción de las mutaciones espontáneas son generadas por esta ADN Pol de baja fidelidad en la cepa *mutS^β*.

Tabla R1. Tasas para cada mutación en *nfxB*^a

Tipo de mutación	Cepa/Plásmido					
	WT	<i>mutS</i> ^β	<i>dinB</i>	<i>mutS</i> ^β <i>dinB</i>	WT p5BAD <i>dinB</i>	<i>mutS</i> ^β p5BAD <i>dinB</i>
AT>TA	5,4 (3,0-7,5)	2,7 (1,5- 4,5)	3,0 (1,8- 4,8)	3,3 (1,8-5,4)	23,4 (8,1-44,7)	97,8 (27,6- 196,8)
CG>AT	2,7 (1,2-4,5)	2,7 (1,8-4,5)	4,8 (2,7-7,5)	1,2 (0,6-1,5)	47,1 (20,7-81,0)	195,3 (74,7-354,9)
AT>CG	10,8 (6,9-15,0)	21,3 (16,2-27,9)	10,5 (6,9-15,0)	9,0 (5,7-12,9)	117,6 (65,4-180,6)	1074,0 (645,3-1578,9)
CG>GC	2,7 (1,2-4,5)	1,5 (0,6-2,4)	1,8 (0,9-3,3)	2,4 (1,2-3,9)	705,6 (516,3-915,9)	2343,3 (1592,1-3197,1)
CG>TA	18,6 (12,9-25,2)	16,8 (11,7-22,8)	9,6 (6,3-13,5)	9,0 (5,7-12,9)	47,1 (20,7-81,0)	195,3 (74,7-354,9)
AT>GC	1,8 (1,2-4,5)	4,2 (2,4-6,6)	3,0 (1,8-4,8)	1,2 (0,8-1,5)	23,4 (8,1-44,7)	292,8 (128,7-503,1)
1-pb del	6,6 (3,9-9,9)	7,2 (4,2-10,2)	5,7 (3,3-8,7)	10,2 (6,6-14,4)	117,6 (65,4-180,6)	292,8 (128,7-503,1)
1-pb ins	6,6 (3,9-9,9)	4,2 (2,4-6,6)	2,7 (1,8-4,2)	3,3 (1,8-5,4)	23,4 (8,1-44,7)	97,8 (27,6-196,8)
>1-pb del	15,9 (10,8-21,9)	11,4 (7,5-15,6)	8,1 (5,4-10,8)	9,0 (5,7-12,9)	94,2 (49,8-148,2)	585,9 (310,5-921,6)
Total	76,6 (58,8-97,0)	75,1 (58,6-93,9)	60,6 (42,6-75,9)	70,9 (54,8-89,5)	1199,4 (912,0-1523,1)	5370,3 (4072,5-6859,8)

^aLa tasa de mutación y los límites de confianza del 95% (valores entre paréntesis) para cada mutación en *nfxB* fueron calculados como se describe en *Materiales y Métodos* (10^{-10}).

Otro aspecto que se estudió utilizando el reportero *nfxB* fue la preferencia de mutagénesis en una cadena o Strand bias. En términos generales, este parámetro se refiere a que los procesos a los cuales está sometido el ADN, tales como la replicación, reparación o transcripción, operan de manera diferencial en una cadena respecto a la otra. En este trabajo, el concepto de Strand bias hará referencia a que las mutaciones del tipo sustitución de bases se producen preferentemente en una de las cadenas del ADN. Cabe mencionar que nuestro interés en analizar este parámetro se debe a que previamente se observó que la sobreexpresión de Pol IV en *E. coli* aumenta el número de mutaciones preferentemente en la cadena retardada de la replicación [39]. Así, se analizó si cada espectro de sustitución de bases en *nfxB* presenta un Strand bias utilizando el software iMARs [138]. En este programa se puede analizar estadísticamente si existe un Strand bias en los pares de bases dC/dG o dA/dT. Brevemente, en primer lugar el software calcula un valor esperado de la frecuencia de mutación en las bases dG, dC, dA y dT basándose en el supuesto de que las mutaciones se producen al azar independientemente de la cadena. En este cálculo se considera el porcentaje de cada base que contiene el gen *nfxB* y el número de sustituciones de bases que se detectaron en cada cepa. Luego, dicho valor esperado se compara con el valor observado y se realiza un test estadístico. Si existen diferencias significativas en la frecuencia de mutación entre los valores esperados y observados ($p \leq 0,05$) para los pares de bases dC/dG o dA/dT, podría indicar que ocurrió un fenómeno de Strand bias.

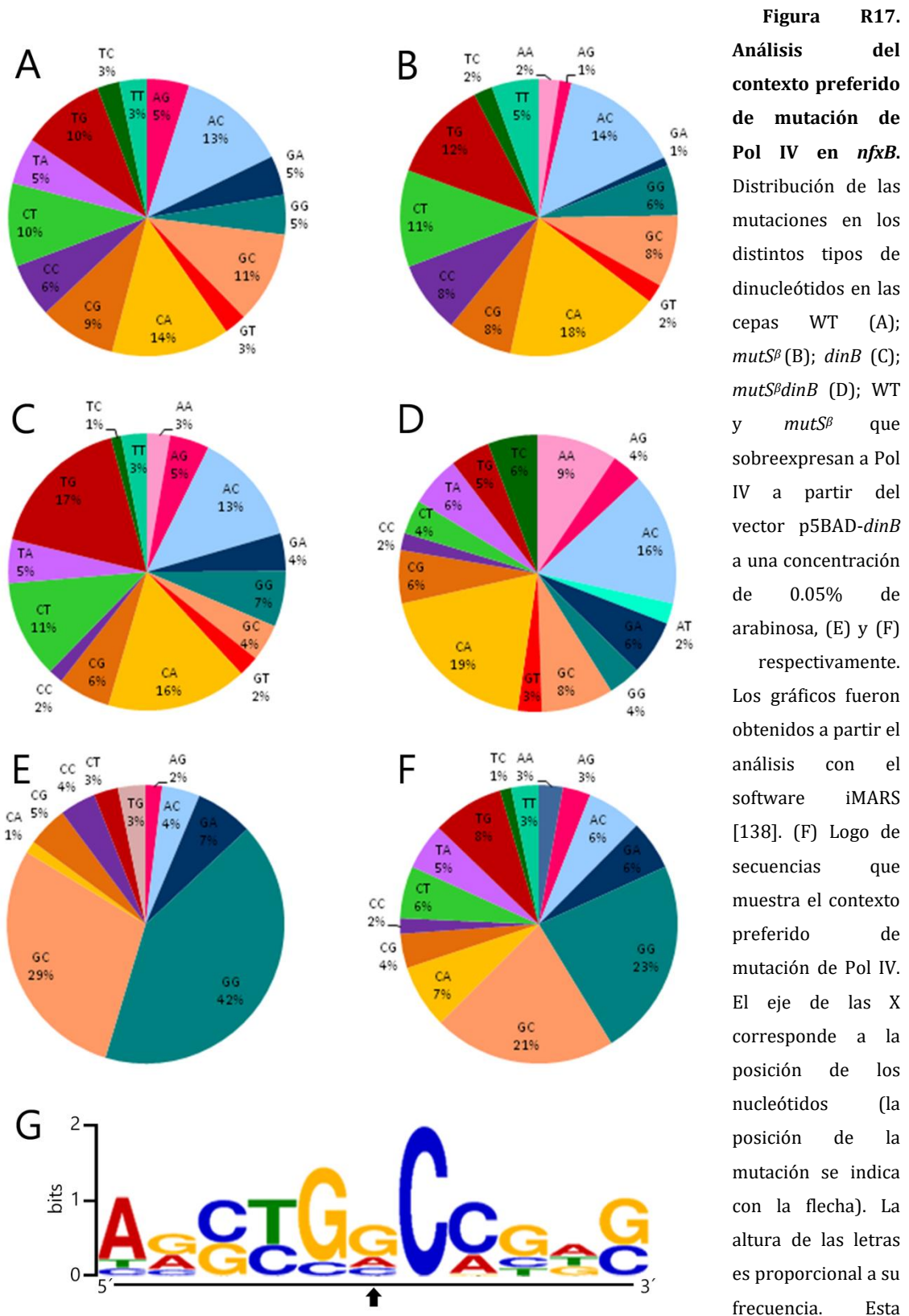
El análisis mediante iMARS arrojó que no existe Strand bias en el espectro de mutación de la cepa WT. En esta cepa, la sobreexpresión de Pol IV produjo un Strand bias mientras que la deficiencia de dicha Pol no tuvo ningún efecto. Por el contrario, en el contexto *mutS^β* se evidenció un Strand bias significativo en el espectro de mutaciones, fenómeno que no fue observado en la cepa *mutS^βdinB*, deficiente en Pol IV. Como era esperado, las células *mutS^β* que sobreexpresan Pol IV mostraron Strand bias (Tabla R2). En síntesis, la actividad de Pol IV produciría una mutagénesis preferencial en una de las cadenas de la horquilla de replicación en la cepa *mutS^β* creciendo exponencialmente pero no en la cepa WT.

Tabla R2. Strand bias para las mutaciones de sustituciones de base*

Cepa	Base	Observado	Esperado	χ^2	p	Cepa	Base	Observado	Esperado	χ^2	p
WT	C	8	9.65	0.61	0.44	<i>mutS^β</i>	C	13	8.04	6.5	0.01
	G	10	8.35				G	2	6.96		
	A	7	7.41	0.02	0.88		A	10	10.59	0.03	0.86
	T	7	7.00				T	10	10.00		
<i>dinB</i>	C	5	8.58	3.22	0.07	<i>mutS^β dinB</i>	C	7	5.90	0.44	0.50
	G	11	7.42				G	4	5.10		
	A	8	9	0.14	0.71		A	8	6.35	1.09	0.30
	T	9	8.50				T	4	6.00		
WT p5BAD- <i>dinB</i>	C	1	18.23	35.10	0.00	<i>mutS^β p5BAD- dinB</i>	C	1	15.01	28.19	0.00
	G	33	15.77				G	27	12.99		
	A	4	3.18	0.55	0.46		A	10	7.94	1.37	0.24
	T	2	3.00				T	5	7.50		

*Análisis en cepas WT y *mutS^β*, deficientes en Pol IV (*dinB*) o que sobreexpresan Pol IV (p5BAD*dinB*)

Finalmente, el análisis del espectro de mutaciones en *nfxB* utilizando iMARS reveló que los dinucleótidos GG y GC fueron preferencialmente mutados en las cepas *mutS^β* y WT que sobreexpresaban Pol IV (Figura R17E y F). Ambos dinucleótidos están en su mayoría presentes en sitios donde ocurren las transversiones CG>GC, la cual corresponde a una de las mutaciones más comunes provocadas por la sobreexpresión de Pol IV. El análisis visual de las secuencias colindantes al sitio de mutación determinó que las mismas ocurren preferentemente en el trinucleótido GGC (el nucleótido mutado está resaltado en negrita) que incluye a los dinucleótidos GG y GC (Figura R17, Tablas A1-6 del anexo). Además, una alta proporción de transversiones AT>GC ocurrieron en el trinucleótido GAC en condiciones de sobreexpresión de Pol IV. Así, estas observaciones sugieren que la secuencia GXC (donde X corresponde al nucleótido mutado) podría representar el contexto preferido de mutación para Pol IV en *nfxB*. Este resultado fue confirmado mediante el análisis de las secuencias correspondientes a las cepas que sobreexpresaron Pol IV utilizando la herramienta bioinformática MEME suite [139]. A partir de dicha herramienta, se obtuvo un logo de secuencias en el cual se destaca la prevalencia del



contexto GXC en el sitio de mutación. Esta especificidad de secuencia para las mutaciones del tipo de sustituciones de base coincide con lo observado en *E. coli*, bacteria donde Pol IV prefiere el contexto de mutación GX [35, 40]. La secuencia GXC fue detectada en el 58 y 89 % de las sustituciones de bases para las cepas *mutS*^β y WT que sobreexpresaban Pol IV, respectivamente. En la cepa WT, el 3 % de las sustituciones de bases ocurrieron en el contexto GXC, mientras que una mayor proporción (14%) de estas mutaciones fue observada en dicho contexto en la cepa *mutS*^β (Tablas 1 a 6 del anexo). En contraste, no se observaron sustituciones de bases dentro de sitios GXC en la cepa *dinB*, mientras que solo se detectó en el 4% de las sustituciones en la cepa *mutS*^β *dinB*. Estas observaciones demuestran que las mutaciones aparecen en el contexto de secuencia GXC con mayor frecuencia en la cepa *mutS*^β que en la cepa WT, y que dichas mutaciones dependen de la presencia de Pol IV, corroborando que esta enzima constituye un factor importante en la mutagénesis espontánea cuando MutS no interacciona con el factor de procesividad.

La mutagénesis producida por la incorporación de 8-oxo-dGTP se encuentra incrementada en la cepa mutS^β.

El análisis del espectro de mutaciones muestra que Pol IV sería responsable de las mutaciones AT>CG, CG>AT y AT>GC en la cepa *mutS*^β. La aparición de la transición AT>GC solo ha sido descrita cuando una O⁴-alquil-timina se aparea con una G durante la replicación [140]. Sin embargo, se ha reportado que las otras sustituciones son generadas cuando existe daño oxidativo, particularmente la presencia de 8-oxo-dGTP, principal lesión oxidativa en nucleótidos. Así, la sustitución AT>CG se produce cuando Pol IV incorpora 8-oxo-dGTP en frente a una A [54]. En tanto que si la 8-oxo-dG se encuentra presente en la cadena molde, se puede aparear con una A, induciendo la aparición de la transversión CG>AT [141]. En *E. coli*, la defensa contra la 8-oxo-dG involucra la acción de varias proteínas, entre las que se encuentra la fosfohidrolasa MutT. Este factor, hidroliza la 8-oxo-dGTP presente en el pool de nucleótidos a 8-oxo-dGMP, previniendo su incorporación durante la síntesis del ADN [142]. Este mecanismo de reparación está conservado en *P. aeruginosa* donde MutT ha sido identificada y fue corroborada su rol central en evitar la mutagénesis causada por dicho nucleótido oxidado [129, 132].

En esta sección, y considerando que Pol IV es capaz de incorporar 8-oxo-dGTP erróneamente, se analizó si la interacción entre MutS y β clamp tiene un rol importante en la mutagénesis de cepas deficientes en la proteína MutT, donde están incrementados los

niveles endógenos del nucleótido 8-oxo-dGTP. Para ello, se midió la tasa de mutación de resistencia a Cip en las cepas *mutT* y *mutS^β mutT* [143]. La cepa *mutS^β mutT* exhibió una tasa de mutación que fue significativamente mayor a la observada en la cepa *mutT* (41 y 51 veces en relación a las cepas WT y *mutS^β*, respectivamente) (Figura R18A). Cabe destacar que esta diferencia resulta importante ya que las cepas deficientes en MutT presentan una alta mutagénesis relativa a la cepa WT (100 veces mayor a WT). Este dato sugiere que en condiciones de crecimiento exponencial cuando MutS no interacciona con β clamp, aumentaría la frecuencia de incorporación de 8-oxo-dGTP al ADN, probablemente por la acción de Pol IV.

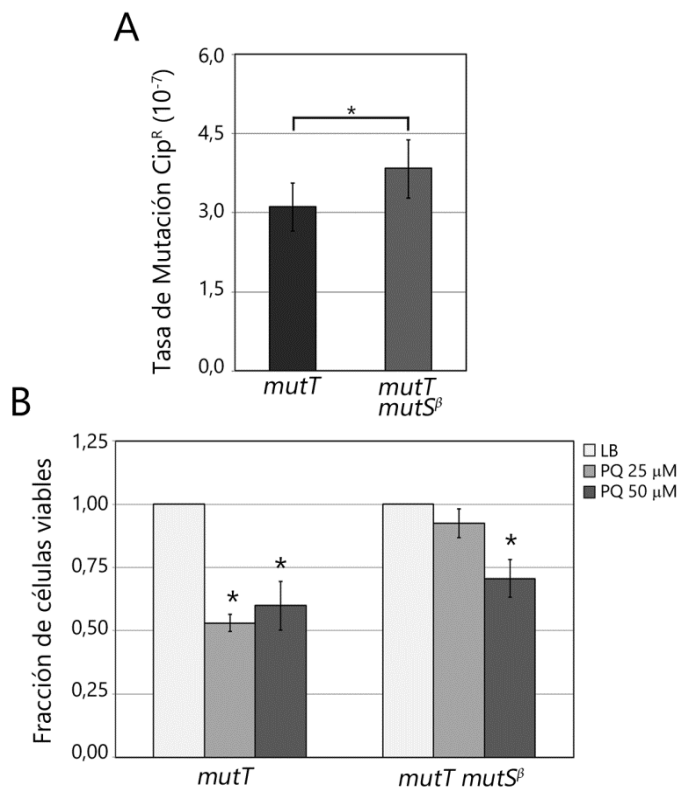


Figura R18. Efecto de la disrupción de la interacción entre MutS y β clamp en el contexto genético *mutT*. (A) Tasa de mutación a Cip^R de las cepas *mutT* y *mutTmutS^β*. Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95% y el * indica diferencia significativa entre las tasa de mutación ($p=0,03$). (B) Sensibilidad al agente oxidante paraquat (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo). Se expusieron cultivos líquidos de cepas *mutT* y *mutTmutS^β* a 25 y 50 μ M de paraquat ($n=3$). Luego, se cuantificó el número de células viable mediante el recuento de las unidades formadoras de colonias. El eje de las Y representa la fracción de células viables siendo 1 el crecimiento en el control en medio LB sin paraquat. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Con * se indica diferencia significativa respecto al control ($p\leq 0,05$).

Como se mencionó anteriormente, las polimerasas alternativas son necesarias para tolerar el daño en el ADN causado tanto por agentes endógenos como exógenos. En este sentido, se encontró que la cepa *mutS^β mutT* es más resistente al tratamiento con el agente oxidante paraquat (PQ) que la cepa *mutT*. Tal como se observa en la Figura R18B, en la cepa *mutT*, la exposición a PQ a concentraciones de 25 y 50 μ M disminuyó significativamente la viabilidad celular a un 50%. En tanto que en la cepa *mutS^β mutT*, el

tratamiento con 25 μM no afectó la viabilidad celular mientras que se observó una disminución significativa en la concentración máxima de PQ (50 μM), mostrando una viabilidad de $\sim 70\%$. Así, estos resultados sugieren que Pol IV podría tener mayor acceso a la replicación en la cepa *mutS β mutT*, protegiendo de las paradas de replicación debidas al daño oxidativo (Función de TLS).

Consecuencias a nivel fenotípico de la acción de Pol IV en el contexto genético mutS β

Si bien en el presente trabajo determinamos que Pol IV posee un rol importante en la mutagénesis espontánea en la cepa *mutS β* pero no incide en la cepa WT, fue de interés analizar si las diferencias en el espectro de mutación del gen *nfxB* se traducen en diferencias a nivel de las variantes fenotípicas de NfxB generadas en ambos contextos genéticos.

El gen *nfxB* codifica para un represor transcripcional que se une al promotor P_{mexCD} del operón *mexCD-opr*. Este operón codifica para una bomba de eflujo que expelle el antibiótico Cip, entre otros compuestos. Mutaciones que inactivan *nfxB* permiten un aumento de la expresión de la bomba de eflujo confiriendo resistencia a Cip [144, 145]. Asimismo, los defectos en NfxB provocan cambios globales en el exo-proteoma y en los endo- y exo-metabolomas en *P. aeruginosa*, indicando que este factor además participa en otros procesos celulares [146]. Cabe mencionar que en etapas tempranas de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* en pacientes FQ, son comunes mutaciones que inactivan *nfxB*, las cuales se consideran importantes para el establecimiento de la infección, a la vez que confirman el rol central de NfxB en la fisiología celular de esta bacteria [120].

Para determinar los niveles de actividad de las variantes de NfxB, se utilizó una construcción reportera donde el P_{mexCD} se fusionó al operón *luxCDABE* [132]. Cuando *nfxB* se inactiva, los genes del operón aumentan su expresión y se observa un incremento de la luminiscencia. Así, se introdujo esta construcción en el cromosoma de las cepas WT, *mutS β* , *dinB* y *mutS β dinB*, y luego, se aislaron clones Cip^R donde se determinó el nivel de inactivación de *nfxB* midiendo los niveles de luminiscencia. Como se observa en la Figura R19A-B, donde se muestran los repiques de clones Cip^R en placas de LB, se aislaron clones con diferente grado de luminiscencia para cada cepa. La cuantificación de los niveles de luminiscencia a partir de cultivos líquidos (Figura R19C-D) muestra que un 30% de los

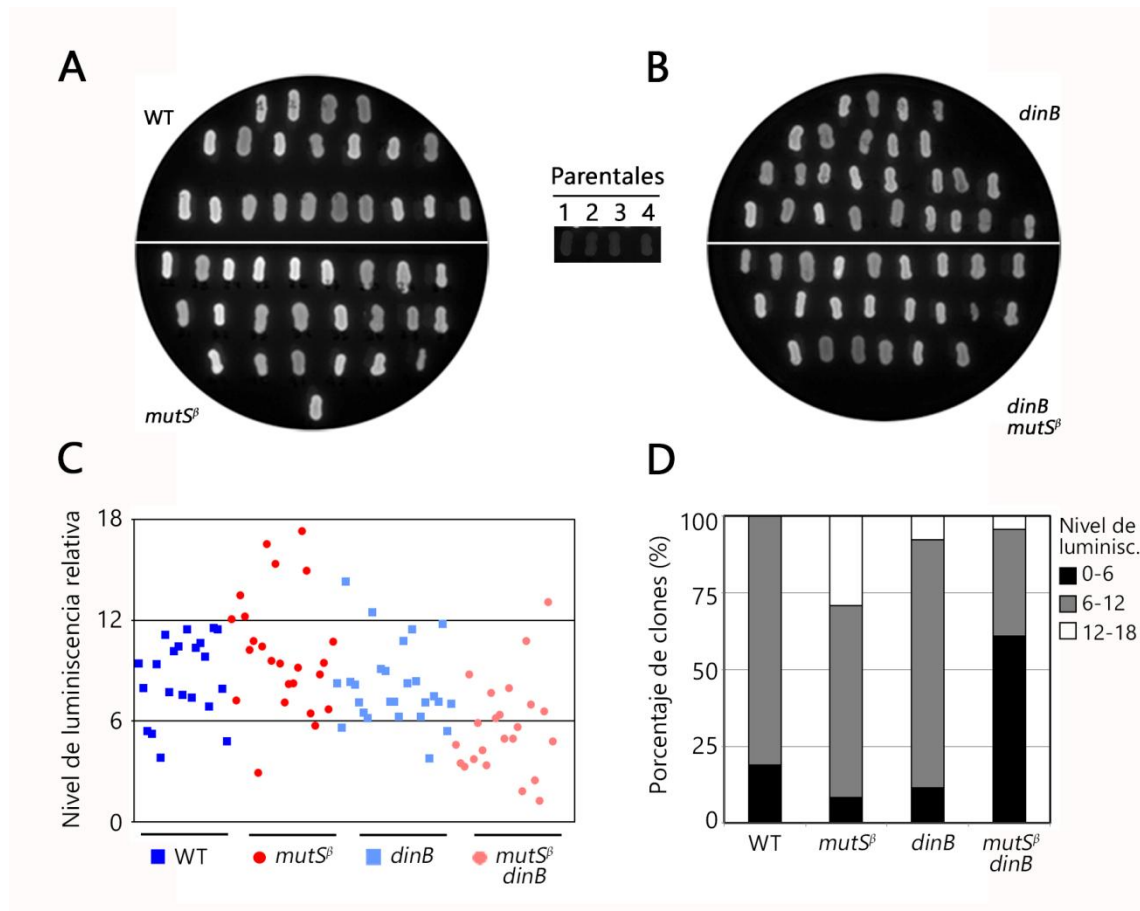


Figura R19. Análisis de los niveles de inactivación de *nfxB* mediante el repórtero $P_{mexCD}::luxCDABE$.

(A-B) Repiques de clones Cip^R en placas de LB aislados a partir de cultivos independientes de las cepas WT, *mutS β* , *dinB* y *mutS β dinB* que contienen la fusión del promotor de la bomba de eflujo *mexCD-oprJ* al operon *luxCDABE*. Se muestran la luminiscencia basal de los piques de los clones parentales. Correspondencias a las cepas: (1) WT, (2) *mutS β* , (3) *dinB* y (4) *mutS β dinB*. (C) Niveles de luminiscencia. Para cada clon Cip^R se cuantificó el nivel de luminiscencia relativa a la biomasa celular, determinada a partir de la absorbancia a 600nm, en cultivos creciendo exponencialmente. Dicho valor se utilizó para calcular las veces que aumentó la luminiscencia en relación a la cepa parental a partir de los cuales se aislaron los clones Cip^R . Cabe mencionar que las cepas WT, *mutS β* , *dinB* y *mutS β dinB* parentales presentaron valores de luminiscencia basales similares. (D) Las poblaciones de clones de las cuatro cepas fueron clasificadas en tres categorías en base al grado de luminiscencia: baja (0-6, color negro), media (6-12, color gris) y alta (12-18, color blanco). El eje de las Y representa el porcentaje de clones de cada categoría y el eje de las X las cepas WT, *mutS β* , *dinB* y *mutS β dinB*.

clones de la cepa *mutS β* tienen niveles de luminiscencia marcadamente superiores, es decir, poseen una versión de *nfxB* altamente inactiva. Asimismo, en esta cepa, se detectaron clones Cip^R con luminiscencia media que alcanzaron un 63% del total. Llamativamente, solo un 4% de los clones con un alto nivel de luminiscencia fueron observados en la cepa *mutS β dinB*, indicando que probablemente Pol IV posee un rol

importante en su generación en la cepa *mutS^β*. Incluso, en este contexto genético, predominan clones con niveles bajos de luminiscencia (61%). En relación a la cepa WT, la población Cip^R fue dominada por clones con niveles de luminiscencia medio (81 %). La cepa *dinB* exhibió un comportamiento similar, lo cual sugiere que Pol IV no posee un rol importante en la generación de los clones Cip^R. Esto coincide con el hecho que Pol IV no está involucrada en la mutagénesis espontánea en el contexto genético WT. Por el contrario, estos ensayos revelaron que las mutaciones introducidas por Pol IV en la cepa *mutS^β* podrían generar variantes de *nfxB* más inactivas.

Otro aspecto que se analizó fue si existe una correlación entre los diferentes niveles de luminiscencia y la supervivencia en Cip. Con tal propósito, se seleccionaron 6 clones que presentaron niveles de luminiscencia diferentes y se midió la fracción de células que sobreviven al tratamiento con distintas concentraciones de Cip. Como se puede observar en la Figura R20A, en general, los clones con mayor luminiscencia mostraron mayor supervivencia a Cip. Posteriormente a fin de estudiar este efecto en todos los clones Cip^R, se determinó la fracción de células que sobrevive a una concentración 0,5 µg/ml de Cip en donde se observó la mayor diferencia de supervivencia entre los clones. Se graficó la luminiscencia relativa en el eje X y la fracción que sobrevive en el eje Y luego del tratamiento con Cip para los clones Cip^R aislados de cada cepa (Figura R20B). En cada una se calculó el coeficiente de Pearson (r), el cual indica el grado de correlación entre dos variables. En todos los casos, la correlación fue positiva y mostró significancia estadística, indicando que el nivel resistencia a Cip se relaciona linealmente con el grado de inactivación de *nfxB*. Cuando se compararon los valores de r en las cepas deficientes en Pol IV respecto a sus parentales, se encontró que en la cepa WT y *dinB* fueron similares mientras que en la cepa *mutS^βdinB* el valor de r fue un 40% menor respecto a la cepa *mutS^β*. Si bien los niveles de resistencia a Cip alcanzados a nivel poblacional en la cepa WT y *mutS^β* fueron los mismos, estos resultados confirman el rol de Pol IV en la cepa *mutS^β*. A su vez, las diferentes variantes del regulador transcripcional NfxB podrían participar en otros procesos celulares, brindando ventajas para la célula en otras condiciones de crecimiento estresantes.

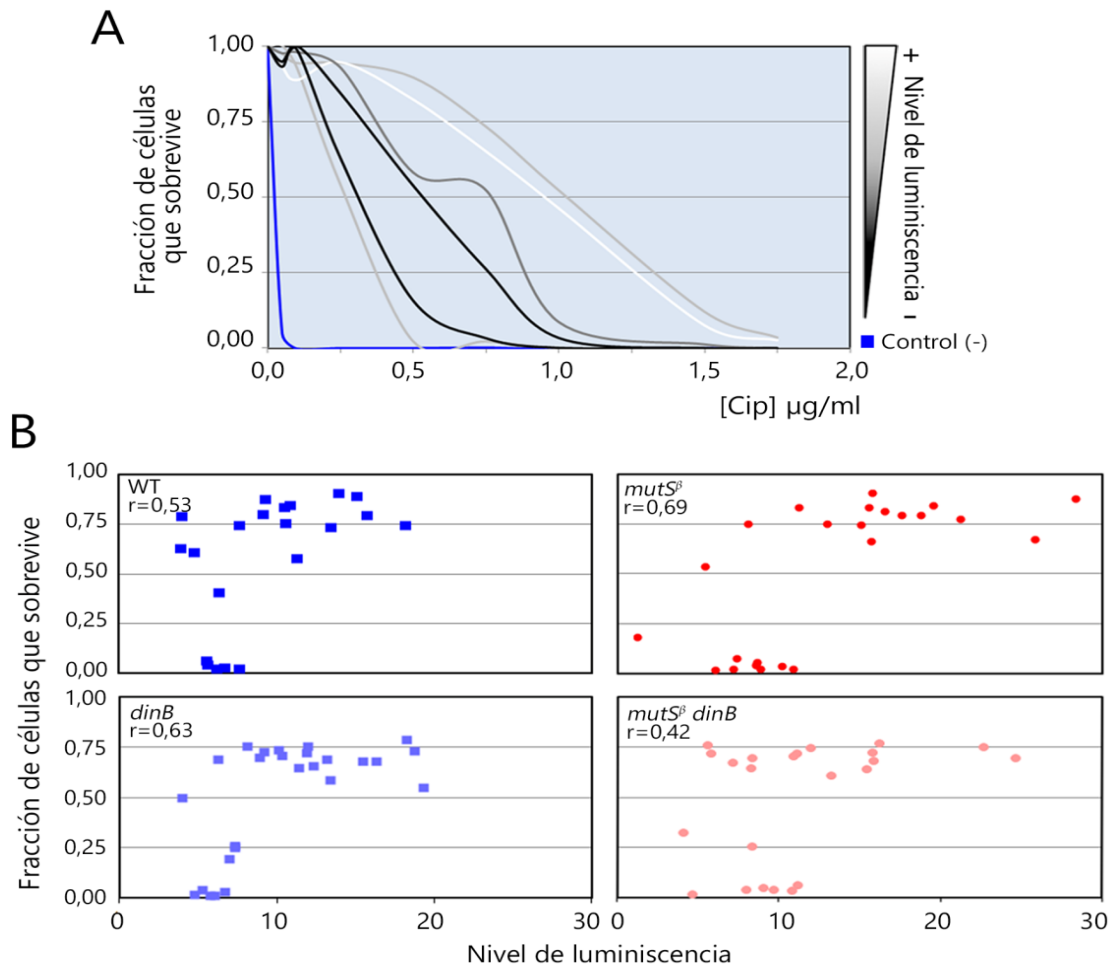


Figura R20. Análisis de la correlación entre los niveles de inactivación de *nfxB* y la resistencia a ciprofloxacina. (A) Crecimiento de cultivos a diferentes concentraciones de Cip. Se seleccionaron 6 clones representativos de cada nivel de luminiscencia y se inocularon medios líquidos que contenían diferentes concentraciones de Cip (0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 1,75 $\mu\text{g/ml}$). Luego, se determinó el crecimiento mediante la medición de la absorbancia a 600 nm. El gráfico representa en el eje de las X la concentración de Cip y en el eje de las Y la fracción de células que sobrevive, siendo 1 el crecimiento en ausencia de Cip. Cada curva corresponde a un clon Cip^R. La escala de grises indica el nivel de luminiscencia del clon. Como control, se utilizó la cepa WT que no posee inactivado el gen *nfxB* (curva azul). (B) Estudio a nivel poblacional de la correlación entre el nivel de luminiscencia (eje X) y la fracción de células que sobrevive a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Cip (eje Y) en las cepas WT, *mutS* ^{β} , *dinB* y *mutS* ^{β} *dinB*. La fracción de células que sobrevive fue calculada considerando 1 al crecimiento en ausencia de Cip. La letra r indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson. Los valores p para cada r fueron WT: $p=0,01$; *mutS* ^{β} : $p=0,00022$; *dinB*: $p=0,00055$; *mutS* ^{β} *dinB*: $p=0,03$.

MutS no controla a Pol IV cuando realiza síntesis de translesión libre de error

Dado que Pol IV está involucrada en la TLS libre de error de bases alquiladas, su actividad permite tolerar el efecto letal de agentes alquilantes exógenos tal como el N-etil-N-nitrosourea (ENU) [51, 121]. Con el fin de analizar el rol de Pol IV en la síntesis de translesión en los contextos WT y *mutS^β*, se examinó la supervivencia de células creciendo exponencialmente luego del tratamiento con ENU. La exposición a ENU redujo la viabilidad celular al 15% y 12% en las cepas WT y *mutS^β*, respectivamente, en relación al control sin tratar. Como se esperaba, las células deficientes en Pol IV (*dinB* y *mutS^βdinB*) fueron aproximadamente 7 veces más sensibles al tratamiento. La sobreexpresión ectópica de Pol IV mediante el plásmido p5BAD-*dinB* incrementó la supervivencia a un 42 y 54% en las cepas WT y *mutS^β*, respectivamente. Por el contrario, ambas cepas transformadas con el plásmido vacío p5BAD presentaron niveles de supervivencia similares a las células sin transformar (Figura R21A).

Por otro lado, mediante un sistema reportero para detectar la inducción de la respuesta SOS (ver siguiente sección para más detalle), se demostró que la exposición a ENU no induce dicha respuesta de estrés de la cual Pol IV forma parte. Cabe mencionar que este control fue llevado a cabo debido a que en condiciones donde se induce la respuesta SOS, MutS no controla la acción de Pol IV tal como se describe a continuación en la sección II-b. Las cepas WT, *mutS^β*, *dinB* y *mutS^βdinB* mostraron niveles de luminiscencia similares luego del tratamiento con ENU, los cuales no difieren significativamente con los valores observados para las células sin tratar. Como control se utilizó una cepa que expresa una versión no clivable del gen *lexA* (LexAG86V), por lo cual no es capaz de inducir la respuesta SOS (Figura R21B).

En conclusión, los resultados sugieren que la interacción entre MutS y β clamp no afectaría la habilidad de Pol IV para realizar la TLS de lesiones inducidas por ENU. La ausencia de control por parte de MutS podría deberse a que la TLS llevada a cabo por Pol IV en este tipo de lesiones es libre de error [51, 121], y no a que hay inducción de la respuesta SOS por la exposición a ENU como comprobamos con el sistema reportero.

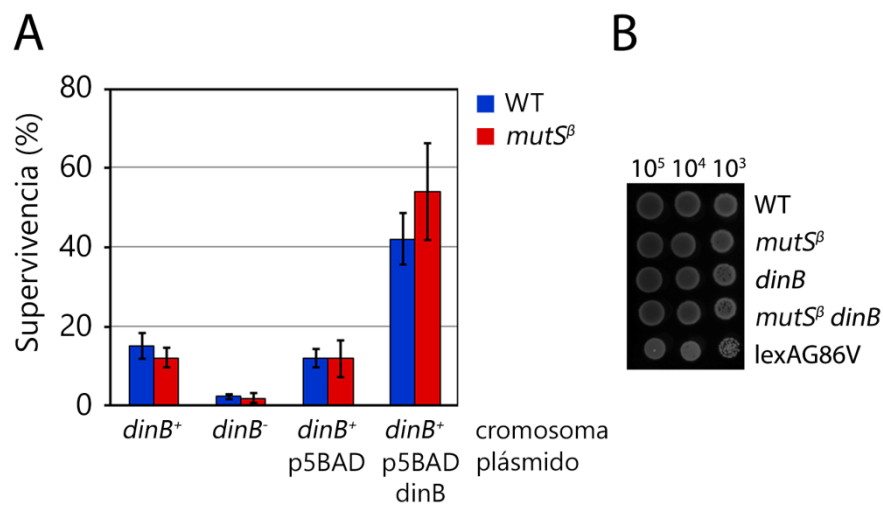


Figura R21. Efecto de la exposición al agente alquilante ENU. (A) La sensibilidad a ENU fue medida en células que contenían el gen cromosomal *dinB* (*dinB*⁺, cepas WT y *mutS*^β) o deficientes en *dinB* (*dinB*⁻, cepas *dinB* y *mutS*^β*dinB*) transformadas o no con los vectores p5BAD vacío y p5BAD-*dinB*. Se crecieron cultivos líquidos independientes hasta fase exponencial, luego se realizaron diluciones sucesivas que fueron sembradas en placas de LB y en placas de LB conteniendo N-etil-N-nitrosourea (ENU) 0,6 mM. Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias en cada placa y se calculó el % de supervivencia en la placa de ENU en función al control en la placa LB, la cual se consideró como el 100%. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3). (B) Inducción de la respuesta SOS en células expuestas a ENU. Células (10³, 10⁴ y 10⁵) de cultivos en fase exponencial de las cepas WT, *mutS*^β, *dinB* y *mutS*^β*dinB*, que contienen en el cromosoma la fusión transcripcional del promotor de *lexA* al operón *luxCDABE*, fueron sembradas en placas de LB con 0,6 mM de ENU. La imagen de luminiscencia de las unidades formadoras de colonias fue obtenida utilizando el equipo NightOWL LB 983. Como control se sembró la cepa mutante *lexAG86V* incapaz de inducir la respuesta SOS. Cada panel representa un cultivo representativo del experimento (n=3).

II.b- Estudio de la mutagénesis inducida por Pol IV en condiciones de estrés

En *E. coli*, así como en otras bacterias emparentadas, la expresión de Pol IV se induce como parte del regulón SOS dependiente de la proteína LexA en respuesta a condiciones de estrés que perturben la replicación. La señal que desencadena esta respuesta es la acumulación de ADNsc como consecuencia del estrés replicativo. El factor RecA se une al ADNsc promoviendo el autoclivaje del represor transcripcional LexA. La inactivación de LexA conduce a la desrepresión de numerosos genes regulados por la respuesta SOS, entre los cuales se encuentra *dinB* y *lexA* [35, 36]. En *P. aeruginosa*, los niveles de transcripción de *dinB* aumentan por la disrupción del gen *lexA*, confirmando que LexA actúa reprimiendo a *dinB* en esta especie [43].

Con el propósito de determinar si MutS controla la mutagénesis dependiente de Pol IV en este contexto, se estudiaron dos condiciones donde la respuesta SOS se encuentra inducida: la exposición a concentraciones subinhibitorias del antibiótico Cip y cepas deficientes en LexA.

Exposición a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina

Los antibióticos, especialmente en concentraciones subinhibitorias (SI), inducen un incremento de la variación genética [147]. Particularmente, la exposición de *P. aeruginosa* a concentraciones subinhibitorias de Cip aumenta la frecuencia de mutación espontánea, favoreciendo la adquisición de resistencia a diferentes antibióticos [148, 149]. La Cip pertenece a la familia de las fluoroquinolonas, las cuales inhiben la replicación del ADN ya que su blanco de acción son las enzimas ADN Girasa (codificada por el gen *gyrA*) y ADN Topoisomerasa IV (codificada por el gen *parC*) [150]. Se ha postulado que el incremento en la mutagénesis provocado por Cip se debe a que este antibiótico genera daños en el ADN y a la vez que provoca un aumento en las especies reactivas del oxígeno las cuales causan DSBs. En ambos casos, se induce fuertemente la respuesta SOS, donde cientos de genes tienen alterada su expresión [55, 124, 147, 151, 152]. Cabe destacar que las fluoroquinolonas, especialmente la Cip, son comúnmente utilizadas para tratar infecciones pulmonares de *P. aeruginosa* en pacientes FQ [153]. Por ello, resulta de gran interés estudiar los mecanismos mediante los cuales Cip promueve la mutagénesis en esta bacteria, los cuales podrían ser importantes para la adaptación y adquisición de resistencia a antibióticos durante los procesos infectivos.

En esta sección se analizará si concentraciones SI de Cip (Cip_{SI}) inducen un aumento de los niveles de mutación de manera dependiente de Pol IV, y si dicha mutagénesis es controlada por MutS a través de su interacción con β clamp. Para ello, en primer lugar se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Cip en las cepas WT, *mutS β* , *dinB* y *mutS β dinB*. La CIM fue de 0,07 μ g/ml en las cuatro cepas, valores similares a los previamente reportados en *P. aeruginosa* en nuestro laboratorio (0,08 μ g/ml). Asimismo, se comparó la sensibilidad a Cip de las cuatro cepas mediante la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (Colony Forming Units –CFU-) luego del tratamiento con una concentración del 0.02 μ g/ml de Cip (Cip_{SI}) durante 15 horas, condiciones en las cuales posteriormente se evaluó la tasa de mutación. Como se esperaba, el tratamiento con

Cip_{SI} inhibió el crecimiento celular, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las cepas WT, *mutS*^β, *dinB* y *mutS*^β*dinB* ($p > 0,05$) (Figura R22A).

Para confirmar la inducción del SOS en presencia de Cip_{SI}, se utilizó un reportero introducido en el cromosoma que contiene la región promotora de *lexA* fusionada al operón *luxCDABE*. Se espera que si LexA se encuentra inactivo, como ocurre en la respuesta SOS, el nivel de luminiscencia debería incrementar. Efectivamente, los niveles de luminiscencia aumentaron aproximadamente de 3,5 a 4,5 veces en cultivos líquidos de las cepas WT, *mutS*^β, *dinB* y *mutS*^β*dinB* luego del tratamiento con Cip_{SI} respecto al control en ausencia del antibiótico (Figura R22B). Dichos datos confirmaron que la exposición a Cip_{SI} induce la respuesta SOS en *P. aeruginosa*, tal como se había reportado previamente [124].

A continuación, se estimó la tasa de mutación a Cip^R de las cepas WT, *mutS*^β, *dinB* y *mutS*^β*dinB* expuestas a Cip_{SI}. Estas cepas mostraron un aumento significativo en los niveles de mutagénesis en presencia de Cip_{SI} (Figura R22C). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ellas ya que todas las cepas mostraron un incremento de aproximadamente 20 veces en la tasa de mutación en relación al control sin tratar con el antibiótico. Dado que este resultado podría deberse a que durante el tratamiento con Cip se podrían estar seleccionando clones resistentes a dicho antibiótico, se midió la tasa de mutación de resistencia a otro antibiótico, Amikacina (Amk^R). La tasa de mutación a Amk^R aumentó significativamente alrededor de 6 veces en todas las cepas, indicando que Cip_{SI} incrementa la mutagénesis en el cromosoma de *P. aeruginosa* independientemente del contexto genético (Figura R22D), tal como había sido reportado en esta bacteria así como en *E. coli* [154].

En su conjunto, estos experimentos muestran que la exposición a Cip_{SI} induce la respuesta SOS a la vez, provoca un fuerte aumento en la tasa de mutación en el cromosoma de *P. aeruginosa*. De acuerdo a nuestros resultados, Pol IV aparentemente no estaría involucrada ya que su deficiencia no disminuyó los niveles de mutagénesis provocados por el tratamiento con Cip_{SI}. Sin embargo, no se puede descartar la acción de Pol IV en estas condiciones ya que si la actividad de Pol IV es libre de error, no se producirán cambios en los niveles de mutagénesis a la vez que según nuestra hipótesis, MutS no regularía esta Pol en estas condiciones. Alternativamente, en las células deficientes en Pol IV podría actuar otra Pol libre de error, la cual no se encuentra bajo el control de MutS. Además, tal como se

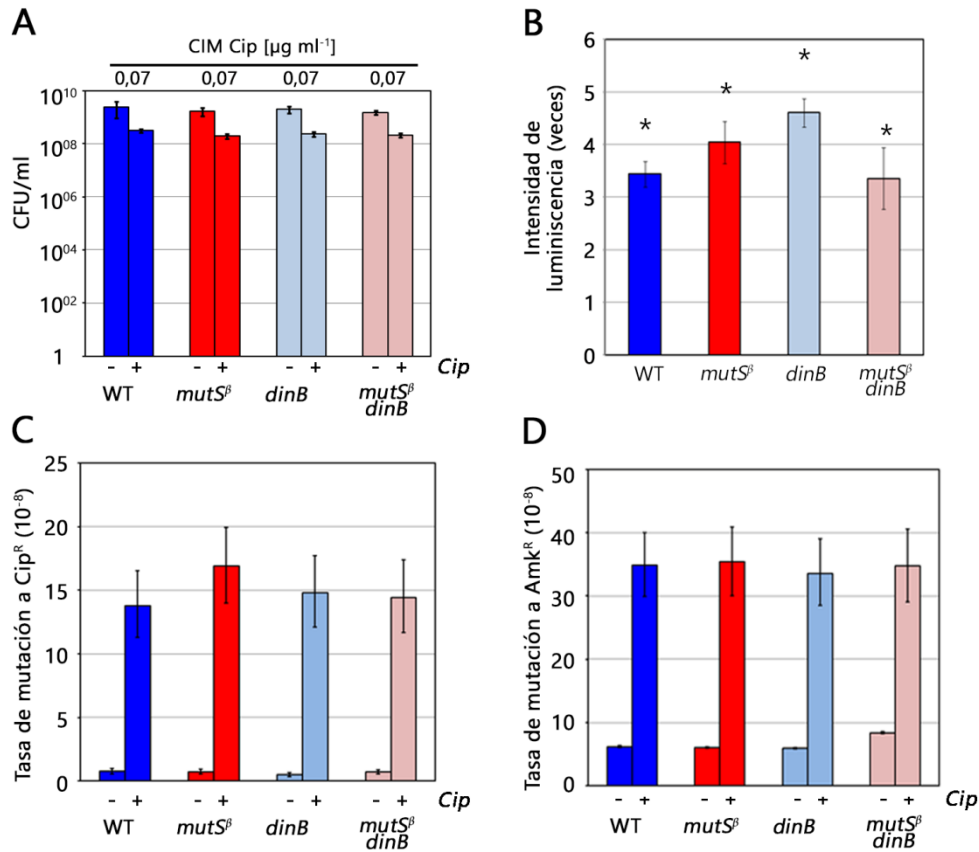


Figura R22. Rol de Pol IV en la mutagénesis inducida por concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina. (A) Crecimiento en cultivos líquidos en ausencia (-) o presencia (+) de Cip_{SI} (0,02 $\mu\text{g ml}^{-1}$) luego de 15 horas a 37°C. El eje Y corresponde a las unidades formadoras de colonias (Colony Forming Units – CFU-) por ml de cultivo. En el margen superior del gráfico se indican los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a Cip para cada cepa en $\mu\text{g/ml}$. (B) Inducción de la respuesta SOS en condiciones de exposición a Cip_{SI}. La inducción de la respuesta SOS fue determinada midiendo los niveles de luminiscencia relativos a la biomasa (Absorbancia a 600nm) en cultivos líquidos en fase exponencial de células que contienen la fusión transcripcional del promotor *lexA* al operón reportero *luxCDABE* dentro del cromosoma. El eje de las Y representa las veces en que aumenta la luminiscencia en cultivos expuestos a Cip respecto al control en cultivos creciendo en medio LB. Las barras de error corresponden a la desviación standard y los asteriscos indican diferencias significativas del tratamiento (Cip) con respecto al control (LB) ($p \leq 0,05$, $n=3$). (C), (D) Tasa de mutación a la resistencia a Cip (Cip^R) y Amikacina (Amk^R), respectivamente, en cultivos de las cepas WT, *mutS^Δ*, *dinB* y *mutS^ΔdinB* crecidos en ausencia (-) o presencia (+) de Cip (0,02 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Las barras indican los intervalos de confianza del 95%. En todos los casos el tratamiento con Cip aumentó significativamente la tasa de mutación ($p \leq 0,05$).

mostró en la sección previa, Pol IV podría modificar el espectro de mutaciones. Finalmente, los estudios previos muestran que la Cip afecta diferentes procesos celulares involucrados en la mutagénesis del cromosoma [55, 124, 147, 155-157], por lo que resulta

difícil estudiar la actividad específica de una polimerasa de baja fidelidad en este contexto.

Mutagénesis en cepas que expresan constitutivamente la Respuesta SOS

La complejidad de los efectos que produce la exposición a Cip_{SI} probablemente no permiten estudiar la actividad de Pol IV en el contexto de estrés SOS, y por lo tanto, determinar si existe una regulación de la acción de esta enzima por parte de MutS. Es por ello, que se analizó la mutagénesis en cepas donde se realizó el reemplazo cromosomal del gen *lexA* por un alelo inactivo en las cepas WT, *mutS^β*, *dinB* y *mutS^β dinB*. Así, las cepas deficientes en *lexA* (*lexA*⁻) tendrían una respuesta SOS constitutiva, mientras que en las cepas parentales (*lexA*⁺), la respuesta es inducible.

La desrepresión de *lexA* fue medida utilizando el reportero del promotor de *lexA* fusionado al operón *luxCDABE*, construcción que fue insertada en el cromosoma de células que contienen los alelos *lexA* activo o inactivo (*lexA*⁺ o *lexA*⁻, respectivamente). La señal de luminiscencia fue ≈3 veces mayor en cultivos creciendo exponencialmente de las cepas *lexA*⁻ en comparación con las cepas *lexA*⁺ confirmando que la deficiencia de LexA induce la respuesta SOS (Figura R23A).

A continuación, se midió la tasa de mutación a Cip^R para estimar los niveles de mutagénesis en células que expresan constitutivamente la respuesta SOS. La deficiencia de LexA aumentó significativamente la mutagénesis en las cepas WT y *mutS^β*, ya que la tasa de mutación fue 11 y 16 veces mayor en el contexto *lexA*⁻ en relación al *lexA*⁺, respectivamente. La delección de *dinB* disminuyó considerablemente la mutagénesis bajo condiciones de SOS constitutivas ya que las cepas *dinB lexA* y *mutS^β dinB lexA* mostraron una tasa ~3,5 veces menor respecto a *lexA* y *mutS^β lexA*. Es importante señalar que si bien la deficiencia de Pol IV disminuyó los niveles de mutagénesis, no alcanzaron los valores basales. Las cepas *dinB lexA* y *mutS^β dinB lexA* presentaron tasas de mutación 3,2-3,4 veces más altas comparadas a las cepas *dinB* y *mutS^β dinB* respectivamente (Figura R23B).

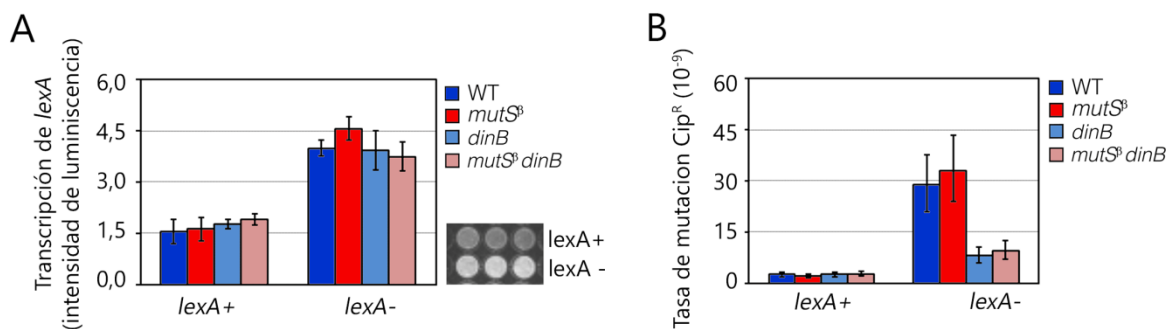


Figura R23. Mutagénesis bajo condiciones de expresión constitutiva de la respuesta SOS. (A) Análisis de los niveles de transcripción del promotor de *lexA*. La transcripción a partir del promotor de *lexA* fue determinada midiendo los niveles de luminiscencia en cultivos creciendo exponencialmente de células que contienen la fusión transcripcional del promotor *lexA* al operón reportero *luxCDABE* dentro del cromosoma. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$). Se agregó además una imagen representativa de la luminiscencia de cultivos *lexA-* y *lexA+* de la cepa WT. Cabe mencionar que la presencia del reportero no altera la mutagénesis ya que las cepas *lexA+* que contienen la fusión no mostraron diferencias significativas en la tasa de mutación respecto a las cepas que no contienen dicha fusión ($p \geq 0.05$) (B) Tasa de mutación de resistencia a ciprofloxacina (*Cip^R*). Las cepas utilizadas fueron WT, *mutS^β*, *dinB* y *mutS^βdinB* conteniendo el gen *lexA* activo (*lexA+*) o inactivo (*lexA-*). Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95%. Los valores de p para la comparación de las tasas de mutación de las cepas *lexA(-)* respecto a las *lexA (+)* fueron $p \leq 0.05$.

Estos resultados indicaron que Pol IV tiene un rol clave en la mutagénesis inducida cuando la respuesta SOS se expresa constitutivamente, tal como fue descrito previamente para *E. coli* [158]. Además, las evidencias demuestran claramente que MutS no limita la mutagénesis dependiente de Pol IV en estas condiciones, ya que los niveles de mutación en los contextos genéticos WT y *mutS^β* fueron similares.

Niveles de expresión de MutS y Pol IV

Los niveles de MutS y MutS^β fueron medidos mediante Western blot en las cepas WT y *mutS^β*, respectivamente, que expresan dichas proteínas fusionadas al péptido de afinidad Strep III en su región C-terminal. Los niveles de MutS y MutS^β fueron similares en células creciendo exponencialmente (Figura R24). Dichos niveles no difirieron entre células que contenían el vector p5BAD vacío, así como en células que sobreexpresaron Pol IV y Pol IV $\Delta 5$ a partir de los vectores p5BAD-*dinB* y p5BAD-*dinB* $\Delta 5$ en medios conteniendo 0,050 % de arabinosa (Figura R24). Estos experimentos demuestran que las diferencias de

mutagénesis exhibidos por la cepa *mutS β* respecto a la WT bajo condiciones normales de crecimiento no se deben a diferencias en la expresión de MutS y MutS β .

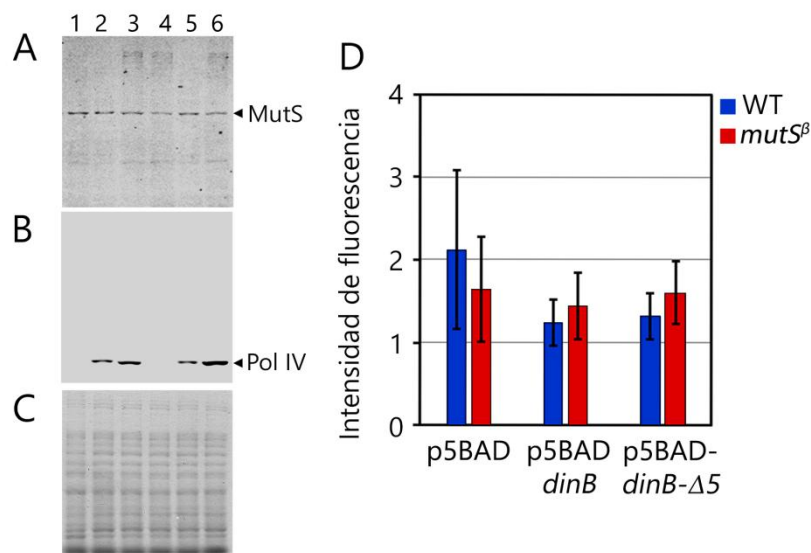


Figura R24. Niveles de expresión de MutS en células creciendo exponencialmente. Se fusionó al gen cromosomal de MutS y MutS β en las cepas WT y *mutS β* respectivamente, a la secuencia del péptido Strep III. (A) Los niveles de expresión de las proteínas MutS (carriles 1-3) y MutS β (carriles 4-6) fueron examinadas en células transformadas con el vector vacío p5BAD (carriles 1 y 4), p5 BAD-*dinB* (carriles 2 y 5) y p5BAD-*dinB* $\Delta 5$ (carriles 3 y 6) luego de la inducción con 0,050% de arabinosa. Para la detección se utilizó un anticuerpo monoclonal que detecta Strep III. (B) La membrana de Western blot también fue revelada con un anticuerpo que detecta el péptido His6 presente en Pol IV expresada desde el plásmido p5BAD*dinB*. (C) Proteína total sembrada. (D) Cuantificación de la señal de la banda correspondiente a MutS. Las barras de error muestran la desviación estándar (n=3).

Asimismo, la exposición a Cip_{SI} no cambió la cantidad de las proteínas de reparación en relación al control no expuesto al antibiótico (Figura R25A-B), indicando que el aumento de la mutagénesis en estas condiciones no se debe a una disminución en la expresión de MutS, tal como había sido reportado en células de *E. coli* expuestas a concentraciones subinhibitorias de β lactámicos [123]. Asimismo, no se observó cambios en los niveles de expresión de MutS y MutS β en cepas *lexA*⁻ y *lexA*⁺ (Figura R25C-D). Este resultado confirma que la concentración de MutS no cambia en células de *P. aeruginosa* cuya respuesta SOS se expresa constitutivamente.

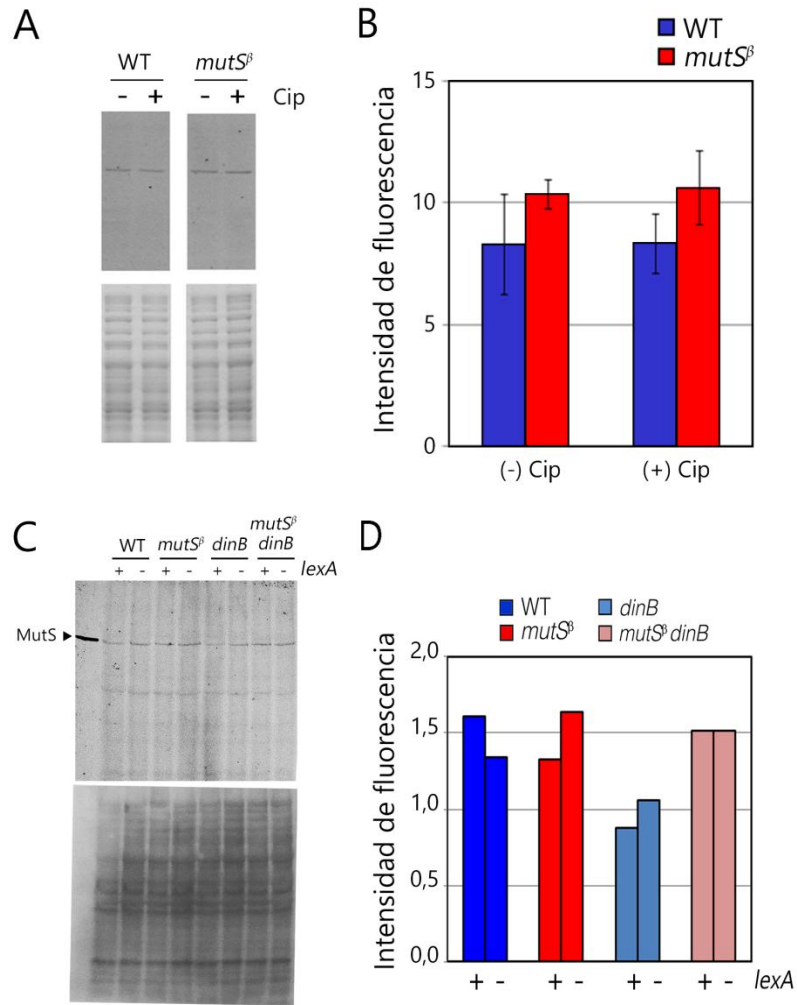


Figura R25. Niveles de expresión de MutS en condiciones de estrés Se fusionó el gen cromosomal de MutS a la secuencia del péptido Strep III en las cepas WT, *dinB*, *lexA* y *dinB lexA*. Asimismo se fusionó el gen cromosomal de MutS β a la secuencia del péptido Strep III en las cepas *mutS β* , *mutS β lexA*, *mutS β dinB* y *mutS β dinB lexA*. (A-B) Los niveles de expresión de las proteínas MutS y MutS β fueron examinadas en células WT y *mutS β* tratadas (+) y no tratadas (-) con concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina (Cipsi). (A) El panel superior corresponde a la membrana de Western blot y el inferior a la proteína total sembrada. (B) Cuantificación de la señal de la banda correspondiente a MutS. Las cepas no muestran diferencias significativas ($p=0,15$). Las barras de error muestran la desviación estándar ($n=3$). (C-D) Expresión de MutS en cepas *lexA*- y *lexA*+. (C) El panel superior corresponde a la membrana de Western blot y el inferior a la proteína total transferida. (D) Cuantificación de la señal de la banda correspondiente a MutS.

Cabe mencionar que con el objeto de testear que la fusión de la proteína de reparación a Strep III no altera su actividad correctora, se midió la tasa de mutación a Cip^R en estas cepas. Las tasas de mutación fueron 30,9 (21,2-42,5) $\cdot 10^{-9}$ y 22,9 (15,9-31,1) $\cdot 10^{-9}$ en las cepas conteniendo MutS-Strep III y MutS β -Strep III, respectivamente, valores incluso menores a las tasas de mutación basales de las cepas que expresan MutS -25,3 (19,5-

$32,1)10^{-9}$ - y $MutS^{\beta}$ $-25,1 (19,6-31,4)10^{-9}$ -, indicando que las construcciones $MutS$ -Strep III y $MutS^{\beta}$ -Strep III mantienen su funcionalidad.

De la misma manera, se analizaron los niveles de expresión de Pol IV en las células WT y $mutS^{\beta}$ donde esta proteína se expresó fusionada al péptido His₆. La expresión basal de Pol IV no pudo ser detectada mediante Western blot en ninguna de las cepas ya sea utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales que detectan al His₆. Este resultado coincide con lo reportado previamente en donde no se detectó esta Pol en células de *P. aeruginosa* utilizando un anticuerpo policlonal anti-Pol IV [43].



DISCUSIÓN

Pol IV es una Pol alternativa altamente conservada cuya función es llevar a cabo TLS y asistir a la Pol replicativa Pol III cuando ocurren paradas en la replicación debido a la incorporación incorrecta de nucleótidos [26]. Actualmente, se postula que su acción ocurriría en el replisoma, donde interaccionaría con el β clamp que forma parte de la holoenzima Pol III [80]. En condiciones normales de crecimiento, la concentración de Pol IV es alta en comparación con Pol III [58]. Sin embargo, dicha Pol no contribuye a la mutagénesis espontánea por lo que se ha propuesto que su actividad mutagénica y/o acceso a la replicación debe estar estrictamente regulada [49, 63].

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis, junto con evidencias previas, nos permitieron proponer un nuevo mecanismo de regulación de esta ADN polimerasa mutagénica basado en el control de la interacción de Pol IV con su cofactor β clamp por parte de la proteína MutS. El modelo propuesto se encuentra esquematizado en la figura presente en la página 31. Particularmente, nuestros resultados nos permitieron postular las etapas B y C del modelo presentado, en el cual se resumen las evidencias que nos llevaron a postular dichas etapas. Nuestro modelo predice que Pol IV puede aliviar las paradas de la horquilla de replicación, pero si su actividad genera un mal apareamiento (MM), MutS actúa para limitar su actividad de síntesis e impedir que dicho MM se fije como una mutación. De acuerdo a las evidencias obtenidas, este mecanismo funciona en células bajo condiciones normales de crecimiento mientras que MutS no controlaría la acción de Pol IV cuando la respuesta de estrés replicativo SOS se encuentra inducida. A continuación se discuten detalladamente las evidencias que apoyan el mecanismo postulado así como diversos aspectos interesantes que surgieron a partir de esta Tesis Doctoral.

Pol IV de *P. aeruginosa* interacciona con β clamp, aunque con menor afinidad que MutS

De acuerdo con nuestros datos bioquímicos, Pol IV y MutS de *P. aeruginosa* interaccionan con β clamp, aunque la proteína de reparación presentó una afinidad significativamente mayor (~ 10 veces). Como se mencionó previamente, se postula que los sliding clamps (β clamp en procariotas y PCNA en eucariotas) actúan como una plataforma para el reclutamiento de numerosas proteínas del metabolismo del ADN funcionando

como co-factores esenciales para su actividad. Igualmente, y tomando en consideración la baja concentración de los sliding clamps relativa a la gran cantidad de proteínas con las cuales interaccionan, se postula que la afinidad de los factores que se asocian a los sliding clamps jugaría un rol importante para determinar su acceso al anillo [21]. En este sentido, el intercambio de Pols en el factor de procesividad durante la TLS o la maduración de los fragmentos de Okazaki estaría modulado por las afinidades de las diferentes Pols así como de su concentración intracelular [26, 159, 160]. Por ejemplo, la Pol replicativa exhibe una gran afinidad por β clamp, lo cual le permite sinterizar la mayoría del ADN cromosomal aun cuando existen pocas copias de esta enzima (10-20 Pol III en *E. coli*) comparado con las Pols alternativas (250 Pol IV en *E. coli*) por célula durante crecimiento exponencial. Así, y dado que el número de moléculas de MutS (200 MutS en *E. coli*) es similar a Pol IV [161], es posible postular que la mayor afinidad de MutS por β clamp favorecería el acceso de la proteína de reparación al factor de procesividad. Cabe mencionar que no se conoce la cantidad de moléculas de Pol III, Pol IV y MutS en células de *P. aeruginosa* pero es de esperar que no difiera considerablemente con los valores descritos para *E. coli*.

La asociación entre el motivo conservado QLxLF presente en Pol IV y el bolsillo hidrofóbico de β clamp corresponde al principal contacto entre ambas proteínas

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que el motivo conservado de unión (Clamp Binding Motif ó CBM) presente en Pol IV y MutS de *P. aeruginosa* corresponde al principal sitio de interacción con β clamp. Como había sido reportado previamente en nuestro laboratorio [131], no se observó unión de la mutante MutS^b a β clamp en ninguno de los ensayos bioquímicos realizados. En tanto que no se detectó interacción entre el factor de procesividad y la mutante de delección del CBM, Pol IV $\Delta 5$, en los experimentos de PAGE y FW, métodos que nos permitieron examinar las interacciones proteicas en el estado de equilibrio. Sin embargo, ambas proteínas se asociaron en los ensayos de SPR donde se analizan las cinéticas de reacción. Nuestra hipótesis en relación a este hecho es que la delección de los últimos cinco aminoácidos del C-terminal de Pol IV podrían exponer un nuevo sitio de interacción normalmente ocluido por estos residuos o que Pol IV posee un sitio secundario de unión al anillo, y la asociación entre este sitio y β clamp sea transiente por lo cual sólo sería detectada en experimentos cinéticos. En este sentido, Pol IV de *E. coli* contiene un sitio secundario en el N-terminal que interacciona con la interfase entre monómeros de β clamp, además de su motivo CBM presente en su región C-terminal [6, 64, 65]. Se postula que este sitio secundario de baja afinidad le permitiría mantenerse unida al factor de procesividad en una forma inactiva, para luego acceder al bolsillo

hidrofóbico del anillo cuando Pol III se detiene y poder catalizar la síntesis de ADN [68, 70, 73]. En su conjunto, nuestros resultados sugieren que el CBM de Pol IV sería el sitio principal involucrado en la interacción con el factor de procesividad, sin embargo, no es posible descartar la presencia de un sitio secundario de unión a β clamp en Pol IV de *P. aeruginosa*. Asimismo, nuestros resultados demostraron que la sobreexpresión de Pol IV $\Delta 5$ no induce un aumento de la mutagénesis tal como la proteína salvaje, indicando que el CBM de Pol IV sería esencial para la actividad de esta enzima *in vivo*.

Los experimentos de competencia demostraron que la presencia del péptido que contiene el CBM de MutS (MQSDLFA) inhibió la asociación Pol IV- β clamp y MutS- β clamp *in vitro*, lo cual nos permitió confirmar que el principal sitio de unión en β clamp es el bolsillo hidrofóbico presente en la región C-terminal. Los estudios sobre la estructura cristalina del factor de procesividad acomplejada con el CBM de Pol IV (QLDLGL) de *E. coli* muestran que el péptido se une a través de dos contactos. La porción C-terminal del péptido se posiciona en una región hidrofóbica rica en leucinas (subsitio 1 – SS1) mientras que el residuo altamente conservado Q forma un red compleja de interacciones con β clamp y los demás residuos del CMB dentro del subsitio 2 (SS2). El área donde ocurre dicha interacción es flexible, por lo cual luego de la asociación entre el péptido y el anillo de β clamp se produce una serie de reordenamientos que conducen a la formación de un surco entre los sitios SS1 y SS2. Allí, la región hidrofóbica se extiende y se asocia al segundo aminoácido correspondiente al péptido [65, 162, 163]. Asimismo, el análisis comparativo de los sliding clamps de bacterias demostró que los sitios de unión al CBM son estructuralmente muy similares, sin embargo muestran notables diferencias en los niveles de afinidad con respecto a pequeñas variaciones en la secuencia del péptido conservado. Particularmente β clamp de *P. aeruginosa* se comporta de una manera muy similar al de *E. coli* [18]. Distintas modificaciones en la secuencia del CBM de Pol IV provocan cambios en la afinidad por el factor de procesividad así como en las estructuras [163]. Por ejemplo, los residuos LGL pueden ser perfectamente reemplazados por los residuos LF, tal como se encuentran en el CBM de MutS. Es posible que la presencia de un grupo aromático (como el residuo F de MutS) mejore considerablemente la interacción de tipo hidrofóbica, favoreciendo el desplazamiento de Pol IV, incluso considerando que la proteína completa tiene una mayor afinidad por β clamp que el péptido aislado [163].

Como se mencionó previamente, la conformación activa de β clamp corresponde al dímero, especie que contiene dos bolsillos hidrofóbicos idénticos donde se asociarían los CBM de Pol IV o MutS. En principio, asumimos que Pol IV de *P. aeruginosa* es monomérica al igual que Pol IV de *E. coli* [63]. Sin embargo, mediante nuestros experimentos no fue posible determinar su estado oligomérico ni la estequiometría de la interacción Pol IV- β clamp. Esto se debe principalmente a que en geles nativos Pol IV tiene muy baja movilidad dado que su pI es similar al pH utilizado en el buffer de corrida. Cuando Pol IV fue acomplejada con β clamp, se observó que la banda de dicho complejo ingresa al gel, no obstante, no fue lo suficientemente definida como para estimar un valor de peso molecular. La curva de afinidad obtenida a partir de este ensayo mostró una forma hiperbólica, lo cual indica que Pol IV se uniría a uno de los sitios de unión, o bien, se asocia a los dos sitios pero no existe interacción entre los mismos. Por otro lado, los trabajos previos del laboratorio demostraron que MutS de *P. aeruginosa* se encuentra como tetrámero en solución [130]. Entonces, dada su naturaleza oligomérica es posible que esta proteína ocupe ambos bolsillos hidrofóbicos presentes en β clamp. Efectivamente, nuestros experimentos muestran que la unión MutS- β clamp es cooperativa, es decir, la interacción con un sitio favorece la asociación con el segundo sitio. Esto implica necesariamente que MutS se uniría a los dos sitios presentes en β clamp en las condiciones analizadas.

MutS inhibe la interacción Pol IV- β clamp

Nuestros resultados demostraron que MutS es capaz de competir con Pol IV por β clamp, a la vez que la proteína de reparación posee la capacidad para desplazar a Pol IV del factor de procesividad. Estos resultados pueden ser explicados por el hecho de que ambas proteínas compiten por el mismo sitio de interacción en el anillo, y la unión MutS- β clamp posee una mayor afinidad que la asociación Pol IV- β clamp. En nuestros experimentos MutS fue capaz de competir o desplazar Pol IV del anillo aún a altas concentraciones relativas de Pol IV/MutS, lo cual difiere de trabajos previos donde se estudió la competencia de otros factores por β clamp *in vitro*. Por ejemplo, a relaciones Pol IV/Pol III 6:1, tal como se encuentran en condiciones de crecimiento normal, Pol III lleva a cabo el mayor porcentaje de síntesis de ADN (78%). Sin embargo, tal como ocurre en condiciones de respuesta SOS, cuando la concentración de Pol IV es diez veces mayor (relación Pol IV/Pol III 60:1), Pol IV lleva a cabo la replicación del sustrato en un 78% de los casos. Destacablemente, este efecto ocurrió de manera dosis-dependiente y mediado por la interacción con β clamp [68]. En este sentido, se ha postulado que tanto la afinidad

por dicho factor así como la concentración de Pols alternativas en la célula serían las estrategias para regular su acceso a la replicación [26, 68]. Nuestros resultados de competencia Pol IV-MutS pueden explicarse analizando las constantes cinéticas de la interacción con el factor de procesividad obtenidas por SPR. Los experimentos muestran que la k_{ON} de MutS es tres órdenes de magnitud mayor que la de Pol IV mientras que la k_{OFF} es dos órdenes de magnitud menor. Esto le permitiría asociarse rápidamente a β clamp de manera que una vez unida, Pol IV no pueda desplazarla del factor, incluso a altas concentraciones. Como se discutirá más adelante, es posible que existan otros factores de regulación que permitan a Pol IV actuar en presencia de MutS cuando su acción es necesaria.

Otro aspecto interesante es que no se detectó la formación de un complejo ternario formado por Pol IV-MutS- β clamp como ha sido observado para otras proteínas que interactúan con β clamp y su homólogo eucariota PCNA [68, 69, 73, 74, 164]. Por ejemplo, tanto la subunidad catalítica de α como la exonucleasa ϵ de Pol III contienen un CBM. Durante la replicación, ambas subunidades interactúan entre sí y a su vez con el mismo anillo de β clamp a través de dicho motivo conservado, los cuales se unen a los dos bolsillos hidrofóbicos presentes en el factor de procesividad para realizar la síntesis de ADN con alta eficiencia. Tal como sugieren los datos de afinidad, es probable que MutS se encuentre ocupando los dos bolsillos hidrofóbicos de β clamp y por esta razón no se forme el complejo ternario. Asimismo, no se detectó interacción directa entre Pol IV y MutS, lo cual podría ser útil estabilizar un posible triple complejo tal como ocurre entre las subunidades α y ϵ de Pol III [74].

Diferentes estructuras de ADN modulan esta función de MutS

Estudios previos muestran que las estructuras de ADN podrían regular la asociación entre diferentes proteínas y β clamp [135]. Es por ello que en el presente trabajo se investigó el efecto de diferentes estructuras de ADN sobre las interacciones bimoleculares Pol IV- β clamp y MutS- β clamp así como la competencia de Pol IV y MutS por el factor de procesividad. Cabe recordar que β clamp tiene una alta afinidad por ADNp, es decir, ADN que tiene un extremo 3' libre donde se pueden incorporar nucleótidos durante la síntesis de ADN, mientras que se une con baja afinidad a ADNdc [17]. Pol IV exhibe una baja afinidad por ADNp por lo cual necesita utilizar a β clamp como cofactor para su actividad [67] mientras MutS tiene gran afinidad por sustratos ADNdc que contengan MMs o InDels

y se une débilmente a ADNdc [131, 134]. Cabe destacar que previo a esta Tesis no se habían realizado estudios tendientes a analizar el efecto sobre MutS de sustratos de ADN presentes en los sitios de replicación.

Particularmente, los resultados muestran que las diversas estructuras de ADN tienen efectos específicos en la habilidad de MutS de regular la interacción Pol IV- β clamp. En presencia de GT-ADNp, se observó que la afinidad de MutS por β clamp aumenta, lo cual podría ser importante para dirigir a MutS hacia las moléculas de β clamp que se encuentran posicionadas sobre ADN primeado y cercanas a un MM. Asimismo, MutS es capaz de inhibir la interacción Pol IV- β clamp más eficientemente en presencia de ADNp que contengan o no un MM, probablemente asegurando un control más estricto del acceso de Pol IV al factor de procesividad en el contexto de los sitios de replicación. Por el contrario, la presencia de ADNsc anula la capacidad de MutS de limitar la formación del complejo Pol IV- β clamp. Interesantemente, esta especie de ADN se acumula cuando ocurren paradas de la maquinaria de replicación provocadas por lesiones, entre otras causas [31]. La presencia de ADNsc funciona como señal que induce la actividad co-proteasa RecA, facilitando el autoclivaje del represor transcripcional LexA y posterior inducción de la respuesta general al estrés SOS [35, 36]. Este resultado sugiere que MutS no controlaría a Pol IV bajo estas condiciones estresantes en la cual la actividad mutagénica de Pol IV sería necesaria para generar variantes adaptativas. Dichos datos coinciden con el hecho que Pol IV es un factor importante en la mutagénesis producto de la inducción del SOS en cepas deficientes para LexA, actividad que no fue regulada por MutS (ver más adelante). Finalmente, la presencia de ADNdc con o sin MM no modificó la capacidad de MutS para competir con Pol IV por β clamp. Esto podría deberse a que estas estructuras son sustratos de la reacción de reparación llevada a cabo por el MMR, donde MutS de *P. aeruginosa* no requiere la interacción con β clamp.

Como se expuso en la sección de Resultados, MutS fue capaz de acomplejarse con las estructuras de ADN analizadas mientras que no se observó interacción β clamp-ADN en las condiciones ensayadas. Estas evidencias sugieren que los efectos observados sobre la interacción MutS- β clamp y la competencia serían producto de un efecto del ADN sobre MutS. De igual modo, no se puede descartar la hipótesis de que β clamp se asocie al sustrato de ADN cuando interacciona con el complejo MutS-ADN. Asimismo, nuestros experimentos muestran que los diferentes sustratos de ADN modifican considerablemente la migración de MutS en geles nativos. MutS retarda su migración cuando se encuentra acomplejada con ADNdc, ADNp y GT-ADNdc mientras que si bien la presencia de ADNsc no

cambia la migración se observó una banda más definida. Por el contrario, en presencia del sustrato GT-ADNp, MutS forma una banda bien definida con una mayor movilidad, efecto que depende de la proximidad del GT al extremo 3' libre del primer.

Los cambios de migración de los complejos MutS-ADN pueden ser explicados por alteraciones que ocurren en la estructura de la proteína de reparación. En relación al complejo MutS-GT-ADNp, nuestra hipótesis fue que MutS podría sufrir una compactación o bien un cambio en su estado oligomérico de tetrámero a dímero. Sin embargo, los experimentos llevaron a descartar la última hipótesis. Brevemente, la migración del complejo MutS-GT-ADNp fue menor en comparación con MutSR842E, mutante dimérica que presenta una sustitución de la arginina por un ácido glutámico en la posición 842 del dominio C-terminal de tetramerización [130]. Asimismo, se observó que MutSR842E exhibe un comportamiento similar a la proteína WT en presencia del GT-ADNp, lo cual nos llevó a postular que la interacción de MutS con GT-ADNp induce una compactación de la proteína. De la misma manera, el análisis de la migración de MutS y MutSR842E en geles nativos en presencia de ADNdc, ADNp y GT-ADNdc demostró que ambas proteínas exhiben un comportamiento similar, confirmando que el cambio ocurre a nivel estructural y no en el estado oligomérico. Es posible que MutS asociada con dichos sustratos sufra cambios conformacionales que generan formas más extendidas de la proteína, lo cual se traduce en una mayor heterogeneidad de especies y por lo tanto una banda difusa de menor migración en el gel nativo. Finalmente, los resultados en presencia del ADNsc muestran que MutS WT se asocia a este sustrato disminuyendo levemente su migración, mientras que MutSR842E exhibe una banda más difusa de mayor migración, indicando una pérdida en la homogeneidad estructural del complejo ADN-proteína. Actualmente, estamos estudiando la hipótesis de la modificación estructural que sufre MutS en presencia del GT-ADNp mediante la determinación de la estructura tridimensional del complejo ADN-proteína así como cuál podría ser la función de dicho cambio conformacional. En relación a este último aspecto, postulamos que la estructura más compacta de MutS cuando se asocia a un MM cercano a un sitio primeado podría facilitar el acceso a la molécula de β clamp presente en el replisoma donde debería asociarse al anillo junto a Pol III (etapa C del modelo propuesto, ver sección "Sitios de control de MutS sobre la actividad de Pol IV").

Nuestros resultados coinciden con reportes previos que indican que MutS de *E. coli* cambia su conformación cuando se une al ADN [93, 165]. Como se mencionó en la

introducción, el dímero de la proteína de reparación adopta una forma de pinza [95]. En solución, es capaz de experimentar cambios conformacionales dinámicos en el dominio IV, el cual participa en la apertura y el cierre de la misma, facilitando el posicionamiento sobre el sustrato de ADNdc [165]. Una vez cargada, MutS lleva a cabo el escaneo de la molécula de ADN con su dominio IV cerrado y el dominio I (de reconocimiento de MM o InDel) abierto o cerrado. En presencia de un MM, el dominio I de la proteína de reparación se cierra, adoptando una única conformación que permanece por varios segundos unida al ADN facilitando el inicio del MMR [93, 165, 166]. Por otro lado, el tetrámero de MutS en solución tiene una conformación extendida donde los dímeros se disponen alejados entre sí, unidos a través de la región C-terminal. Cuando dicho tetrámero es incubado con un ADNdc que contiene un MM mantiene su forma extendida pero pierde flexibilidad. En estas condiciones el complejo más probable se forma con una estequiometría 1:1. Los cambios conformacionales observados corresponden principalmente a modificaciones inducidas en cada uno de los dímeros cuando interactúan con el ADN [167]. Así, los datos de estudios anteriores coinciden con nuestros experimentos, ya que demuestran que los cambios en la movilidad de MutS en geles nativos ocurren a nivel del dímero. En conjunto, las evidencias sugieren que la estructura de ADN es un punto clave en la regulación del nuevo rol de MutS en la replicación propuesto en esta Tesis.

MutS limita a Pol IV cuando realiza replicación mutagénica, mientras que no la controla cuando lleva a cabo replicación libre de errores en condiciones normales de crecimiento

Los ensayos *in vivo* demostraron que los niveles basales de Pol IV contribuyen a la mutagénesis espontánea en *P. aeruginosa* cuando MutS no interactúa con β clamp. Los resultados que soportan esta conclusión son: (i) la deficiencia de Pol IV disminuyó significativamente las tasas de las sustituciones de bases AT>CG, CG>AT y AT>GC en la cepa *mutS* ^{β} . Por lo contrario, y en concordancia con estudios realizados en otras bacterias como *E. coli* [40, 42, 168, 169], el espectro de mutación no fue modificado cuando se deletó el gen *dinB* en la cepa WT; (ii) la cepa *mutS* ^{β} mostró un Strand bias o preferencia de mutación en una cadena dependiente de Pol IV, la cual no fue detectada en la cepa WT; (iii) se encontró una proporción mayor de sustituciones de bases en el contexto preferido de mutación de Pol IV (GXC) en la cepa *mutS* ^{β} comparado con la cepa WT; y (iv) un incremento de los niveles de Pol IV obtenido mediante la expresión ectópica a partir de un plásmido, produjo un aumento de la mutagénesis de manera dosis-dependiente en la cepa *mutS* ^{β} mientras que dicha mutagénesis estuvo limitada en la cepa WT. Este efecto no se

observó con la mutante Pol IV $\Delta 5$, indicando que la asociación con β clamp es importante para ubicar a Pol IV en su sustrato de ADN.

Como se expuso en la sección Resultados, los tipos de sustituciones de bases producidos por Pol IV en la cepa *mutS β* podrían deberse a la incorporación incorrecta de nucleótidos oxidados, o bien, la TLS de lesiones oxidativas catalizados por esta enzima [54, 140, 141]. Dicha hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en las cepas deficientes en la fosfohidrolasa MutT, las cuales acumulan una mayor concentración del nucleótido oxidado 8-oxo-dGTP. En este contexto genético, se observó un aumento de la mutagénesis cuando MutS no se asocia a β clamp (cepa *mutT mutS β* vs cepa *mutT*). Asimismo, la cepa *mutT mutS β* exhibe una menor sensibilidad al tratamiento con el agente oxidante paraquat que la cepa *mutT*. Estos hallazgos podrían explicarse por el hecho que Pol IV tiene mayor acceso a la replicación en el contexto *mutS β* y en consecuencia, realiza la introducción mutagénica de nucleótidos oxidados y/o TLS en provocando un aumento de mutaciones y tolerancia a paraquat.

Asimismo, el análisis del espectro de mutaciones reveló que existe un Strand bias en la cepa *mutS β* , pero no en la WT. Cabe recordar que en este contexto, el concepto de Strand bias hace referencia a que la mutagénesis ocurre preferencialmente en una de las cadenas del ADN. Estas diferencias podrían explicarse debido a que la síntesis de cada cadena es llevada a cabo por diferentes Pols replicativas [10, 160, 170-173]. Por ejemplo, Pol III está involucrada en la síntesis de la cadena adelantada mientras esta enzima junto a Pol I realizan la replicación de la cadena retardada en bacterias Gram (-) [2, 26]. Además, se postula que existe una mayor probabilidad de que las Pols alternativas accedan a los sitios de replicación en la cadena retardada debido al mayor intercambio de Pols replicativas que ocurre en este contexto. En concordancia con este postulado, la sobreexpresión de Pol IV en *E. coli* incrementa el número de mutaciones, siendo significativamente mayor en la cadena retardada [39, 160]. Nuestros resultados indican que el Strand bias detectado en la cepa *mutS β* fue claramente dependiente de la actividad de Pol IV, ya que la cepa deficiente en dicha Pol no mostró Strand bias (*mutS β* vs *mutS β dinB*). A priori el software iMARS utilizado para detectar este fenómeno no permite discriminar en que cadena ocurre preferencialmente la mutagénesis [138]. Sin embargo, y considerando los datos mencionados, es probable que el mayor acceso de Pol IV pueda darse en la cadena retardada de la replicación en la cepa *mutS β* de *P. aeruginosa*.

Finalmente, no se encontraron diferencias en la habilidad de Pol IV para promover la supervivencia mediante la tolerancia de lesiones inducidas por el agente alquilante ENU entre las cepas WT y *mutS^β*, tanto a niveles basales de esta Pol como en condiciones de sobreexpresión. *In vitro*, Pol IV es capaz de catalizar la TLS con diferente grado de eficiencia de una amplia variedad de lesiones entre las que se incluyen las bases oxidadas, las bases metiladas, los sitios apurínicos y las lesiones fuertemente bloqueantes de la replicación provocadas por diferentes agentes mutagénicos como acetilaminofluoreno, benzopireno, nitrofurazona, 4-nitroquinolona y radiación UV (Resúmenes en [26]). Sin embargo, su participación en la TLS *in vivo* se limita a unas pocas bases alquiladas y oxidadas [26, 174, 175]. Los datos obtenidos de la actividad de Pol IV *in vitro* así como su acción *in vivo* indican que, a diferencia de la TLS de bases oxidadas donde Pol IV incorpora principalmente el nucleótido incorrecto, esta enzima cataliza la TLS libre de error en presencia de bases alquiladas. Así, nuestros datos indicarían que MutS no limita la TLS de bases alquiladas llevada a cabo por Pol IV por lo cual es posible postular que la proteína de reparación no limita la replicación de esta Pol cuando no introduce errores.

En resumen, los datos obtenidos en los ensayos mencionados previamente sugieren que la asociación MutS- β clamp limita la síntesis de baja fidelidad de Pol IV (replicación de ADN no dañado y TLS de bases oxidadas) mientras que no afecta la actividad de Pol IV cuando cataliza síntesis de ADN libre de error (TLS de lesiones alquilantes).

MutS no controlaría la acción de Pol IV en condiciones de estrés

Diversos antecedentes indican que Pol IV cumple un rol importante en la mutagénesis inducida en condiciones estresantes [35, 42, 46, 47, 55, 58, 62]. Este efecto se debe, entre otros factores, a que la expresión de Pol IV aumenta significativamente como parte de la respuesta SOS al estrés genotóxico [35, 36], tal como la que induce la exposición a concentraciones subinhibitorias del antibiótico ciprofloxacina (Cip_{SI})[124]. Nuestros experimentos mostraron que Cip_{SI} indujo fuertemente la respuesta SOS a la vez que aumentó la tasa de mutación en las cepas WT y *mutS^β* de *P. aeruginosa*. La deficiencia de Pol IV no provocó una disminución de la mutagénesis inducida por el tratamiento de Cip_{SI} en ambas cepas, lo cual a priori indicaría que esta Pol no está involucrada en el incremento de mutaciones en esta condición. Sin embargo, no se puede descartar la participación de Pol IV en la mutagénesis provocada por la exposición a este antibiótico, ya que su aporte podría estar enmascarado por otros procesos que ocurren en estas condiciones. Por ejemplo, la inducción de la respuesta SOS en presencia de Cip aumenta la expresión de

otra polimerasa alternativa, ImuB, en *P. aeruginosa* [124]. En este contexto, se ha observado la deficiencia de Pol IV en *P. aeruginosa* aumenta la mutagénesis dependiente de ImuBCD en condiciones de exposición al agente alquilante MMS [121]. Asimismo, la exposición prolongada a Cip_{SI} en *E. coli* aumenta la frecuencia de mutación alrededor de 2000 veces. La delección de forma independiente de Pol IV (*dinB*) o Pol V (*umuDC*) disminuye estos niveles a 500 veces aproximadamente. Sin embargo, en la doble mutante *dinB umuDC* los niveles bajan a 60 veces [155]. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que en este contexto, es posible que la actividad llevada a cabo por Pol IV sea reemplazada por otra Pol alternativa, como ImuBCD, y por esta causa cuando se deleciona el gen *dinB* no se observa una menor mutagénesis. Notablemente, la frecuencia de mutación de la doble mutante en las Pols es mayor en relación al control sin Cip, sugiriendo que existen otros factores que también participan en este fenómeno [124, 155]. En este sentido, se conoce que los antibióticos pueden actuar en diferentes vías que causan mutagénesis. Específicamente, Cip promueve la recombinación entre secuencias divergentes mediante una vía independiente de la respuesta SOS [157]. Asimismo, este antibiótico provoca un incremento de radicales libres dentro de la célula generando estrés oxidativo que a su vez, produce un desbalance del metabolismo de nucleótidos [55, 156]. Incluso hay reportes que demuestran que las quinolonas podrían tener una acción directa sobre el ADN [147]. Es por ello que, con este resultado no se puede descartar la acción de Pol IV en la mutagénesis inducida por Cip.

Debido a la complejidad de efectos producidos por Cip, se estudió el rol de Pol IV en condiciones de expresión constitutiva de la respuesta al estrés SOS (cepas *lexA*). En este caso, se observó un aumento significativo de la tasa de mutación en las cepas deficientes en el represor transcripcional LexA. Dicho efecto depende de Pol IV ya que cepas deficientes en esta proteína muestran una mutagénesis considerablemente menor. Dado que no se observaron diferencias entre los contextos genéticos WT y *mutS^β*, concluimos que la acción de Pol IV no está limitada por la interacción MutS-β clamp en este contexto.

Un interrogante que surge a partir de estos datos es porqué MutS no controla la replicación mutagénica realizada por Pol IV. Estudios previos demostraron que la exposición a niveles subletales de antibióticos β-lactámicos induce un aumento de la mutagénesis en *E. coli*, efecto que correlaciona con un aumento de expresión de Pol IV y una disminución de la cantidad de MutS [123]. Es por ello, que una posibilidad es que la

expresión de MutS se encuentre disminuida en las cepas *lexA* permitiendo que Pol IV acceda libremente a los sitios de replicación. Sin embargo, nuestros ensayos de Western blot demuestran que la expresión de MutS se mantiene al mismo nivel en este contexto de inducción del SOS que en células bajo condiciones normales de crecimiento. Por otro lado, se ha reportado que los niveles de expresión β clamp de *P. aeruginosa* disminuyen 4 veces en exposición a Cip, convirtiéndolo en un factor limitante para las proteínas que requieren de su actividad [124].

Una explicación alternativa a la falta de control de MutS en condiciones de estrés es que Pol IV podría actuar independientemente de la interacción con β clamp, molécula clave para que MutS controle a esta Pol. En este sentido, como se mencionó en la Introducción, recientes estudios de microscopía de molécula única han analizado el rol de la asociación Pol IV- β clamp sobre la actividad de Pol IV. En condiciones estresantes, donde Pol IV aumenta 10 veces su concentración se produce un enriquecimiento de Pol IV en células de *E. coli*. [59, 80, 176]. La distribución de los focos de Pol IV así como su dependencia con la interacción con β clamp varía según el tipo de lesión inducida por los diferentes agentes que dañan al ADN. Así, por ejemplo Pol IV forma focos próximos al replisoma de manera dependiente de la asociación a β clamp en presencia del compuesto MMS, pero alejados de la replicación e independiente de la unión a β clamp en células expuestas al antibiótico NFZ [59].

Finalmente, otra posibilidad es que MutS sea inactiva para regular a Pol IV debido a la acumulación de ADNsc como consecuencia de un aumento de la expresión de múltiples genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo del ADN. Tal como sugieren nuestros ensayos bioquímicos, la presencia de ADNsc sería un factor clave que modula la capacidad de MutS para competir con Pol por el factor de procesividad. Tampoco es posible descartar que la acción de MutS sea regulada por otros factores inducidos como parte de la respuesta SOS.

Sitios de control de MutS sobre la actividad de Pol IV

En base a la bibliografía y nuestras evidencias, el modelo propuesto plantea que lo más probable es que MutS actúe en el contexto del replisoma. En primer lugar, se postula que la actividad de Pol IV se centraría en el replisoma bajo condiciones normales de crecimiento. Los estudios *in vitro* han demostrado que Pol IV accede al β clamp que forma

parte del complejo Pol III HE presente en el replisoma cuando se producen paradas de replicación, o con mucha menor eficiencia, cuando Pol III HE está replicando activamente [68, 69, 71, 72]. Los ensayos que permiten analizar los intermediarios de replicación *in vivo*, demostraron que la subunidad ϵ correctora de Pol III compite con Pol IV por el terminal del primer en templados que contienen una base dañada sugiriendo que la Pol alternativa podría situarse en el aparato de replicación [177]. Sin embargo, al momento no ha sido posible confirmar si Pol IV accede al replisoma en condiciones no estresantes mediante estudios de microscopía en bacterias. Por otro lado, estudios proteómicos previos de nuestro laboratorio demostraron que la región C-terminal de MutS fusionada a la Proteína de Unión a Maltosa co-purifica con β clamp y la subunidad α de Pol III core *in vivo* (Monti et al., datos no publicados). Dado que en este trabajo determinamos que α no interacciona con MutS, es probable que MutS sea capaz asociarse a β clamp junto a la subunidad α lo cual implicaría que la proteína de reparación podría acceder al factor de procesividad asociado a la maquinaria de replicación en *P. aeruginosa*. Estos datos concuerdan con un estudio donde se analizó el comportamiento de moléculas de MutS individuales en células de *B. subtilis* utilizando microscopía de superresolución [178]. En este trabajo se observó que una gran proporción de esta proteína accede al replisoma en todas las células, a la vez que dicha localización depende de la asociación a β clamp [98, 178].

A partir de estos resultados se plantearía estudiar cómo dos proteínas tan voluminosas como MutS (400 kDa) y Pol III (160 kDa) pueden unirse al mismo tiempo al factor de procesividad. En parte, esto podría explicarse por la existencia de una regulación de la conformación de MutS en presencia de los sustratos de ADN, tal como fue observado en el GT-ADNp. Además, y para relevancia de este modelo, se estimó que la concentración de MutS en células de *P. aeruginosa* creciendo exponencialmente es de ≈ 265 nM, valor menor a la KD ($\approx 1\mu\text{M}$) de la interacción MutS- β clamp. Debido a que la unión de MutS a β clamp aumenta significativamente ($\approx 3,5$ veces) en presencia de ADNp con un MM, se podría asumir que MutS solo interacciona con el factor de procesividad cuando se produce un mal apareamiento durante la replicación.

Otra posibilidad es que Pol IV acceda a la replicación actuando en los anillos de β clamp acumulados detrás del replisoma durante la síntesis de la cadena retardada [24, 25]. Si MutS regula la unión de Pol IV a esas moléculas de β clamp, la actividad exonucleasa de Pol

II, podría estar involucrada en la remoción de las bases mal apareadas generadas por Pol IV. De hecho existen evidencias de que Pol II corrige los errores introducidos por Pol IV y Pol III durante la replicación así como los MM generados por Pol IV cuando participa en la síntesis de ADN durante la recombinación homóloga [60, 179]. Entonces, si el control ocurre en el replisoma, la subunidad ϵ sería la encargada de remover el error mientras que si Pol IV acceda a los β clamps remanentes detrás del replisoma, sería Pol II responsable de escindir los MMs.

La nueva función de MutS podría estar presente en otras especies bacterianas y eucariotas

MutS de otras bacterias también interacciona con el factor de procesividad [98, 103]. Al presente, se postula que esta interacción juega un rol en el MMR de *B. subtilis* reclutando a MutS a los sitios de replicación del ADN y permitiendo un eficiente reconocimiento de la base mal apareada [98, 100]. Sin embargo, estos resultados han sido obtenidos en base al análisis de la mutante que no se asocia a β clamp, MutS800, la cual presenta una menor actividad ATPasa y unión al ADN. Por lo cual, es difícil analizar si los defectos en la reparación se deben o no a la ausencia de interacción con el factor de procesividad. Contrariamente, la interacción MutS- β clamp claramente no es importante en el MMR de *E. coli* y *P. aeruginosa* [131, 180], planteando el interrogante acerca de su significancia funcional en ambos organismos. Nuestros hallazgos develaron un nuevo rol de esta interacción en *P. aeruginosa* y se espera que las características descritas aquí puedan ser extrapolables a otras bacterias. En relación a organismos eucariotas, se observó que la asociación entre MutS α -PCNA tiene una contribución limitada a la vía del MMR [181, 182]. No obstante, MutS α sería capaz de regular la TLS dependiente de Pol κ y Pol η en células humanas promoviendo la monoubiquitinación de PCNA en respuesta a UV y daño oxidativo, respectivamente [183, 184]. Esta modificación postraducciona transitoria de PCNA facilita el reclutamiento de estas TLS Pols, que realizan una TLS libre de error sobre estas lesiones, y su intercambio con la Pol replicativa para tolerar el daño [164]. Por lo tanto, MutS podría modular la acción de las Pols alternativas tanto en bacterias como en eucariotas a fin de evitar la mutagénesis provocada por estas enzimas.

Actualmente, nuestro laboratorio está investigando si el mecanismo de control de Pol IV por MutS que describimos en *P. aeruginosa* está conservado en otras especies bacterianas, tal como *B. subtilis* y *E. coli*. Estas bacterias fueron elegidas como modelo de

estudio porque como se detalla en la Introducción, exhiben diferencias mecánicas importantes a nivel del MMR, las Pols alternativas y el funcionamiento del aparato de replicación. Nuestros resultados indicarían que la interacción MutS- β clamp tendría un rol importante en evitar la mutagénesis provocada por los conflictos que se producen cuando colisionan la maquinaria de replicación y transcripción. En este sentido, Pol IV está implicada en el proceso de reparación de lesiones llamado sistema de escisión de nucleótidos asociado a la transcripción (Transcription-Coupled-Nucleotide Excision Repair, TC-NER) [185-187]. Este proceso se inicia cuando la ARN Pol encuentra una lesión en la cadena molde que impide su avance, aumentando la probabilidad de que ocurran choques con el replisoma. Para evitar la colisión entre ambos aparatos, la ARN Pol se disocia o aparta del sitio dañado para reclutar los factores del NER que remueven la lesión. El proceso de reparación por el NER consiste en la generación de incisiones en el ADN, escisión de la cadena de ADN generando un gap que es rellenado por la actividad de síntesis de Pol IV [188]. Así, es posible que MutS a través de la unión a β clamp regule la acción de Pol IV asociada al TC-NER.

Igualmente, y como parte de una pasantía de investigación que realicé en el Laboratorio del Dr. Vincent Pagès en el Centro de Investigación en Cáncer de Marsella-Francia, inicié un trabajo para analizar el rol funcional de la asociación entre MutS y β clamp en *E. coli*. Para ello, utilicé un sistema que permite insertar una única base dañada en una posición específica del cromosoma y posteriormente, analizar las vías de tolerancia a lesiones, incluyendo la TLS [189]. Brevemente, los resultados obtenidos indicarían que MutS no estaría implicada en la regulación de los niveles de TLS de la lesión altamente bloqueante AFF, la cual es principalmente tolerada por recombinación y en una baja proporción por TLS llevada a cabo por Pol V y Pol II. Asimismo, construí un nuevo sistema con la lesión N2-alkylguanina, la cual produce un bloqueo menor de la replicación y se ha observado que Pol IV de *E. coli* realizaría la TLS [190]. Nuestros ensayos muestran que esta lesión sería tolerada principalmente por TLS libre de error a la vez que confirman que Pol IV sería la principal Pol involucrada. Asimismo, la disrupción de la interacción MutS- β clamp no afectaría los niveles de TLS. Estos experimentos concuerdan con nuestra hipótesis de que MutS no desplaza a Pol IV cuando realiza síntesis libre de error. A futuro se pretende estudiar la tolerancia de lesiones oxidativas, ya que, como se mencionó, Pol IV lleva a cabo TLS errónea [54, 141].

El rol de Pol IV y MutS en la adaptación de bacterias patógenas como P. aeruginosa

En el presente estudio, hemos utilizado como modelo de estudio *P. aeruginosa*, bacteria patógeno oportunista de humanos que puede establecer infecciones tanto agudas como crónicas principalmente en personas inmunocomprometidas como pacientes FQ. Esta bacteria produce una amplia variedad de factores de virulencia que junto con fenotipos asociados a la movilidad son importante en procesos infectivos agudos [120, 191]. Por el contrario, esta bacteria experimenta una adaptación durante infecciones crónicas caracterizada por una menor producción de factores de virulencia, transición a la forma de crecimiento en biofilms junto con pérdida de la movilidad y la adquisición de resistencia a múltiples antibióticos. Este proceso adaptativo se caracteriza por la adquisición de un gran número de mutaciones donde se inactivan genes que codifican reguladores transcripcionales globales, incluyendo a RpoN, NfxB, AmpR y MucA en etapas tempranas de la infección mientras se seleccionan mutaciones en otros genes en estadios más tardíos de la infección, probablemente necesarias para la persistencia del patógeno, tal como aquellas que inactivan el gen *mutS* [120].

En este trabajo analizamos nuestro mecanismo utilizando como gen reportero de la calidad de mutaciones a *nfxB* en los distintos contextos genéticos. Este gen codifica uno de los reguladores transcripcionales implicado en la adaptación temprana de *P. aeruginosa* [144]. Así, utilizando un sistema reportero que contiene la fusión del promotor *mexCD* al operón *luxCDABE*, demostramos que surgen variantes menos activas de NfxB en la cepa *mutS^β* que no se observaron en la cepa WT. Dichas variantes fueron generadas por acción de Pol IV ya que no se detectaron en la cepa deficiente en Pol IV, *mutS^β dinB*. Estas evidencias sugieren que la acción no controlada de Pol IV podría producir cambios en la calidad de las mutaciones en *nfxB* que se traducen en la generación de variantes fenotípicas menos activas. Cabe destacar que durante el establecimiento de la infección en el pulmón FQ, *P. aeruginosa* se encuentra dentro de un ambiente altamente estresante, en el cual, según nuestro modelo, MutS no controlaría a Pol IV. En consecuencia, es posible que en este contexto se promueva la mutagénesis en ciertas regiones específicas dentro del genoma según la preferencia de secuencia de Pol IV, y a su vez, se produzcan cierto tipo de mutaciones. De esta manera, en etapas tempranas de la infección, la ausencia de control de Pol IV podría representar un factor importante en la pato-adaptación de bacterias. Además, esta estrategia tendría menores consecuencias sobre la viabilidad celular en comparación con la mutagénesis provocada por inactivación de genes de

reparación, tal como MutS o MutL, lo cual genera células hipermutadoras. Luego, la inactivación de MutS podría ser un factor importante en el mantenimiento de la infección crónica [192, 193].

¿Cómo separa MutS sus funciones en la regulación del acceso de Pol IV a la replicación de su función más conservada en la vía del MMR?

MutS es principalmente conocida por su función en el MMR, donde inicia el proceso de remoción bases mal apareadas o MM durante la replicación del ADN. Esta proteína reconoce y se une al MM para luego reclutar a otra proteína clave del MMR, MutL. Ambas proteínas, MutS y MutL, forman un complejo que llama en acción a otros factores implicados en las etapas subsecuentes que incluyen la discriminación de la hebra recién sintetizada de la nueva, la escisión de la base errónea y la re síntesis de ADN [83, 194]. Así, la interacción MutS-MutL es crítica para el correcto funcionamiento del MMR, ya que coordina el reconocimiento del MM con los eventos siguientes. Por el contrario, la asociación entre MutS y β clamp es importante en el mecanismo de control de Pol IV propuesto en la presente Tesis.

En este trabajo analizamos la interacción entre MutS y MutL en presencia del factor de procesividad en ensayos de FW (Ver anexo Figura A1). La interacción entre las proteínas del MMR fue inhibida en presencia de β clamp. Por el contrario, la versión mutante MutS $^{\beta}$ fue capaz de asociarse a MutL en presencia o ausencia de β clamp. Basándose en estos datos, se puede postular que la interacción de MutS con β clamp funciona en la regulación del acceso de Pol IV a la replicación y limita la actividad de MutS en la reparación. Entonces, es posible plantear que cuando un MM generado por la actividad de Pol IV se encuentra cercano a β clamp, puede ser detectado por MutS y removido según nuestro modelo. Estos MM no serían removidos por el mecanismo clásico del MMR ya que la unión de MutS a β clamp inhibe su asociación con MutL. Contrariamente, cuando un MM generado por Pol IV o las Pols replicativas están en sitios lejanos a β clamp, MutS puede interaccionar con MutL e iniciar la vía del MMR (Figura D1). De esta manera, una vez que MutS se une a un MM, la asociación con MutL o β clamp dicte que mecanismo de remoción del MM se desencadena.

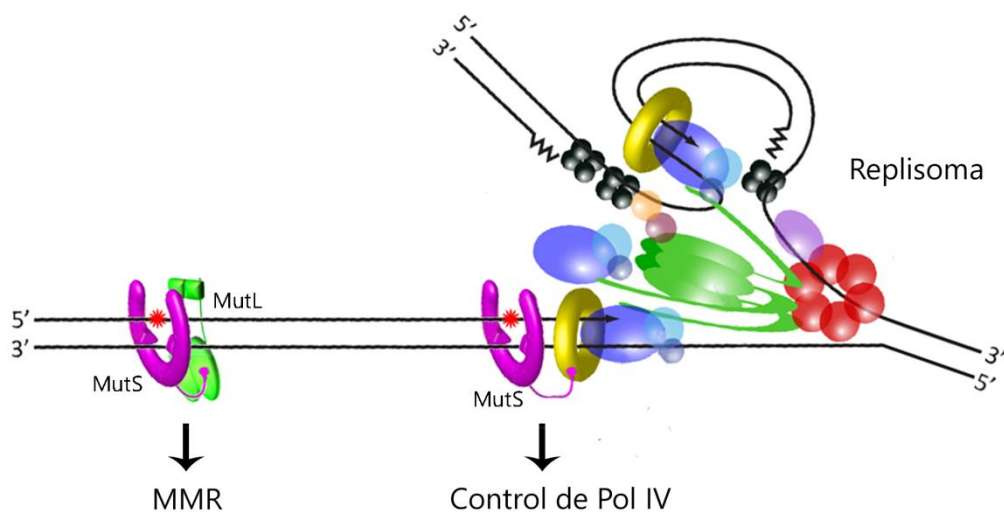


Figura D1. Modelos propuestos para la separación de las funciones de MutS. Se postula que cuando aparece un MM próximo a un anillo de β clamp, como ocurre cuando Pol IV realiza la síntesis, MutS es reclutada para desplazar dicha Pol de β clamp. La interacción MutS- β clamp favorecería la regulación del acceso de Pol IV a la replicación y limitaría la actividad de MutS en la reparación, ya que la unión de MutS con β clamp inhibe su asociación con MutL. Por el contrario, si los MMs se encuentran en sitios lejanos a β clamp, MutS es capaz interaccionar con MutL e inicia la vía del MMR

Conclusión final

Como se mencionó previamente, las funciones más conocidas de MutS es reconocer las bases mal apareadas para gatillar el MMR [83] así como regular la recombinación entre secuencias parcialmente homólogas [108, 195]. Los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral aportan evidencias por primera vez sobre una función no canónica de la proteína de reparación MutS en la regulación de una actividad inherente al aparato de replicación en bacterias. Asimismo, este trabajo expone la existencia de una regulación fina y compleja de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN que modulan la acción de un mecanismo en particular para mantener la fidelidad de la replicación.

Estos hallazgos abren nuevos interrogantes acerca del contexto en el que ocurre y los detalles de su regulación. Como perspectiva y teniendo en cuenta los recientes estudios utilizando microscopía de molécula única en bacterias, sería interesante investigar si MutS regula la acción de Pol IV dentro o fuera del replisoma. Además, como se mencionó previamente, es de nuestro interés utilizar el sistema de monitoreo de lesiones únicas

desarrollado en el grupo del Dr. Pagés (Francia) para analizar la actividad y control de Pol IV en su función de TLS mutagénica y libre de error. La ventaja de dicho sistema, es que permite estudiar la tolerancia de una lesión específica en el cromosoma en presencia de todos los componentes celulares, por lo cual se pueden extraer conclusiones considerando el contexto completo en el que ocurre dicho evento. En cuanto a la regulación del mecanismo, los resultados preliminares indicarían que la estructura de ADN juega un rol fundamental en esta nueva función de MutS, por lo que es interesante continuar estudiando a nivel estructural cuales son los cambios provocados en la proteína de reparación y como afecta su funcionalidad, tal como su actividad ATPasa o sus interacciones con otras proteínas como MutL y β clamp. En este sentido, nuestro grupo se encuentra colaborando activamente con equipos de investigación especializados en estudios estructurales.



MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

Tabla M1. Cepas bacterianas utilizadas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Nombre de la cepa	Características relevantes	Referencia
PAO1	Cepa salvaje	[131]
PAO1 <i>mutS</i> ^β	Posee el alelo <i>mutS</i> ^β ; derivada de la cepa PAO1	[131]
PAO1 <i>dinB</i>	Deficiente en el gen <i>dinB</i> ; derivada de la cepa PAO1	Tesina de grado
PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β	Deficiente en el gen <i>dinB</i> y posee el alelo <i>mutS</i> ^β ; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β	Tesina de grado
PAO1 <i>dinB</i> -His	Posee el gen <i>dinB</i> fusionado a un His ⁶ -tag en el N-terminal; derivada de la cepa PAO1.	Este trabajo
PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>dinB</i> -His	Posee el alelo <i>mutS</i> ^β y el gen <i>dinB</i> fusionado a un His ⁶ -tag en el N-terminal, derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β	Este trabajo
PAO1 <i>plexA</i> ::lux	Posee el operón reportero luxCDABE fusionado al promotor del gen <i>lexA</i> (<i>plexA</i> ::lux); derivada de la cepa PAO1	Este trabajo
PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux	Posee el alelo <i>mutS</i> ^β y el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β	Este trabajo
PAO1 <i>dinB plexA</i> ::lux	Deficiente en el gen <i>dinB</i> y posee el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>dinB</i>	Este trabajo
PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux	Deficiente en el gen <i>dinB</i> , posee el alelo <i>mutS</i> ^β y el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>dinB</i>	Este trabajo
PAO1 <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Deficiente en el gen <i>lexA</i> y posee el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>plexA</i> ::lux	Este trabajo
PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Posee el alelo <i>mutS</i> ^β , el reportero <i>plexA</i> ::lux y es deficiente en el gen <i>lexA</i> ; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux	Este trabajo
PAO1 <i>dinB plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Deficiente en los gen <i>dinB</i> y <i>lexA</i> y posee el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>dinB plexA</i> ::lux	Este trabajo
PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Deficiente en el gen <i>dinB</i> y <i>lexA</i> , posee el alelo <i>mutS</i> ^β y el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux	Este trabajo
PAO1 <i>mutS</i> C-strep	Posee el gen <i>mutS</i> fusionado a un Strep III-tag en el C-terminal (<i>mutS</i> -strep); derivada de la cepa PAO1.	Este trabajo
PAO1 <i>mutS</i> ^β C-strep	Posee el alelo <i>mutS</i> ^β fusionado a un Strep III-tag en el C-terminal (<i>mutS</i> ^β -strep); derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β	Este trabajo
PAO1 <i>dinB mutS</i> C-strep	Deficiente en el gen <i>dinB</i> y posee el gen <i>mutS</i> -strep; derivada de la cepa PAO1 <i>dinB</i>	Este trabajo
PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β C-strep	Deficiente en el gen <i>dinB</i> y que posee el alelo <i>mutS</i> ^β -Strep; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>dinB</i>	Este trabajo
PAO1 <i>plexA</i> ::lux <i>lexA mutS</i> C-strep	Deficiente en el gen <i>lexA</i> y posee el gen <i>mutS</i> -strep y el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Este trabajo
PAO1 <i>mutS</i> ^β C-strep <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Posee el alelo <i>mutS</i> ^β -Strep, el reportero <i>plexA</i> ::lux y es deficiente en el gen <i>lexA</i> ; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Este trabajo
PAO1 <i>dinB plexA</i> ::lux <i>lexA mutS</i> C-strep	Deficiente en los genes <i>dinB</i> y <i>lexA</i> y posee el gen <i>mutS</i> -strep y el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>dinB plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Este trabajo
PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β C-strep <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Deficiente en los genes <i>dinB</i> y <i>lexA</i> , posee el alelo <i>mutS</i> ^β -strep y el reportero <i>plexA</i> ::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β <i>plexA</i> ::lux <i>lexA</i>	Este trabajo
PAO1 pMexCD::lux	Posee el operón reportero luxCDABE fusionado al promotor del gen <i>mexCD</i> (pMexCD::lux); derivada de la cepa PAO1	Este trabajo

PAO1 <i>mutS</i> ^β pMexCD::lux	Posee el alelo <i>mutS</i> ^β y el reportero pMexCD::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β	Este trabajo
PAO1 <i>dinB</i> pMexCD::lux	Deficiente en el gen <i>dinB</i> y posee el reportero pMexCD::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>dinB</i>	Este trabajo
PAO1 <i>dinB mutS</i> ^β pMexCD::lux	Deficiente en el gen <i>dinB</i> , posee el alelo <i>mutS</i> ^β y el reportero pMexCD::lux; derivada de la cepa PAO1 <i>mutS</i> ^β <i>dinB</i>	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
Nombre de la cepa	Características relevantes	Referencia
BL21	Cepa huésped para la expresión de proteínas	Novagen
BL21 plysS	Cepa huésped para la expresión de proteínas	Stratagene
XL1Blue	Tc ^R ; Cepa huésped para clonado de ADN	Invitrogene
DH5α	Cepa huésped para clonado de ADN	Invitrogene
SY327	Rif ^R ; Cepa huésped para clonado de ADN	[196]
SM10 (λpir)	Cepa donora para la conjugación de pKNG101	Dra. Lucchesi

Tabla M2. Plásmidos utilizados en esta Tesis

Nombre	Características	Referencias
pGEM-Teasy	Amp ^R ; Vector de clonado de productos de PCR	Promega
pGEM- <i>dinB</i>	Amp ^R ; pGEM-T Easy que contiene el gen <i>dinB</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Tesina de grado
pGEM- <i>dinB</i> D8A	Amp ^R ; pGEM-T Easy que contiene el gen <i>dinBD8A</i>	Este trabajo
pGEM- <i>dinB</i> Δ5	Amp ^R ; pGEM-T Easy que contiene el gen <i>dinB</i> Δ5	Este trabajo
pGEM- <i>dinB</i> up	Amp ^R ; pGEM-Teasy que contiene los 255 nucleótidos aguas arriba y 23 nucleótidos aguas abajo del gen <i>dinB</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este trabajo
pGEM- <i>dinB</i> del	Amp ^R ; pGEM-Teasy conteniendo el gen <i>dinB</i> de <i>P. aeruginosa</i> delecionado	Tesina de grado
pGEM- <i>lexA</i>	Amp ^R ; pGEM-Teasy conteniendo el gen <i>lexA</i> de <i>P. aeruginosa</i> delecionado	[132]
pGEM- <i>lexA</i> del	Amp ^R ; pGEM-Teasy conteniendo el gen <i>lexA</i> de <i>P. aeruginosa</i> con un codón de stop prematuro	Este trabajo
pGEM- <i>dinB</i> NterHis ⁶	Amp ^R ; pGEM-Teasy conteniendo la región 5' del gen <i>dinB</i> de <i>P. aeruginosa</i> fusionado a la secuencia que codifica His6-tag	Este trabajo
pGEM- <i>mutS</i> CterStrep y	Amp ^R ; pGEM-Teasy conteniendo la región 3' del gen <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> fusionado a la secuencia que codifica Strep II-tag	Este trabajo
pGEM-15 <i>mutS</i> ^β CterStrep	Amp ^R ; pGEM-Teasy conteniendo la región 3' del gen mutante <i>mutS</i> ^β de <i>P. aeruginosa</i> fusionado a la secuencia que codifica Strep II-tag	Este trabajo
pKNG101	Sm ^R ; Vector suicida para la sustitución alélica de genes en <i>P. aeruginosa</i>	[196]
pKNG- <i>dinB</i> del	Sm ^R ; pKNG101 con el gen <i>dinB</i> delecionado	Este trabajo
pKNG- <i>lexA</i> del	Sm ^R ; pKNG101 con el gen <i>lexA</i> que contiene un codón stop prematuro	Este trabajo
pKNG- <i>dinB</i> NterHis ⁶ ,	Sm ^R ; pKNG101 conteniendo la región 5' del gen <i>dinB</i> de <i>P. aeruginosa</i> fusionado a la secuencia que codifica His6-tag	Este trabajo
pKNG- <i>mutS</i> CterStrep	Sm ^R ; pKNG101 conteniendo la región 3' del gen <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> fusionado a la secuencia que codifica Strep II-tag	Este trabajo
pKNG- <i>mutS</i> ^β CterStrep	Sm ^R ; pKNG101 conteniendo la región 3' del gen mutante <i>mutS</i> ^β de <i>P. aeruginosa</i> fusionado a la secuencia que codifica Strep II-tag	Este trabajo
pUC18-mini-Tn7T-Gm-lux	Gm ^R ; vector utilizado para la inserción de reporteros lux mediante transposición	[132, 197]
pTNS2	Plásmido Helper que contiene los genes TnsABCD involucrados en la transposición sitio específica	[197]
pET15b	Ap ^R ; Vector de expresión de proteínas fusionadas a His ₆	Novagen
pET15b- <i>dinB</i> ,	Ap ^R ; pET15b con el gen <i>dinB</i> que codifica a Pol IV	Tesina de grado
pET15b- <i>dinB</i> Δ5	Ap ^R ; pET15b con el gen <i>dinB</i> Δ5 que codifica para la mutante de deleción Pol IV-Δ5	Tesina de grado

lexA-fw	5'-TTCATATGCAGAAGCTGACGCCCG-3'	Sitio NdeI subrayado	
lexA-rv	5'-AAATGCATCAGCGCCGGATCACGCC-3'	Sitio NsiI subrayado	
NfxB1	5'-AGCCATGACACACCCGACCG-3'		[143]
NfxB2	5'-TGCCATGCGGCGACGAGAGG-3'		[143]
pETStrep-fw	5'CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACG ATGGCTAGCTGGAGCCATCCGCAATTCGAGAAGGG-3'		Este trabajo
pETStrep-rv	5'AACTCAGCTTCCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCGAG CATATGTGCGCCCTTTTCGAACTGGGGGTG-3'		Este trabajo
PlexAF	5'-TATA <u>ACTAGT</u> GGTTTCTCCGCCTGACAAACAC-3'	Sitio SpeI subrayado	Tesis Morero
PlexAR	5'-ATAT <u>GGATCC</u> GTTCAGCTTCTGCATGTCGTCGC-3'	Sitio BamHI subrayado	Tesis Morero
StrepmutS1-fw	5'-CAAT <u>GGGCCC</u> AACGTGCACCTGAACGC-3'	Sitio ApaI subrayado	Este trabajo
StrepmutS1-rv	5' <u>CTGGGGGTGCGACCACGAGCCGCCGCGCTACCGCCGCCGCTAC</u> <u>CGCCGCCCTTCTCGAATTGCGGATGGCTCCAGGCGCTGACCCGCAT</u> <u>CTTCCATGC-3'</u>	Secuencia del Strep-tag (Subrayado)	Este trabajo
StrepmutS2-fw	5' <u>CTCGTGGTGGCACCCCCAGTTCGAAAAGTGACGGACTACCGCAC</u> AAG-3'	Secuencia del Strep-tag (Subrayado)	Este trabajo
StrepmutS2-rv	5'-CCTAG <u>TCGACC</u> CAGCTCGCTGTTTCAGCTCG-3'	Sitio Sall subrayado	Este trabajo
VIR 4	5'-ATTTCTTCAGCAGATAG <u>TA</u> ACCATACTGATTCACAT-3'	Oligonucleótido de base. Se subraya la posición del GT.	[130]
VIR 5	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>ACT</u> ATCTGCTGAAGGAAAT-3'	Forma el ADNdc	[130]
VIR 7	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>ACT</u> ATCTGC-3'	Forma el ADNp	Este trabajo
VIR 3	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGCTGAAGGAAAT-3'	Forma el ADNdc-GT	[130]
VIR 6	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGC-3'	Forma el ADNp-GT ^{8pb} (8 pb desde el GT-)	Este trabajo
VIR6.3	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGCT-3'	Forma el ADNp-GT ^{9pb}	Este trabajo
VIR6.4	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGCTG-3'	Forma el ADNp-GT ^{10pb}	Este trabajo
VIR 6.1	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGCTGA-3'	Forma el ADNp-GT ^{11pb}	Este trabajo
VIR6.5	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGCTGAA-3'	Forma el ADNp-GT ^{12pb}	Este trabajo
VIR6.6	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGCTGAAG-3'	Forma el ADNp-GT ^{13pb}	Este trabajo
VIR 6.2	5'-ATGTGAATCAGTATGGTT <u>GCT</u> ATCTGCTGAAGG-3'	Forma el ADNp-GT ^{14pb}	Este trabajo
VIR 4.1	5'-ATTTCTTCAGCAGATAGCAACT <u>ATA</u> CTGATTCACAT-3'	Forma el ADNp-GT ^{15pb} con el VIR 6.1	Este trabajo
VIR 4.2	5'-ATTTCTTCAGCAGATAGCAACCATA <u>T</u> TGATTCACAT-3'	Forma el ADNp-GT ^{16pb} con el VIR 6	Este trabajo

MEDIOS DE CULTIVOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las bacterias fueron crecidas aeróbicamente a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) (peptona ácida de caseína 10 g/l, NaCl 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l) con o sin

antibiótico según corresponda. Para la obtención de medios de cultivo sólidos se agregó agar-agar 1,3%.

El crecimiento bacteriano fue determinado midiendo la biomasa celular por absorbancia a 600 nm (DO600) o el número de células viables mediante siembra de diluciones apropiadas en medio LB-agar y cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC).

ENZIMAS Y REACTIVOS QUÍMICOS

Las enzimas ADN polimerasa (Taq y Pfu) y las enzimas de restricción se obtuvieron de Promega, Fermentas y Biolabs. El reactivo de Bradford fue obtenido de Bio-Rad. Para la purificación de proteínas con His-tag se utilizó la resina Ni-NTA Agarose de Qiagen y, para las proteínas con Strep-tag la resina ProBond de Invitrogene.

Los anticuerpos utilizados para Western Blot y far Western fueron rabbit anti-His6 polyclonal antibody de Santa Cruz Biotechnology; mouse anti-His6 monoclonal antibody de Sigma; IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit y goat anti-mouse antibodies de LI-COR Bioscience.

Los inductores isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y L-(+)-Arabinosa fueron obtenidos de Promega y Sigma, respectivamente.

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL CLONADO MOLECULAR

Minipreparaciones de ADN plasmídico

Para extraer y purificar plásmidos bacterianos se utilizaron los kits Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega y GenElute™ Plasmid Miniprep de Sigma.

Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de digestión con enzimas de restricción fueron separados del resto de la mezcla de reacción por electroforesis en geles de agarosa. La banda de interés se escindió del gel y luego se purificó el ADN mediante absorción a una columna con sílica-gel (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit de Thermo scientific o Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System). Los productos de PCR fueron purificados directamente a partir de la mezcla de reacción con los mismos kits.

Reacciones enzimáticas

Las reacciones de digestión y ligado se realizaron según protocolos convencionales y las indicaciones de los proveedores (Promega, Biolabs, Thermo scientific).

Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar el ADN se utilizaron geles de agarosa (1-2%). La electroforesis se llevó a cabo en cubas electroforéticas sumergidas en buffer TAE 0,5x (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 1mM, pH 8) durante 30 min a 100 voltios.

La visualización del gel se realizó mediante tinción con Bromuro de Etidio y exposición a luz UV. La determinación del tamaño de los fragmentos de ADN se realizó por comparación con marcadores de peso molecular (Thermo scientific).

Transformación de bacterias

La preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se efectuó mediante lavados sucesivos con H₂O MiliQ estéril a 4°C de células en fase exponencial (DO₆₀₀=0,7). En el caso de *P. aeruginosa*, los lavados fueron realizados con solución de sacarosa 300 mM a temperatura ambiente. Luego, las células fueron concentradas y mezcladas con el ADN para luego realizar la electrotransformación a través de una descarga eléctrica.

Las células ultracompetentes de *E. coli* DH5α fueron provistas por el servicio de FACEMES del CIQUIBIC-CONICET, FCQ, UNC.

Chequeo de los plásmidos

Todos los plásmidos nombrados anteriormente fueron secuenciados en el servicio de secuenciamiento del ADN de la Universidad de Chicago, Estados Unidos (University of Chicago, DNA Sequencing & Genotyping Facility).

CLONADOS DE PLÁSMIDOS

Clonado de *dinB* y construcción de sus versiones mutantes

El gen *dinB* (1050 pb) fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de *P. aeruginosa* PAO1 con los oligonucleótidos *dinBfw* y *dinBrv*. Para la reacción de PCR se utilizaron las siguientes condiciones: (a) 5 min 95°C; (b) 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72°C; (c) 10 min a 72°C. Luego, dicho producto de PCR fue clonado en el vector comercial pGEM-Teasy obteniendo el plásmido pGEM-*dinB*. Esta construcción fue utilizada para generar las versiones mutadas Pol IV D8A y Pol IV Δ5 mediante mutagénesis sitio dirigida. En la mutante puntual Pol IV D8A se reemplazó el codón GAC (Asp) por GCC (Ala), mientras que la mutante Pol IV Δ5 que contiene una delección de los cinco aminoácidos del C-terminal se obtuvo reemplazando el codón CAA por el codón de terminación TAA. Brevemente, se realizó el siguiente protocolo: (1) Amplificación por PCR con ADN Polimerasa Pfu a partir del plásmido pGEM-*dinB* (3,4 ng/μl) utilizando los pares de primers D8As y D8As ó Δ5s y Δ5as (condiciones de reacción: (a) 2 min 95°C; (b) 18 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50-65 °C y 15,5 min a 72°C; (c) 10 min a 72°C); (2) Se trató el producto con DpnI para digerir el sustrato molde pGEM-*dinB* que no contiene las mutaciones; (3) Se transformó *E. coli* XL1-Blue con los productos de dicha digestión para recuperar los plásmidos mutados por PCR pGEM-*dinB* D8A y pGEM-*dinB* Δ5.

Clonados en el vector pKNG101

Con el fin de generar cepas deficientes en Pol IV (*dinB*), en primer lugar, un fragmento (1288 pb) que abarca de 255 nucleótidos aguas arriba y 23 nucleótidos aguas abajo del gen *dinB* fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos *dinB-up* y *dinB-rv* a partir de ADN genómico obtenido de la cepa PAO1. Las condiciones de reacción fueron: (a) 5 min

95°C; (b) 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72°C; (c) 10 min a 72°C. Subsecuentemente, este producto de PCR fue clonado en el plásmido pGEM-T Easy para obtener el vector pGEM-dinBup. La delección interna fue obtenida por digestión del pGEM-dinBup con XhoI, la cual corta en las posiciones +46 y +799 respecto al codón de iniciación ATG, seguida de religación, lo cual dio lugar al vector pGEM-dinBdel.

Para obtener las cepas PAO1 deficientes en *lexA*, se amplificó el gen por PCR con los primers *lexA-fw* y *lexA-rv* a partir de ADN Genómico de PAO1. Las condiciones de reacción fueron: (a) 5 min 95°C; (b) 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72°C; (c) 10 min a 72°C. Subsecuentemente, este producto fue clonado en el plásmido pGEM-T Easy para obtener el vector pGEM-*lexA*. La delección interna de 4 pb fue realizada mediante digestión de pGEM-*lexA* con XmaI, la cual corta en una posición +80 pb respecto al codón de iniciación ATG, seguida de un tratamiento con la nucleasa S1 y religación, obteniendo el plásmido pGEM-*lexA*del.

En la construcción de las cepas PAO1 His₆-*dinB*, se generó la fusión en marco de un fragmento que incluye los 320 nucleótidos aguas arriba de *dinB* y la secuencia que codifica para His₆ mediante la técnica Overlap PCR de la siguiente manera: (1) Se amplificaron dos productos de PCR, el primero utilizando los oligonucleótidos HisdinB1-fw y HisdinB1-rv, y el segundo con los oligonucleótidos HisdinB2-fw y HisdinB2-rv a partir de ADN Genómico de PAO1; (2) Se mezclaron cantidades equimolares de ambos fragmentos, los cuales se solapan parcialmente, en una segunda reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos HisdinB1-fw y HisdinB2; (3) Se clonó este producto final en el plásmido pGEM-T Easy para obtener el vector pGEM-*dinBNterHis*₆.

Para generar las cepas *mutS*-Strep II y *mutS*^β- Strep II, se prosiguió mediante la técnica de Overlap PCR dando lugar a un fragmento que incluye 351 nucleótidos del extremo 3' de *mutS* fusionado en marco a la secuencia codificante del Strep II-tag, la región intergénica entre *MutS* y *fdxA*, y los 226 nucleótidos iniciales del gen *fdxA*. Para ello se procedió de la siguiente manera: (1) Se amplificaron dos productos de PCR a partir de ADN genómico de PAO1 WT o *mutS*^β según corresponda, el primero utilizando los oligonucleótidos StrepmutS1-fw y StrepmutS1-rv y el segundo con StrepmutS2-fw y StrepmutS2-rv. - Condiciones de reacción: (a) 5 min 95°C; (b) 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55 °C y 1.5 min a 72°C; (c) 10 min a 72°C - ; (2) Los fragmentos fueron combinados en una segunda reacción de PCR con los oligonucleótidos StrepmutS1-fw y StrepmutS2-rv; (3) El producto

fue clonado en pGEM-T Easy para obtener los vectores pGEM-*mutS*CterStrep y pGEM-*mutS^β*CterStrep.

Finalmente, los fragmentos clonados en pGEM-*dinB*del, pGEM-*lexA*del, pGEM-16 *dinB*NterHis6, pGEM-*mutS*CterStrep y pGEM-*mutS^β*CterStrep fueron subclonados dentro de los sitios ApaI-SalI del plásmido pKNG101, obteniendo los vectores pKNG-*dinB*del, pKNG-*lexA*del, pKNG-*dinB*NterHis6, pKNG-*mutS*CterStrep y pKNG-*mutS^β*CterStrep.

Construcción de vectores de expresión de proteínas recombinantes en *E.coli*

Para la expresión en *E. coli* de las fusiones con His₆-tag, los genes *dinB*, *dinBD8A* y *dinB* Δ5 fueron subclonados entre de los sitios de restricción NdeI-EcoRI del vector pET15b para obtener los plásmidos pET15b-*dinB*, pET15b-*dinBD8A* y pET15b-*dinB*Δ5 respectivamente. Por otro lado, para obtener las fusiones con Strep II-tag, la secuencia que codifica para el His₆-tag fue reemplazada por la secuencia del Strep II tag en los plásmidos pET15b-*dinB*, pET15b-*dinB*Δ5 y pET15b*dnaN*. Para ello, la secuencia que codifica para Strep tag II se obtuvo mediante una amplificación por PCR a partir del plásmido pGEM-*mutS*CterStrep utilizando los primers pETStrep-fw y pETStrep-rv. Luego, este fragmento fue subclonado entre los sitios de restricción XbaI-NdeI de los plásmidos que contienen los genes de las proteínas obteniéndose los vectores pET15bStrep-*dinB*, pET15bStrep-*dinB* Δ5 y pET15bStrep-*dnaN*.

Para generar los plásmidos de expresión de MutS fusionada al Strep II-tag en el C-terminal, el fragmento que contiene la secuencia del StrepII-tag fue obtenido por digestión con NsiI a partir del plásmido pGEM-*mutS*CterStrep, y subclonado dentro del sitio de restricción NsiI de los plásmidos inducibles por IPTG pEx-*mutS* y pEx-*mutS^β* dando lugar a los vectores pExStrep-*mutS* y pExStrep- *mutS^β*.

Los plásmidos pET-15b conteniendo los genes de las proteínas MutS, MutS^β y β clamp fusionadas a His₆-tag así como los plásmidos derivados de pMALc2x para la expresión de proteínas fusionadas a MBP ya habían sido previamente clonados en el grupo del laboratorio [131].

Construcción los vectores de expresión p5BAD

El vector p5BAD deriva de los vectores pBBRIMCS-5 y pBAD18-Cm. Para su construcción, el fragmento de 1,35 Kb que contiene el promotor pBAD y el gen *araC* (que codifica para el represor transcripcional AraC) derivado del pBAD18-Cm fue subclonado en pBBRIMCS-5 utilizando los sitios NsiI y HindIII, para obtener el vector p5BAD. A continuación, para generar los vector p5BAD que expresan Pol IV y sus versiones mutantes fusionadas a His₆-tag, primero se aislaron los genes *dinB*, *dinBD8A* y *dinBD5* mediante digestión con XbaI y EcoRI a partir de los correspondientes plásmidos pET15b. Luego, dichos genes fueron introducidos en el vector p5BAD entre los sitios NheI y EcoRI.

CONSTRUCCIÓN CEPAS MUTANTES DE *P. aeruginosa*

Las cepas de *P. aeruginosa* generadas en este trabajo (Tabla M1) fueron realizadas mediante la técnica de reemplazo alélico utilizando el plásmido suicida pKNG101. En *P. aeruginosa*, el vector pKNG101 es incapaz de replicar ya que la bacteria carece de la proteína π de replicación (codificada por los genes *pir*), sin embargo, se integra en el genoma por eventos de recombinación homóloga permitiendo el intercambio alélico entre el gen subclonado en el plásmido y su homólogo en el genoma bacteriano [196].

La transferencia al cromosoma de *P. aeruginosa* de los fragmentos derivados de los clonados en pKNG101 se realizó mediante conjugación biparental utilizando la cepa donora *E. coli* SM10 (λ pir) por el método de apareamiento en filtro [201]. Brevemente, cultivos de *P. aeruginosa* (50 μ l) y *E. coli* SM10 previamente transformada con el correspondiente vector pKNG101 (150 μ l), crecidos hasta fase estacionaria fueron mezcladas en MgSO₄ 10 mM. La mezcla se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa Invitrogene de 0,45 μ m, que luego fue colocada sobre medio LB sólido e incubada a 37°C durante 24 h. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 μ l de MgSO₄ 10 mM y se sembraron distintas diluciones en medio LB-agar suplementados con estreptomicina (Sm) 50 μ g/ml para seleccionar el primer evento de recombinación, y ampicilina 50 μ g/ml para contra-seleccionar a *E. coli*. Las cepas de *P. aeruginosa* conteniendo el co-integrado, las cuales exhiben sensibilidad a sacarosa, se crecieron en medio LB para permitir que se produzca el segundo evento de recombinación. La resolución del co-integrado se seleccionó plaqueando en medio LB-agar suplementado con sacarosa 25% y confirmado mediante sensibilidad a Sm.

Chequeo de mutantes

En términos generales, con el fin de verificar la presencia de las diferentes mutaciones introducidas en el genoma de *P. aeruginosa* por intercambio alélico, se amplificó el gen correspondiente por PCR colony y, según el caso, se prosiguió a realizar cortes con enzimas de restricción. De igual manera, todas las construcciones cromosomales fueron verificadas mediante secuenciamiento. Para la PCR colony, se resuspendieron células de diferentes clones a partir de medio LB-agar en 100 µl de H₂O MiliQ estéril que se utilizó como templado para la reacción.

En los casos de las cepas deficientes en Pol IV (*dinB*) y de las cepas en las que se fusionó el His6-tag al gen *dinB*, se emplearon los oligonucleótidos *dinBup* y *dinBrv* y las cepas que contienen el gen normal amplifican un producto de 1288 pb, las cepas deficientes 535 pb y las cepas *dinB*-His 1306 pb.

Para las cepas *lexA* se emplearon los oligonucleótidos *lexA-fw* y *lexA-rv*. Los productos de PCR fueron sometidos a corte con la enzima de restricción *Sma* I (Promega) durante 1,5 hora a 25 °C y luego analizados por electroforesis en geles de agarosa. Los clones *lexA* deficientes no contienen el sitio de restricción, mientras que los clones *lexA* normales sí.

En cuanto a las cepas que contienen las fusiones de Strep II-tag al C-terminal de MutS y MutS^β, los oligonucleótidos utilizados fueron *StrepmutS2-rv* y *StrepmutS1-fw* y las condiciones de reacción fueron: (a) 5 min 95°C; (b) 27 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72°C; (c) 10 min a 72°C.

Construcción e inserción cromosomal de la fusión del promotor *lexA* al operón reportero *luxCDABE*

La fusión del promotor transcripcional de *lexA* al operón *luxCDABE* fue construida e insertada en el cromosoma utilizando el vector basado en mini-Tn7, pUC18-mini-Tn7T-Gm-*lux* [197]. El promotor de *lexA* (246 pb, -231 a +15 respecto al codón de iniciación ATG) fue amplificado utilizando los primers *PlexAF* y *PlexAR* a partir de ADN genómico de PAO1. Luego se clonó en pGEM-T Easy y se subclonó en el vector pUC18-mini-Tn7T-Gm-

lux utilizando los sitios de restricción SpeI-BamHI. La inserción de la construcción reportera en el cromosoma fue llevada a cabo mediante la co-transformación con el plásmido “helper” pTNS2. La inserción cromosomal fue confirmada por PCR como se describió previamente [197].

De la misma manera, la fusión del promotor de la bomba de eflujo MexCD al operón luxCDABE ya había sido clonada en el laboratorio en el vector pUC18-mini-Tn7T-Gm-lux [132], que se utilizó para transformar las cepas correspondientes de *P. aeruginosa*.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Purificación de proteínas fusionadas a Strep-tag

Para la purificación de las proteínas Pol IV y Pol IV $\Delta 5$ fusionadas al Strep II-tag en el N-terminal (Pol IV-Strep y Pol IV $\Delta 5$ -Strep) se realizó el siguiente protocolo: (1) Células de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS transformadas con los correspondientes plásmidos derivados del pET15bStrep, fueron inoculadas en un medio LB suplementado con 0.2% de glucosa, 25 μ g/ml de Cloranfenicol y 50 μ g/ml de Ampicilina; (2) Se incubaron los cultivos a 37°C con agitación de 180 rpm hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) a 600 nm de 0.8; (3) Se agregó 50 μ M de IPTG y se incubó a 30°C durante 3,5 horas a 180rpm; (4) Se recolectaron las células por centrifugación y se guardaron a -20°C durante una noche; (5) Se resuspendió el pellet en Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, β mercaptoetanol 5 mM (Buffer A) suplementado con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM; Benzamidina 1 mM); (6) Se lisaron las células utilizando una prensa francesa (2000 psi durante 2-4 min a 4°C); (7) Se agregó DNAsa (5 U/ml) al lisado y se incubó 15 minutos a 4°C; (8) Se añadió avidina (1 nmol por litro de cultivo) y se incubaron 15 minutos; (9) Se centrifugó el lisado a 9000 g por 40 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para obtener la fracción soluble; (10) Se pasó el sobrenadante por una columna que contiene la resina “Strep Tactin Sepharosa”; (11) Se lavó la columna sucesivamente con 10 volúmenes de buffer A, buffer A con NaCl 250 mM de concentración final, buffer A suplementado con Tween-20 0.1% y buffer A; (12) Se eluyeron las proteínas adsorbidas en la resina con buffer A conteniendo destiobiotina 2,5 mM; (13) Se recolectaron y concentraron las fracciones en un buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; β -Mercaptoetanol 20 mM y Glicerol 10%, utilizando filtros Amicon Ultra-15 10000 Da (Millipore).

Las proteínas MutS y MutS^β fusionadas a Strep II-tag en el C-terminal (MutS-strep y MutS^β-Strep) fueron expresadas y purificadas de la siguiente manera: (1) Células de *E. coli* XL1-Blue que contienen los plásmidos correspondientes derivados de pExStrep fueron inoculadas en medio LB suplementado con 0.2% de glucosa y 10 µg/ml de Gentamicina; (2) Se incubaron los cultivos a 37°C con agitación de 180 rpm hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) a 600 nm de 0.8; (3) Se agregó 1mM de IPTG y se incubó a 30°C durante 3 horas a 180rpm; A continuación, se siguió el mismo protocolo previamente descrito para Pol IV, a excepción que el buffer A tiene una composición diferente (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM –buffer B-). Para la concentración y cambio de buffer de las fracciones obtenidas se utilizaron filtros Amicon Ultra-15 30000 Da (Millipore). El buffer final fue Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 25 mM, MgCl₂ 1.5 mM y Glicerol 10 %.

Purificación de las proteínas fusionadas His₆-tag

Las proteínas MutS, MutS^β, MutS R842E y β clamp fusionadas a His₆-tag en el N-terminal (MutS-His, MutS^β-His y β clamp-His) fueron purificadas de la siguiente manera: (1) Células de *E. coli* BL21 (λDE3) transformadas con los correspondientes plásmidos pET-15b fueron crecidas a saturación en medio LB con ampicilina 100 µg/ml y glucosa 0,5%. (2) Se inoculó 500 ml de LB con ampicilina 200 µg/ml y glucosa 0,5% (dilución 1/250) y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀=0.7; (3) Se indujo la expresión con IPTG 0.4 mM durante 2 horas; (4) Se recolectaron las células por centrifugación; (5) Se resuspendió el pellet en 30-40 ml de buffer Tris-HCl 20 mM pH=7,5; NaCl 500 mM; Glicerol 10%; (Buffer BBL) suplementado con inhibidores de proteasas (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.5 mM; Benzamidina 85 µg/ml); (6) Se lisaron las células utilizando una prensa francesa (2000 psi durante 2-4 min a 4°C); (7) Se centrifugó el lisado a 9000 g por 40 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para obtener la fracción soluble; (10) Se mezcló el sobrenadante obtenido con 1 ml de la resina Ni-NTA agarose y se incubó durante 16 horas con agitación; (11) Se empaquetó la resina en una columna y se sometió a lavados sucesivos de 4-10 ml de buffer BBL conteniendo concentraciones crecientes de imidazol (10 mM, 20 mM, 30 mM y 40 mM) (12) Se eluyeron las proteínas absorbidas en la resina con 6 ml de buffer BBL suplementado con imidazol 400 mM y se obtuvieron 4 fracciones de 1,5 ml que fueron colectadas y almacenadas a -20°C. (13) Se cambió el buffer y se concentraron las proteínas mediante centrifugación utilizando filtros Amicon Ultra-15

Millipore 10.000 Da (β clamp) o 30.000 Da (MutS y MutS^β). Las proteínas purificadas fueron guardadas a -70°C en un buffer final con 25 mM Tris, 20 mM NaCl y glicerol 15%.

La proteína MutL fusionada a His6-tag, se obtuvo de una purificación previa realizada en el grupo del laboratorio [128].

Purificación de las proteínas fusionadas a MBP

Para la purificación de los dominios HTH-Cter, C-ter y HTH-Cter R842 de MutS fusionadas a la Proteína de Unión a la Maltosa (Maltose Binding Protein ó MBP) en el N-terminal se realizó el siguiente protocolo: (1) Células de *E. coli* DH5 α transformadas con los correspondientes plásmidos derivados del pMALc2x, fueron inoculadas en un medio LB suplementado con 0.2% de glucosa y 100 μ g/ml de Ampicilina a partir de un cultivo saturado (Dilución 1/100); (2) Se incubaron los cultivos a 37°C con agitación de 180 rpm hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.4/0.5; (3) Se indujo con IPTG 1 mM y se incubó a 37°C durante 1 hora a 180rpm; (4) Se recolectaron las células por centrifugación y se guardaron a -20°C durante una noche (4) Se resuspendió el pellet en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1mM (Buffer C) suplementado con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.5 mM; Benzamidina 80 μ g/ml); (4) Se lisaron las células mediante ciclos sucesivos de 15 segundos de sonicación durante 2 minutos totales (en hielo); (5) Se centrifugaron los lisados a 9000 g por 40 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante; (6) Se agregó 1 volumen de buffer C y se pasó por una columna que contiene la resina de amilosa, previamente equilibrada con 10 volúmenes de Buffer C; (7) La columna fue lavada con 12 volúmenes de Buffer C; (8) Se eluyeron las proteínas adsorbidas en la resina con buffer C suplementado con Maltosa 10 mM; (9) Se recolectaron y concentraron las fracciones en un buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 25 mM y Glicerol 10%, utilizando filtros Amicon Ultra-15 10000 Da (Millipore).

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Las proteínas recombinantes purificadas fueron analizadas en geles SDS-PAGE al 7,5% o 10% (acrilamida/bisacrilamida 1:30). La electroforesis se realizó en buffer de corrida

(Tris-HCl 25 mM pH 8,2, Glicina 192 mM, SDS 10%) a 120 V durante 90 min. El gel se tiñó con Coomassie Blue y destiñó con ácido acético 7,5%; metanol 5%.

En la Figura MM1 se muestran purificaciones de proteínas utilizadas en este trabajo para posteriores ensayos *in vitro*. Todas las proteínas fueron purificadas con un grado de pureza >95%. En todos los casos la concentración de proteína fue determinada mediante el ensayo de Bradford utilizando BSA como estándar. Las concentraciones de MutS, MutS β , C-ter-MBP y HTH/C-ter-MBP están expresadas como la molaridad del tetrámero; las concentraciones de β clamp, MutS R842E y HTH/CterR842E-MBP como dímero y Pol IV como monómero.

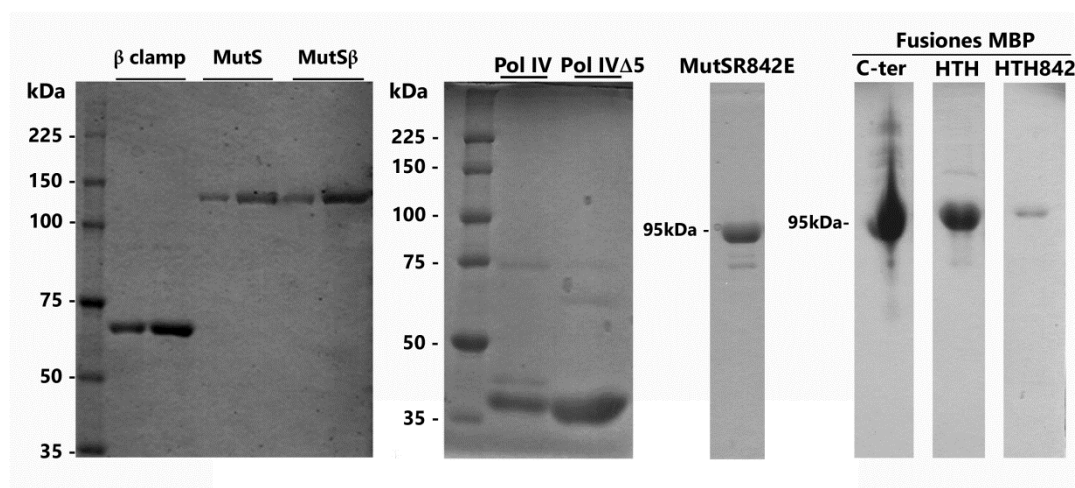


Figura MM1. Purificaciones de proteínas. Geles SDS-PAGE 7,5 a 10%

ENSAYOS BIOQUÍMICOS

Electroforesis de geles nativos de poliacrilamida (PAGE)

En términos generales, los ensayos PAGE se llevaron a cabo incubando las correspondientes mezclas proteínas en presencia/ausencia de ADN durante 25 minutos a 30°C en baño seco en un buffer que contiene Tris-HCl 20 mM, pH7,4, MgCl₂ 5 mM, Ditiotretitol 1 mM, NaCl 25 mM, Albúmina Sérica Bovina 100 μ g/ml (Buffer de Reacción). Luego, se añadió glicerol a una concentración final de 10% para sembrar las muestras en geles nativos de poliacrilamida preparados en buffer Tris-borato, que se corrieron a 4°C.

Finalmente los geles fueron teñidos con Coomassie blue, escaneados y posteriormente analizados mediante el software Gel-Pro analyzer.

Para caracterizar las interacciones bimoleculares se incubaron las proteínas Pol IV (1-45 μM), Pol IV $\Delta 5$ (4-32 μM), MutS (1-14 μM) y MutS $^{\beta}$ (2-14 μM) fusionadas a Strep II-tag con una concentración fija de β clamp-His $_6$ -tag (2 μM). En el análisis de los resultados se cuantificó la intensidad de la banda de β clamp libre para luego calcular la fracción de β clamp unido y las concentraciones de Pol IV y MutS libre. Las curvas de unión fueron obtenidas mediante el ajuste de una ecuación a los datos correspondientes a la fracción de β clamp acomplejado en función las concentraciones de Pol IV y MutS libre. Entonces, mediante el software Sigma Plot, los datos se ajustaron a una curva hiperbólica para Pol IV y una curva sigmoidea para MutS y se pudo calcular la constante de disociación (K_D). La ecuación hiperbólica fue $Y = nX/K_D + X$, donde Y es la fracción de β clamp unido, X la concentración de Pol IV libre, K_D es la constante aparente de disociación y n la estequiometría. La ecuación sigmoidea fue $Y = Y_{\text{max}} X^n / X^n + K_D^n$, donde Y es la fracción de β clamp unido, Y_{max} es la fracción máxima de β clamp unido, X es la concentración de MutS libre, K_D es la constante aparente de disociación y n es el coeficiente de Hill.

En los experimentos de competencia, Pol IV-Strep (20 μM), β clamp-His (2 μM) y concentraciones crecientes de MutS-Strep o MutS $^{\beta}$ -Strep (1, 2 y 3 μM) fueron incubadas simultáneamente. Alternativamente, Pol IV-strep y β clamp-His fueron pre-incubadas y luego se agregaron concentraciones crecientes de MutS-Strep o MutS $^{\beta}$ -Strep (1, 2 y 3 μM).

Para la competencia con el péptido MQSDLFA, Pol IV-Strep (20 μM) y MutS-Strep (6 μM) fueron individualmente incubadas con β clamp-His (2 μM) en presencia de cantidades crecientes del péptido (10, 50 y 100 veces más altas que las concentraciones de Pol IV y MutS).

En cuanto a los ensayos para determinar el efecto de los diferentes sustratos de ADN en las interacciones biomoleculares, se mezclaron individualmente Pol IV-Strep (6 μM), MutS-Strep (2 μM) y MutS $^{\beta}$ -Strep (1, 2, 4 y 6 μM) con β clamp (2 μM) en presencia de los correspondientes sustratos de ADN (15 μM). Como control se incluyó la misma reacción en ausencia de ADN.

Finalmente, en los experimentos para analizar el efecto de los diferentes sustratos de ADN sobre la estructura de MutS, se incubaron diferentes concentraciones de los sustratos de ADN (2, 4, 8 y 16 μM) con una concentración fija de MutS o MutS 842 (2 μM y 4 μM respectivamente). En el caso de MutS^B, C-ter, HTH C-ter y HTH 842 se mezclaron individualmente (2 μM) con una concentración fija de los diferentes sustratos (4 μM). Finalmente, para el estudio del efecto de la posición del GT, del largo del primer y diferentes MM, se incubó MutS (2 μM) con cada uno de los correspondientes sustratos a 4 μM .

Reacciones de annealing

Las reacciones de annealing se realizaron de la siguiente manera: (1) Se mezclaron cantidades equimolares de los pares de oligonucleótidos simple hebra en un buffer que contiene Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM; (2) Las muestras se calentaron a 100°C por 5 min; (3) Se dejó enfriar a 25°C durante 2 horas hasta alcanzar una temperatura igual o menor a 37°C; (4) Se guardaron a -20°C. A continuación se detallan las mezclas oligonucleótidos en cada reacción de annealing.

Sustrato	Oligonucleótidos simple cadena utilizados	
ADNsc	VIR4	---
ADNdc	VIR4	VIR5
ADNp	VIR4	VIR7
ADNdc-GT	VIR4	VIR3
ADNp-GT (ó ADNp-GT 8pb)	VIR4	VIR6
ADNp-GT9pb	VIR4	VIR 6.3
ADNp-GT10pb	VIR4	VIR 6.4
ADNp-GT11pb	VIR4	VIR 6.1
ADNp-GT12pb	VIR4	VIR 6.5
ADNp-GT13pb	VIR4	VIR 6.6
ADNp-GT14pb	VIR4	VIR 6.2
ADNp-GT15pb	VIR 4.1	VIR 6.1
ADNp-GT16pb	VIR 4.2	VIR 6

Far Western

En términos generales, para los ensayos de Far Western, las proteínas purificadas fueron inmovilizadas sobre membranas de nitrocelulosa PROTRAN (0,2 μm , Schleicher & Schuell BioScience). Una vez que las membranas se secaron, se bloquearon incubando

durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente en el buffer Tris-HCl 10 mM pH=8; NaCl 0,15 M; EDTA 1mM (Buffer FW) suplementado con 0,1% de Triton X-100 y 5% de leche descremada (buffer de bloqueo) dentro de un recipiente previamente bloqueado con el mismo buffer. A continuación, se incubaron las membranas en el mismo buffer suplementado con las correspondientes proteínas fusionadas al His₆- o Strep II-tag en presencia/ausencia de sustratos de ADN (15 μM) durante toda la noche a 4°C. Se lavó la membrana tres veces con buffer de bloqueo durante 10 min a temperatura ambiente con agitación. Luego, se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo “rabbit anti-His6 polyclonal” (dilución 1/1.000, Santa Cruz Biotechnology) o con el anticuerpo “mouse anti-His6 monoclonal” (1/1.000, Sigma) durante 3 horas. Se realizaron lavados de la misma manera descrita anteriormente y se incubó con el anticuerpo IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit o goat anti-mouse (1/10.000, LI-COR Bioscience) por 1 h. Finalmente, se lavó la membrana y los resultados fueron visualizados mediante Odyssey infrared imaging (LI-COR Bioscience) y analizados mediante el software Odyssey.

Para el cálculo de la intensidad relativa se aplicó la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(I_s - I_b)}{(8 \cdot 10^{-3} / PM)}$$

Donde I es la intensidad relativa; I_s es la intensidad del spot; I_b es la intensidad del fondo y PM es el peso molecular de la proteína en gramos. En esta ecuación se tiene en cuenta la cantidad de moles colocados en solución.

Resonancia de superficie de plasmon (Surface Plasmon Resonance o SPR)

Las interacciones biomoleculares de MutS, MutS^β y Pol IV con β clamp fueron determinadas de la siguiente manera: β clamp-His fue inmovilizado directamente en la superficie de un chip CM5 (GE Healthcare) mediante acoplamiento amino (2300 RU) o indirectamente capturado con un anticuerpo policlonal anti-His (Santa Cruz Biotechnology) que está inmovilizado en la superficie del chip por acoplamiento amino (~10 RU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La celda de flujo 1 se utilizó como blanco, ya que se encontraba vacía o con el anticuerpo anti-His inmovilizado, mientras que en la celda 2 se inmovilizó o capturó a β clamp. Durante los ensayos, Pol IV-Strep (0.50-

8.00 μM), MutS-Strep o MutS $^{\beta}$ -Strep (35-560 nM para β clamp capturado y 137-1100 nM para β clamp inmovilizado) fueron diluidos en buffer de corrida e inyectados sobre la superficie del chip a un tasa de flujo de 30 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 45 segundos. Los datos obtenidos de los análisis de SPR fueron analizados utilizando el programa Biacore T100 Evaluation (Biacore, versión 3.2). Las constantes de disociación (K_D) para MutS- β clamp y Pol IV- β clamp fueron determinadas mediante el análisis de condiciones de equilibrio (Steady State Analysis, SSA) luego de aplicar una corrección por interacción no específica o bien, mediante el ajuste al modelo no lineal de unión 1:1 utilizando los parámetros cinéticos de tasa de asociación (k_{ON}) y la tasa de disociación (k_{OFF}).

Para testear la interacción entre MutS y Pol IV, Pol IV-Strep fue directamente inmovilizada en la superficie de un chip CM5 por acoplamiento amino (5000 RU), seguida de la inyección de MutS-Strep (0.5 μM) o β clamp-His (0.5 μM). Alternativamente, MutS-Strep fue inmovilizada a la superficie de un chip CM5 por acoplamiento amino (5600 RU), seguido de la inyección de Pol IV-Strep (2 μM) o β clamp-His (0.25 μM).

En los ensayos de competencia, Pol IV-Strep fue inmovilizado a la superficie de un chip CM5 por acoplamiento amino (~ 5000 RU). Luego, β clamp-His (0.25 μM) solo o preincubado con MutS-Strep (20-250 nM) o MutS $^{\beta}$ -Strep (250 nM) durante toda una noche a 4°C, fue inyectado sobre la superficie del chip.

Para los experimentos de competencia en presencia de los diferentes sustratos de ADN, Pol IV-Strep fue inmovilizada en la superficie de un chip CM5 mediante acoplamiento amino (~ 3000 RU). Luego, β clamp-His (0.25 μM) solo o preincubado con los sustratos de ADN correspondientes (15 μM) por 2 horas a 37°C fueron mezclados con MutS-Strep (30 o 60 nM) y luego inyectados sobre la superficie del chip.

MEDICIÓN DE MUTAGÉNESIS

Estimación de la tasa de mutación

La tasa de mutación fue determinada mediante el test de fluctuación de Luria-Delbruck [202]. Células de *P. aeruginosa* fueron crecidas en 3 ml de medio LB durante toda la noche

a 37°C con agitación. Luego, se inoculó medio LB con 100-1000 células/ml provenientes del cultivo saturado, y se separaron en alícuotas de 300 µl (20-60). Las células se incubaron con agitación a 37°C, hasta alcanzar la fase exponencial (1-3 10⁸ cel/ml, aproximadamente durante 16 a 22 h). En el caso de las células transformadas con los plásmidos derivados de p5BAD, se adicionó gentamicina 10 µg/ml al medio LB y arabinosa 0.005-0.050% para la inducción de la expresión proteica. En el caso de la estimación de la tasa de mutación en presencia de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina, se añadió 0.02 µg/ml de dicho antibiótico. Posteriormente, se sembraron alícuotas de diluciones sucesivas en LB-agar para determinar el número de células viables y en LB adicionado con ciprofloxacina 0,5 o 1 µg/ml (100 µl del cultivo saturado), rifampicina 50 µg/ml (100 µl del cultivo saturado) o amikacina 10 µg/ml (50 µl del cultivo saturado) para seleccionar los clones resistentes. El número de colonias fueron cuantificadas entre las 24 y 48 horas de incubación a 37°C. Para estimar el número esperado de mutaciones (m) se aplicó el método de máxima probabilidad ajustado a la eficiencia de plaqueo utilizando el algoritmo de tipo Newton-Raphson [203]. Luego, se calculó la tasa de mutación (µ) mediante la ecuación de Luria-Delbruck $\mu = m/Nt$, donde Nt corresponde al número de células viables promedio en los cultivos de una cepa. Para ello, se empleó el programa rSalvador [204] a partir del cual también se obtuvieron los intervalos de confianza del 95% y se compararon estadísticamente las tasas de mutación mediante el Test “Likelihood Ratio Test under the Classic Luria-Delbruck Model with Partial Plating” [205].

Determinación del espectro de mutación

El gen *nfxB* fue secuenciado de 50 a 60 colonias de clones independientes seleccionadas en LB agar con ciprofloxacina 0.5 µg/ml. Para ello, se amplificó mediante PCR colony la región codificante (564 pb) y el promotor (160 pb) de *nfxB* utilizando los primers *nfxBfw* y *nfxBrv*. Para ello, se resuspendieron células de dichos clones en 25 µl de H₂O MiliQ estéril; se hirvieron por 10 min y centrifugaron a 13000 rpm por 10 min a 4°C. Las condiciones de reacción fueron: 10 min 95°C; 32 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72°C; y por último una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron purificados como se describió previamente y enviados a secuenciar al servicio de secuenciamiento del ADN de la Universidad de Chicago, Estados Unidos.

Luego se calculó la tasa de mutación para cada tipo de mutación como está descrito previamente [202], mediante la multiplicación de la frecuencia relativa en el espectro por

la correspondiente tasa de mutación de resistencia a Cip (ya que todos los clones Cip^R tenían mutado *nfxB*).

Las secuencias fueron analizadas posteriormente utilizando el software iMARS [138], mediante el cual se estudió el contexto de secuencia en el que ocurren las mutaciones y la preferencia de hebra o Strand bias. En primer lugar se identificaron los patrones de contexto de secuencia en el que ocurren las mutaciones. Para ello, se utilizó el análisis de “vecino más cercano” mediante el cual se calculó una puntuación de la mutabilidad relativa de cada dinucleótido posible dentro de cada espectro de mutación considerando únicamente las sustituciones de base. Además, el contexto de secuencia de mutación fue examinado mediante el análisis visual de los cinco nucleótidos aguas arriba y aguas abajo del sitio de mutación. El contexto de secuencia preferido para Pol IV también fue analizado mediante la herramienta bioinformática MEME - Multiple Em for Motif Elicitation - Suite 5.0.5 [139]. Para ello, en primer lugar se generó un archivo txt con las secuencias colindantes al sitio de mutación (5 pb aguas arriba y 5 pb aguas abajo) obtenidas a partir de las cepas WT y *mutS^β* que sobreexpresaban Pol IV. Luego, se cargó dicho archivo en la página web <http://meme-suite.org/tools/meme> utilizando la opción “Classical Mode”.

En segundo lugar, se examinó para cada espectro de mutación de sustitución de base si existe un Strand bias. Brevemente, el software iMARS calcula el número de dG, dC, dA y dT que deberían estar mutadas al azar de acuerdo a la proporción de cada base en el gen *nfxB* y el número de sustituciones de bases que se detectaron (valor Esperado). El valor esperado se compara con el valor observado y si existen diferencias en la frecuencia de mutación entre dG y dC o dA y dT podría indicar un Strand bias.

AISLAMIENTO DE CLONES CON DIFERENTE GRADO DE INACTIVACIÓN DE NFXB

Se crecieron células de *P. aeruginosa* que contienen el reportero pMexCD-luxCDABE en el genoma en medio LB durante toda la noche a 37°C con agitación. Luego, se inoculó medio LB con 100-1000 células/ml provenientes del cultivo saturado, y se separaron en 30 alícuotas de 300 µl. Las células se incubaron con agitación a 37°C, hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente, se sembraron 100 µl de cada réplica en placas de LB-agar con ciprofloxacina 0,5 µg/ml, para seleccionar los clones resistentes por inactivación de *nfxB*. Las placas se incubaron a 37°C y luego se seleccionó un clon al azar por cultivo para

replicar en una placa LB-agar. A cada clon se midió nivel de luminiscencia y de resistencia a ciprofloxacina 0.5 µg/ml (ver más adelante).

MEDICIÓN DE LUMINISCENCIA

Sistema *pMexCD-luxCDABE*

Para evaluar la inactivación del represor transcripcional *nfxB*, se insertó una fusión del promotor de la bomba de eflujo MexCD al operón reportero *luxCDABE* en el cromosoma del *P. aeruginosa*. La luminiscencia se midió en células creciendo exponencialmente de la siguiente manera: los cultivos fueron diluidos 5 veces en medio LB y se colocaron 100 µl de esta dilución en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. La señal de luminiscencia proveniente de los cultivos en la placa fue capturada por el equipo NightOWL LB 983 durante 20 segundos de exposición y el número de fotones emitidos por pocillo fue cuantificado utilizando el programa Berthold Win Ligth 32. Para calcular la intensidad de luminiscencia relativa a la densidad óptica, se determinó la absorbancia a 600 nm de la misma placa utilizando el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (Biotek™). En el análisis de los niveles de luminiscencia se determinó el valor máximo y mínimo y se dividió en 5 categorías de luminiscencia para calcular la fracción de clones en cada categoría por cepa.

Sistema *plexA-luxCDABE*

Para evaluar la inducción de la respuesta SOS, se insertó una fusión del promotor de *lexA* al operón reportero *luxCDABE* en el cromosoma del *P. aeruginosa*. La luminiscencia se midió en células creciendo exponencialmente de la siguiente manera: los cultivos fueron diluidos en medio LB a una DO_{600nm} de 0.10 y se colocaron 100 µl de esta dilución en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. La señal de luminiscencia proveniente de los cultivos en la placa fue capturada por el equipo NightOWL LB 983 durante 20 segundos de exposición y el número de fotones emitidos por pocillo fue cuantificado utilizando el programa Berthold Win Ligth 32. Finalmente, para evaluar la luminiscencia por unidad formadora de colonia, la imagen fue tomada con 1 minuto de exposición.

ENSAYO DE CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE LUMINISCENCIA Y RESISTENCIA A CIP

En primer lugar se seleccionaron clones representativos de cada categoría de luminiscencia y se midió la sensibilidad a ciprofloxacina (Cip) mediante una curva de antibiótico. Para ello, se inocularon dichos aislados individualmente en medio LB y se crecieron los cultivos durante toda la noche a 37°C. Luego, se diluyeron los cultivos (1000 células/ml) en medio LB o LB con Cip (Sigma) 0.05, 0.10, 0.25, 0.75, 1.00, 1.50 y 1.75 µg/ml y se colocaron en microplacas de poliestireno de 96 pocillos e incubaron a 37°C durante 15 horas. Por último, se midió la DO a 600 nm en el equipo Epoch para estimar el número de células totales. En el gráfico de supervivencia, los valores de supervivencia fueron relativizados al crecimiento en medio LB en ausencia de Cip.

En segundo lugar, para medir la sensibilidad a Cip a nivel poblacional, se realizó el mismo protocolo para todos los clones aislados incubando en ausencia o en presencia de Cip 0.5 µg/ml, ya que a esta concentración es posible diferenciar los grados de resistencia.

MEDICIÓN DE SENSIBILIDAD DE *P. aeruginosa* A DIFERENTES AGENTES

N-etil-N-nitrosourea (ENU)

Las células fueron inoculadas en medio LB y crecidas hasta fase exponencial. En el caso de las células transformadas con los plásmidos derivados del p5BAD, se añadió gentamicina 5 µg/ml al medio LB. Se sembraron alícuotas de diluciones sucesivas en medio LB agar suplementado o no con ENU 0.6 mM y se incubaron durante una noche a 37°C. Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias en cada placa y se calculó la supervivencia relativa al control en ausencia de ENU, considerándose el 100% (1) de crecimiento.

Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (Paraquat)

En primer lugar, se inocularon células de las cepas MAO1 *mutT* y *mutT mutS^β* en medio LB y se crecieron los cultivos durante toda la noche a 37°C. Segundo, se diluyeron los

cultivos (1000 células/ml) en medio LB o LB adicionados con Paraquat 10, 25 y 50 μM y se incubaron a 37°C con agitación durante 6 horas (3 réplicas en cada tratamiento). Tercero, se realizaron diluciones sucesivas y se sembraron alícuotas en placas LB agar para el recuento de células viables. Finalmente, se calculó la fracción de células viables considerando como 1 al crecimiento en LB en ausencia de Paraquat.

Ciprofloxacina

En primer lugar, se comparó la sensibilidad a Ciprofloxacina (Cip) de las cepas PAO1 siguiendo el protocolo previamente descrito [132]. Brevemente, se realizaron diluciones sucesivas de cultivos saturados y se sembraron alícuotas en placas de LB agar o LB con Cip 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.25, 0.50 $\mu\text{g/ml}$. Las placas se incubaron a 37°C durante toda una noche y se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC). Luego se estimó la fracción de supervivencia en relación al número total de UFC crecidas en LB.

En segundo lugar, se analizó la sensibilidad a Cip 0.02 $\mu\text{g/ml}$ de las cepas de *P. aeruginosa* en cultivos líquidos previo a la estimación de la tasa de mutación. Para ello, primero se inocularon células de *P. aeruginosa* en medio LB y se crecieron los cultivos durante toda la noche a 37°C. Segundo, se diluyeron los cultivos (1000 células/ml) en medio LB o LB adicionados con Cip 0.02 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron a 37°C con agitación durante 6 horas (3 réplicas en cada tratamiento). Tercero, se realizaron diluciones sucesivas y se sembraron alícuotas en placas LB agar para el recuento de células viables. Finalmente, se calculó la fracción de células viables considerando como 1 al crecimiento en LB en ausencia de Cip.

Para la preparación de la solución de stock de Cip 2 mg/ml, se pesó 0.002g de Cip (Sigma) y se diluyó en una solución de Milli Q estéril con HCl 0.1 M

ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Para obtener los extractos de proteínas totales solubles, las células se resuspendieron en buffer Tris-HCl 20 mM pH=7.5; NaCl 0.5 M; Glicerol 10%, suplementado con inhibidores de proteasas (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1mM y Benzamidina 1mM) y lisozima 0.2

mg/ml, y se incubaron durante 1 h en hielo. Las muestras fueron sonicadas durante 2 min y luego fueron congeladas/descongeladas en nitrógeno líquido. Este ciclo se repitió 4 veces. Finalmente, se centrifugaron a 9000 xg durante 20 min y se separó el sobrenadante que fue almacenado a -20°C. La cuantificación de la concentración de proteínas totales de cada muestra se realizó por la técnica de Bradford utilizando como estándar de referencia BSA (2,5-15 µg).

Posteriormente, se sembraron 30-50 µg de proteína total en un gel SDS-PAGE (7,5%) que fue corrido a 120 V durante 60 min. A continuación se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (0,22 µm, Sigma) de acuerdo al protocolo descrito en el catálogo del aparato de transferencia Biorad. Para el revelado, según el ensayo, se emplearon los anticuerpos primarios policlonal rabbit anti His6 (Santa Cruz Biotechnology), o monoclonal mouse anti-His6 (Sigma), o monoclonal mouse anti- Strep II (IBA) en una dilución 1/1000 y se incubó por 3 horas a temperatura ambiente. Luego del lavado, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit o goat anti-mouse (LI-COR Bioscience) en una dilución 1/10.000 Finalmente, se lavó la membrana y los resultados fueron visualizados mediante Odyssey infrared imaging (LI-COR Bioscience) y analizados mediante el software Odyssey. La cuantificación de la concentración total de proteína sembrada se realizó de dos maneras: mediante la siembra de una alícuota en un gel SDS-PAGE (7,5%) o utilizando el reactivo Ponceau directamente sobre la membrana transferida.

Para la concentración estimada de MutS por célula, se consideró un volumen promedio de una célula de 0.75 fl y la cantidad promedio de proteína por célula de 150 fg.

TRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS PATOLÓGICOS

Los residuos sólidos descartables (placas de Petri plásticas, eppendorf, tips, etc.) fueron segregados en bolsas rojas, según la Resolución 349/94, MSyAS. Las bolsas rojas son luego transportadas y tratadas por transportistas y operadores habilitados. En tanto que los cultivos líquidos contenidos en material reutilizable (tubos de ensayos, falcons, frascos de vidrio, etc.) fueron inactivados con hipoclorito de sodio.



ANEXO

Tabla A1. Contexto de secuencia de sustituciones de pase en *nfxB* de la cepa WT que contiene el plásmido *p5BAD-dinB^a*.

Mutación	Sitio (pb)	Contexto de secuencia	Frecuencia
CG>TA	88	AACTGGCCGAG	1
	552	AATCCGGCTCG	1
AT>GC	69	CCGCCAGCGAC	1
CG>AT	163	TGCTCGAGGAC	1
	436	TCACCGAACTG	1
AT>CG	41	GGCGCTGGCAG	1
	115	AGGCCACCCTG	1
	564	TCCTGACCCTG	3
AT>TA	149	CAACCTGGTGC	1
CG>GC	43	CGCTGGCAGTC	3
	88	AACTGGCCGAG	10
	94	CCGAGGC GGCC	1
	97	AGGCGGC CGGC	6
	450	ATCACCTGGC	1
	539	CCATGGCGCCT	9

^aSe muestran las secuencias 5pb aguas arriba y 5pb aguas abajo al sitio de mutación para todos los tipos de sustituciones de base. La base que muta está indicada en negrita. Los nucleótidos A, T, C y G están coloreados en violeta, verde, celeste y Amarillo, respectivamente. Se subraya el contexto preferido de secuencia 5'-GXC-3'.

Tabla A2. Contexto de secuencia de sustituciones de pase en *nfxB* de la cepa *mutS^B* que contiene el plásmido *p5BAD-dinB^a*.

Mutación	Sitio (pb)	Contexto de secuencia	Frecuencia
CG>TA	107	CGT AAGCAAGG	1
	482	ACG T CGCGGAC	1
AT>GC	41	GGCG C TGGCAG	1
	149	CAAC C TGGTGC	1
	530	GATG T TCCTCC	1
CG>AT	98	GGCGG C CGGCG	1
	274	ACCG C GAGCTG	1
AT>CG	106	GG T AAGCAAG	1
	115	AGG C CACCC T G	5
	352	AG T C C TAC C TG	1
	564	TC C T G ACC C TC	4
AT>TA	86	GGA A CTGG C CG	1
CG>GC	43	CG C TGG C AG T C	3
	62	CGAC C G C CC C GC	2
	88	AA C TGG C CG A G	11
	94	CC G AG G CG C CC	1
	97	AG G CG C CG C GC	3
	482	AC G T C G C CG A C	1
	490	GAC G GG C CG C CC	1
	538	TC C AT G GG C CC	1
	539	CC A T G GG C C T	1

^a Se muestran las secuencias 5pb aguas arriba y 5pb aguas abajo al sitio de mutación para todos los tipos de sustituciones de base. La base que muta está indicada en negrita. Los nucleótidos A, T, C y G están coloreados en violeta, verde, celeste y Amarillo, respectivamente. Se subraya el contexto preferido de secuencia 5'-GXC-3'.

Tabla A3. Contexto de secuencia de sustituciones de pase en *nfxB* de la cepa *WT*

Mutación	Sitio (pb)	Contexto de secuencia	Frecuencia
CG>TA	65	CCG CCCGCGAG	3
	67	GCCCGCG A GCG	1
	91	TGGCCG A GGCG	1
	107	CG TAA GCAAGG	2
	124	TGCACCG C TTC	1
	125	GCACCG C TTCT	2
	346	GCTGGC A GTCC	1
	523	TGGAG C AGATG	2
	539	CCATGG C GCCT	1
AT>GC	161	G A TGCTCGAGG	1
	440	CG A ACTGTTCA	1
CG>AT	232	CT C TGGAGGCG	2
AT>CG	115	AG G CCACCTG	7
	119	CAC C CTGCACC	1
AT>TA	41	GG C GCTGGCAG	2
	119	CAC C CTGCACC	1
	149	CA A CTGGTGC	1
CG>GC	125	GCACCG C TTCT	1
	541	A TGGCGCCTCC	1

^aSe muestran las secuencias 5pb aguas arriba y 5pb aguas abajo al sitio de mutación para todos los tipos de sustituciones de base. La base que muta está indicada en negrita. Los nucleótidos A, T, C y G están coloreados en violeta, verde, celeste y Amarillo, respectivamente. Se subraya el contexto preferido de secuencia 5'-GXC-3'.

Tabla A4. Contexto de secuencia de sustituciones de pase en *nfxB* de la cepa *mutS^β*

Mutación	Sitio (pb)	Contexto de secuencia	Frecuencia
CG>TA	25	ACGAGCGACTC	2
	65	CCGCCCCGAG	1
	89	ACTGGCCGAGG	1
	116	GGCCACCCTGC	1
	154	TGGTGCAGATG	1
	190	TGAACCAGATC	1
	241	CGTTGCAGCGC	1
	298	TATTCCAGTAC	1
	345	CGCTGGCAGTC	1
	388	GCGGACAGCAG	1
	523	TGGAGCAGATG	1
AT>GC	77	GACGCTGAAGG	1
	365	AGCGCTGGACG	1
	404	CGTGTTTCGCA	1
CG>AT	89	ACTGGCCGAGG	1
	98	GGCGGCCGGCG	1
AT>CG	41	GGCGCTGGCAG	1
	86	GGAACTGGCCG	2
	115	AGGCCACCCTG	9
	119	CACCCTGCACC	2
	440	CGAACTGTTCA	1
AT>TA	34	TCATCAAGGCG	1
	41	GGCGCTGGCAG	1
CG>GC	97	AGGCGGCCGGC	1

^aSe muestran las secuencias 5pb aguas arriba y 5pb aguas abajo al sitio de mutación para todos los tipos de sustituciones de base. La base que muta está indicada en negrita. Los nucleótidos A, T, C y G están coloreados en violeta, verde, celeste y Amarillo, respectivamente. Se subraya el contexto preferido de secuencia 5'-GXC-3'.

Tabla A5. Contexto de secuencia de sustituciones de pase en *nfxB* de la cepa *dinB*^a

Mutación	Sitio (pb)	Contexto de secuencia	Frecuencia
CG>TA	107	CGT AAGCAAGG	1
	125	GCAC CGCTT CT	1
	241	CG TTGC AGCGC	1
	298	TAT TCCAGTAC	1
	344	AC GCT GGCAGT	1
	346	G CT GGCAGTCC	1
	388	G CGG ACAGCAG	1
	538	TCCAT GGCGCC	2
AT>GC	86	GGA ACTGGCCG	1
	119	CAC CC TGCACC	1
	452	CAC CC TGGTCT	1
CG>AT	22	ATG ACGAGCGA	1
	163	T GCT CGAGGAC	1
	175	AC GG AGAGACC	1
	385	T GCG GGACAG	1
	436	TCAC CGAACTG	1
AT>CG	86	GGA ACTGGCCG	2
	115	AGG CCACCC TG	8
	440	CGA ACTGTTCA	1
AT>TA	41	GGC GCTGGCAG	2
	119	CAC CC TGCACC	1
CG>GC	354	TCCT ACCTGGA	1
	383	CCT GGCGGAC	1

^aSe muestran las secuencias 5pb aguas arriba y 5pb aguas abajo al sitio de mutación para todos los tipos de sustituciones de base. La base que muta está indicada en negrita. Los nucleótidos A, T, C y G están coloreados en violeta, verde, celeste y Amarillo, respectivamente. Se subraya el contexto preferido de secuencia 5'-GXC-3'.

Tabla A6. Contexto de secuencia de sustituciones de pase en *nfxB* de la cepa *mutS^β dinB^a*.

Mutación	Sitio (pb)	Contexto de secuencia	Frecuencia
CG>TA	25	ACGAGCGACTC	1
	67	GCCCGCGAGCG	1
	154	TGGTGCAGATG	2
	346	GCTGGCAGTCC	1
	388	GCGGACAGCAG	1
	436	TCACCGAACTG	1
	538	TCCATGGCGCC	1
AT>GC	533	GTTCCTCCATG	1
CG>AT	207	GCCTGCGACCT	1
AT>CG	115	AGGCCACCCIG	7
	122	CCTGCACCGCT	1
AT>TA	41	GGCGCTGGCAG	2
	104	CGGCGTAAGCA	1
CG>GC	97	AGGCGGCCGGC	1
	538	TCCATGGCGCC	1

^aSe muestran las secuencias 5pb aguas arriba y 5pb aguas abajo al sitio de mutación para todos los tipos de sustituciones de base. La base que muta está indicada en negrita. Los nucleótidos A, T, C y G están coloreados en violeta, verde, celeste y Amarillo, respectivamente. Se subraya el contexto preferido de secuencia 5'-GXC-3'.

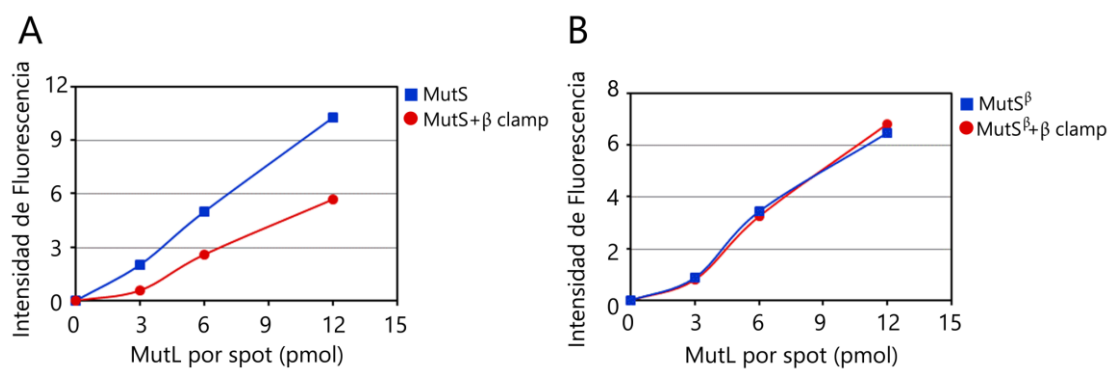


Figura A1. Análisis de la unión de MutS a MutL cuando está acomplejada con β clamp, mediante FW.

(A) MutL-His (3, 6 y 12 pmol) fue inmovilizada en una membrana de nitrocelulosa, y luego incubada con una solución que contiene MutS-strep (0.5 μM) sola o mezclada simultáneamente con β clamp-His (0.5 μM). La unión de MutS a MutL fue detectada utilizando un anticuerpo anti-Strep II. Las curvas de unión obtenidas representa la intensidad de fluorescencia relativa de un spot en función de la concentración de MutL (pmol) por spot. (B) El mismo ensayo fue llevado a cabo para la versión mutante MutS^β. Se muestra la desviación estándar (n=3).



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Yao, N.Y. and M.E. O'Donnell, *Evolution of replication machines*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2016. **51**(3): p. 135-49.
2. Beattie, T.R. and R. Reyes-Lamothe, *A Replisome's journey through the bacterial chromosome*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 562.
3. Kurth, I. and M. O'Donnell, *New insights into replisome fluidity during chromosome replication*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(4): p. 195-203.
4. Yao, N. and M. O'Donnell, *Bacterial and Eukaryotic Replisome Machines*. JSM Biochem Mol Biol, 2016. **3**(1).
5. Slater, S.C., et al., *holE, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of Escherichia coli: characterization of a holE mutant and comparison with a dnaQ (epsilon-subunit) mutant*. J Bacteriol, 1994. **176**(3): p. 815-21.
6. Dalrymple, B.P., et al., *A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11627-32.
7. Hedglin, M., R. Kumar, and S.J. Benkovic, *Replication clamps and clamp loaders*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a010165.
8. Jarvis, T.C., et al., *Reconstitution of a minimal DNA replicase from Pseudomonas aeruginosa and stimulation by non-cognate auxiliary factors*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7890-900.
9. Jarvis, T.C., et al., *Discovery and characterization of the cryptic psi subunit of the pseudomonad DNA replicase*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40465-73.
10. Dervyn, E., et al., *Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1716-9.
11. Sanders, G.M., H.G. Dallmann, and C.S. McHenry, *Reconstitution of the B. subtilis replisome with 13 proteins including two distinct replicases*. Mol Cell, 2010. **37**(2): p. 273-81.
12. Le Chatelier, E., et al., *Involvement of DnaE, the second replicative DNA polymerase from Bacillus subtilis, in DNA mutagenesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 1757-67.
13. Rannou, O., et al., *Functional interplay of DnaE polymerase, DnaG primase and DnaC helicase within a ternary complex, and primase to polymerase hand-off during lagging strand DNA replication in Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(10): p. 5303-20.
14. Paschalis, V., et al., *Interactions of the Bacillus subtilis DnaE polymerase with replisomal proteins modulate its activity and fidelity*. Open Biol, 2017. **7**(9).
15. Wu, C.A., et al., *Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the Escherichia coli DNA replication fork. IV. Reconstitution of an asymmetric, dimeric DNA polymerase III holoenzyme*. J Biol Chem, 1992. **267**(6): p. 4064-73.
16. O'Donnell, M., et al., *The sliding clamp of DNA polymerase III holoenzyme encircles DNA*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(9): p. 953-7.
17. Georgescu, R.E., et al., *Structure of a sliding clamp on DNA*. Cell, 2008. **132**(1): p. 43-54.
18. Wolff, P., et al., *Differential modes of peptide binding onto replicative sliding clamps from various bacterial origins*. J Med Chem, 2014. **57**(18): p. 7565-76.
19. McGrath, A.E., et al., *Crystal structures and biochemical characterization of DNA sliding clamps from three Gram-negative bacterial pathogens*. J Struct Biol, 2018. **204**(3): p. 396-405.
20. Kuriyan, J. and M. O'Donnell, *Sliding clamps of DNA polymerases*. J Mol Biol, 1993. **234**(4): p. 915-25.

21. Lopez de Saro, F.J., *Regulation of interactions with sliding clamps during DNA replication and repair*. *Curr Genomics*, 2009. **10**(3): p. 206-15.
22. Vivona, J.B. and Z. Kelman, *The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins*. *FEBS Lett*, 2003. **546**(2-3): p. 167-72.
23. Bloom, L.B., *Loading clamps for DNA replication and repair*. *DNA Repair (Amst)*, 2009. **8**(5): p. 570-8.
24. Su'etsugu, M. and J. Errington, *The replicase sliding clamp dynamically accumulates behind progressing replication forks in Bacillus subtilis cells*. *Mol Cell*, 2011. **41**(6): p. 720-32.
25. Moolman, M.C., et al., *Slow unloading leads to DNA-bound beta2-sliding clamp accumulation in live Escherichia coli cells*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5820.
26. Fuchs, R.P. and S. Fujii, *Translesion DNA synthesis and mutagenesis in prokaryotes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(12): p. a012682.
27. Friedberg, E.C., *Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair*. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(10): p. 381.
28. Pages, V. and R.P. Fuchs, *Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo*. *Science*, 2003. **300**(5623): p. 1300-3.
29. Yeeles, J.T. and K.J. Mariani, *The Escherichia coli replisome is inherently DNA damage tolerant*. *Science*, 2011. **334**(6053): p. 235-8.
30. Henrikus, S.S., A.M. van Oijen, and A. Robinson, *Specialised DNA polymerases in Escherichia coli: roles within multiple pathways*. *Curr Genet*, 2018. **64**(6): p. 1189-1196.
31. Indiani, C. and M. O'Donnell, *A proposal: Source of single strand DNA that elicits the SOS response*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013. **18**: p. 312-23.
32. Sale, J.E., *Competition, collaboration and coordination--determining how cells bypass DNA damage*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 7): p. 1633-43.
33. Friedberg, E.C., *Suffering in silence: the tolerance of DNA damage*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(12): p. 943-53.
34. Fuchs, R.P., *Tolerance of lesions in E. coli: Chronological competition between Translesion Synthesis and Damage Avoidance*. *DNA Repair (Amst)*, 2016. **44**: p. 51-58.
35. Foster, P.L., *Stress-induced mutagenesis in bacteria*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2007. **42**(5): p. 373-97.
36. Maslowska, K.H., K. Makiela-Dzbenska, and I.J. Fijalkowska, *The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage*. *Environ Mol Mutagen*, 2019. **60**(4): p. 368-384.
37. Ganai, R.A. and E. Johansson, *DNA Replication-A Matter of Fidelity*. *Mol Cell*, 2016. **62**(5): p. 745-55.
38. Yang, W. and Y. Gao, *Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism*. *Annu Rev Biochem*, 2018. **87**: p. 239-261.
39. Kuban, W., et al., *Mutator phenotype resulting from DNA polymerase IV overproduction in Escherichia coli: preferential mutagenesis on the lagging strand*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(19): p. 6862-6.
40. Wolff, E., et al., *Polymerases leave fingerprints: analysis of the mutational spectrum in Escherichia coli rpoB to assess the role of polymerase IV in spontaneous mutation*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(9): p. 2900-5.
41. Wagner, J. and T. Nohmi, *Escherichia coli DNA polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity*. *J Bacteriol*, 2000. **182**(16): p. 4587-95.
42. Tegova, R., et al., *Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(9): p. 2735-44.
43. Sanders, L.H., et al., *Role of Pseudomonas aeruginosa dinB-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(24): p. 8573-85.

44. Duigou, S., et al., *Distinctive genetic features exhibited by the Y-family DNA polymerases in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2004. **54**(2): p. 439-51.
45. Corzett, C.H., M.F. Goodman, and S.E. Finkel, *Competitive fitness during feast and famine: how SOS DNA polymerases influence physiology and evolution in Escherichia coli*. Genetics, 2013. **194**(2): p. 409-20.
46. Yeiser, B., et al., *SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8737-41.
47. Nohmi, T., *Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 231-53.
48. Ohmori, H., et al., *The Y-family of DNA polymerases*. Mol Cell, 2001. **8**(1): p. 7-8.
49. Sharma, A., et al., *A strategically located serine residue is critical for the mutator activity of DNA polymerase IV from Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(9): p. 5104-14.
50. Kottur, J., et al., *Unique structural features in DNA polymerase IV enable efficient bypass of the N2 adduct induced by the nitrofurazone antibiotic*. Structure, 2015. **23**(1): p. 56-67.
51. Bjedov, I., et al., *Involvement of Escherichia coli DNA polymerase IV in tolerance of cytotoxic alkylating DNA lesions in vivo*. Genetics, 2007. **176**(3): p. 1431-40.
52. Hori, M., et al., *Error-Prone Translesion DNA Synthesis by Escherichia coli DNA Polymerase IV (DinB) on Templates Containing 1,2-dihydro-2-oxoadenine*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**: p. 807579.
53. Kumari, A., et al., *Replication bypass of interstrand cross-link intermediates by Escherichia coli DNA polymerase IV*. J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27433-7.
54. Yamada, M., et al., *Involvement of Y-family DNA polymerases in mutagenesis caused by oxidized nucleotides in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(13): p. 4992-5.
55. Foti, J.J., et al., *Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics*. Science, 2012. **336**(6079): p. 315-9.
56. Cohen, S.E., et al., *Roles for the transcription elongation factor NusA in both DNA repair and damage tolerance pathways in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15517-22.
57. Williams, A.B., K.M. Hetrick, and P.L. Foster, *Interplay of DNA repair, homologous recombination, and DNA polymerases in resistance to the DNA damaging agent 4-nitroquinoline-1-oxide in Escherichia coli*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(10): p. 1090-7.
58. Kim, S.R., et al., *Roles of chromosomal and episomal dinB genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in Escherichia coli*. Mol Genet Genomics, 2001. **266**(2): p. 207-15.
59. Thrall, E.S., et al., *Single-molecule imaging reveals multiple pathways for the recruitment of translesion polymerases after DNA damage*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 2170.
60. Pomerantz, R.T., M.F. Goodman, and M.E. O'Donnell, *DNA polymerases are error-prone at RecA-mediated recombination intermediates*. Cell Cycle, 2013. **12**(16): p. 2558-63.
61. Pomerantz, R.T., et al., *Preferential D-loop extension by a translesion DNA polymerase underlies error-prone recombination*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(6): p. 748-55.
62. Layton, J.C. and P.L. Foster, *Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2003. **50**(2): p. 549-61.
63. Wagner, J., et al., *The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis*. Mol Cell, 1999. **4**(2): p. 281-6.

-
64. Lenne-Samuel, N., et al., *The processivity factor beta controls DNA polymerase IV traffic during spontaneous mutagenesis and translesion synthesis in vivo*. EMBO Rep, 2002. **3**(1): p. 45-9.
 65. Bunting, K.A., S.M. Roe, and L.H. Pearl, *Structural basis for recruitment of translesion DNA polymerase Pol IV/DinB to the beta-clamp*. EMBO J, 2003. **22**(21): p. 5883-92.
 66. Johnson, A. and M. O'Donnell, *Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 283-315.
 67. Wagner, J., et al., *The beta clamp targets DNA polymerase IV to DNA and strongly increases its processivity*. EMBO Rep, 2000. **1**(6): p. 484-8.
 68. Kath, J.E., et al., *Polymerase exchange on single DNA molecules reveals processivity clamp control of translesion synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(21): p. 7647-52.
 69. Indiani, C., et al., *A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 805-15.
 70. Heltzel, J.M., et al., *Escherichia coli DNA polymerase IV (Pol IV), but not Pol II, dynamically switches with a stalled Pol III* replicase*. J Bacteriol, 2012. **194**(14): p. 3589-600.
 71. Ikeda, M., et al., *DNA polymerase IV mediates efficient and quick recovery of replication forks stalled at N2-dG adducts*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(13): p. 8461-72.
 72. Heltzel, J.M., et al., *A model for DNA polymerase switching involving a single cleft and the rim of the sliding clamp*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12664-9.
 73. Toste Rego, A., et al., *Architecture of the Pol III-clamp-exonuclease complex reveals key roles of the exonuclease subunit in processive DNA synthesis and repair*. EMBO J, 2013. **32**(9): p. 1334-43.
 74. Jergic, S., et al., *A direct proofreader-clamp interaction stabilizes the Pol III replicase in the polymerization mode*. EMBO J, 2013. **32**(9): p. 1322-33.
 75. Park, J., et al., *Dynamics of Proofreading by the E. coli Pol III Replicase*. Cell Chem Biol, 2018. **25**(1): p. 57-66 e4.
 76. Uchida, K., et al., *Overproduction of Escherichia coli DNA polymerase DinB (Pol IV) inhibits replication fork progression and is lethal*. Mol Microbiol, 2008. **70**(3): p. 608-22.
 77. Indiani, C., et al., *Translesion DNA polymerases remodel the replisome and alter the speed of the replicative helicase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6031-8.
 78. Wagner, J., et al., *Distinct beta-clamp interactions govern the activities of the Y family PolIV DNA polymerase*. Mol Microbiol, 2009. **74**(5): p. 1143-51.
 79. Mallik, S., et al., *Interactions and Localization of Escherichia coli Error-Prone DNA Polymerase IV after DNA Damage*. J Bacteriol, 2015. **197**(17): p. 2792-809.
 80. Henrikus, S.S., et al., *DNA polymerase IV primarily operates outside of DNA replication forks in Escherichia coli*. PLoS Genet, 2018. **14**(1): p. e1007161.
 81. Jiricny, J., *The multifaceted mismatch-repair system*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 335-46.
 82. Drake, J.W., *The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **870**: p. 100-7.
 83. Reyes, G.X., et al., *New insights into the mechanism of DNA mismatch repair*. Chromosoma, 2015. **124**(4): p. 443-62.
 84. Friedhoff, P., P. Li, and J. Gotthardt, *Protein-protein interactions in DNA mismatch repair*. DNA Repair (Amst), 2016. **38**: p. 50-7.
 85. Fukui, K., *DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria*. Journal of nucleic acids, 2010. **2010**.
 86. Chakraborty, U. and E. Alani, *Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision*. FEMS Yeast Res, 2016. **16**(6).

87. Morita, R., et al., *Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**: p. 179594.
88. Lakhani, B., et al., *Evolutionary Covariance Combined with Molecular Dynamics Predicts a Framework for Allostery in the MutS DNA Mismatch Repair Protein*. J Phys Chem B, 2017. **121**(9): p. 2049-2061.
89. Bjornson, K.P., et al., *Assembly and molecular activities of the MutS tetramer*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34667-73.
90. Mendillo, M.L., C.D. Putnam, and R.D. Kolodner, *Escherichia coli MutS tetramerization domain structure reveals that stable dimers but not tetramers are essential for DNA mismatch repair in vivo*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16345-54.
91. Lamers, M.H., et al., *The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 711-7.
92. Mendillo, M.L., et al., *A conserved MutS homolog connector domain interface interacts with MutL homologs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22223-8.
93. Obmolova, G., et al., *Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 703-10.
94. Biswas, I., et al., *Disruption of the helix-u-turn-helix motif of MutS protein: loss of subunit dimerization, mismatch binding and ATP hydrolysis*. J Mol Biol, 2001. **305**(4): p. 805-16.
95. Perevozchikova, S.A., et al., *Modern aspects of the structural and functional organization of the DNA mismatch repair system*. Acta Naturae, 2013. **5**(3): p. 17-34.
96. Lebbink, J.H., et al., *Magnesium coordination controls the molecular switch function of DNA mismatch repair protein MutS*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 13131-41.
97. Mukherjee, S., S.M. Law, and M. Feig, *Deciphering the mismatch recognition cycle in MutS and MSH2-MSH6 using normal-mode analysis*. Biophys J, 2009. **96**(5): p. 1707-20.
98. Simmons, L.A., et al., *Beta clamp directs localization of mismatch repair in Bacillus subtilis*. Mol Cell, 2008. **29**(3): p. 291-301.
99. Dupes, N.M., et al., *Mutations in the Bacillus subtilis beta clamp that separate its roles in DNA replication from mismatch repair*. J Bacteriol, 2010. **192**(13): p. 3452-63.
100. Lenhart, J.S., et al., *DnaN clamp zones provide a platform for spatiotemporal coupling of mismatch detection to DNA replication*. Mol Microbiol, 2013. **87**(3): p. 553-68.
101. Lopez de Saro, F.J., et al., *The beta sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14340-9.
102. Zhou, Y., et al., *Functional analyses of Escherichia coli MutS-beta clamp interaction in vitro and in vivo*. Curr Microbiol. **60**(6): p. 466-70.
103. Lopez de Saro, F.J. and M. O'Donnell, *Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8376-80.
104. Kleczkowska, H.E., et al., *hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci*. Genes Dev, 2001. **15**(6): p. 724-36.
105. Flores-Rozas, H., D. Clark, and R.D. Kolodner, *Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 375-8.
106. Clark, A.B., et al., *Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36498-501.
107. Pillon, M.C., et al., *The sliding clamp tethers the endonuclease domain of MutL to DNA*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(22): p. 10746-59.

108. Fukui, K., *DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**.
109. Pillon, M.C., J.H. Miller, and A. Guarne, *The endonuclease domain of MutL interacts with the beta sliding clamp*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(1): p. 87-93.
110. Fukui, K., et al., *Structural Features and Functional Dependency on beta-Clamp Define Distinct Subfamilies of Bacterial Mismatch Repair Endonuclease MutL*. J Biol Chem, 2016. **291**(33): p. 16990-7000.
111. Fishel, R., *Mismatch repair*. J Biol Chem, 2015. **290**(44): p. 26395-403.
112. Pluciennik, A., et al., *PCNA function in the activation and strand direction of MutLalpha endonuclease in mismatch repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(37): p. 16066-71.
113. Kadyrov, F.A., et al., *Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair*. Cell, 2006. **126**(2): p. 297-308.
114. Boehm, E.M., M.S. Gildenberg, and M.T. Washington, *The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication*. Enzymes, 2016. **39**: p. 231-54.
115. Spies, M. and R. Fishel, *Mismatch repair during homologous and homeologous recombination*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(3): p. a022657.
116. Denamur, E. and I. Matic, *Evolution of mutation rates in bacteria*. Mol Microbiol, 2006. **60**(4): p. 820-7.
117. Li, S.K.H. and A. Martin, *Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored*. Trends Mol Med, 2016. **22**(4): p. 274-289.
118. Hall, L.M. and S.K. Henderson-Begg, *Hypermutable bacteria isolated from humans--a critical analysis*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 9): p. 2505-14.
119. Gellatly, S.L. and R.E. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses*. Pathog Dis, 2013. **67**(3): p. 159-73.
120. Winstanley, C., S. O'Brien, and M.A. Brockhurst, *Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections*. Trends Microbiol, 2016. **24**(5): p. 327-337.
121. Jatsenko, T., et al., *DNA Polymerases ImuC and DinB Are Involved in DNA Alkylation Damage Tolerance in Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170719.
122. Moyano, A.J., et al., *MutS deficiency and activity of the error-prone DNA polymerase IV are crucial for determining mucA as the main target for mucoid conversion in Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 2007. **64**(2): p. 547-59.
123. Gutierrez, A., et al., *beta-Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1610.
124. Cirz, R.T., et al., *Defining the Pseudomonas aeruginosa SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin*. J Bacteriol, 2006. **188**(20): p. 7101-10.
125. Sanders, L.H., et al., *Epistatic roles for Pseudomonas aeruginosa MutS and DinB (DNA Pol IV) in coping with reactive oxygen species-induced DNA damage*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18824.
126. Lee, D.G., et al., *Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial*. Genome Biol, 2006. **7**(10): p. R90.
127. Jacquelin, D.K., et al., *Pseudomonas aeruginosa MutL protein functions in Escherichia coli*. Biochem J, 2005. **388**(Pt 3): p. 879-87.
128. Correa, E.M., et al., *Some amino acids of the Pseudomonas aeruginosa MutL D(Q/M)HA(X)2E(X)4E conserved motif are essential for the in vivo function of the protein but not for the in vitro endonuclease activity*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(11): p. 1106-13.
129. Oliver, A., F. Baquero, and J. Blazquez, *The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in Pseudomonas aeruginosa: molecular characterization of naturally occurring mutants*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1641-50.

130. Miguel, V., M.R. Monti, and C.E. Argarana, *The role of MutS oligomers on Pseudomonas aeruginosa mismatch repair system activity*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(11): p. 1799-808.
131. Monti, M.R., et al., *Functional analysis of the interaction between the mismatch repair protein MutS and the replication processivity factor beta clamp in Pseudomonas aeruginosa*. DNA Repair (Amst), 2012. **11**(5): p. 463-9.
132. Morero, N.R., M.R. Monti, and C.E. Argarana, *Effect of ciprofloxacin concentration on the frequency and nature of resistant mutants selected from Pseudomonas aeruginosa mutS and mutT hypermutators*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(8): p. 3668-76.
133. Monti, M.R., et al., *nfxB as a novel target for analysis of mutation spectra in Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66236.
134. Brown, J., T. Brown, and K.R. Fox, *Affinity of mismatch-binding protein MutS for heteroduplexes containing different mismatches*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 3): p. 627-33.
135. Naktinis, V., J. Turner, and M. O'Donnell, *A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings*. Cell, 1996. **84**(1): p. 137-45.
136. Jatsenko, T., et al., *Molecular characterization of Rif(r) mutations in Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida*. Mutat Res. **683**(1-2): p. 106-14.
137. Guenard, S., et al., *Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(1): p. 221-8.
138. Morgan, C. and P.D. Lewis, *iMARS--mutation analysis reporting software: an analysis of spontaneous cII mutation spectra*. Mutat Res, 2006. **603**(1): p. 15-26.
139. Bailey, T.L., et al., *MEME SUITE: tools for motif discovery and searching*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W202-8.
140. Nakano, K., et al., *E. coli mismatch repair enhances AT-to-GC mutagenesis caused by alkylating agents*. Mutat Res, 2017. **815**: p. 22-27.
141. van Loon, B., E. Markkanen, and U. Hubscher, *Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(6): p. 604-16.
142. Maki, H. and M. Sekiguchi, *MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis*. Nature, 1992. **355**(6357): p. 273-5.
143. Morero, N.R. and C.E. Argarana, *Pseudomonas aeruginosa deficient in 8-oxodeoxyguanine repair system shows a high frequency of resistance to ciprofloxacin*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **290**(2): p. 217-26.
144. Poole, K., et al., *Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 1996. **21**(4): p. 713-24.
145. Purssell, A. and K. Poole, *Functional characterization of the NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 2013. **159**(Pt 10): p. 2058-73.
146. Stickland, H.G., et al., *Mutation of nfxB causes global changes in the physiology and metabolism of Pseudomonas aeruginosa*. J Proteome Res, 2010. **9**(6): p. 2957-67.
147. Blazquez, J., et al., *Antimicrobials as promoters of genetic variation*. Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(5): p. 561-9.
148. Tanimoto, K., et al., *Fluoroquinolone enhances the mutation frequency for meropenem-selected carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa, but use of the high-potency drug doripenem inhibits mutant formation*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(10): p. 3795-800.

-
149. Nair, C.G., et al., *Sub-lethal concentrations of antibiotics increase mutation frequency in the cystic fibrosis pathogen Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol, 2013. **56**(2): p. 149-54.
 150. Fisher, L.M., et al., *Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. New concepts on the mechanism of action and resistance*. Am J Med, 1989. **87**(5A): p. 2S-8S.
 151. Brazas, M.D. and R.E. Hancock, *Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3222-7.
 152. Brazas, M.D., et al., *Role of lon, an ATP-dependent protease homolog, in resistance of Pseudomonas aeruginosa to ciprofloxacin*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(12): p. 4276-83.
 153. Hurley, M. and A. Smyth, *Fluoroquinolones in the treatment of bronchopulmonary disease in cystic fibrosis*. Ther Adv Respir Dis, 2012. **6**(6): p. 363-73.
 154. Song, L.Y., et al., *Mutational Consequences of Ciprofloxacin in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(10): p. 6165-72.
 155. Cirz, R.T., et al., *Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e176.
 156. Kohanski, M.A., D.J. Dwyer, and J.J. Collins, *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(6): p. 423-35.
 157. Lopez, E., et al., *Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2007. **64**(1): p. 83-93.
 158. Kuban, W., et al., *Role of DNA polymerase IV in Escherichia coli SOS mutator activity*. J Bacteriol, 2006. **188**(22): p. 7977-80.
 159. Becherel, O.J., R.P. Fuchs, and J. Wagner, *Pivotal role of the beta-clamp in translesion DNA synthesis and mutagenesis in E. coli cells*. DNA Repair (Amst), 2002. **1**(9): p. 703-8.
 160. Fijalkowska, I.J., R.M. Schaaper, and P. Jonczyk, *DNA replication fidelity in Escherichia coli: a multi-DNA polymerase affair*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(6): p. 1105-21.
 161. Feng, G., H.C. Tsui, and M.E. Winkler, *Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase Escherichia coli K-12 cells*. J Bacteriol, 1996. **178**(8): p. 2388-96.
 162. Burnouf, D.Y., et al., *Structural and biochemical analysis of sliding clamp/ligand interactions suggest a competition between replicative and translesion DNA polymerases*. J Mol Biol, 2004. **335**(5): p. 1187-97.
 163. Wolff, P., et al., *Structure-based design of short peptide ligands binding onto the E. coli processivity ring*. J Med Chem, 2011. **54**(13): p. 4627-37.
 164. Li, H., et al., *How Does the Proliferating Cell Nuclear Antigen Modulate Binding Specificity to Multiple Partner Proteins?* J Chem Inf Model, 2017. **57**(12): p. 3011-3021.
 165. Qiu, R., et al., *Large conformational changes in MutS during DNA scanning, mismatch recognition and repair signalling*. EMBO J, 2012. **31**(11): p. 2528-40.
 166. Sass, L.E., et al., *Single-molecule FRET TACKLE reveals highly dynamic mismatched DNA-MutS complexes*. Biochemistry, 2010. **49**(14): p. 3174-90.
 167. Groothuizen, F.S., et al., *Using stable MutS dimers and tetramers to quantitatively analyze DNA mismatch recognition and sliding clamp formation*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(17): p. 8166-81.
 168. Kuban, W., et al., *Role of Escherichia coli DNA polymerase IV in in vivo replication fidelity*. J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4802-7.
 169. McKenzie, G.J., et al., *The dinB operon and spontaneous mutation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2003. **185**(13): p. 3972-7.

170. Pavlov, Y.I., I.M. Mian, and T.A. Kunkel, *Evidence for preferential mismatch repair of lagging strand DNA replication errors in yeast*. *Curr Biol*, 2003. **13**(9): p. 744-8.
171. Fijalkowska, I.J., et al., *Unequal fidelity of leading strand and lagging strand DNA replication on the Escherichia coli chromosome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(17): p. 10020-5.
172. McElhinny, S.A.N., et al., *Division of labor at the eukaryotic replication fork*. *Molecular cell*, 2008. **30**(2): p. 137-144.
173. Pursell, Z.F., et al., *Yeast DNA polymerase ϵ participates in leading-strand DNA replication*. *Science*, 2007. **317**(5834): p. 127-130.
174. Jarosz, D.F., et al., *A DinB variant reveals diverse physiological consequences of incomplete TLS extension by a Y-family DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(50): p. 21137-42.
175. Bichara, M., et al., *Postreplication repair mechanisms in the presence of DNA adducts in Escherichia coli*. *Mutat Res*, 2011. **727**(3): p. 104-22.
176. Zhao, G., E.S. Gleave, and M.H. Lamers, *Single-molecule studies contrast ordered DNA replication with stochastic translesion synthesis*. *Elife*, 2017. **6**.
177. Pages, V., R. Janel-Bintz, and R.P. Fuchs, *Pol III proofreading activity prevents lesion bypass as evidenced by its molecular signature within E.coli cells*. *J Mol Biol*, 2005. **352**(3): p. 501-9.
178. Liao, Y., et al., *Single-molecule motions and interactions in live cells reveal target search dynamics in mismatch repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(50): p. E6898-906.
179. Banach-Orlowska, M., et al., *DNA polymerase II as a fidelity factor in chromosomal DNA synthesis in Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2005. **58**(1): p. 61-70.
180. Pluciennik, A., et al., *Involvement of the beta clamp in methyl-directed mismatch repair in vitro*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(47): p. 32782-91.
181. Shell, S.S., C.D. Putnam, and R.D. Kolodner, *The N terminus of Saccharomyces cerevisiae Msh6 is an unstructured tether to PCNA*. *Mol Cell*, 2007. **26**(4): p. 565-78.
182. Iyer, R.R., et al., *The MutSalpha-proliferating cell nuclear antigen interaction in human DNA mismatch repair*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(19): p. 13310-9.
183. Zlatanou, A., et al., *The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol eta in response to oxidative DNA damage in human cells*. *Mol Cell*, 2011. **43**(4): p. 649-62.
184. Lv, L., et al., *Mismatch repair protein MSH2 regulates translesion DNA synthesis following exposure of cells to UV radiation*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(22): p. 10312-22.
185. Hamperl, S. and K.A. Cimprich, *Conflict Resolution in the Genome: How Transcription and Replication Make It Work*. *Cell*, 2016. **167**(6): p. 1455-1467.
186. Kamarthapu, V. and E. Nudler, *Rethinking transcription coupled DNA repair*. *Curr Opin Microbiol*, 2015. **24**: p. 15-20.
187. Lang, K.S. and H. Merrikh, *The Clash of Macromolecular Titans: Replication-Transcription Conflicts in Bacteria*. *Annu Rev Microbiol*, 2018. **72**: p. 71-88.
188. Million-Weaver, S., et al., *An underlying mechanism for the increased mutagenesis of lagging-strand genes in Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(10): p. E1096-105.
189. Pages, V., et al., *Monitoring bypass of single replication-blocking lesions by damage avoidance in the Escherichia coli chromosome*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(18): p. 9036-43.
190. Shrivastav, N., et al., *A chemical genetics analysis of the roles of bypass polymerase DinB and DNA repair protein AlkB in processing N2-alkylguanine lesions in vivo*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94716.

-
-
191. Al-Wrafy, F., et al., *Pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017. **71**(0): p. 78-91.
 192. Moyano, A.J., et al., *Simple sequence repeats together with mismatch repair deficiency can bias mutagenic pathways in Pseudomonas aeruginosa during chronic lung infection*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80514.
 193. Moxon, R., C. Bayliss, and D. Hood, *Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 307-33.
 194. Polosina, Y.Y. and C.G. Cupples, *Wot the 'L-Does MutL do?* Mutat Res, 2010. **705**(3): p. 228-38.
 195. Smith, J. and P. Modrich, *Mutation detection with MthH, MutL, and MutS mismatch repair proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4374-9.
 196. Kaniga, K., I. Delor, and G.R. Cornelis, *A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica*. Gene, 1991. **109**(1): p. 137-41.
 197. Choi, K.H. and H.P. Schweizer, *mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example Pseudomonas aeruginosa*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 153-61.
 198. Kovach, M.E., et al., *pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector*. Biotechniques, 1994. **16**(5): p. 800-2.
 199. Guzman, L.M., et al., *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4121-30.
 200. Kovach, M.E., et al., *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes*. Gene, 1995. **166**(1): p. 175-6.
 201. de Lorenzo, V. and K.N. Timmis, *Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons*. Methods Enzymol, 1994. **235**: p. 386-405.
 202. Rosche, W.A. and P.L. Foster, *Determining mutation rates in bacterial populations*. Methods, 2000. **20**(1): p. 4-17.
 203. Zheng, Q., *A note on plating efficiency in fluctuation experiments*. Math Biosci, 2008. **216**(2): p. 150-3.
 204. Zheng, Q., *rSalvador: An R Package for the Fluctuation Experiment*. G3 (Bethesda), 2017. **7**(12): p. 3849-3856.
 205. Zheng, Q., *A new practical guide to the Luria-Delbruck protocol*. Mutat Res, 2015. **781**: p. 7-13.