

***“Regulación de la recombinación genética entre
secuencias de ADN divergentes: recombinasas y
Sistema de Reparación de Bases Apareadas
Incorrectamente”***

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Lic. María Victoria Borgogno

Director de Tesis: Dr. Carlos E. Argaraña



**Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba – CIQUIBIC
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba**

2016

Índice

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	5
1- RECOMBINACIÓN GENÉTICA.....	5
2-RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	8
2.1- Relevancia Biológica	8
2.2- Primeros modelos de recombinación homóloga.....	9
2.3- Mecanismo molecular de recombinación homóloga en <i>Escherichia coli</i>	11
2.4- Intercambio de cadenas catalizado por recombinasas de la familia RecA.	15
3-RECOMBINACIÓN HOMEÓLOGA	22
3.1- Fidelidad de las recombinasas.....	23
3.2- Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente	23
4- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : RECOMBINACIÓN Y MRS.....	25
OBJETIVOS	28
RESULTADOS.....	29
CAPITULO 1. ESTUDIOS DE LA REACCIÓN DE INTERCAMBIO DE CADENAS DE ADN. EFECTO DE DIFERENTES SUSTRATOS CONTENIENDO DIVERGENCIAS Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RECOMBINASAS BACTERIANAS Y EUCARIOTAS.	29
1.1- Análisis de recombinación de ADN <i>in vitro</i> utilizando la técnica de Fluorescencia por Transferencia de Energía Resonante (FRET): intercambio de cadenas catalizado por recombinasas bacterianas y eucariotas.....	30
1.2- Efecto de la presencia de bases mal apareadas (mismatches) en el intercambio de cadenas catalizado por recombinasas.	32
1.2.1- La posición y distribución de mismatches TG afectan la eficiencia de intercambio de cadena. ..	32
1.2.2- MutS no fue capaz de inhibir el intercambio de cadena catalizado por recombinasas en presencia de mismatches con los sustratos de ADN utilizados.	34
1.2.3- Efecto de diferentes tipos, posición, cantidad y distribución de mismatches en el intercambio de cadenas.....	35
1.3- Análisis de la presencia de pequeñas inserciones/deleciones en el intercambio de cadenas.	41
1.4- Estudios del efecto de Hop2-Mnd1 en el intercambio de cadenas catalizado por la recombinasa eucariota Dmc1.....	43

1.4.1- Estudios del efecto de Hop2-Mnd1 en el intercambio de cadenas catalizado por Dmc1 en presencia de mismatches.	43
1.4.2- Análisis de distintas versiones mutadas de Hop2 y Mnd1 sobre el intercambio de cadena catalizado por Dmc1.	44
1.5- Análisis del mecanismo molecular por el cual las recombinasas detectan la presencia de heterologías durante el intercambio de cadenas.....	46
1.5.1- Temperatura de Fusión del ADNdc conteniendo mismatches.	46
1.5.2- Direccionalidad del intercambio de cadena catalizado por RecA y Dmc1.....	48
1.5.3- Reversibilidad de la reacción de intercambio catalizado por RecA.	49
CAPITULO 2. ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN EN <i>P. aeruginosa</i> MEDIANTE ENSAYOS <i>IN VIVO</i> . FUNCIÓN DEL MRS Y DE GENES INVOLUCRADOS EN RECOMBINACIÓN.....	54
2.1- Construcción de un sistema para medir recombinación homóloga y homeóloga en bacterias Gram-negativas.....	54
2.1.2- Determinación de la tasa de recombinación en cepas de <i>E. coli</i> silvestre y deficientes en <i>mutS</i> y <i>recA</i>	56
2.2- Determinación de la recombinación homóloga y homeóloga en cepas de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en genes involucrados en recombinación.....	58
2.3- Rol de las proteínas del MRS de <i>P. aeruginosa</i> en la regulación de la recombinación homeóloga.....	60
2.3.1- Determinación de la tasa de recombinación en cepas de <i>P. aeruginosa</i> silvestre y deficientes en <i>mutS</i> , <i>mutL</i> y <i>uvrD</i>	60
2.3.2- Determinación de los sitios de intercambio de cadena durante la recombinación homeóloga en cepas silvestre y deficiente en <i>mutS</i>	61
2.3.3- Determinación de los dominios de MutS implicados en la regulación de la recombinación homeóloga.	62
DISCUSIÓN CAPITULO 1.	66
DISCUSIÓN CAPITULO 2.	74
CONCLUSIONES.....	81
CAPITULO 1.....	81
CAPITULO 2.....	82
MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
CAPITULO 1.....	84
Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	84
Medios de cultivos, enzimas y reactivos químicos	84
Clonado del gen <i>recA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85
Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	85
Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)	87

Sustratos de ADN para reacciones de intercambio de cadenas catalizadas por recombinasas	87
Reacciones de intercambio de cadenas.....	89
Mediciones de FRET y análisis de datos.....	90
Reversión de la reacción de intercambio	91
Análisis de las reacciones de intercambio de cadena en geles nativos de poliacrilamida	91
Cálculo de la Temperatura de Fusión de diferentes ADNdc	92
CAPITULO 2.....	94
Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	94
Medios de cultivos, enzimas y reactivos químicos	95
Construcción de una cepa de <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 con delección del gen <i>recA</i>	95
Construcción de los plásmidos p2-LacZ _{homo} y p2-LacZ _{homEo} para medir recombinación homóloga y homeóloga en bacterias Gram-negativas.	96
Determinación de la tasa de recombinación	97
ANEXO.....	99
REFERENCIAS.....	107

ABREVIATURAS

ADNsc: ADN simple cadena.

ADNdc: ADN doble cadena.

ADNdc^{FINAL}: ADN doble cadena producto de la reacción de intercambio.

MM: base mal apareada (del inglés mismatch).

FRET: Fluorescencia por transferencia de energía resonante (del inglés, Fluorescence Resonance Energy Transfer).

MRS: Sistema de Reparación de bases Apareadas Incorrectamente (del inglés, Mismatch Repair System).

SSA: apareamiento de simple hebra (del inglés, Single Strand Annealing).

DSBs: ruptura de ADN doble cadena (del inglés, Double Strand Breaks).

D-loop: bucle D (del inglés, Displacepent loop).

pb: pares de bases.

kb: kilobases.

nt: nucleótidos.

FI: Fracción de Intercambio

EIC: Eficiencia de Intercambio de Cadenas.

RESUMEN

La recombinación homóloga es un proceso esencial en el metabolismo celular de todos los organismos que permite la reorganización de genes dentro y entre cromosomas, provee una de las mayores vías de reparación de rupturas de ADN doble cadena y asegura la segregación correcta de los cromosomas en la meiosis eucariota. De esta manera, dicho proceso es una potente fuerza evolutiva que promueve la diversidad genética y mantiene la integridad del genoma. El mecanismo molecular de recombinación homóloga involucra una gran cantidad de proteínas las cuales intervienen en las tres etapas principales del proceso: *presinapsis*, *sinapsis* y *postsinapsis*. Una de las etapas más importantes es el intercambio de cadenas entre moléculas de ADN, proceso catalizado por las recombinasas de la familia RecA. Las recombinasas tienen la capacidad de buscar y discriminar la secuencia homóloga blanco entre una gran cantidad de secuencias heterólogas en un proceso denominado “búsqueda de la homología” que es un paso determinante para que se lleve a cabo el intercambio entre hebras de ADN homólogas. Esta propiedad de las recombinasas actuaría como una primera barrera para evitar la recombinación entre secuencias de ADN divergentes mientras que las proteínas del Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS) proporcionan un segundo control para asegurar que las secuencias heterólogas no recombinen entre sí. Por lo tanto, la función de las recombinasas no se limita a catalizar mecánicamente el intercambio de cadenas, sino que también cumple un rol importante en la regulación de la recombinación, principalmente cuando el MRS se encuentra inactivo o circunstancialmente reprimido.

El objetivo general de este trabajo de Tesis se focaliza en el estudio de la recombinación genética entre secuencias de ADN divergentes y su regulación por las recombinasas y el MRS. Para abordar este objetivo se llevaron a cabo estudios de recombinación de ADN *in vitro* e *in vivo*; por un lado, se estudió la reacción de intercambio de cadenas de ADN catalizado por recombinasas bacterianas (RecA de *P. aeruginosa* y *E. coli*) y eucariota (Dmc1 de humanos) mediante ensayos *in vitro*, y por otro lado, se analizó la recombinación homóloga y homeóloga en cepas salvajes y mutantes de *P. aeruginosa* y *E. coli* mediante ensayos *in vivo*.

Para los estudios de la reacción de intercambio de cadenas *in vitro* se utilizó un sistema con oligonucleótidos utilizando la técnica de Fluorescencia por Transferencia de Energía Resonante (FRET) y se llevó a cabo un estudio sistemático con diferentes sustratos de ADN que contenían diferentes tipos de heterologías. Se encontró que tanto las recombinasas bacterianas como la recombinasa eucariota fueron capaces de detectar bases

mal apareadas durante el intercambio de cadenas, tales como mismatches y pequeñas inserciones o deleciones (loops). El reconocimiento y por lo tanto la inhibición de dichas heterologías depende del tipo, posición, cantidad y distribución de mismatches; así como también del tamaño del loop y la hebra de ADN en la cual se ubica dicho loop. Asimismo, el análisis de las reacciones reversas reveló que el nivel de inhibición de un determinado mismatch se correlaciona con el grado de reversibilidad de las reacciones de intercambio de cadenas.

En general, los patrones de inhibición del intercambio de cadenas fueron similares para RecA y Dmc1, sugiriendo que ambas recombinasas utilizan los mismos principios para el reconocimiento de heterologías, lo cual sería una propiedad conservada entre organismos procariontes y eucariotes. Sin embargo, las recombinasas bacterianas fueron más activas que la recombinasa eucariota Dmc1 y a su vez Dmc1 mostró mayor tolerancia a la presencia de mismatches y loops que las RecA de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Finalmente, el estudio de las reacciones de intercambio de cadenas catalizadas por Dmc1 en presencia de Hop2-Mnd1 reveló que dicho complejo aumenta la eficiencia de intercambio con ADN homólogo o conteniendo un mismatch TG. Sin embargo, cuando Dmc1 es fuertemente inhibida por la presencia de 3 mismatches, Hop2-Mnd1 no es capaz de revertir esta inhibición.

Aunque el proceso de recombinación ha sido estudiado en *E. coli*, al presente no se habían realizado estudios sobre el mecanismo de recombinación genética y su modulación por el MRS en *P. aeruginosa* ni en otras especies del género *Pseudomonas*. Asimismo, esta bacteria constituye un modelo interesante para la investigación de estos mecanismos, dado que el MRS presenta más similitud con eucariotes que con *E. coli* y además se ha demostrado que los eventos de recombinación son los principales responsables de la diversificación fenotípica y genotípica en esta bacteria. Por lo tanto, con el propósito de estudiar la recombinación de ADN *in vivo* se construyó un sistema plasmídico para medir la tasa de recombinación homóloga y homeóloga (5% de divergencia) en bacterias Gram-negativas. De esta manera, se llevaron a cabo mediciones en distintas cepas mutantes y especies bacterianas como *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permitieron corroborar la participación de las proteínas MutS, MutL y UvrD de *P. aeruginosa* en la inhibición de la recombinación homeóloga. Además, se determinó que tanto la versión tetramérica como dimérica de MutS de *P. aeruginosa* son eficientes para inhibir la recombinación homeóloga *in vivo*. Por otro lado, se determinó que en *P. aeruginosa* el 50% de los eventos de recombinación homeóloga ocurren por un mecanismo dependiente de RecA y el otro 50% de manera independiente de RecA. Estas diferencias no se observaron en la bacteria *E. coli*,

en la cual el 95% de los eventos de recombinación homeóloga ocurren por un mecanismo dependiente de RecA. Por lo tanto, estos resultados plantean diferencias entre ambas especies bacterianas con respecto a los mecanismos involucrados en la recombinación homeóloga y sugieren que los mecanismos independientes de RecA tendrían un importante rol en *P. aeruginosa*. Nuestra hipótesis es que estos eventos independientes de RecA se llevan a cabo por el mecanismo de “*apareamiento de simple hebra (SSA)*”, el cual ha sido previamente caracterizado en eucariotas y bacteriófagos. Sin embargo, se desconocen actualmente cuales serían las proteínas de *P. aeruginosa* involucradas en este proceso.

El desarrollo de este trabajo de Tesis dio como resultado la elaboración de los siguientes artículos:

Borgogno, M.V., Monti, M.R., Zhao, W., Sung, P., Argaraña, C.E., Pezza, R.J. 2016. “*Tolerance of DNA Mismatches in Dmc1 Recombinase-mediated DNA Strand Exchange*”. *The Journal of Biological Chemistry* 291: 4928-4938.

Monti, M.R., Miguel, V., **Borgogno, M.V., Argarana, C.E. 2012.** “*Functional analysis of the interaction between the mismatch repair protein MutS and the replication processivity factor beta clamp in Pseudomonas aeruginosa*”. *DNA Repair* 11: 463-469.

INTRODUCCIÓN

La función principal de la molécula de ADN (ácido desoxirribonucleico) es el almacenamiento de la información genética para dirigir la síntesis de otros componentes celulares como las moléculas de ARN y proteínas. Los segmentos de ADN que llevan esta información genética son llamados genes, y existen además otras secuencias de ADN que tienen propósitos estructurales o participan en la regulación del uso de esta información genética. El “metabolismo del ADN” es importante para la supervivencia celular y describe el proceso mediante el cual se hacen copias fieles de las moléculas de ADN (**replicación**) junto con los procesos que afectan a la estructura de la información contenida (**mutación, reparación y recombinación**).

En este trabajo estudiamos la recombinación genética entre secuencias homólogas o parcialmente homólogas (homeólogas) y su regulación por recombinasas de la familia RecA y por el Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente. Por este motivo, la introducción describe de forma general las clases de recombinación genética y luego nos centramos en la recombinación general u homóloga. Para este tipo de recombinación se describe el mecanismo general en la bacteria *Escherichia coli*, las proteínas involucradas en cada etapa del proceso y luego se confiere un énfasis especial a la etapa de “intercambio de cadenas de ADN” catalizado por las recombinasas de la familia RecA. Para entender el mecanismo molecular de este intercambio se aportan datos estructurales y bioquímicos de las recombinasas provenientes de *Escherichia coli* y eucariotas. Finalmente, se describen las enzimas y mecanismos involucrados en la regulación de la recombinación homeóloga y nuestro modelo biológico de estudio para los análisis de recombinación *in vivo*, la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

1- RECOMBINACIÓN GENÉTICA

La interacción e intercambio de información entre secuencias de ADN durante la recombinación genética es un proceso universal en todos los organismos y juega un papel fundamental en el mantenimiento del genoma.

La **recombinación genética** se puede definir como un proceso biológico en el que tiene lugar la formación de una nueva molécula de ADN a partir de moléculas distintas, de manera que la información genética procedente de cada molécula de ADN original estará presente en las nuevas. Dicho proceso constituye fuente de variabilidad genética e intercambio físico de segmentos y tiene valor regulatorio ya que puede tener como resultado activación o inactivación de genes y proporciona además una vía de reparación del ADN. Entender el fenómeno de recombinación genética a nivel molecular en los diversos

organismos, desde bacterias hasta humanos, es de suma importancia para conocer el impacto que ha tenido en la evolución, función y estructura de sus genomas [1, 2].

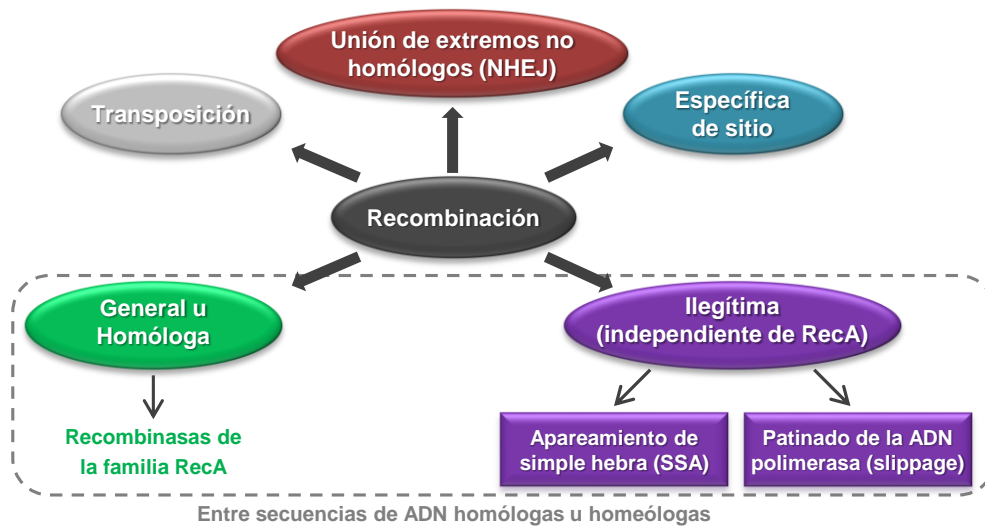


Figura 11. Clases de recombinación genética en células procariotas y eucariotas.

La recombinación se puede clasificar en cinco grandes clases (**Figura 11**):

Recombinación general u homóloga. Consiste en el apareamiento e intercambio de material genético entre moléculas de ADN que comparten una región de secuencia homóloga o parcialmente homóloga (homeóloga) [3-5]. Dichos eventos pueden ocurrir entre secuencias homólogas de gran tamaño que pueden estar cercanas o muy distantes en el cromosoma y depende de un gran número de factores proteicos entre los cuales RecA cumple un rol central ya que es la proteína encargada de llevar a cabo la búsqueda de homología y el intercambio entre hebras de ADN [6-11]. El mecanismo molecular de la recombinación homóloga será descrito en detalle más adelante.

Recombinación ilegítima. Al igual que la recombinación homóloga, involucra moléculas o segmentos de ADN que comparten una región homóloga u homeóloga. Sin embargo, la recombinación ilegítima se efectúa de forma independiente de RecA e involucra secuencias repetitivas de menor tamaño y muy próximas entre sí [12]. Puede ocurrir por diferentes mecanismos, entre los cuales se destacan el *patinado de la ADN polimerasa (slippage)* y el *apareamiento de simple hebra (Single Strand Annealing, SSA)* [12-15]. El *patinado de la ADN polimerasa* es común cuando se detiene la replicación, lo cual puede llevar a la disociación de la hebra recientemente sintetizada de su hebra molde y la unión por complementariedad con otra secuencia repetitiva próxima. De esta manera, luego de la replicación, estos eventos pueden dar lugar a la restauración de la secuencia original, o a la conversión, eliminación o duplicación de una copia de las secuencias repetitivas [16, 17].

Por otro lado, el *apareamiento de simple hebra (SSA)* ocurre durante la reparación de rupturas de ADN doble cadena (DSBs, Double Strand Breaks) que se producen entre dos secuencias repetitivas en la misma molécula de ADN. Luego de la ruptura se lleva a cabo la degradación de los extremos romos por acción de exonucleasas, lo cual genera regiones de ADN simple cadena (ADNsc) que se hibridan entre sí por complementariedad de bases. Finalmente, el ligado de dichas moléculas lleva a la eliminación (comúnmente llamada “deleción”) de una de las secuencias repetitivas [18, 19]. Estos eventos de recombinación ilegítima son muy comunes debido a la abundancia de secuencias repetitivas de diferentes clases y tamaños en genomas procariotas y eucariotas [15].

Recombinación no-homóloga. La unión de los extremos no-homólogos (non-homologous end joining o NHEJ) es una de las principales vías de reparación de DSBs en procariotas y eucariotas [20, 21]. Estudios realizados en células humanas en mitosis determinaron que el mecanismo de NHEJ es más frecuente que el de recombinación homóloga y altamente dependiente de la posición cromosomal [22]. Este mecanismo repara los DSBs a través del ligado directo de los extremos previo una degradación limitada de los mismos lo cual conduce a un proceso mutagénico. Dicho proceso involucra enzimas especializadas como nucleasas, polimerasas y ligasas [21].

Recombinación específica de sitio. Proceso de recombinación especializada en el cual el intercambio recíproco de material genético ocurre en una determinada posición. Las secuencias que recombinan sólo comparten una pequeña región homóloga (10 a 50 pares de bases). Depende de enzimas específicas (serina-recombinasas o tirosina-recombinasas) capaces de reconocer dichas secuencias y catalizar el corte, intercambio entre hebras de ADN y la re-unión de las mismas para dar origen a los productos recombinantes. Este tipo de recombinación conduce generalmente a un reordenamiento de la información génica, el cual involucra la integración, escisión o inversión del ADN que recombina [23]. El ejemplo más conocido, aunque no el único, es la integración del ADN del fago lambda en el cromosoma de *E. coli* [24].

Transposición. Es un mecanismo especial de recombinación que implica el movimiento de un segmento corto de ADN que “salta” de un lugar a otro del mismo o diferente cromosoma. Dicho segmento se llama *transposón* o *elemento genético transponible* y, generalmente, no presenta ninguna homología de secuencia con el ADN en el cual se integra. La proteína que lleva a cabo la transposición es la *transposasa*, la cual reconoce secuencias repetidas e invertidas localizadas en los extremos del transposón que son utilizadas como señales para el inicio de la recombinación [25, 26].

2-RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

2.1- Relevancia Biológica

La recombinación homóloga es un proceso esencial en el metabolismo celular de todos los organismos que permite la reorganización de genes dentro y entre cromosomas, provee una de las mayores vías de reparación de rupturas de ADN doble cadena (DSBs) y asegura la segregación correcta de los cromosomas en la meiosis eucariota. De esta manera, dicho proceso es una potente fuerza evolutiva que promueve la diversidad genética y mantiene la integridad del genoma [1, 3].

En eucariotas, la recombinación homóloga juega un papel muy importante en la división celular mitótica y meiótica. Estudios llevados a cabo en distintas especies eucariotas en los últimos años han demostrado que la recombinación homóloga se inicia por la aparición de una rotura bi-catenarias (de las dos cadenas de una doble hélice). Dichas lesiones, llamadas DSBs (*Double-Strand Breaks* en inglés), se generan con cierta frecuencia en el ADN celular en respuesta a diversas causas.

En la mitosis, los DSBs se producen por daños químicos o radiación ionizante. Cuando estos daños en el ADN no son reparados, pueden ocurrir reordenamientos cromosomales y predisposición al cáncer [27]. Por otro lado, en la meiosis los DSBs se producen durante la profase I y son generados por la proteína Spo11, la cual cliva a los cromosomas homólogos en diversos sitios [28, 29]. La meiosis es una forma especializada de división celular durante la cual se producen dos células haploides (gametos) a partir de una diploide, reduciendo de esta manera el contenido cromosomal. La apropiada segregación de cromosomas homólogos en la primera división meiótica depende de la formación de conexiones físicas específicas entre pares de cromosomas homólogos, conocida como “quiasma”. Dichas estructuras se originan durante la profase I de la meiosis y son la manifestación física de los entrecruzamientos genéticos [30, 31]. Si se producen errores durante la segregación de los cromosomas, la formación de gametos aneuploides (número incorrecto de cromosomas por célula) puede llevar a abortos espontáneos o enfermedades genéticas tales como síndrome de Down, Klinefelter, Edwards o síndrome de Turner en humanos [32, 33]. De esta manera, la recombinación homóloga permite la apropiada segregación de los cromosomas durante la meiosis y contribuye a la diversidad genética creando nuevas combinaciones que otorgan una ventaja evolutiva a la descendencia.

En bacterias, la recombinación homóloga está involucrada en mecanismos de transferencia horizontal de la información génica [1, 34] así como también en algunos

mecanismos de regulación de la expresión génica y procesos de defensa bacteriana generando variabilidad genética y favoreciendo la capacidad de adaptación en bacterias tales como la ocupación a diversos hábitats y resistencia a antibióticos [35]. Además, está implicada en la reparación del ADN principalmente cuando se producen rupturas de la doble cadena (DSBs) por la detención de la maquinaria de replicación [36-39] o daños exógenos. Este proceso puede ocurrir entre secuencias repetitivas del genoma bacteriano [15], en presencia de elementos extracromosomales (virus, plásmidos o secuencias de ADN) que ingresan a las células mediante transferencia horizontal (conjugación, transducción o transformación) o entre secuencias de cromosomas duplicados previo a la división celular.

2.2- Primeros modelos de recombinación homóloga

El estudio de la recombinación homóloga ha planteado dos desafíos significativos a los biólogos moleculares, ninguno de los cuales ha sido resuelto completamente. El primero ha consistido en describir la serie de interacciones, que implican rotura y re-unión de las cadenas de ADN, que se llevan a cabo durante la recombinación. El segundo, se relaciona con la identificación y caracterización del alto número de factores proteicos que intervienen y regulan este proceso.

En las décadas de 1960 y 1970, Robin Holliday y Matthew Meselson postularon diversos modelos que mostraban como la rotura y reunión de moléculas de ADN podían permitir el intercambio de segmentos cromosómicos [2, 40, 41]. Así, los modelos de **Holliday** y de **Meselson-Radding** (**Figura I2**) describen la recombinación entre dos moléculas bicatenarias con secuencias idénticas o casi idénticas. Su característica fundamental es la formación de un heterodúplex por intercambio de segmentos de ADN entre dos moléculas homólogas. Al principio, el heteroduplex es estabilizado por apareamiento de bases entre cada cadena transferida y los polinucleótidos intactos de las moléculas receptoras y luego la ADN ligasa sella los terminales libres, lo que crea una **estructura de Holliday**. Esta estructura es dinámica; la migración de ramas da por resultado un intercambio de segmentos más largos de ADN si las dos hélices rotan en la misma dirección. Finalmente, la separación, o resolución, de la estructura de Holliday para volver a formar dos moléculas bicatenarias individuales se produce por escisión a través del punto de ramificación y unión. Ésta es la clave de todo el proceso, ya que el corte se puede efectuar en una u otra de dos orientaciones de la estructura de Holliday. Estos dos cortes dan a lugar a resultados muy diferentes. Si el corte se practica de izquierda a derecha (horizontal), como ilustra la **Figura I2**, hay transferencia entre las dos moléculas de un segmento corto pero no ocurre el entrecruzamiento o intercambio de genes. Por otro lado, un corte de arriba-abajo (vertical) determina un intercambio recíproco de cadenas, de modo

que el extremo de una molécula es intercambiado por el extremo de la otra molécula, llevándose a cabo el “entrecruzamiento”.

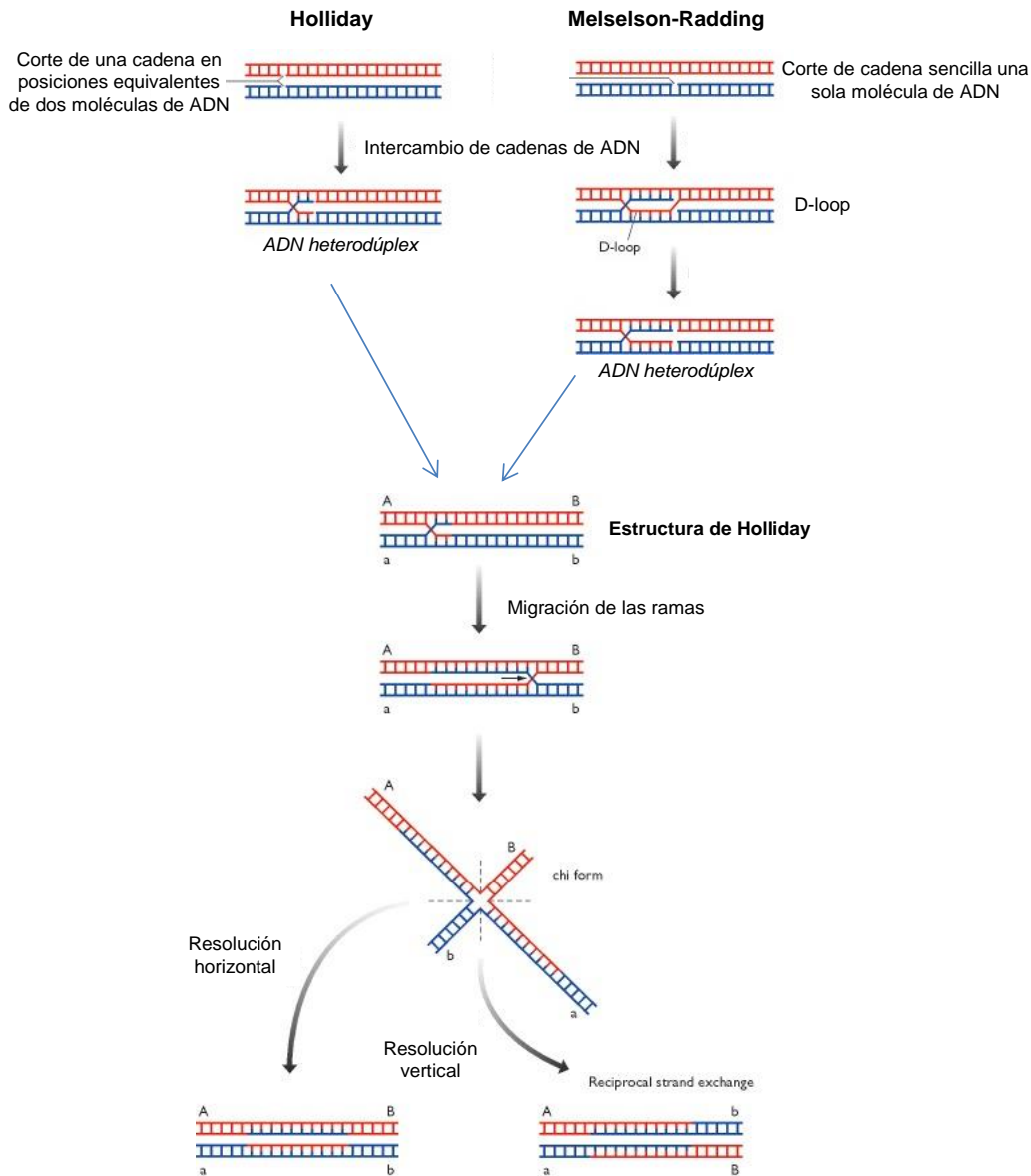


Figura I2. Primeros modelos para describir la recombinación homóloga entre dos moléculas que comparten una secuencia idéntica o casi idéntica. Se muestran las etapas del modelo de Holliday y Mieselson-Radding. (Por detalles ver el texto).

Los modelos difieren en el inicio del proceso de intercambio. El **modelo de Holliday** comienza con cortes de cadena sencilla en moléculas de ADN homólogas que se alinean entre sí. Esta característica del modelo fue criticada ya que no era posible proponer un mecanismo que garantizara que los cortes aparecieran precisamente en la misma posición de cada molécula. La modificación de **Mieselson-Radding** postula un esquema más satisfactorio en el cual se produce la ruptura de simple hebra en una de las moléculas de ADN. Así, el extremo libre generado “invade” la doble hélice intacta de la otra molécula en la

posición homóloga y desplaza una de las cadenas formando el bucle D (D-loop, displacement loop) Posteriormente, el corte de la cadena desplazada y apareamiento de pares produce el heterodúplex que luego dará origen a la estructura de Holliday [42] (ver **Figura I2**).

2.3- Mecanismo molecular de recombinación homóloga en *Escherichia coli*.

El mecanismo de recombinación homóloga ha sido ampliamente estudiado en *E. coli* y se han caracterizado una gran cantidad de proteínas y complejos proteicos involucrados en las tres etapas principales del proceso: *presinapsis*, *sinapsis* y *postsinapsis* [3, 8, 9, 43-46]. En la *presinapsis* ocurre la ruptura de la doble o simple hebra de ADN (DSBs o gaps), las cuales son procesadas por enzimas específicas para generar ADN simple cadena (ADNsc); luego ocurre la *sinapsis*, etapa en la que se intercambia el material genético entre las moléculas de ADN (ADNsc y dúplex de ADN homólogo), catalizado por **recombinasas de la familia RecA**. En esta etapa se forma el intermediario de recombinación que finalmente es resuelto durante la *postsinapsis* para dar origen a las moléculas finales.

En la **Tabla I1** se muestran los factores proteicos de *E. coli* y humanos involucrados en cada etapa de la recombinación homóloga y la función principal de cada uno de ellos (Kowalczykowski S.T., comunicación personal):

	<i>E. coli</i>	Humanos	Función principal
<i>Pre-sinapsis</i>	RecBCD	--	Procesamiento del ADN para generar ADNsc
	SbcCD	Mre11/Rad50/Nbs1	
	RecQ	RecQ1/4/5/BLM/WRN	
	RecJ	ExoI	
	UvrD	--	
	SSB	RPA	
	RecF(R)	Rad51B/C/D/Xrcc2/3	
	RecO	Rad52	
<i>Sinapsis</i>	RecA	Rad51, Dmc1	Recombinasas: apareamiento e intercambio entre cadenas de ADN
<i>Post-sinapsis</i>	RuvAB	Rad54	Extensión del ADN heteroduplex
	RecG	--	
	RecQ	RecQ1/4/5/BLM/WRN	Migración de rama
	RecJ	ExoI	Resolución del intermediario de recombinación
	RuvC	Mus81/Mms4/?	

En *E. coli* existen dos vías principales de la recombinación homóloga, la **vía RecBCD**, la cual repara principalmente rupturas de ADN doble cadena (DSBs), y la **vía RecFOR**, que repara lesiones que se producen en una sola hebra del ADN la cual da origen a una región interna de ADN simple cadena (ADNsc) en el dúplex, comúnmente llamado “gap” (Figura I3) [3, 43]. Ambas vías necesitan a la recombinasa RecA para el reconocimiento de homología y el intercambio entre cadenas de ADN; a la proteína de unión al ADN simple hebra (SSB, Single Strand Binding protein) y al complejo proteico RuvABC y RecG que resuelven las estructuras de Holliday.

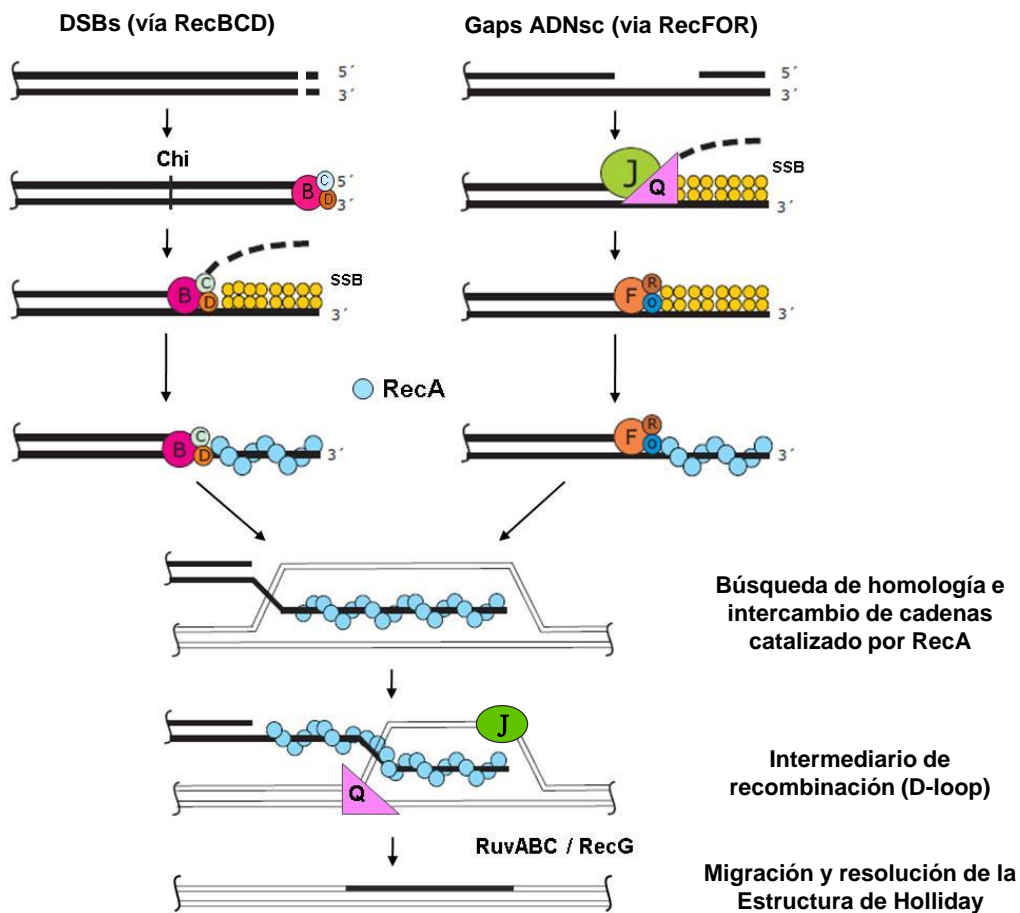


Figura I3. Mecanismo molecular de recombinación homóloga en *E. coli*, a través de la **vía RecBCD** (reparación de rupturas de ADN doble cadena: DSBs), o de la **vía RecFOR** (reparación de gaps ADNsc).

- Pre-sinapsis en la vía RecBCD

En la vía RecBCD, el complejo enzimático RecBCD se une a los extremos romos del ADN doble cadena (ADNdc) luego de la ruptura del mismo, desenrolla el dúplex y degrada una de las hebras hasta encontrar un sitio Chi (secuencia de ADN específica) de tal manera de generar ADN simple hebra y permitir la unión de RecA a dicho ADN (extremo 3' libre) (Figura I3) [43, 45, 47].

La enzima RecBCD (exonucleasa V) (330 kDa) es un complejo multifuncional compuesto por las subunidades RecB, RecC y RecD. Por un lado, la subunidad RecB tiene actividad nucleasa y helicasa en dirección 3'-5' mientras que RecD tiene actividad helicasa en dirección 5'-3'. Así, ambas helicatas tienen polaridades opuestas y viajan en la misma dirección de ambas cadenas del dúplex [48]. Por otro lado, la subunidad RecC es responsable de que el complejo reconozca en el ADN la secuencia Chi: 5'-GCTGGTGG-3' (Crossover hotspot instigator)[49]. De esta manera, una vez que se encuentra el sitio Chi, se produce el clivaje final del ADN a pocas pares de bases del mismo y RecC se une al extremo 3' libre evitando su degradación, mientras que el extremo 5' libre queda expuesto a nucleasas y es generalmente degradado. Finalmente, RecBCD facilita la unión de RecA al extremo ADNsc 3' libre para que se inicie el apareamiento homólogo y el intercambio de cadenas [47].

- Pre-sinapsis en la vía RecFOR

La vía RecFOR está constituida por las proteínas RecF, RecO, RecR, RecJ, RecQ y RecN. En condiciones normales, esta vía procesa los "gaps" de ADN simple hebra para generar extremos 3' libres y permitir de esta manera la unión de RecA al ADN. Se ha propuesto que dichos gaps se originan cuando la ADN polimerasa encuentra lesiones en la horquilla de replicación y se disocia del templado para reiniciar la replicación aguas abajo de esa región [39, 50]. Así, una vez que se generan estos gaps la actividad conjunta de la helicasa RecQ y la exonucleasa RecJ genera el sustrato ADNsc con el extremo 3' libre. Posteriormente, las proteínas RecF, RecO y RecR interactúan con RecA y facilitan la formación del filamento RecA-ADNsc (**Figura I3**) [44, 51]. A su vez, estas proteínas están involucradas en el desarmado de dicho filamento y la disociación de RecA del ADNsc una vez que lleva a cabo el intercambio de cadenas [52].

La proteína RecF de *E. coli* (40.5 kDa) se une al ADNdc y ADNsc *in vitro*, y tiene actividad ATPasa dependiente de ADNdc *in vivo* [53-55]. Además, RecF interactúa con RecR (22 kDa), la cual a su vez interactúa con RecO (26 kDa). Así, el complejo RecFOR cataliza el reemplazo de las proteínas SSB por RecA para la formación de un filamento estable RecA-ADNsc.

La proteína RecQ tiene actividad helicasa en dirección 3'-5' y es dependiente de ATP mientras que RecJ (60 kDa) tiene actividad exonucleasa en dirección 5'-3' [51]. Se ha demostrado que ambas proteínas procesan horquillas de replicación que se encuentran detenidas, evitando así eventos de recombinación innecesarios [56]. Adicionalmente, RecJ y RecQ son fundamentales para procesar rupturas de ADN doble cadena cuando la vía RecBCD se encuentra inactiva [57].

- Regulación en la formación del filamento RecA-ADNsc

Aunque las vías de recombinación son diferentes en fases iniciales, ambas generan ADNsc con extremos libres para que RecA pueda unirse, formar el filamento y llevar a cabo la búsqueda de homología y posterior intercambio de cadenas de ADN. El mecanismo molecular detallado de dichos procesos será explicado más adelante.

Además de los complejos RecBCD, RecFOR y las proteínas RecJ y RecQ, existen muchas otras proteínas que controlan y regulan la formación del filamento RecA-ADNsc en *E. coli*. Una de las más importantes es la proteína de unión a simple hebra, SSB que se une al ADNsc evitando su degradación y compite con RecA inhibiendo la formación del filamento [58]. Sin embargo, dicha inhibición es superada por la acción de los complejos proteicos RecBCD y RecFOR, que facilitan la unión de RecA al ADN [59, 60]. Por otro lado, se ha determinado que la proteína SSB se une al ADN y elimina las estructuras secundarias del mismo lo cual permite la posterior unión de RecA [61]. Por lo tanto, las proteínas SSB son esenciales para el metabolismo del ADN en todos los organismos.

Adicionalmente, el ensamble y desensamble del filamento RecA-ADNsc es regulado por la interacción de RecA con otras proteínas, tales como: la proteína DinI, que estabiliza el filamento [62]; la proteína RecX, la cual bloquea la extensión del filamento [63]; RecF, que antagoniza con la función inhibitoria de RecX [64]; y finalmente la helicasa UvrD que causa disrupción del filamento [46, 65].

- Etapas de post-sinapsis en las vías RecBCD y RecFOR

Una vez que se lleva a cabo el intercambio entre cadenas homólogas catalizada por RecA, se originan intermediarios de recombinación de tres hebras (D-loop) que dan origen a las estructuras de Holliday. Finalmente ocurre la migración de la rama y la resolución de dichas estructuras para obtener los productos recombinantes finales. En estas etapas están involucrados principalmente el complejo proteico RuvABC y la proteína RecG (**Figura I3**).

La migración de las ramas es catalizada por las proteínas RuvA (22 kDa) y RuvB (37 kDa), que se unen al punto de ramificación de la unión de Holliday. Estudios por cristalografía sugieren que RuvA se une como tetrámero a la rama y forma un núcleo al que se unen dos anillos de la helicasa RuvB (cada uno compuesto por seis proteínas), uno a cada lado [66, 67]. La estructura resultante podría actuar como un “motor molecular” que rota las hélices de la manera requerida para que el punto de ramificación se mueva [68]. Cuando ha finalizado la migración de las ramas, el complejo RuvAB es reemplazado por la resolvasa RuvC (19kDa) que se une como dímero y lleva a cabo la escisión en dos hebras del ADN en un sitio específico, resolviendo las estructuras de Holliday [69]. Las cepas mutantes de *E. coli* que carecen de RuvA o RuvB pueden, de todos modos, llevar a cabo la recombinación

homóloga, ya que una helicasa llamada RecG [70] puede suplir la función de RuvAB. Sin embargo, la actividad de RecG es mucho más débil en comparación al complejo RuvAB. Estudios bioquímicos de RecG determinaron que dicha proteína es activa como monómero [71] y que cataliza la conversión de las uniones de Holliday y de las horquillas de replicación facilitando la conexión entre recombinación, replicación y reparación del ADN [71-73].

Recientemente, se ha determinado que las proteínas RecJ y RecQ además de estar involucradas en estadios iniciales de la recombinación homóloga, en la vía RecFOR, también participan en estadios finales [74]. Particularmente, la exonucleasa RecJ estabiliza el intermediario de recombinación (D-loop triple hebra) degradando el ADN_{sc} que es desplazado luego del intercambio de cadenas [75]. Por otro lado, la helicasa RecQ estaría involucrada en la disrupción de dichos intermediarios a través del desenrollamiento del ADN en dirección 3'-5' lo cual estimula la formación de la estructura de Holliday [74].

2.4- Intercambio de cadenas catalizado por recombinasas de la familia RecA.

Como se ha mencionado, la etapa central del proceso de recombinación homóloga es el intercambio entre moléculas de ADN con secuencias homólogas o parcialmente homólogas. Las recombinasas de la familia RecA son responsables de la búsqueda de homología y el intercambio entre cadenas de ADN en el proceso de recombinación homóloga en procariontes y eucariotes. En bacterias, la recombinasa típica se denomina RecA, mientras que en eucariotes han sido descritas dos recombinasas homólogas: Rad51, que repara DSBs en células mitóticas y meióticas y Dmc1, involucrada en el intercambio de material genético durante la meiosis [5, 76-78]. En todos los organismos el proceso de intercambio de cadenas comienza con la formación de un complejo núcleo-proteico que se forma por el ensamblado de la recombinasa a lo largo del sustrato de ADN_{sc}, que se denomina filamento pre-sináptico. A continuación, se produce la búsqueda de homología, donde el filamento pre-sináptico RecA-ADN_{sc} se alinea con el ADN_{dc} formando un intermediario sináptico de tres hebras. Por último, la recombinasa cataliza el intercambio de cadenas donde el ADN_{sc} desplaza a una de las hebras del ADN_{dc} para formar un nuevo dúplex de ADN (**Figura I4**).

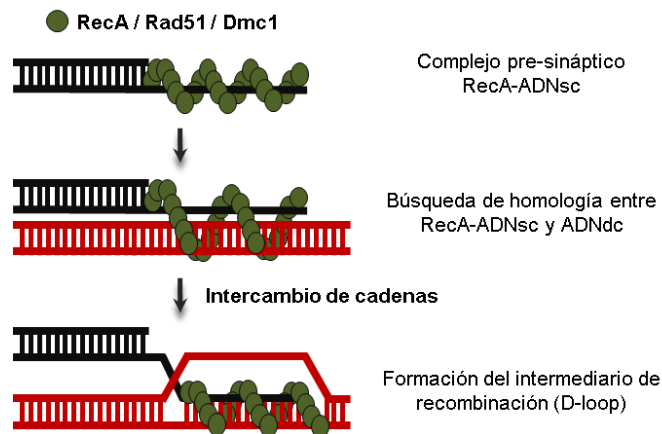


Figura I4. Mecanismo general del intercambio de cadenas de ADN catalizado por recombinasas de la familia RecA, en procariontes y eucariotes (sinapsis). ADNsc: ADN simple cadena; ADNdc: ADN doble cadena.

- RecA de *E. coli* y su interacción con ADN

RecA de *E. coli* es la recombinasa mejor caracterizada, a nivel estructural y bioquímico, y ha sido recientemente cristalizada con ADNsc y ADNdc [9]. Los estudios cristalográficos han contribuido con gran cantidad de información en relación a los mecanismos moleculares específicos tales como el reconocimiento de la homología y el intercambio entre hebras de ADN.

RecA es una proteína oligomérica (352 residuos, PM = 37842 Daltons) con actividad ATPasa dependiente de ADN que puede unirse al ADNsc y ADNdc a través de dos sitios de unión (sitio I y II). Cada monómero consiste en un dominio ATPasa central de 240 residuos, y dos dominios pequeños en los extremos N-terminal (30 residuos) y C-terminal (82 residuos) (**Figura I5-A**). El dominio central es común a otros tipos de proteínas tales como F1 ATPasa, múltiples helicasas y proteínas que transportan el ADN [8, 9].

- Estructura del filamento pre-sináptico RecA-ADNsc

La estructura cristalina del filamento RecA-ADNsc se muestra en la **Figura I5-B**. La estequiometría del complejo corresponde a una molécula de RecA cada 3 nucleótidos (nt), comúnmente llamado triplete. RecA se une al ADNsc formando un filamento helicoidal que involucra aproximadamente 6 proteínas y 18.5 nt por vuelta [9, 79]. Como resultado de la interacción con la proteína, el ADNsc adopta la conformación de ADN-B, que se refiere a la estructura secundaria de la doble hélice del ADN propuesta por Watson y Crick, y es la forma predominante en las células. La estructura cristalina del complejo muestra que el ADNsc se une a RecA a través de algunas regiones de los loops L1 y L2 y de una porción del dominio N-terminal de dicha proteína.

Los loops L1 (residuos 157-164) y L2 (residuos ~ 194-206) están ubicados en el dominio central y albergan los residuos involucrados en el sitio I de unión al ADN. Estos loops se encuentran desordenados y flexibles cuando RecA no está unida al ADN, sin

embargo, cuando RecA se une al ADN y se forma el filamento pre-sináptico, los loops se vuelven ordenados y estables, lo cual ha permitido su cristalización y visualización [9]. El dominio N-terminal está involucrado en las interacciones monómero-monómero, importantes para la polimerización de RecA en el ADNsc, contribuyendo al área de interfase entre dichos monómeros. En este sentido, el ATP se encuentra unido a las interfases entre monómeros de RecA cuando la proteína es parte del filamento pre-sináptico (“estado activo”) y es expuesto a la superficie de RecA [8, 80]. Así, la interfase monómero/monómero tiene un rol importante en el reconocimiento de la homología y el intercambio de cadenas [81]. Con respecto al dominio C-terminal, se ha postulado que estos dominios facilitan el acceso del ADNdc al filamento pre-sináptico [82].

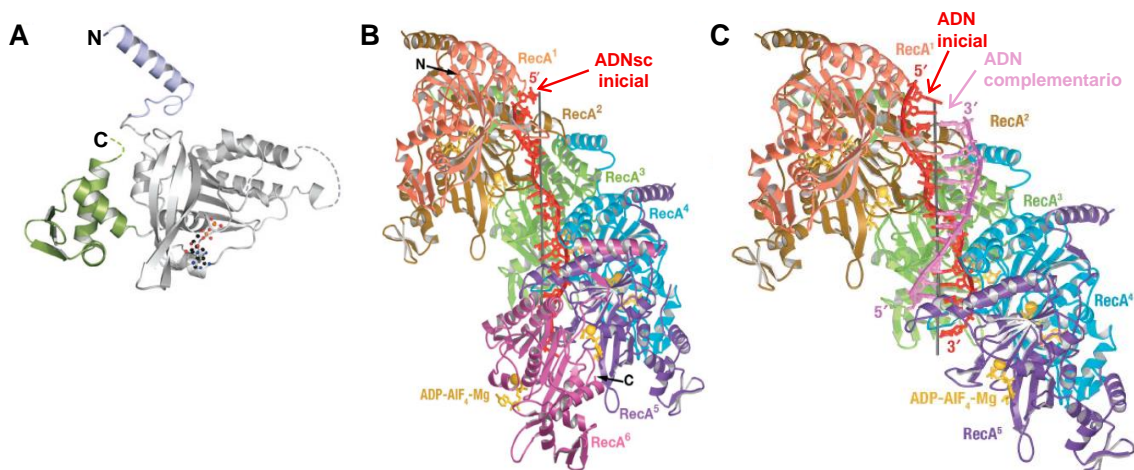


Figura 15. (A) Estructura del monómero de RecA. Se muestra el dominio central (en gris) y los dominios N-terminal (en lila) y C-terminal (en verde) (Cox MM et al. 2007). (B) Estructura cristalina complejo pre-sináptico RecA-ADNsc. (C) Estructura cristalina complejo post-sináptico RecA-ADNdc (Chen et al. 2008). En (B) y (C) cada monómero de RecA se indica en diferentes colores (); en amarillo se indica el ADP-AIF₄-Mg (nucleótido no hidrolizable análogo al ATP) unido a las interfases entre monómeros de RecA; el ADNsc inicial se indica en rojo y el ADN complementario se indica en lila.

- Los sitios de unión al ADN

La proteína RecA tiene dos sitios de unión al ADN: un sitio primario, denominado “sitio I” y otro secundario denominado “sitio II” [83]. Cualquiera de estos sitios puede ser ocupado por una molécula de ADNsc o ADNdc [83, 84] y ambos sitios tienen residuos con cargas positivas lo cual posibilita la interacción de RecA con los fosfatos negativos del ADN.

La estructura cristalina del complejo RecA-ADNsc reveló que el sitio I involucra principalmente 6 residuos (Arg169, Arg176, Arg196, Lys 198 y Lys216) que se ubican en el dominio central de la proteína RecA. A su vez, el análisis de dicha estructura cristalina, junto con la estructura de RecA-ADNdc, sugieren que 4 residuos (Arg226, Arg227, Arg243 y Lys245) ubicados entre el dominio central y C-terminal de RecA participan del sitio II de unión al ADN [9].

- *Estructura del filamento post-sináptico RecA-ADNdc*

La estructura cristalina del complejo RecA-ADNdc, correspondiente al filamento post-sináptico obtenido una vez que ocurre el intercambio de cadenas [9], reveló que el ADNdc se encuentra unido a RecA a través del sitio I mientras que los residuos del sitio II se encuentran libres. En la **Figura I5** se pueden observar tanto el complejo pre-sináptico (**I5-A**) como el complejo post-sináptico (**I5-B**), los cuales presentan parámetros similares ya que tanto el ADNsc como el ADNdc de cada filamento adoptan la estructura ADN-B.

En el complejo RecA-ADNdc la unidad de repetición es un triplete de pares de bases (pb) apiladas. En este complejo, el ADNdc está compuesto por la hebra primaria, que inicialmente formaba parte del complejo RecA-ADNsc, y la hebra complementaria, la cual formaba parte del ADNdc inicial. El esqueleto de fosfodiéster de la hebra primaria tiene una conformación y contactos con RecA similares a los observados en el estado pre-sináptico. Sin embargo, las conformaciones de las ribosas y las bases de cada nucleótido cambian y se vuelven más uniformes en todo el triplete. Estos cambios le permiten una geometría óptima para la interacción con las bases de la cadena complementaria, que se mantiene en su lugar debido a los enlaces puente hidrógeno de Watson y Crick pero hacen muy poco contacto con RecA.

- *Actividad ATPasa*

Como se ha mencionado, RecA es una ATPasa que sólo hidroliza ATP en presencia de ADN ($k_{\text{cat}} = 30 \text{ min}^{-1}$ para ADNsc; $k_{\text{cat}} = 16\text{-}20 \text{ min}^{-1}$ para ADNdc; $K_m \sim 50 \mu\text{M}$) [85]. Esta recombinasa es capaz de hidrolizar una gran cantidad de nucleótidos (rNTPs y dNTPs), pero sólo ATP, dATP y PTP pueden ser utilizados como cofactores durante las reacciones de intercambio de cadena [86, 87]. Además, la hidrólisis ocurre uniformemente durante la formación del filamento pre-sináptico [7, 61].

Cuando RecA se une al ATP u otro análogo (por ej. ATP no hidrolizable), ocurren cambios conformacionales en la proteína, la cual aumenta su afinidad por el ADN favoreciendo la formación del filamento pre-sináptico. Por lo tanto, RecA se encuentra en su “estado activo” y la unión a cualquiera de estos nucleótidos es indispensable para que lleve cabo el intercambio de cadenas. Más allá de que la hidrólisis del ATP no es necesaria durante el intercambio de cadenas, cuando ocurre dicha hidrólisis la recombinasa cambia nuevamente su conformación (estado inactivo) y se disocia del ADNdc [8, 46, 88].

- **Mecanismo molecular del intercambio de cadenas**

En base a los antecedentes cristalográficos y bioquímicos expuestos previamente, se postuló un mecanismo detallado del intercambio de cadenas catalizado por RecA. Dicho mecanismo se muestra en la **Figura I6**. Tal como se puede observar, cuando RecA no está

unida al ATP (o análogos de ATP) se encuentra en su estado inactivo y tiene baja afinidad por el ADN. Al unirse al ATP, la proteína cambia su conformación y tiene alta afinidad por el ADN, principalmente por el ADNsc. De esta manera el complejo RecA-ATP se une al ADNsc a través de su sitio I y forma un filamento pre-sináptico cuyas características fueron previamente descritas (**Figura I5**). En esta etapa, RecA puede hidrolizar el ATP y disociarse del ADNsc, o bien llevar a cabo la búsqueda de homología a través de la unión del complejo pre-sináptico con ADNdc. Cuando comienza la búsqueda de homología, RecA se encuentra unida al ADNsc a través del sitio I y al ADNdc a través del sitio II. Una vez que encuentra ADN homólogo, la proteína cataliza el intercambio entre hebras, permitiendo el apareamiento de la hebra primaria (ADNsc inicial) con su hebra complementaria en el dúplex y desplazando la otra hebra. Así, el nuevo ADNdc se mantiene unido a RecA a través del sitio I y el ADNsc desplazado permanece unido a la proteína a través del sitio II. Finalmente ocurre la hidrólisis de ATP y RecA se disocia del ADN obteniéndose un nuevo dúplex. Como se muestra en el esquema, la hidrólisis del ATP sólo es necesaria para que RecA se disocie del ADN, pero no es necesaria para que ocurra el intercambio de cadenas.

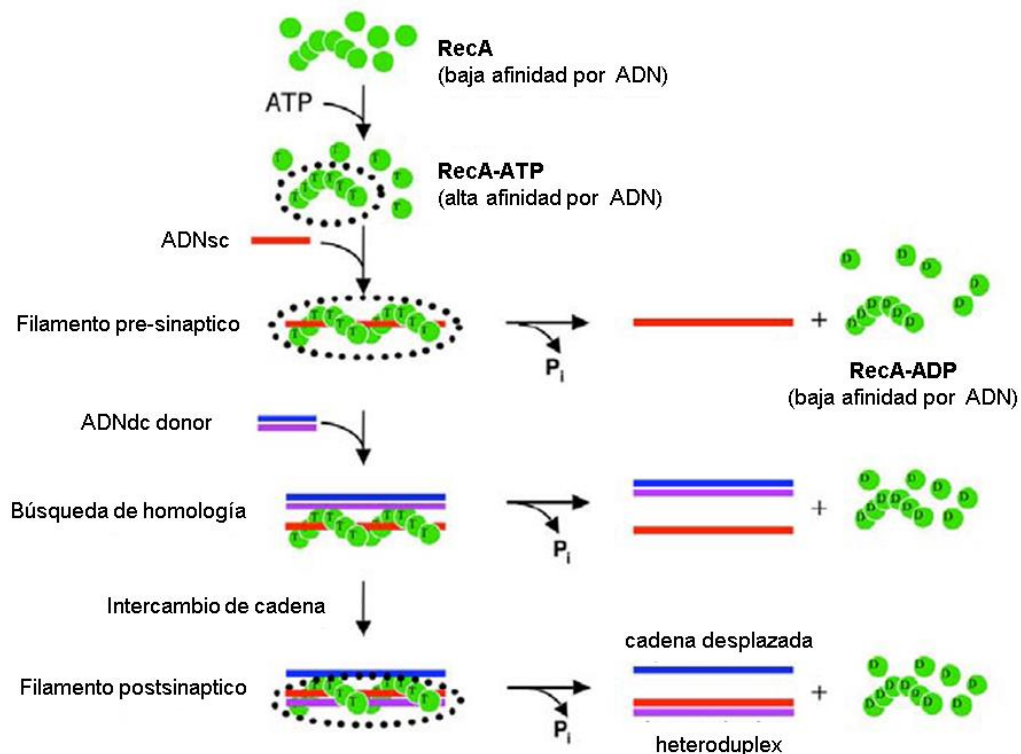


Figura I6. Mecanismo molecular del intercambio de cadenas catalizado por RecA de *E. coli*. (Modificado de Chen et al. 2008, por detalles ver texto).

En la **Figura I7** se muestra el detalle molecular del proceso de búsqueda de homología catalizada por recombinasas de la familia RecA [10]. Como se observa en el

esquema, en el filamento pre-sináptico RecA-ADNsc se une 1 monómero/3nt y el ADNsc se encuentra 50% extendido adoptando la conformación de ADN-B. Cuando RecA inicia la búsqueda de homología e interacciona con el ADNdc a través de su sitio II, induce cambios conformacionales en la doble hélice desestabilizándola y extendiéndola para permitir la interacción de una de las hebras con el ADNsc inicial. Finalmente, cuando se encuentra el ADN homólogo ocurre el apareamiento entre la cadena complementaria y el ADNsc inicial, el cual permanece unido a RecA a través del sitio I. Por otro lado, la cadena del ADNdc desplazada se mantiene unida a la recombinasa a través del sitio II, lo cual resulta en la formación de la estructura D-loop (Displacement loop, en inglés). Se ha establecido que para que dicho intermediario sea energéticamente estable, deben existir al menos unos 8 pb de homología entre las secuencias que intercambian su ADN, denominado microhomología [89].

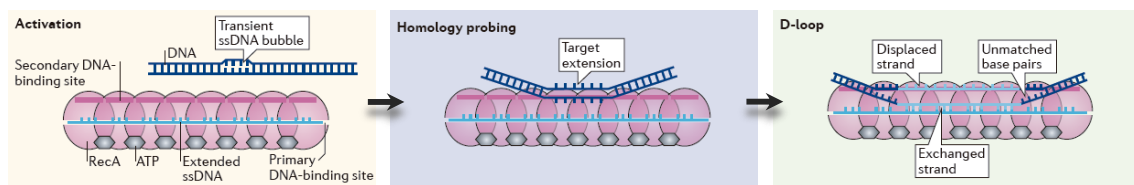


Figura I7. Detalles moleculares del proceso de búsqueda de homología catalizada por recombinasas de la familia RecA. Se muestran los monómeros de RecA, el ATP entre las interfases monómero-monómero, los sitios primarios y secundarios de unión al ADN (sitio I y II respectivamente), el ADNsc inicial (celeste) y el ADNdc (azul) (Renkawitz et al. 2014, por detalles ver texto).

- Recombinasas eucariotas

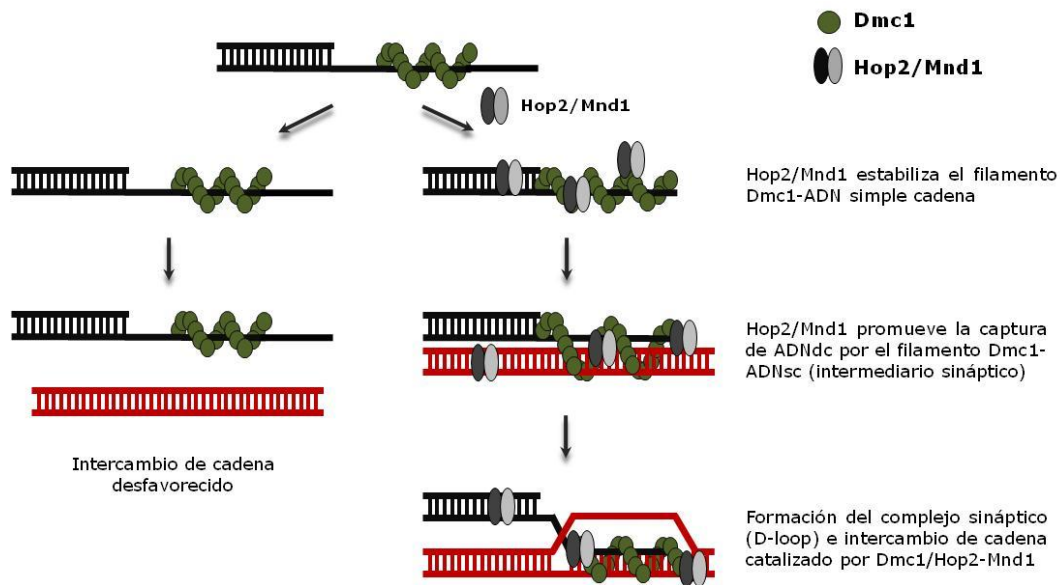
Como se ha mencionado, las células eucariotas poseen dos homólogos a RecA, las recombinasas Rad51 (36966 Da; 31.7 % de identidad y 43.2 % de similitud de aminoácidos con RecA) y Dmc1 (37707 Da; 30.1% de identidad y 40 % de similitud de aminoácidos con RecA). Ambas recombinasas actúan en conjunto durante la recombinación meiótica, ya que tienen funciones biológicas diferentes y superpuestas. Rad51 promueve la recombinación entre cromátidas hermanas, mientras que Dmc1 participa en la recombinación entre cromosomas homólogos [76, 90-93].

El análisis bioquímico y estructural de Rad51 está muy avanzado, ya que se ha obtenido la estructura cristalina del filamento pre-sináptico Rad51-ADNsc [94] y los parámetros estructurales obtenidos son similares a los resultados con RecA de *E. coli*. Con respecto a las actividades bioquímicas, las funciones *in vitro* de Rad51 también son similares a la RecA bacteriana, aunque la recombinasa eucariota presenta menor actividad

de intercambio de cadenas y actividad ATPasa más débil [76]. A su vez, se ha postulado que la direccionalidad del intercambio de cadenas catalizado por Rad51 puede extenderse en ambas direcciones (5'-3' o 3'-5'), mientras que RecA sólo lo haría en la dirección 5'-3' [95, 96].

Dado que Dmc1 fue descrita en el año 1992 [97], ha sido mucho menos estudiada que RecA y Rad51. Estudios *in vitro* han demostrado que Dmc1 es capaz de catalizar la invasión y el intercambio de cadenas entre oligonucleótidos de 83 nt de longitud [76, 98, 99]. Sin embargo, Dmc1 mostró baja actividad de intercambio de cadena en comparación a RecA y Rad51 [5, 78]. Si bien algunos estudios cuestionaron la capacidad de Dmc1 de formar el filamento núcleo-proteico [78, 100, 101], estudios recientes con Dmc1 de humanos han demostrado que dicha recombinasa cataliza el apareamiento entre secuencias homólogas y el posterior intercambio de cadenas a través de la formación de un filamento pre-sináptico helicoidal en el ADNsc y en presencia de ATP [99, 102]. Dicho filamento presenta parámetros estructurales similares a los descritos para Rad51, sin embargo se ha establecido que Dmc1 requiere la hidrólisis del ATP para llevar a cabo el intercambio de cadenas a diferencia de Rad51 y RecA que sólo necesitan la unión al nucleótido. Si bien existe poca diferencia entre las funciones bioquímicas *in vitro* de Rad51 y Dmc1, dichas recombinasas presentan funciones biológicas diferentes *in vivo* las cuales podrían deberse a la interacción con diferentes proteínas accesorias [5, 76, 78] y están siendo ampliamente estudiadas en la actualidad, como por ejemplo la interacción de Dmc1 con Hop2-Mnd1.

Estudios previos han demostrado que dos proteínas denominadas Hop2 y Mnd1 interactúan con Dmc1 como heterodímero (Hop2-Mnd1) e incrementan la eficiencia de intercambio de cadenas *in vitro* cuando se utilizan sustratos de ADN homólogos [103-105]. A su vez, este heterodímero es esencial *in vivo* para que Dmc1 pueda finalizar la recombinación homóloga [78]. Dicho efecto se debe a que Hop2-Mnd1 actúa en dos pasos críticos del proceso de intercambio. Inicialmente, estabiliza el filamento pre-sináptico Dmc1-ADNsc, y luego, facilita la condensación del ADNdc y captura del mismo para la formación del intermediario sináptico triple hebra (**Figura I8**) [105, 106].



3-RECOMBINACIÓN HOMEÓLOGA

La recombinación homóloga cumple un rol biológico importante en células eucariotas y procariotas. Dicho proceso es una potente fuerza evolutiva que promueve la diversidad genética y mantiene la integridad del genoma [3-5]. Sin embargo, cuando la recombinación ocurre entre secuencias de ADN divergentes puede producir mutaciones o reordenamientos cromosomales tales como translocaciones, deleciones o inserciones lo cual podría aportar nuevos genes y funciones. Los mecanismos de transferencia horizontal como así también el alto contenido de secuencias repetitivas en los genomas eucariotas y procariotas, entre las cuales puede existir cierto grado de divergencia [15], constituyen un riesgo para la estabilidad estructural de dichos genomas. En este sentido, se ha postulado que la recombinación homeóloga es importante en la evolución, diversificación y adaptación de las especies [107].

Por lo tanto, el proceso de recombinación homeóloga debe estar estrictamente regulado por los mecanismos celulares encargados de llevar a cabo y de revisar el proceso de recombinación. De esta manera, el censado de homología por las recombinasas actuaría como una primera barrera para evitar la recombinación entre secuencias de ADN divergentes [108] y las proteínas del Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS) proporcionarían un segundo nivel de control [109, 110].

3.1- Fidelidad de las recombinasas

Como ya se ha mencionado, las recombinasas de la familia RecA llevan a cabo la búsqueda de homología seguido del intercambio de material genético entre moléculas de ADN homólogas. Así, durante la recombinación homóloga catalizada por RecA se necesita una región mínima de homología para que la recombinasa pueda llevar a cabo los estadios iniciales del proceso de intercambio de hebras, actuando como una primera barrera de control. Por lo tanto, la eficiencia de recombinación dependerá del grado de identidad que comparten las moléculas de ADN que recombinan y de la capacidad de RecA para detectar heterologías durante el proceso de intercambio de cadenas. En este sentido, la tolerancia de las recombinasas a dichas heterologías debe estar regulada para mantener un fino balance entre divergencia genética y fidelidad de la recombinación [108, 111].

Estudios de recombinación de ADN *in vitro* demuestran que la presencia de bases mal apareadas inhibe la reacción de intercambio de cadenas catalizada por las recombinasas de la familia RecA (RecA/Rad51/Dmc1). A su vez, dicha inhibición es mayor al aumentar la cantidad de heterologías en el ADN [108, 111-115].

3.2- Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente

El Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (Mismatch Repair System, MRS en inglés) es un mecanismo fisiológico esencial que contribuye a preservar la estabilidad genómica mediante la corrección de mutaciones puntuales y/o pequeños bucles de inserción/delección generados durante la replicación del ADN. Además, este sistema regula la recombinación entre secuencias de ADN parcialmente homólogas (recombinación homeóloga) [109, 110, 116]. Por lo tanto, las principales funciones del MRS están relacionadas a su actividad anti-mutagénica y anti-recombinogénica y defectos en el funcionamiento del MRS produce un incremento en la tasa de mutaciones espontáneas y recombinación homeóloga en procariotas y eucariotas. En humanos un mal funcionamiento del MRS está directamente asociado a la iniciación y promoción de la carcinogénesis mientras en bacterias produce un fenotipo "hipermutador" e "hiperrecombinogénico" [117].

Este sistema está ampliamente conservado en procariotas y eucariotas. Al presente, el MRS bacteriano mejor caracterizado corresponde al de *E. coli*, constituyendo el sistema modelo por excelencia [118, 119]. A partir de diversos estudios bioquímicos y estructurales se ha propuesto el mecanismo expuesto en la **Figura 19-A**, el cual está relacionado a la reparación de errores posreplicativos. Dos de los componentes esenciales de esta vía de reparación son: la proteína MutS, encargada de reconocer los pares de nucleótidos mal apareados sobre el ADN, y la proteína MutL. El reconocimiento de la hebra de ADN

recientemente sintetizada, y que contiene la mutación, se realiza gracias a la ausencia transitoria de metilación de adeninas (llevada a cabo por la metiltransferasa Dam) en dicha hebra. La ausencia de la metilación Dam permite la acción de la endonucleasa MutH, la cual introduce un corte en la hebra nueva de ADN al ser activada por la interacción con el complejo MutS-MutL sobre el ADN. Posteriormente, a partir de dicho corte se inicia la reparación, mediante degradación y resíntesis de la hebra mutada [120].

Cabe mencionar que solo organismos cercanamente relacionados a *E. coli*, como *Salmonella thyphimurium* y *Haemophilus influenzae* utilizan el estado de metilación de la hebra como mecanismo de diferenciación [121]. Por otro lado, en eucariotas así como posiblemente en la mayoría de las bacterias, el sistema Dam-MutH se encuentra ausente, y la reparación podría ser iniciada a partir de un corte introducido por la actividad endonucleolítica de la proteína MutL. Dicha actividad ha sido identificada *in vitro* en proteínas MutL provenientes de humano, levadura y ciertas bacterias, incluyendo *P. aeruginosa* [122-124].

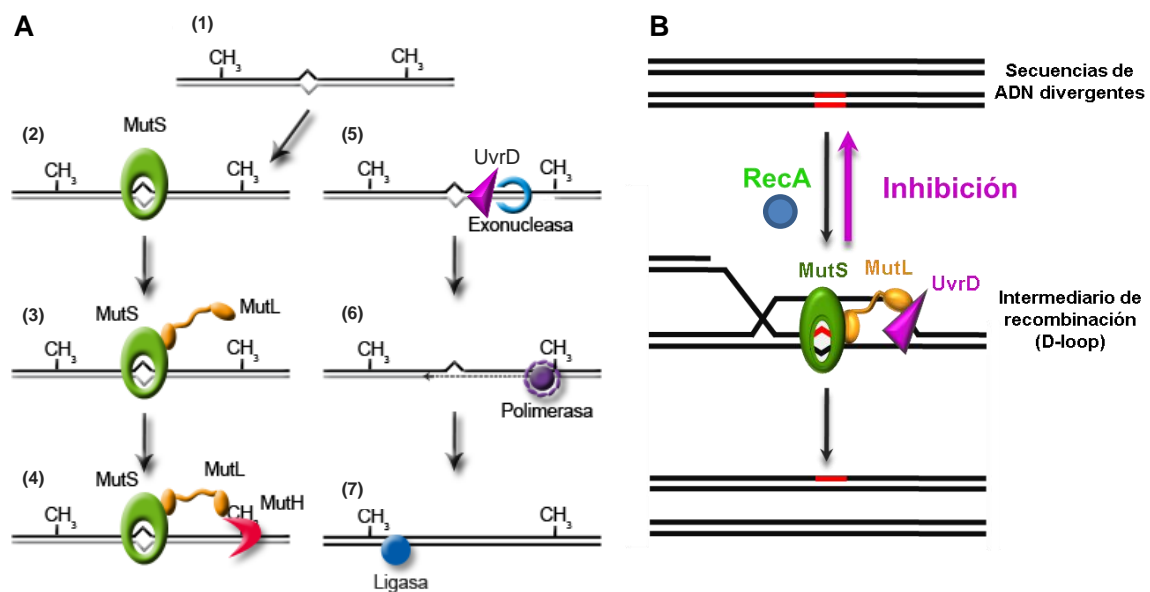


Figura I9. Secuencia simplificada de eventos involucrados en el MRS de *E. coli* para la reparación de errores posreplicativos (A) ó para la inhibición de la recombinación homeóloga (B).

(A) MutS se une a la base mal apareada y luego interacciona con MutL formando un complejo que activa a la endonucleasa MutH, la cual produce un corte en un sitio dGATC no metilado presente en la hebra recién sintetizada. Luego, la helicasa UvrD desenrolla la hebra recién sintetizada que es degradada por exonucleasas hasta remover el error. Finalmente, la ADN polimerasa III resintetiza la hebra con la complementariedad correcta y la ADN ligasa sella los extremos libres del ADN.

(B) RecA cataliza el intercambio entre secuencias de ADN divergentes, generando un intermediario D-loop que contiene bases mal apareadas. El complejo MutS-MutL reconocen estas bases mal apareadas y junto con UvrD inhiben la recombinación homeóloga por reversión del proceso de recombinación (por detalles ver texto).

Con respecto a la función anti-recombinogénica del MRS, las proteínas involucradas son las mismas pero el mecanismo de acción es diferente. Estudios *in vivo* en *E. coli* han revelado que la inhibición de la recombinación homeóloga puede darse por dos mecanismos. El primero de estos mecanismos es independiente de MutH e involucra a MutS, MutL y UvrD durante estadios iniciales de la recombinación homeóloga, una vez que el intercambio de cadenas y se genera el intermediario de recombinación (D-loop). El segundo mecanismo es dependiente de MutH y ocurre en estadios finales de la recombinación, cuando se inicia la síntesis de ADN en la estructura de Holliday. Este mecanismo involucra a MutS, MutL, MutH y una helicasa alternativa que no es UvrD [125, 126]. Además, es importante destacar que a diferencia de lo que ocurre con la reparación de las lesiones, la cual es independiente de los niveles de MutL, la inhibición de la recombinación es altamente sensible a los niveles celulares de la misma [127].

Estudios recientes *in vitro* han revelado a nivel molecular como la acción coordinada de MutS, MutL y la helicasa UvrD inhiben la recombinación homeóloga [128]. Tal como se muestra en la **Figura I9-B**, una vez que RecA cataliza el intercambio de cadenas homeólogas y se disocia del ADN por hidrólisis de ATP, se genera un intermediario D-loop que contiene bases mal apareadas (mismatches). De esta manera, el complejo MutS-MutL se une a los mismatches dentro del intermediario de recombinación [129], como así también a las estructuras secundarias generadas por el ADN_{sc} que es desplazado cuando ocurre intercambio. Así, se generan complejos MutS-MutL de alto peso molecular los cuales evitan la rotación del ADN y bloquean la migración de cadenas y por lo tanto la formación del producto de recombinación. Finalmente, la helicasa UvrD es reclutada y activada por estos complejos para desenrollar el ADN_{dc} generado durante el intercambio y permitir la reversión del proceso y la obtención de los sustratos ADN_{sc} y ADN_{dc} iniciales [128].

Es importante mencionar que la regulación de la recombinación homeóloga mediada por el MRS ocurre tanto en la recombinación dependiente como independiente de RecA (recombinación ilegítima) [130]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual el MRS inhibe la recombinación homeóloga independiente de RecA.

4-*Pseudomonas aeruginosa*: RECOMBINACIÓN Y MRS

A pesar de que el proceso de recombinación y la función anti-recombinogénica del MRS han sido ampliamente estudiados y caracterizados en *E. coli*, actualmente poco se conoce del funcionamiento de estos procesos en la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es un microorganismo con una remarcable capacidad para ocupar diferentes nichos del medio ambiente e infectar organismos superiores. En humanos, actúa como un patógeno oportunista asociado a infecciones intra-hospitalarias afectando principalmente a pacientes post-quirúrgicos, inmuno-comprometidos, con lesiones por quemaduras y afecciones pulmonares [131, 132]. Además, este organismo cuenta con un genoma de gran tamaño y una importante complejidad genómica debida a una alta proporción de genes regulatorios, lo que le confiere una importante diversidad funcional [131].

Las infecciones provocadas por *P. aeruginosa* son la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con Fibrosis Quística (FQ) [133]. Una característica común de las infecciones crónicas de pacientes con FQ causadas por esta bacteria es la alta prevalencia de aislados de cepas hipermutadoras, los cuales se encuentran en el 30 al 60 % de los pacientes [134]. La mayoría de estos aislados hipermutadores son deficientes en las proteínas del MRS, fundamentalmente con mutaciones en el gen *mutS* [134, 135]. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la hipermutabilidad otorga una importante ventaja en la persistencia y adaptación de las bacterias en el ambiente sumamente variable del pulmón infectado. Sin embargo, en estudios *in vivo* solo se ha verificado una asociación entre el fenotipo hipermutador y ciertos fenotipos adaptados al pulmón del paciente FQ, tales como la resistencia a antibióticos y emergencia de poblaciones persistentes [133, 136]. Por otro lado, un artículo reciente en el que analizan el genoma completo de 22 aislados de pacientes con FQ crónicamente infectados reveló que los eventos de recombinación son los principales responsable de la diversificación fenotípica y genotípica en estas poblaciones, mientras que las mutaciones espontaneas no tendrían ningún rol importante en dicha diversificación [137].

El secuenciamiento total del genoma de *P. aeruginosa* reveló que existen genes que codifican homólogos a MutS, MutL y UvrD de *E. coli*, sin embargo no fue posible detectar homólogos a MutH ni Dam [131, 138]. En relación a la actividad endonucleasa, MutL de *P. aeruginosa* posee el motivo de unión a metales identificado en homólogos eucariotas que presentan dicha actividad [122-124]. Asimismo, la ausencia de metilación Dam en *P. aeruginosa* indica que la señal de discriminación de la hebra recién sintetizada es diferente a la presente en *E. coli*. En este sentido, en los últimos años nuestro laboratorio ha trabajado en la caracterización de las proteínas MutS y MutL de *P. aeruginosa* con respecto al funcionamiento del MRS en la reparación de errores posreplicativos y se han establecido diferencias importantes con el MRS de *E. coli* y algunas similitudes con eucariotas [124, 139, 140].

Por otro lado, se ha determinado mediante estudios de conjugación *in vivo* en células de *E. coli* que RecA de *P. aeruginosa* es hiperrecombinogénica con respecto a RecA de *E. coli*. A su vez, estudios *in vitro* de ambas recombinasas han determinado que RecA de *P. aeruginosa* tiene mayor afinidad por el ADNsc y es más eficiente para desplazar la proteína de unión al ADN simple cadena (SSB) que la recombinasa de *E. coli* [141, 142].

Por las particularidades mencionadas anteriormente, y teniendo en cuenta que al presente no se han realizado estudios de recombinación homeóloga y su modulación por el MRS en P. aeruginosa ni en otras especies del género Pseudomonas, esta bacteria constituye un modelo interesante para la investigación de ambos procesos biológicos.

OBJETIVOS

El presente trabajo se focaliza en el estudio de la recombinación genética entre secuencias de ADN divergentes. Su descripción se ha organizado en dos partes las cuales se describen a continuación:

Parte 1: Estudios de la reacción de intercambio de cadenas de ADN mediante ensayos *in vitro*. Efecto de diferentes sustratos conteniendo divergencias y caracterización de la actividad de recombinasas bacterianas y eucariotas.

Para abordar esta primera parte se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.1- Análisis de recombinación de ADN *in vitro* utilizando la técnica de Fluorescencia por Transferencia de Energía Resonante (FRET): intercambio de cadenas catalizado por recombinasas bacterianas y eucariotas.
- 1.2- Efecto de la presencia de bases mal apareadas (mismatches) en el intercambio de cadenas catalizado por recombinasas.
- 1.3- Análisis de la presencia de pequeñas inserciones/deleciones en el intercambio de cadenas.
- 1.4- Estudios del efecto de Hop2-Mnd1 en el intercambio de cadenas catalizado por la recombinasa eucariota Dmc1.
- 1.5- Análisis del mecanismo molecular por el cual las recombinasas detectan la presencia de heterologías durante el intercambio de cadenas.

Parte 2: Análisis de la recombinación en *Pseudomonas aeruginosa* mediante ensayos *in vivo*. Función del MRS y de genes involucrados en recombinación.

Los objetivos específicos fueron:

- 2.1- Construcción de un sistema para medir recombinación homóloga y homeóloga en bacterias Gram-negativas.
- 2.2- Determinación de la tasa de recombinación homóloga y homeóloga en cepas de *P. aeruginosa* deficientes en genes involucrados en recombinación.
- 2.3- Estudios del rol de las proteínas del MRS de *P. aeruginosa* en la regulación de la recombinación homeóloga.

RESULTADOS

CAPITULO 1. ESTUDIOS DE LA REACCIÓN DE INTERCAMBIO DE CADENAS DE ADN. EFECTO DE DIFERENTES SUSTRATOS CONTENIENDO DIVERGENCIAS Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RECOMBINASAS BACTERIANAS Y EUCARIOTAS.

Una de las etapas más importante de la recombinación homóloga es el intercambio de cadenas entre moléculas de ADN homólogas u homeólogas, proceso catalizado por las recombinasas de la familia RecA. Las recombinasas tienen la habilidad para buscar y discriminar la secuencia homóloga blanco entre una gran cantidad de secuencias heterólogas en un proceso denominado “búsqueda de la homología” que es un paso determinante para que ocurra el intercambio entre hebras de ADN homólogas.

Esta propiedad de las recombinasas actuaría como una primera barrera para evitar la recombinación entre secuencias de ADN divergentes [108] mientras que las proteínas del Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS) proporcionan un segundo control para asegurar que las secuencias heterólogas no recombinen entre sí [128, 143, 144]. Por lo tanto, la función de las recombinasas no se limita a catalizar mecánicamente el intercambio de cadenas, sino que cumple un rol mucho más importante en la regulación de la recombinación genética.

De esta manera, en el presente capítulo se llevó a cabo el estudio y la caracterización exhaustiva del intercambio de cadena catalizado por diferentes recombinasas procariotas y eucariota mediante ensayos *in vitro* en presencia de diferentes tipos de heterologías en el ADN. A pesar que RecA de *E. coli* y su homóloga eucariota Rad51 han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas a nivel estructural y bioquímico [3, 9, 94, 108, 114, 145], actualmente poco se conoce de la recombinasa eucariota Dmc1 y de RecA de *P. aeruginosa*. Por lo tanto, consideramos importante establecer similitudes y diferencias entre estas recombinasas y RecA de *E.coli*, para determinar si el reconocimiento y/o discriminación de heterologías durante la recombinación es común entre procariotas y eucariotas. Además, este estudio abarca un análisis exhaustivo y detallado de diferentes tipos de heterologías que al momento no habían sido analizadas con ninguna recombinasa y es importante para entender en más detalle un proceso complejo cómo es la recombinación homóloga.

1.1- Análisis de recombinación de ADN *in vitro* utilizando la técnica de Fluorescencia por Transferencia de Energía Resonante (FRET): intercambio de cadenas catalizado por recombinasas bacterianas y eucariotas.

Con el propósito de analizar la recombinación catalizada por recombinasas *in vitro*, se desarrolló un sistema para medir intercambio de cadena entre oligonucleótidos (~50nt) utilizando la técnica de Fluorescencia por Transferencia de Energía Resonante (FRET). Como se muestra en la **Figura R1-A** la reacción consiste en mezclar un ADNdc marcado con un par de fluoróforos donador(3'TAMRA)-aceptor(5'Cy5) y un ADNsc inicial no marcado en presencia de las recombinasas. De esta manera, en ausencia de intercambio, el par de fluoróforos donador-aceptor en el ADNdc estarán a una distancia óptima en la cual la transferencia de energía será máxima (FRET+, **Figura R1-B**). Cuando ocurre el intercambio de cadena catalizado por las recombinasas, la cadena no marcada desplaza a su homóloga (u homeóloga) en el dúplex provocando el distanciamiento entre el grupo donador y aceptor, lo que se traduce en una disminución de la transferencia de energía (FRET-, **Figura R1-B**) y un aumento en la emisión de fluorescencia del donador (TAMRA).

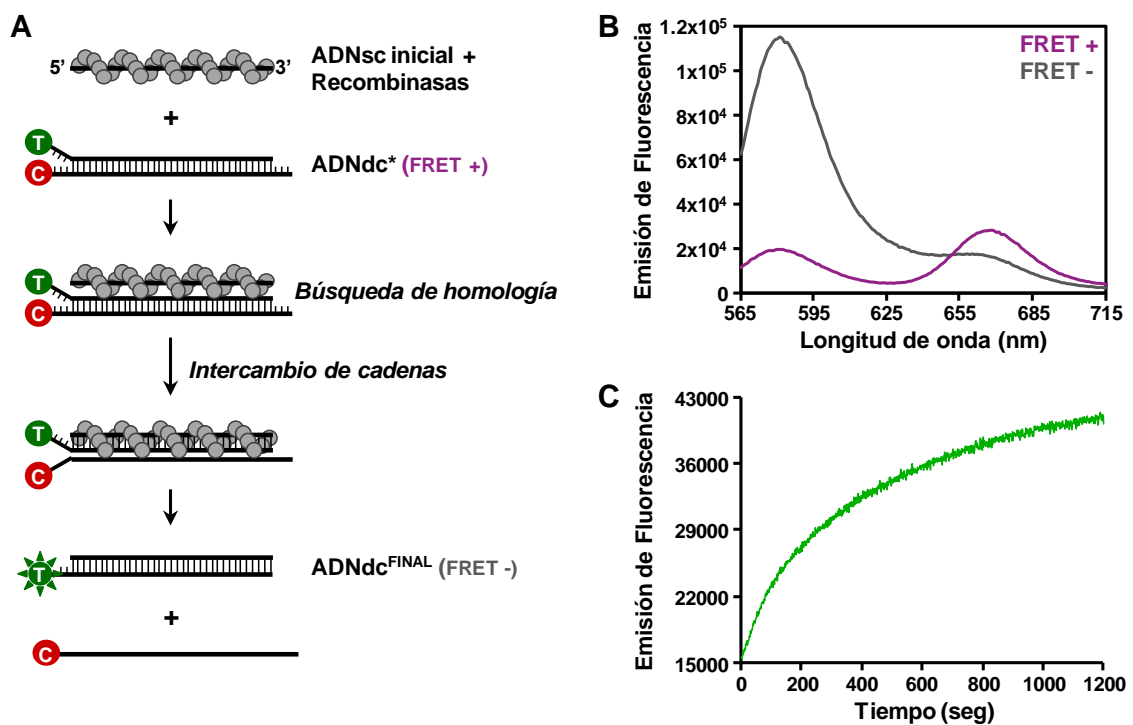


Figura R1. (A) Esquema de la reacción de intercambio de cadenas de ADN *in vitro* catalizada por recombinasas. T: TAMRA (λ_{exc} : 556 nm; λ_{em} : 580 nm). C: Cy5 (λ_{exc} : 649 nm; λ_{em} : 665 nm). ADNsc inicial: ADN simple cadena no marcado. ADNdc*: ADN doble cadena marcado. ADNdc^{FINAL}: ADN doble cadena generado una vez que ocurre el intercambio. (B) Espectro de emisión antes (FRET+) y después (FRET-) de la reacción de intercambio de cadena, λ_{exc} : 556 nm. (C) Cinética de la reacción de intercambio en el tiempo catalizada por recombinasas, λ_{exc} : 556 nm, λ_{em} : 580 nm. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

De esta manera, utilizando este ensayo se puede analizar la cinética de la reacción midiendo la intensidad de fluorescencia de TAMRA en el tiempo (Figura R1-C). Cabe mencionar que al comienzo de la reacción ($t=0$, FRET+) dicho fluoróforo presenta una cierta emisión de fluorescencia, tal como se observa en las Figuras R1-B y R1-C, que puede variar en algunas unidades según el experimento. Por lo tanto, como nuestro objetivo fue medir el incremento en la intensidad de TAMRA a medida que ocurre la reacción de intercambio, todas las curvas cinéticas que se mostrarán a lo largo del trabajo fueron normalizadas (emisión de fluorescencia=0 a $t=0$) del tal manera de facilitar la interpretación de los datos.

En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas de reacción con las 3 recombinasas estudiadas (RecA de *P. aeruginosa*, RecA de *E. coli* y Dmc1 de humanos) variando la concentración de los sustratos de ADN, ATP, sales, y la temperatura de la reacción. Dichas pruebas fueron realizadas utilizando los oligonucleótidos homólogos. Así, una vez elegidas las condiciones óptimas se midió la cinética de la reacción de intercambio para cada recombinasa variando la concentración de proteína y se calculó la fracción de ADNdc intercambiada (Fracción de Intercambio: FI) a una determinada concentración (Figura R2), tal como se indica en Materiales y Métodos. Se observó que las recombinasas bacterianas son más activas que la recombinasa eucariota para llevar a cabo el intercambio de cadena, tal como se había determinado anteriormente (Volodin JBC).

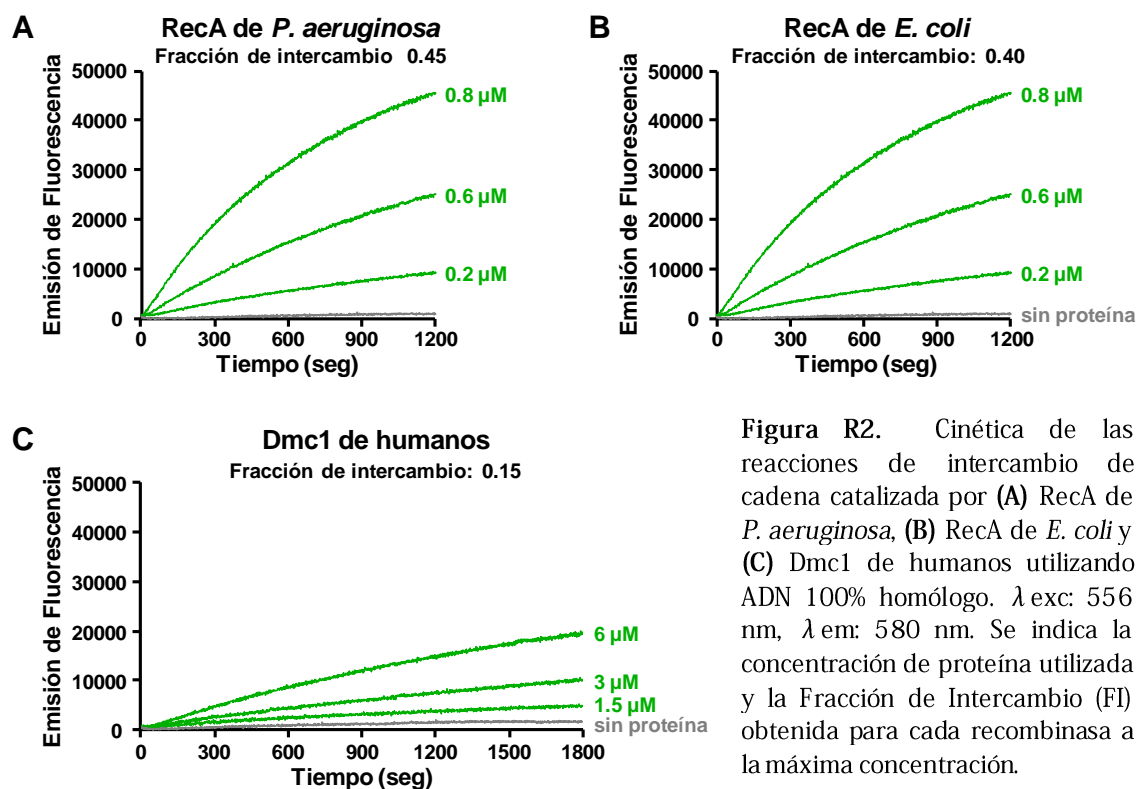


Figura R2. Cinética de las reacciones de intercambio de cadena catalizada por (A) RecA de *P. aeruginosa*, (B) RecA de *E. coli* y (C) Dmc1 de humanos utilizando ADN 100% homólogo. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm. Se indica la concentración de proteína utilizada y la Fracción de Intercambio (FI) obtenida para cada recombinasa a la máxima concentración.

Adicionalmente, se analizó mediante electroforesis en gels de poliacrilamida no desnaturalizantes si efectivamente se producía la reacción de intercambio de cadenas. De esta manera, se corroboró que el oligonucleótido marcados con Cy5 inicialmente se encuentra formando parte del ADNdc y luego de la reacción de intercambio se lo identifica como ADNsc (Figura R3).

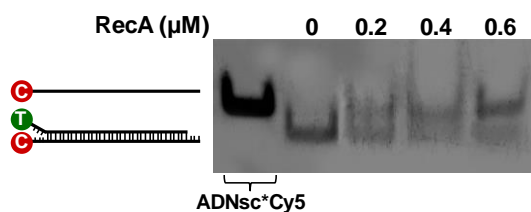


Figura R3. Análisis de la reacción de intercambio de cadenas en gel de poliacrilamida 16% no desnaturalizante detectado mediante la emisión de fluorescencia de Cy5 (λ exc: 649 nm, λ em: 665 nm). Se indican las concentraciones de RecA (μ M) utilizadas para cada reacción y como control se muestra la migración del ADNsc marcado con Cy5 (ADNsc*Cy5).

1.2- Efecto de la presencia de bases mal apareadas (mismatches) en el intercambio de cadenas catalizado por recombinasas.

1.2.1- La posición y distribución de mismatches TG afectan la eficiencia de intercambio de cadena.

Estudios previos han demostrado que RecA de *E.coli* es sensible a la posición y distribución de bases mal apareadas (del inglés “mismatches”) durante el intercambio de cadenas [108]. Para comparar Dmc1 y RecA en cuanto al efecto inhibitorio de mismatches, se analizó el efecto de uno o tres mismatches “TG” ubicados en diferentes posiciones del ADNsc inicial utilizando el sistema previamente descrito (Figura R1). En la Figura R4-A se muestran las modificaciones de nucleótidos que se hicieron en el ADNsc con el fin de generar un mismatch. Cabe mencionar que cuando nos referimos a un mismatch “TG” el mismo es generado una vez que ocurre el intercambio de cadenas, encontrándose “T” en la hebra del ADNdc marcada con TAMRA y “G” en el ADNsc inicial.

Inicialmente, se analizó un mismatch TG en tres posiciones diferentes: extremo 5', medio o extremo 3' del ADNsc inicial. La Figura R4-B muestra los resultados obtenidos con RecA de *P. aeruginosa* y Dmc1. Además, se indican los valores de la Eficiencia de Intercambio de Cadena (EIC) con cada ADNsc inicial utilizado la cual se calculó tal como se detalla en Materiales y Métodos y se consideró al ADNsc 100% homólogo como EIC=1. Tal como se observa para ambas recombinasas la presencia de un mismatch TG en el extremo 5' o en el medio del ADNsc tiene un fuerte efecto inhibitorio en la reacción de intercambio, mientras que un mismatch TG en el extremo 3' prácticamente no afecta la eficiencia de intercambio en comparación al ADNsc 100% homólogo (Figura 4-B). Además, se observó

que la eficiencia de intercambio por la presencia de tres mismatches TG también se ve influenciada por la posición y distribución de los mismos. En este sentido, la **Figura R4-C** muestra que tres mismatches localizados en el extremo 3' (3MM3') inhiben muy poco la reacción de intercambio. Por otro lado, si los tres mismatches están distribuidos uniformemente (3MMunif) hay mayor inhibición que se hace aún más fuerte cuando esos mismatches se localizan juntos en el medio (3MMmid).

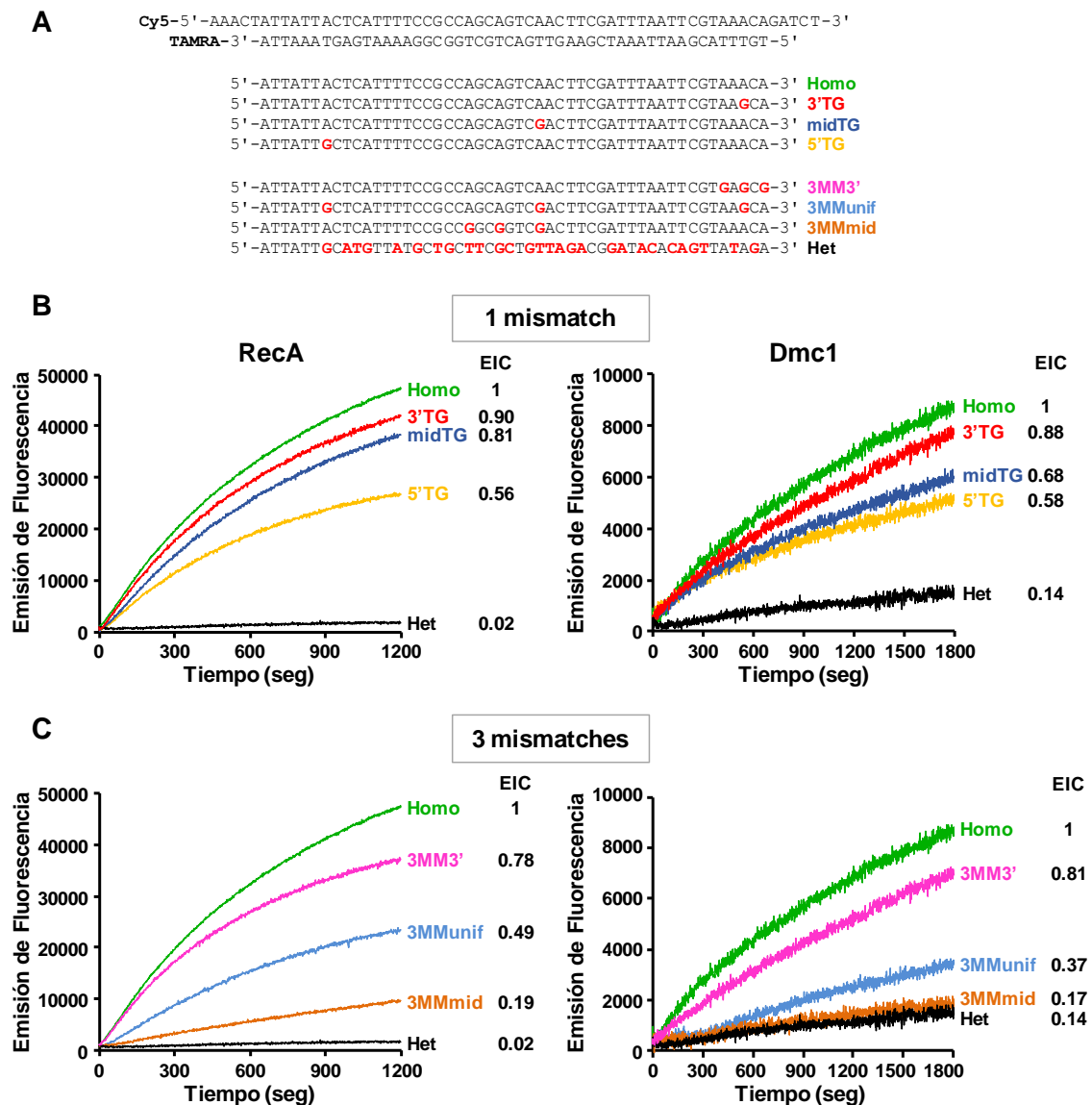


Figura R4. Efecto de la posición y distribución de uno y tres mismatches TG en la eficiencia de intercambio de cadenas catalizada por recombinasas. (A) Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de intercambio de cadena *in vitro*. Los oligonucleótidos marcados con los fluoróforos Cy5 y TAMRA fueron utilizados para generar el ADNdc* y los oligonucleótidos no marcados fueron utilizados como ADNsc inicial. Las modificaciones entre oligonucleótidos se marcan en rojo. Homo, 100% homólogo; Het, heterólogo (60% de divergencia); 5'TG, midTG y 3'TG se refiere a un mismatch en el extremo 5', en el medio o en el extremo 3'; 3MMunif, 3 mismatches distribuidos uniformemente; 3MM3', 3 mismatches localizados en el extremo 3'; 3MMmid, 3 mismatches en la región central del ADNsc inicial. (B y C) Cinéticas de las reacciones de intercambio catalizadas por RecA de *P. aeruginosa* o Dmc1 en presencia de uno o tres mismatches TG en distintas posiciones. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm. Se muestra la eficiencia de intercambio de cadena (EIC) obtenida para cada reacción respecto al ADN homólogo (EIC=1).

Como control negativo se utilizó ADNsc con una divergencia del 60% (28 mismatches), lo cual inhibió totalmente la reacción de intercambio. Dado que las cinéticas obtenidas con RecA de *E. coli* fueron prácticamente iguales a las obtenidas con RecA de *P. aeruginosa*, dichos resultados se muestran en la **Figura A1** (Anexo).

Finalmente, para descartar que los resultados obtenidos se debieran a la posición de los fluoróforos, se utilizaron otros sustratos de ADN para formar el ADNdc marcado manteniendo la secuencia de los mismos pero intercambiando TAMRA y Cy5 (ver esquema **Figura R5**). Así, se llevaron a cabo las reacciones de intercambio catalizadas por Dmc1 y RecA con ambos ADNdc y los ADNsc que generaban mismatches en el extremo 5' o 3' y se observó el mismo efecto de localización de un mismatch TG al cambiar de lugar los fluoróforos (**Figura R5**, se muestran las cinéticas obtenidas con Dmc1).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la posición del mismatch es muy importante durante el intercambio de cadena y que la eficiencia de la reacción disminuye cuando el mismatch se localiza en el extremo 5' del ADNsc inicial. A su vez, se podría asumir que es más importante la posición del mismatch que la cantidad de mismatches presentes durante la reacción de intercambio catalizada por recombinasas.

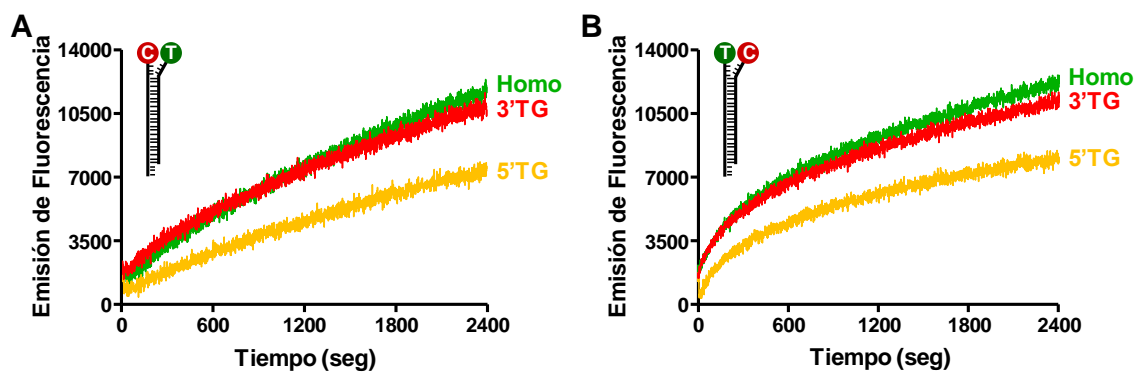


Figura R5. Efecto del intercambio en la posición de TAMRA y Cy5 en el ADNdc* (ADNdc marcado) utilizado como sustrato para la reacción de intercambio catalizada por Dmc1 (ver esquema en **A y B**). Se utilizaron ADNsc inicial que generan un mismatch TG en el extremo 5' o 3'. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm.

1.2.2- MutS no fue capaz de inhibir el intercambio de cadena catalizado por recombinasas en presencia de mismatches con los sustratos de ADN utilizados.

Estudios *in vitro* han demostrado que MutS y MutL bloquean el intercambio de cadenas de ADN catalizado por RecA de *E. coli* entre los genomas de los fagos “fd” y “M13” (6,4 kb de longitud), los cuales poseen una divergencia del 3%. Tal efecto inhibitorio no se observa sobre la recombinación entre fagos “M13”, de homología perfecta [143, 144].

Si bien el estudio con fagos es útil para analizar el efecto del MRS, no permite realizar un estudio sistemático del efecto de diferentes posiciones y cantidad de mismatches. En este contexto, quisimos analizar el efecto de MutS de *P. aeruginosa* durante la reacción de intercambio catalizada por RecA en nuestro sistema de estudio con oligonucleótidos de ADN (50 nucleótidos de longitud). Sin embargo, más allá de que se analizaron gran variedad de condiciones de reacción (relaciones molares y concentración de proteínas, orden de adición de ADN y proteínas, temperatura, tipos y cantidad de mismatches) y se verificó que bajo esas condiciones MutS se unía eficientemente al ADNdc que contenía un mismatch TG, no pudimos observar el efecto inhibitorio de MutS durante el intercambio de cadenas catalizado por RecA en presencia de mismatches (resultados no mostrados). El mismo ensayo se llevó a cabo con la reacción catalizada por Dmc1 en presencia de MutS α (MutS de eucariotas) provista por el laboratorio de la Dra. Peggy Hesieh (National Institutes of Health, Estados Unidos) y tampoco se observó inhibición.

Paralelamente, trabajos realizados en otro laboratorio confirmaron nuestra observación, ya que MutS tampoco fue capaz de inhibir el intercambio de cadenas homeólogo entre oligonucleótidos (83 nt de longitud) que contenían divergencias entre sí [128]. Dicho efecto se atribuyó a la generación de un intermediario de recombinación con un tiempo de vida media muy corto que no permite la unión de MutS al mismatch presente en dicho intermediario.

Por lo tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados y los antecedentes expuestos, no pudimos analizar con nuestro sistema el efecto de los componentes del MRS de *P. aeruginosa* ni de sus versiones mutadas sobre el intercambio de cadenas catalizado por RecA *in vitro*.

1.2.3- Efecto de diferentes tipos, posición, cantidad y distribución de mismatches en el intercambio de cadenas.

El apareamiento entre bases no complementarias puede generar diferentes tipos de mismatches en el ADN. En total existen 12 tipos de mismatches (MM) que pueden adoptar diferentes estructuras, las cuales dependerán de la naturaleza del mismatch, del contexto de secuencia, pH y concentración de sales [146, 147]. Se ha postulado que las diferencias estructurales podrían influenciar la interacción de las bases mal apareadas con determinadas enzimas de reparación tal cómo se determinó con la proteína MutS, que se une con diferente afinidad a distintos mismatches [148, 149]. Asimismo, se ha establecido que el MRS no repara todos los tipos de mismatches con la misma eficiencia [150].

En base a estos antecedentes y a los resultados previamente obtenidos, decidimos encarar un estudio sistemático con el fin de analizar si la presencia de diferentes tipos de mismatches en una determinada posición como así también la cantidad y distribución de los mismos, afectaba la eficiencia de intercambio de cadenas catalizada por diferentes recombinasas.

Para llevar a cabo dicho estudio se utilizaron cuatro ADNdc marcados cuyas secuencias diferían entre sí en tres posiciones específicas (**Figura R6**). Dichos ADNdc fueron combinados con distintos ADNsc que contenían modificaciones en su secuencia conformando 4 diferentes “grupos” que se muestran en la **Figura R6**. De esta manera, el diseño experimental permitió estudiar los 12 tipos de mismatches en diferentes posiciones (extremo 5', en el medio o extremo 3'), cantidad (uno, dos ó tres por molécula) y distribución. En total, los ADNsc utilizados fueron: 36 oligonucleótidos (9 por grupo) para analizar un mismatch en tres posiciones; 54 oligonucleótidos (grupo 1 y 2) para estudiar dos mismatches con diferente distribución; 54 oligonucleótidos (grupo 1 y 2) para estudiar tres mismatches con diferente distribución; y los ADNsc homólogos de cada grupo utilizados como control.

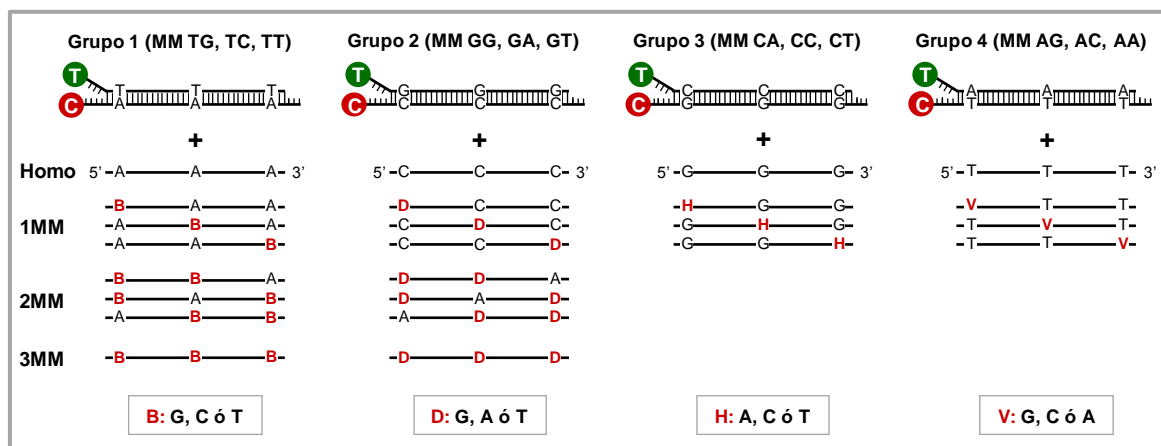


Figura R6. Sustratos de ADN utilizados para estudiar diferentes tipos, posición, cantidad y distribución de mismatches durante las reacciones de intercambio de cadena catalizadas por recombinasas. Para cada grupo se muestra el ADNdc marcado y el conjunto de ADNsc analizados. Las modificaciones entre oligonucleótidos se marcan en rojo con las letras “B, D, H ó V” las cuales representan a los nucleótidos que se indican en la parte inferior de la figura (códigos IUPAC). **Homo**, ADNsc 100% homólogo de cada grupo; **1MM**, ADNsc iniciales que generan 1 mismatch (en total son 9 oligonucleótidos por grupo para estudiar los 12 tipos de mismatches en 3 posiciones diferentes); **2MM**, ADNsc iniciales que generan 2 mismatches (en total son 27 oligonucleótidos por grupo); **3MM**, ADNsc iniciales que generan 3 mismatches (en total son 27 oligonucleótidos por grupo). En la **Figura A2** (Anexo) se muestra un esquema similar con el listado detallado de cada uno de los ADNsc utilizados indicando las modificaciones de nucleótidos. La secuencia de los oligonucleótidos se muestran en la **Tabla M2** (Materiales y Métodos).

- Efecto del tipo y posición de un mismatch

Inicialmente, se llevó a cabo el análisis de diferentes tipos de mismatches en tres posiciones diferentes. Con este fin se utilizaron los oligonucleótidos de los cuatro grupos y se calculó la Eficiencia de Intercambio de Cadena (EIC) tal como se detalla en Materiales y Métodos, considerando al ADNsc 100% homólogo de cada grupo como EIC=1.

En la **Figura R7** se muestra la EIC de cada mismatch en una determinada posición con las tres recombinasas estudiadas. El patrón de EIC obtenido fue similar entre las RecA bacterianas y Dmc1, con algunas diferencias que luego serán detalladas. Cabe mencionar que para determinar un tiempo de reacción adecuado para realizar el estudio, se midió con cada ADNsc la cinética de la reacción determinando la intensidad de fluorescencia a 580 nm en función del tiempo. Luego, las repeticiones para cada ADNsc se hicieron midiendo la intensidad de fluorescencia a un tiempo determinado respecto a la fluorescencia a tiempo = 0.

Se observó que la mayoría de los mismatches en el extremo 5' producen una fuerte inhibición (EIC ~ 0.2-0.5 para RecA y EIC ~ 0.3-0.6 para Dmc1), a excepción de TT, CT y GT que no afectan o tienen muy poco efecto con respecto al ADNsc homólogo (EIC ~ 0.8-1 para RecA y EIC ~ 1-1.2 para Dmc1). El orden de inhibición para RecA de *P. aeruginosa* y *E. coli* fue GG > CA ≈ GA ≈ CC ≈ CT ≈ AG ≈ AA > AC ≈ TG ≈ TC > GT ≈ CT ≈ TT; mientras que para Dmc1 fue CA ≈ CC > TG ≈ TC ≈ GG ≈ AG ≈ AC ≈ AA ≈ GA > GT ≈ CT ≈ TT. Las diferencias observadas entre diferentes tipos de mismatches en el extremo 5' dejan en evidencia que las recombinasas estarían reconociendo estos mismatches de manera diferente. En este sentido, es importante recalcar que mientras los mismatches TG y TC fueron muy inhibitorios, los mismatches GT y CT no afectaron prácticamente la eficiencia de intercambio.

Por otro lado, la mayoría de los mismatches en el medio y en el extremo 3' no afectaron significativamente la eficiencia de intercambio, la cual fue similar entre diferentes tipos de mismatches. Solamente algunos mismatches ubicados en el medio disminuyen la eficiencia de reacción (EIC ~ 0.6) respecto del ADNsc homólogo, principalmente en Dmc1. Además, un resultado interesante que sólo se observó con Dmc1 fue el efecto contrario que tuvo el mismatch TT en los extremos 5' y 3'. En el extremo 5' no se observó inhibición con TT, mientras que en el extremo 3' fue el mismatch más inhibitorio. Este resultado podría dar evidencia de que las diferentes estructuras que puede tener un mismatch en diferentes contextos de secuencia afectarían el reconocimiento y discriminación mediado por la recombinasa.

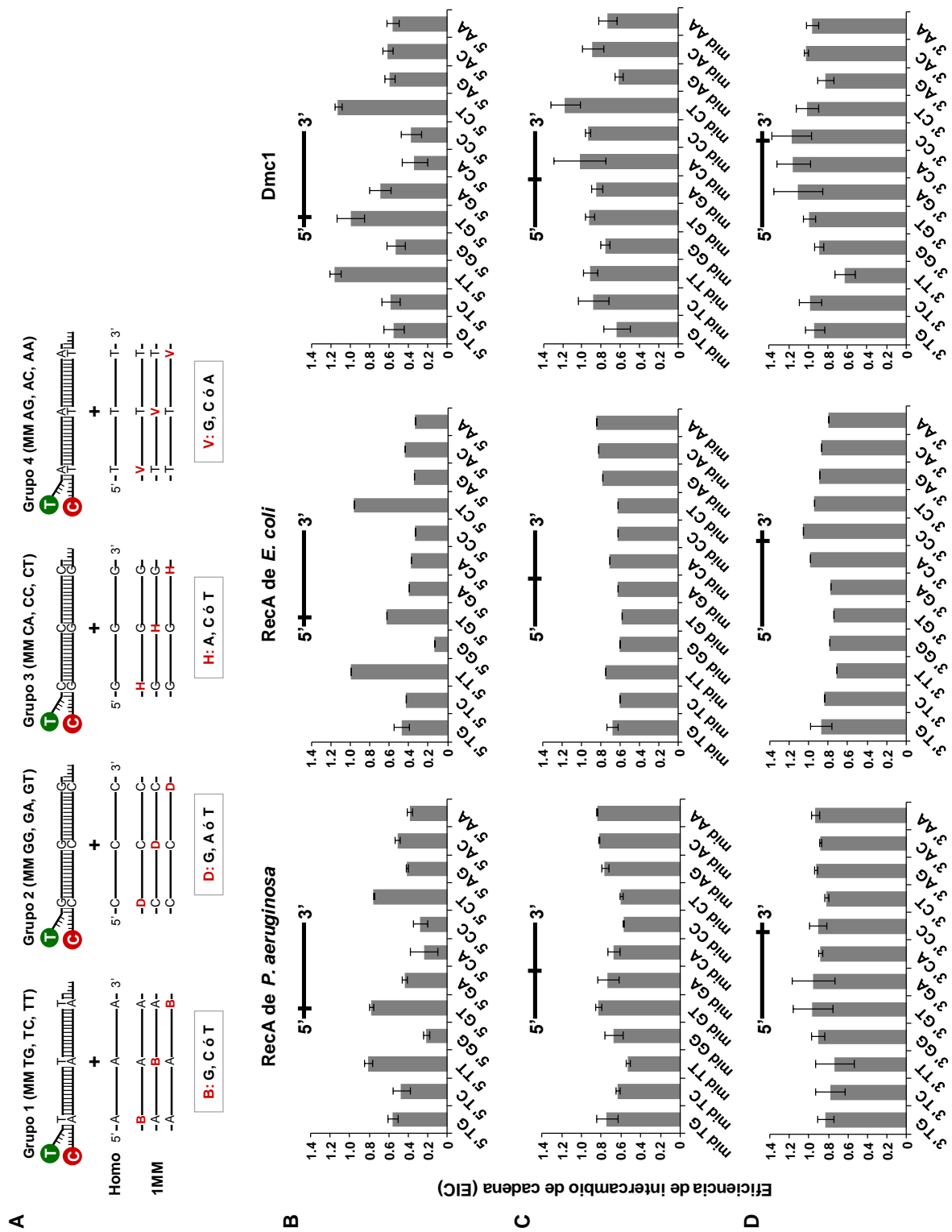


Figura R7. Efecto del tipo y posición de un mismatch en el intercambio de cadena catalizado por RecA de *P. aeruginosa*, RecA de *E. coli* y Dmc1. (A) Esquema de los sustratos de ADN utilizados. (B, C y D) Se muestra la Eficiencia de Intercambio de Cadena (EIC) obtenida con cada tipo de mismatch en tres posiciones diferentes del ADNsc inicial (extremo 5', medio o extremo 3', ver esquema) utilizando los oligonucleótidos de los cuatro grupos que generan 1MM y el ADNsc homólogo de cada grupo como control (EIC = 1).

- Efecto de la distribución de dos y tres mismatches.

Posteriormente, se analizó cómo afectaba la posición y distribución de dos y tres mismatches (ver **Figura R6**). Dicho análisis se llevó a cabo con los mismatches del grupo 1 (TG, TC y TT) y del grupo 2 (GG, GA, GT). En la **Figura R8 y R9** se muestran los resultados obtenidos con los oligonucleótidos del grupo 1, cuyas reacciones fueron llevadas a cabo con RecA y Dmc1. Cabe mencionar que la eficiencia de intercambio de cadenas obtenida con las recombinasas bacterianas fue prácticamente igual por lo que solo se muestran los resultados obtenidos con RecA de *P. aeruginosa*.

Se observó que el efecto fue determinado principalmente por el tipo de mismatch presente en el extremo 5'. Por ejemplo, la presencia de un TG o TC en la posición 5' produjo una fuerte inhibición mientras un TT no inhibió la reacción catalizada por Dmc1 y se observó una leve inhibición con RecA, independientemente del tipo de mismatch presente en el medio o en el extremo 3'. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la posición y tipo de mismatch son los factores más importantes que definen si el intercambio de cadena mediado por recombinasas es inhibido o no.

Tal cómo se mencionó anteriormente, el patrón de inhibición fue similar entre las recombinasas bacterianas y eucariota, aunque Dmc1 mostró mayor tolerancia a la presencia de mismatches que las RecA de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esta diferencia fue más acentuada al aumentar la cantidad de mismatches por molécula, ya que la reacción catalizada por RecA es fuertemente inhibida y más sensible a la presencia de dos o tres mismatches que la reacción catalizada por Dmc1.

Finalmente, se llevó a cabo el mismo tipo de análisis con los oligonucleótidos del grupo 2, de tal manera de generar dos o tres mismatches con distinta distribución. Al igual que se mencionó para el grupo 1, el efecto en la eficiencia de intercambio fue determinada principalmente por el tipo de mismatch presente en el extremo 5', observándose mayor inhibición en presencia de GG en dicho extremo (**Figura A3, Anexo**). Por este motivo, previendo que un resultado similar se obtendría al analizar dos y tres mismatches de los grupos 3 y 4 no se llevaron a cabo dichos experimentos.

Así, nuestros resultados indican que tanto RecA como Dmc1 son sensibles al tipo, posición y distribución de mismatches durante la búsqueda de homología, una propiedad conservada entre recombinasas bacterianas y eucariotas. Además, el tipo de mismatch y la posición del mismo serían más importantes que la cantidad de mismatches.

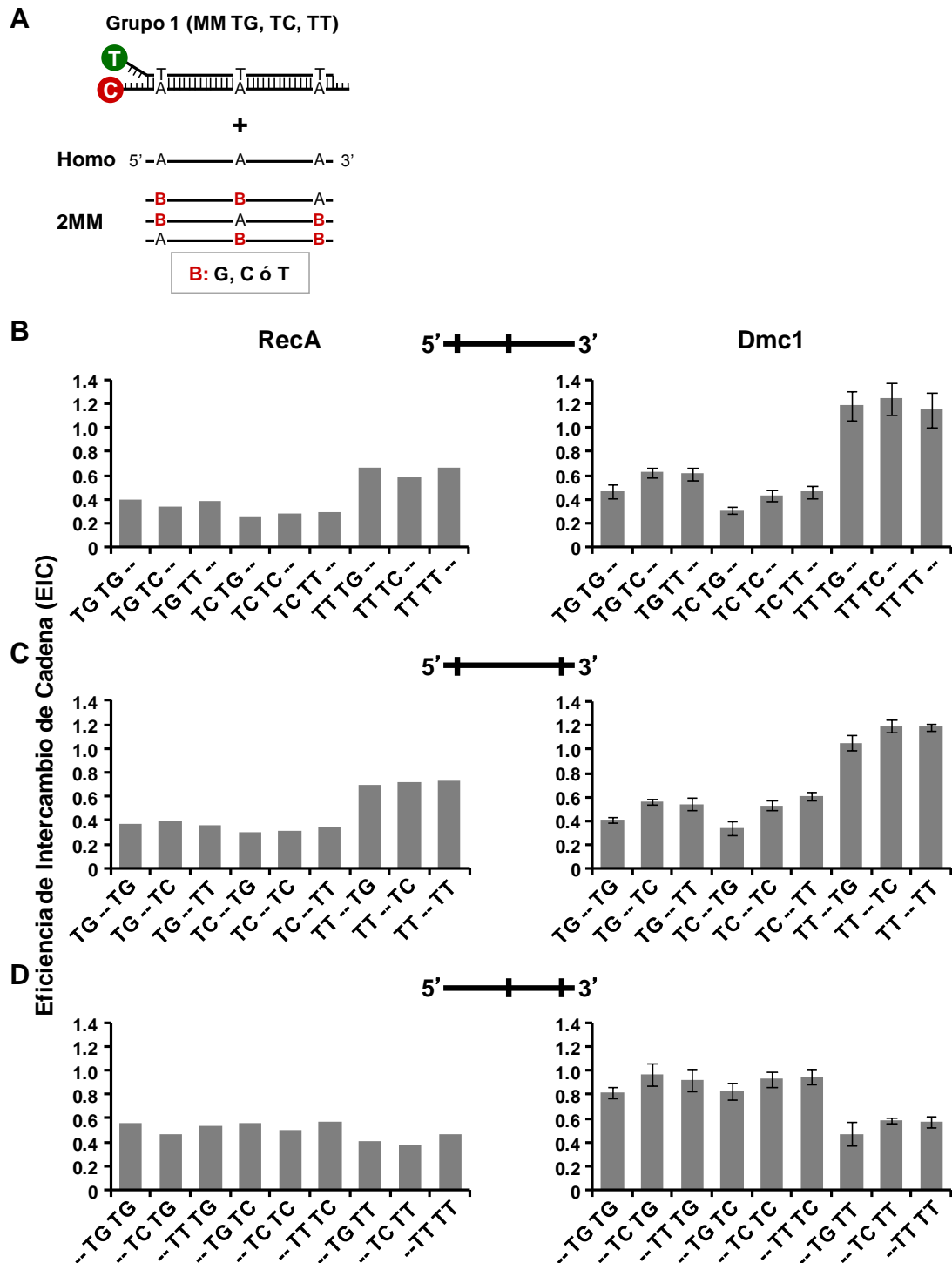


Figura R8. Efecto de la distribución de dos mismatches en el intercambio de cadena catalizado por RecA y Dmc1. (A) Sustratos de ADN utilizados para estudiar dos mismatches en distintas posiciones del ADNsc inicial. “B” representa a los nucleótidos G, C ó T para estudiar los mismatches TG, TC o TT (grupo 1). **Homo**, ADNsc 100% homólogo; **2MM**, ADNsc iniciales que generan 2 mismatches (27 oligonucleótidos). Para más detalles ver Figura A2 (Anexo) (B, C y D) Eficiencia de Intercambio de cadena obtenida en las reacciones catalizadas por RecA (izquierda) o Dmc1 (derecha) en presencia de dos mismatches en diferentes posiciones del ADNsc inicial. En el eje X se indica el tipo de mismatch en cada posición (extremo 5', medio o extremo 3'). Los guiones indican la ausencia de mismatch en esa posición. Los experimentos con RecA fueron determinados por duplicado y los experimentos con Dmc1 por triplicado por lo que se indican sal desviaciones estándar.

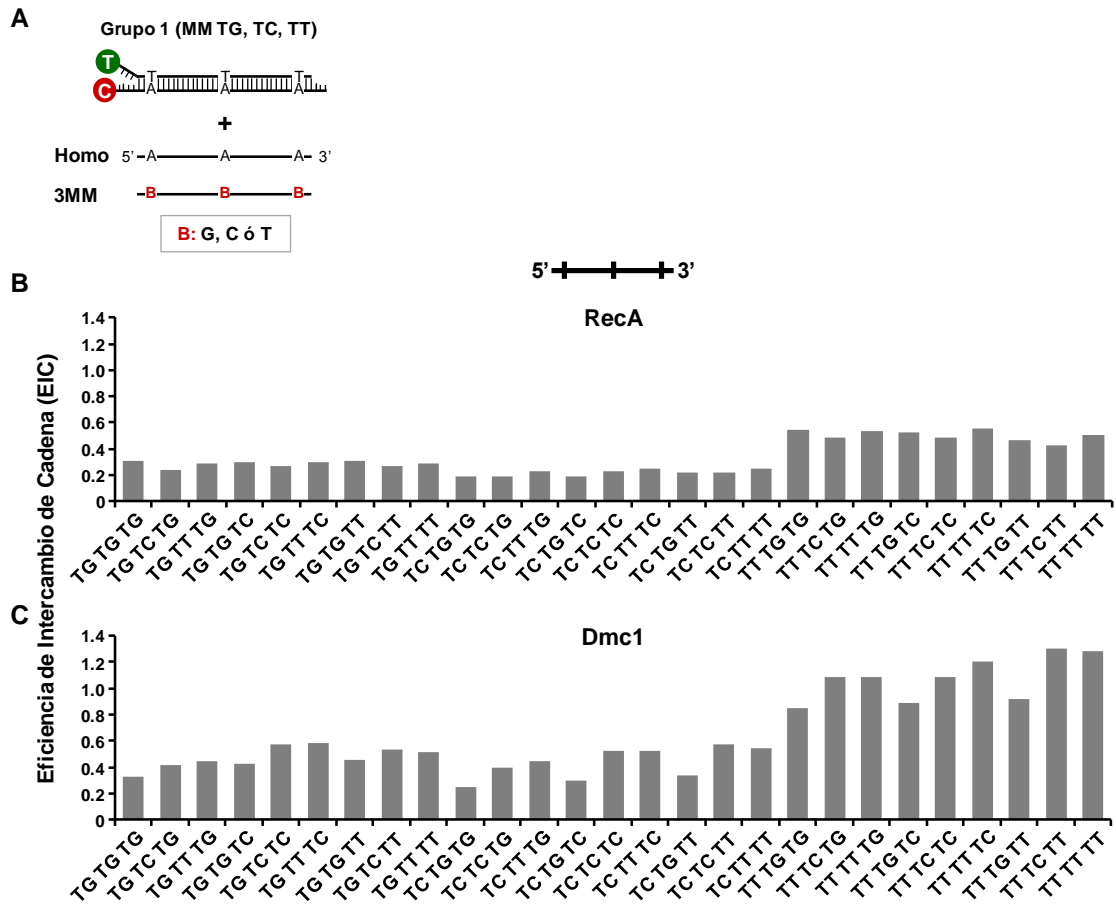


Figura R9. Efecto de la distribución de tres mismatches en el intercambio de cadena catalizado por RecA y Dmc1. (A) Sustratos de ADN utilizados para estudiar tres mismatches. “B” representa a los nucleótidos G, C ó T para estudiar los mismatches TG, TC o TT (grupo 1). **Homo**, ADNsc 100% homólogo; **3MM**, ADNsc iniciales que generan 3 mismatches (27 oligonucleótidos). Para más detalles ver Figura A2 (Anexo). (B y C) Eficiencia de Intercambio de cadena obtenida en las reacciones catalizadas por RecA (B) o Dmc1 (C) en presencia de tres mismatches. En el eje X se indica el tipo de mismatch en cada posición (extremo 5', medio o extremo 3').

1.3- Análisis de la presencia de pequeñas inserciones/deleciones en el intercambio de cadenas.

Durante la replicación y la recombinación homóloga puede ocurrir otro tipo de mal apareamiento como son las estructuras secundarias tipo "loops" generadas por deleción o inserción de bases, especialmente dentro de secuencias repetitivas [130]. Estas inserciones o deleciones son generalmente producidas por errores en la replicación, particularmente por el patinado de la ADN polimerasa, y son detectadas y corregidas por el MRS [12]. Por otro lado, cuando dichas mutaciones ocurren por recombinación intra-molecular entre secuencias repetitivas con cierto grado de divergencia, este proceso estaría regulado inicialmente por las recombinasas y luego por el MRS. En este sentido, se ha postulado que RecA de *E. coli* detecta inserciones y deleciones de 4 nt (+/- AGCT) atenuando el proceso de intercambio de cadena entre oligonucleótidos de ADN *in vitro* [151].

Con el objeto de analizar con nuestro sistema si la formación de pequeños "loops" generados por inserción o deleción de 1 ó 2 bases son reconocidos por RecA y Dmc1, utilizamos diferentes ADNsc con modificaciones en la región media del oligonucleótido no marcado (+/- 1T, +/- 2T). El esquema de la reacción de intercambio se muestra en la **Figura R10-A**, en la cual se detallan las modificaciones en el ADNsc y los diferentes productos de reacción conteniendo loops en una u otra hebra del ADNdc^{FINAL}. Así, los loops que se forman en la hebra del ADNsc inicial se denominan "Inserciones (In)" y los que se forman en la hebra complementaria se denominan "Deleciones (Del)". Las reacciones y la determinación de la eficiencia de intercambio se llevaron a cabo de la misma manera que el estudio de mismatches, siempre utilizando como control el ADNsc 100% homólogo (EIC = 1).

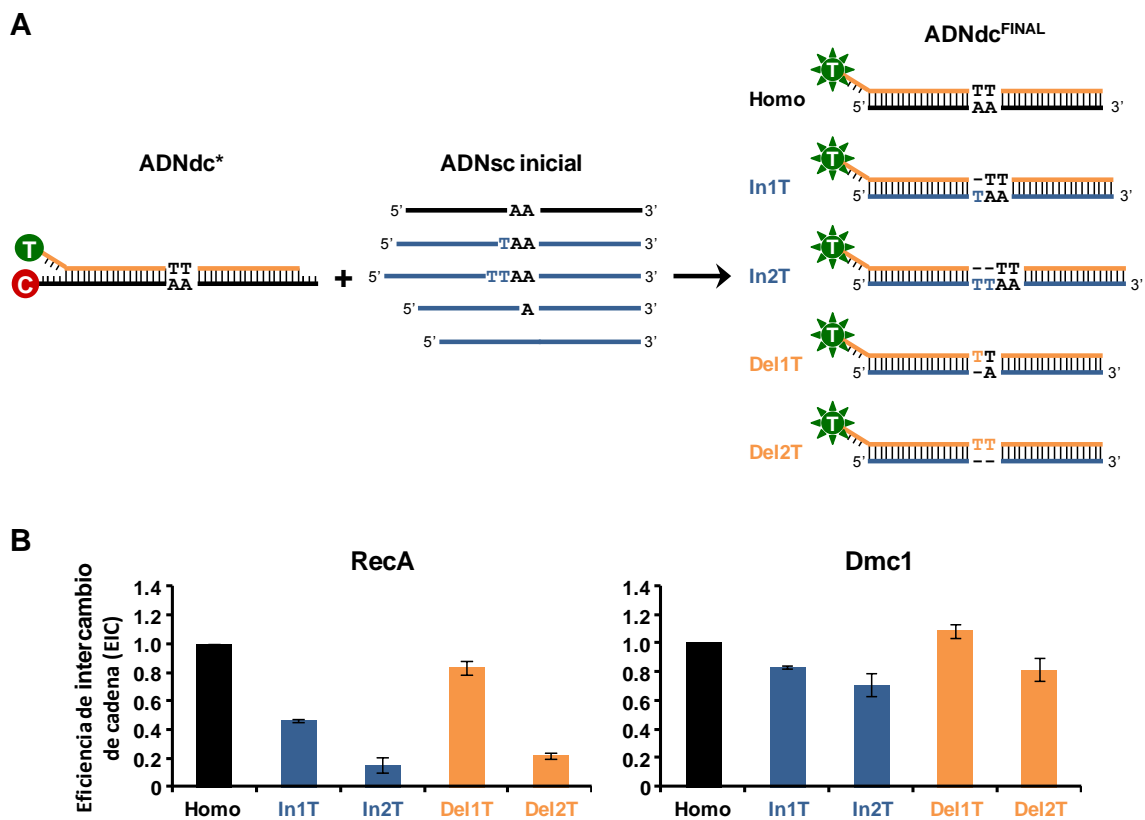


Figura R10. Efecto de pequeñas inserciones y deleciones en el intercambio de cadenas catalizado por recombinasas. (A) Esquema de los sustratos de ADN utilizados. Se muestran las modificaciones en el ADNsc inicial respecto al 100% homólogo (Homo) y los productos de reacción (ADNdc^{FINAL}) conteniendo loops en la hebra del ADNsc inicial (inserción (In), en azul) o en la hebra complementaria marcada con TAMRA (deleción (Del), en naranja). (B) Eficiencia de intercambio de cadena obtenida en las reacciones catalizadas por RecA o Dmc1 en presencia de inserciones/deleciones.

Los resultados obtenidos muestran que RecA fue mucho más sensible que Dmc1 a la presencia de loops y que la sensibilidad de ambas recombinasas aumenta con el tamaño del loop (**Figura R10-B**). Asimismo, se observó mayor inhibición cuando el loop se genera en la hebra del ADNsc inicial (Inserción, en azul), tanto para RecA como para Dmc1.

1.4- Estudios del efecto de Hop2-Mnd1 en el intercambio de cadenas catalizado por la recombinasa eucariota Dmc1.

Tal como se mencionó anteriormente, la recombinasa eucariota Dmc1 es estimulada por proteínas accesorias para llevar a cabo la recombinación *in vivo* e *in vitro* [78]. Estudios previos han demostrado que el heterodímero Hop2-Mnd1 interactúa con Dmc1 e incrementa la eficiencia de intercambio de cadenas *in vitro* cuando se utilizan sustratos de ADN homólogos [103]. Dicho efecto se debe a que Hop2-Mnd1 actúa en dos pasos críticos del proceso de intercambio. Inicialmente, estabiliza el filamento pre-sináptico ADNsc-Dmc1, y luego, facilita la condensación del ADNdc y captura del mismo para la formación del intermediario sináptico triple hebra (ver **Figura I8**, Introducción) [105, 106].

1.4.1- Estudios del efecto de Hop2-Mnd1 en el intercambio de cadenas catalizado por Dmc1 en presencia de mismatches.

Como se observó a lo largo de este trabajo, durante la reacción de intercambio de cadenas la recombinasa eucariota Dmc1 es menos activa y tiene mayor tolerancia a heterologías que las RecA bacterianas. Al presente, se desconoce si la habilidad de recombinasas eucariotas para tolerar mismatches durante el apareamiento e intercambio de cadenas está regulada por proteínas accesorias.

Por lo tanto, con el propósito de determinar si la presencia de Hop2-Mnd1 afecta la capacidad de Dmc1 para discriminar mismatches durante el intercambio de cadenas, se realizaron los ensayos previamente descritos en presencia de Hop2-Mnd1 (**Figura R11**). Inicialmente se llevó a cabo la reacción de intercambio con ADN 100% homólogo para determinar los tiempos y condiciones de reacción óptimas, eligiendo la relación molar 4:1 para Dmc1:Hop2Mnd1 (resultados no mostrados).

Cómo se observa en la **Figura R11**, la presencia de Hop2-Mnd1 aumentó aproximadamente 2 veces los niveles de EIC entre ADN homólogos respecto a la reacción en ausencia de Hop2-Mnd1. Este efecto también fue detectado para ADNsc que genera un mismatch TG en la posición 5' o 3' indicando que el heterodímero estimula el intercambio de cadena catalizado por Dmc1 aún en presencia de un mismatch. Sin embargo, cuando Dmc1 es fuertemente inhibida por la presencia de 3 mismatches TG, Hop2-Mnd1 no fue capaz de revertir esta inhibición (**Figura R11**). Como control se llevó a cabo la reacción de intercambio con Hop2-Mnd1 en ausencia de Dmc1, y se confirmó que el heterodímero no tiene actividad recombinasa por sí sólo. Además, se verificó que Hop2-Mnd1 no estimula el intercambio de cadenas catalizado por la RecA bacteriana, indicando su especificidad por Dmc1 (ver **Figura A4**).

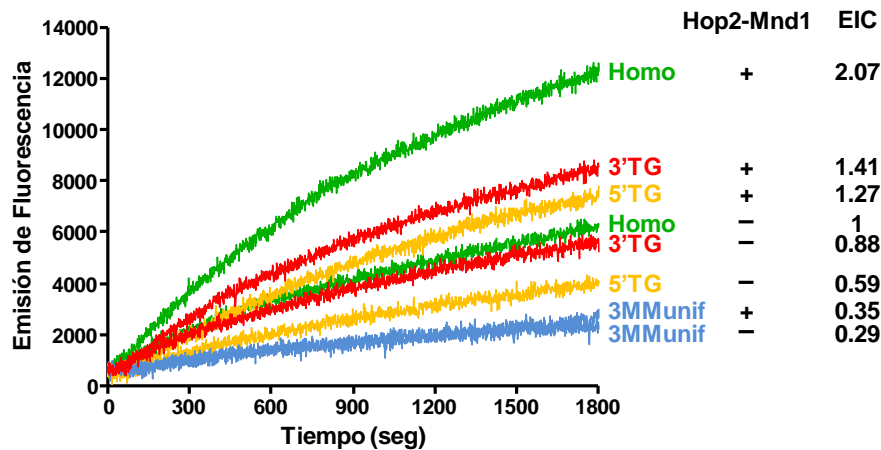


Figura R11. Efecto de Hop2-Mnd1 en el intercambio de cadenas catalizado por Dmc1. Se muestran las cinéticas de las reacciones de intercambio catalizadas por Dmc1 con ADN 100% homólogo o conteniendo mismatches (en el extremo 5' o 3') en presencia o ausencia de Hop2-Mnd1. Se indica la eficiencia de intercambio de cadena (EIC) obtenida para cada reacción. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm. La concentración utilizada fue Dmc1 3 μ M y Hop2-Mnd1 0.75 μ M. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

1.4.2- Análisis de distintas versiones mutadas de Hop2 y Mnd1 sobre el intercambio de cadena catalizado por Dmc1.

El heterodímero Hop2-Mnd1 es una molécula de estructura asimétrica que alberga tres sitios de unión al ADN. Dos de estos sitios se localizan en la región N-terminal de Hop2 y Mnd1 y son importantes para la unión del complejo al ADNdc. El otro sitio se encuentra en la región C-terminal de Hop2 y es el responsable de la unión al ADNsc e importante para estabilizar al filamento pre-sináptico [152].

Para entender en mayor profundidad la función de Hop2-Mnd1 en el proceso de intercambio de cadenas catalizado por Dmc1, se utilizaron cuatro mutantes puntuales en los dominios de unión al ADN (Figura R12-A). En el esquema se muestran los aminoácidos modificados en cada mutante, las cuales ya habían sido caracterizadas estructural y bioquímicamente [152]. Brevemente, la mutación Hop2R176A afecta principalmente la unión al ADNsc mientras que Hop2KYK tiene levemente comprometidas la unión al ADNsc y ADNdc respecto a la proteína salvaje. Por otro lado, la mutación Mnd1RYY afecta considerablemente la unión al ADNdc y la doble mutante Hop2KYK-Mnd1RYY presenta un efecto aditivo. En el mismo trabajo se analizó la formación de D-loop (intermediario de recombinación) catalizado por Dmc1 en geles de agarosa y se determinó que las mutaciones Hop2R176A y Hop2KYK disminuyen la habilidad de Hop2-Mnd1 para estimular dicha reacción mientras que la mutación Mnd1RYY y la doble mutante Hop2KYK-Mnd1RYY tienen un efecto mucho más fuerte al respecto.

En este estudio se analizó la capacidad de las mutantes mencionadas para estimular el intercambio de cadenas catalizado por Dmc1. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R12-B**. Se observó que la mutante Hop2KYK-Mnd1 incrementa la EIC a niveles similares a Hop2-Mnd1 WT. Sin embargo, la mutante Hop2-Mnd1RYY y la doble mutante Hop2KYK-Mnd1RYY no fueron capaces de estimular el intercambio catalizado por Dcm1, indicando que el sitio de unión al ADNdc presente en Mnd1 es importante para esta función del complejo.

Por otro lado, se observó que la mutante Hop2R176A-Mnd1 incrementa la EIC en mayor proporción que la proteína WT (**Figura R21-B**). En este sentido, encontramos que dicha mutante es capaz de llevar a cabo el intercambio de cadenas en ausencia de Dmc1 (**Figura A4**) y esto explica el gran aumento observado en la EIC. Sin embargo, desconocemos las razones por las cuales Hop2R176A-Mnd1 presenta actividad recombinasa por si sola y se necesitarán experimentos adicionales para entenderlo.

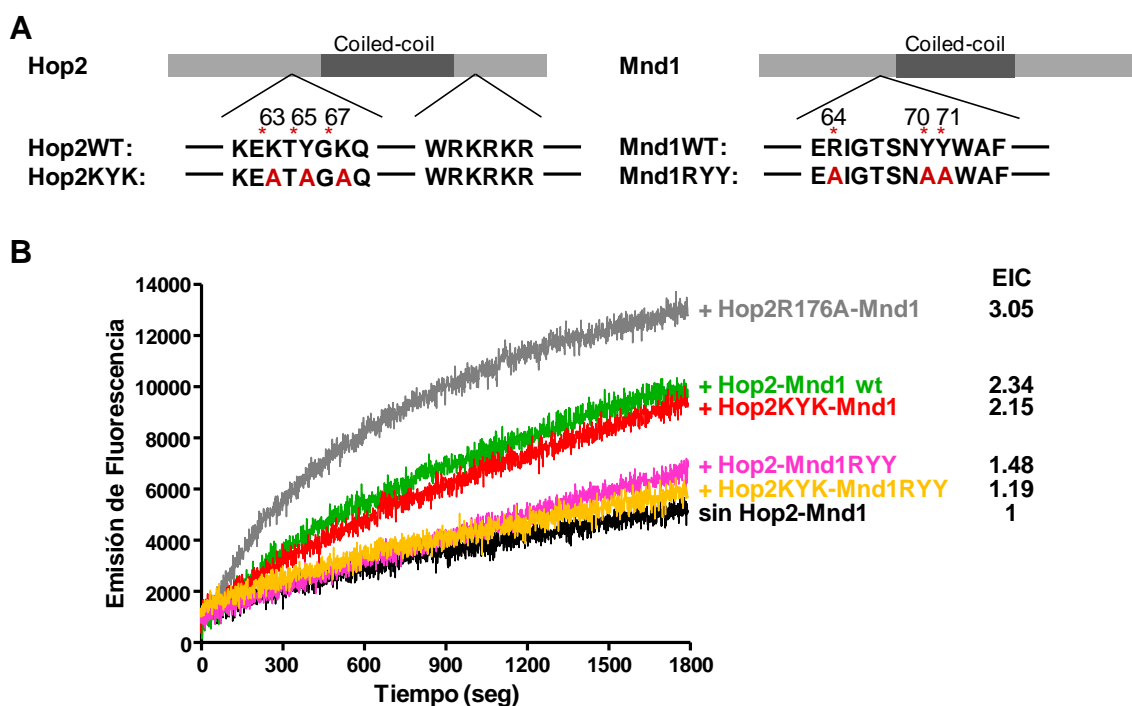


Figura R12. Efecto de mutantes puntuales de Hop2 y Mnd1 en el intercambio de cadenas catalizado por Dmc1. (A) Esquema de las mutantes puntuales de Hop2 o Mnd1 en los dominios de unión al ADN. (B) Cinéticas de las reacciones de intercambio catalizadas por Dmc1 entre secuencias 100% homólogas en presencia de Hop2-Mnd1 wt o mutantes. Se muestra la eficiencia de intercambio de cadena (EIC) obtenida para cada reacción. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm. La concentración utilizada fue Dmc1 2 μ M y Hop2-Mnd1 0.5 μ M.

1.5- Análisis del mecanismo molecular por el cual las recombinasas detectan la presencia de heterologías durante el intercambio de cadenas.

Con el propósito de entender los mecanismos moleculares por los cuales las recombinasas discriminan entre diferentes tipos de bases mal apareadas en el extremo 5', y porqué se observan diferentes efectos cuando un mismo mismatch se encuentra en distintas posiciones (extremo 5' o 3'), llevamos a cabo una serie de ensayos bioquímicos y computacionales que se detallan a continuación.

1.5.1- Temperatura de Fusión del ADNdc conteniendo mismatches.

Para determinar si las diferencias observadas se debían a la estabilidad termodinámica de los dúplex generados durante el intercambio de cadena (ADNdc^{FINAL}), se determinaron las Temperaturas de Fusión (Tf) de dichos dúplex (ADNdc^{FINAL} 100% homólogo y ADNdc^{FINAL} conteniendo diferentes mismatches en distintas posiciones) utilizando el programa informático "MELTING 5" [153, 154]. La Temperatura de fusión (Tf) de una molécula de ADN doble hélice se define como la temperatura a la cual se ha desnaturalizado la mitad del ADN de la muestra y da indicios de la estabilidad termodinámica de dichos dúplex.

Los valores de Temperatura de Fusión obtenidos para cada ADNdc se muestran en la **Tabla R1**. Cabe mencionar que el programa MELTING 5 además brinda valores termodinámicos como Entropía y Entalpía de los dúplex, cuyos valores se muestran en la **Tabla A1** del Anexo. Para facilitar la interpretación de los datos se realizaron gráficos de "EIC vs Temperatura de Fusión". En la **Figura R13-A** se muestra el análisis de los ADNdc^{FINAL} homólogos o conteniendo un mismatch en el extremo 5'. En este caso se analizaron los ADNdc^{FINAL} de los cuatro grupos estudiados anteriormente (12 tipos de mismatches + 4 homólogos) (ver **Figura R6**). Adicionalmente, en la **Figura R13-B** se comparan los valores obtenidos en el extremo 5' o 3' con cuatro tipos de mismatches (TG, GG, CA y AG), cada uno de los cuales corresponde a diferentes grupos.

El análisis de los valores que se muestran en la **Tabla R1** junto a las comparaciones de la **Figuras R13** demuestran que no existe una relación lineal entre la EIC y la Temperatura de Fusión. Por lo tanto, estos resultados indican que el efecto observado entre distintos tipos de mismatches en el extremo 5', como así también las diferencias obtenidas para un determinado mismatch en el extremo 3' o 5', no se debe a la estabilidad termodinámica de los dúplex generados (ADNdc^{FINAL}), sino que sería una propiedad de las recombinasas las cuales son capaces de reconocer o no ciertas heterologías.

Tabla R1. Temperatura de fusión de cada ADNdc^{FINAL} homólogo o conteniendo un mismatch en el extremo 5' o 3' de cada grupo. Se indica también la Eficiencia de intercambio de cadena (EIC) obtenida en las reacciones catalizadas por RecA de *P. aeruginosa* o Dmc1 (Figura R7). La Temperatura de Fusión se obtuvo con el programa informático MELTING 5.

ADNdc ^{FINAL}	Temperatura de Fusión (° C)		Eficiencia de intercambio de cadena			
	5'	3'	RecA		Dmc1	
Tipo de mismatch	5'	3'	5'	3'	5'	3'
TG ¹	73.13	72.93	0.56	0.83	0.55	0.94
TC ¹	71.87	72.03	0.48	0.79	0.59	0.98
TT ¹	71.95	72.26	0.81	0.74	1.16	0.62
GG ²	74.55	74.41	0.22	0.91	0.53	0.89
GA ²	75.11	74.78	0.44	0.97	0.69	1.10
GT ²	74.64	74.71	0.78	0.96	1.00	0.99
CA ³	74.65	74.47	0.24	0.89	0.34	1.16
CC ³	72.80	74.15	0.28	0.91	0.37	1.17
CT ³	74.06	73.88	0.76	0.83	1.13	1.01
AG ⁴	72.09	72.22	0.42	0.93	0.59	0.82
AC ⁴	71.48	71.95	0.52	0.88	0.62	1.02
AA ⁴	71.78	72.60	0.39	0.94	0.56	0.96
Homólogo						
TA ¹		73.99		1		1
GC ²		76.47		1		1
CG ³		76.52		1		1

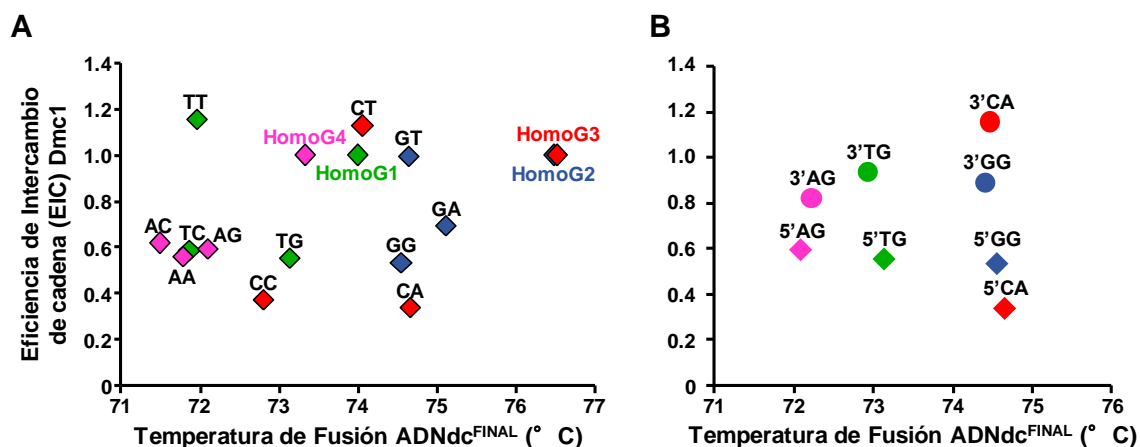


Figura R13. Relación entre la Eficiencia de Intercambio de cadena (EIC) obtenida en la reacción catalizada por Dmc1 con de la Temperatura de Fusión de cada ADNdc^{FINAL} obtenida con el programa informático MELTING 5. (A) Se analizan los ADNdc^{FINAL} de los cuatro grupos, homólogos o conteniendo un determinado tipo de mismatch en el extremo 5'. (B) Se analizan los ADNdc^{FINAL} que contienen un mismatch AG, TG, GG o CA en el extremo 5' o 3'. Cada mismatch corresponde a diferentes grupos, los cuales se indican de diferentes colores. Los valores de la EIC se obtienen de la Figura R7.

1.5.2- Direccionalidad del intercambio de cadena catalizado por RecA y Dmc1.

Un estudio reciente ha postulado que el efecto inhibitorio dado por un mismatch en una determinada posición podría deberse a la direccionalidad del intercambio de cadena catalizado por las recombinasas [108]. Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios respecto al proceso de invasión del ADNsc y la direccionalidad de la reacción de intercambio entre recombinasas procariontas y eucariotas [155]. En este sentido, se ha determinado que RecA de *E. coli* es más invasiva cuando el sustrato ADNsc en el cual forma el filamento tiene el extremo 3' libre [156], aunque paradójicamente la reacción se extendería en dirección 5'-3' [95]. Por otro lado, estudios con la recombinasa eucariota Rad51 mostraron que el sustrato preferido de la misma es el ADN compuesto por ADNdc y ADNsc con cualquier extremo libre (3' o 5') [96], promoviendo la invasión de cadenas con igual eficiencia independientemente del extremo que se encuentre libre. Así, estos resultados explicarían estudios anteriores en los cuales se discutía la direccionalidad del intercambio catalizado por Rad51 [95, 157] y daría indicios de que el intercambio de cadenas puede extenderse en ambas direcciones (5'-3' o 3'-5') [96].

De esta manera, como al momento no se habían llevado a cabo estudios con Dmc1 y RecA de *P. aeruginosa*, quisimos determinar si la direccionalidad de la reacción de intercambio se correlacionaba con el efecto observado por la presencia de un mismatch en las posiciones 5' o 3'. Para ello, se utilizó un ensayo previamente caracterizado para determinar la direccionalidad del intercambio [95] que se basa en el intercambio de cadenas *in vitro* con dos conjuntos de oligonucleótidos (RG1 y RG2) que contienen la mitad del sustrato de ADN rico en AT (71%) y la otra mitad rica en GC (71%), en el extremo 5' o 3' respectivamente (**Figura R14-A**). En estudios previos se determinó que la eficiencia de intercambio entre ADN homólogos es inhibido en proporción directa al contenido GC [113, 158]. De esta manera la comparación de la eficiencia de reacción entre dos oligonucleótidos con diferente contenido GC en las regiones 5' y 3' permite determinar si el intercambio ocurre preferentemente en una dirección o en otra. Así, el filamento pre-sináptico ADNsc-recombinasa fue preformado en el oligonucleótido RG1(-) (extremo 3' conteniendo 71% GC) o en RG2(-) (extremo 5' conteniendo 71% GC) y posteriormente mezclado con el correspondiente dúplex para que ocurra la reacción de intercambio. Los resultados obtenidos se muestran en la **FiguraR14-B**. Se observa claramente que Dmc1 cataliza el intercambio de cadena con mayor eficiencia cuando el contenido rico en GC se localiza en el extremo 5' del ADNsc (RG2). Por el contrario, RecA de *P. aeruginosa* cataliza con mayor eficiencia la reacción cuando el contenido rico en GC se localiza en el extremo 3' (RG1) tal

como se había propuesto anteriormente con RecA de *E. coli* y Rad51 utilizando el mismo ensayo.

Por lo tanto, dichos estudios revelaron que Dmc1 promueve el intercambio en dirección 3'-5', mientras que RecA lo hace preferentemente en dirección 5'-3' (Figura R15-B). En conclusión, estas diferencias indicarían que la direccionalidad no sería una de las causas de la fuerte inhibición observada en la posición 5' con respecto a la posición 3' en la mayoría de los mismatches estudiados con ambas recombinasas.

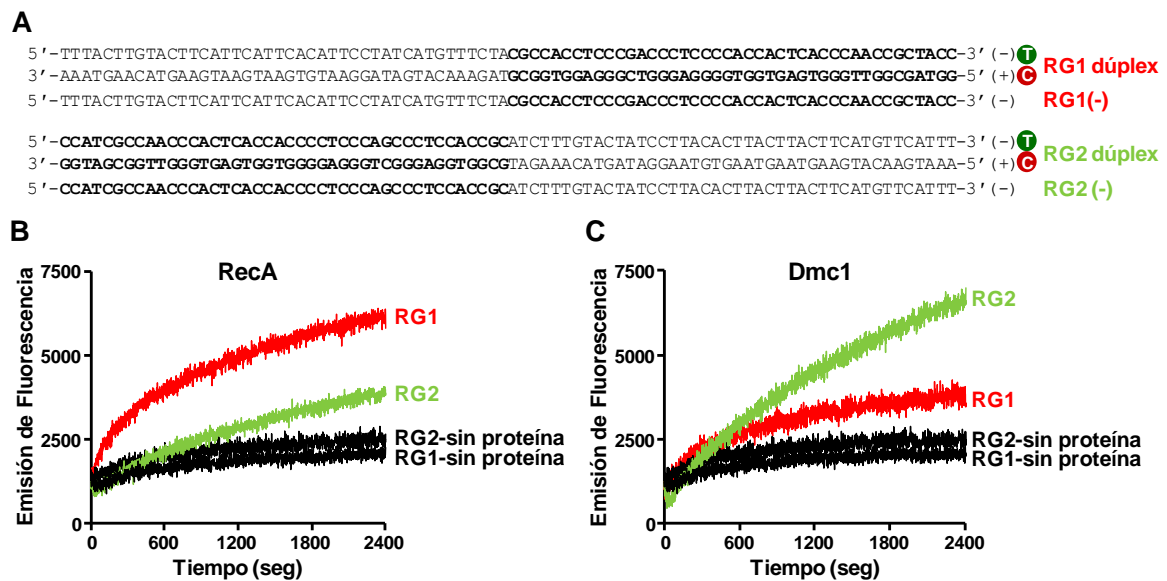


Figura R14. Direccionalidad del intercambio de cadenas catalizado por RecA y Dmc1. (A) Sustratos de ADN utilizados para estudiar la direccionalidad de la reacción de intercambio. Los nucleótidos en negrita indican la región del ADN rica en GC (71%). T: TAMRA, C: Cy5. (B y C) Cinéticas del intercambio de cadenas catalizado por RecA o Dmc1 utilizando el conjunto de oligonucleótidos RG1 o RG2 cuyas secuencias se muestran en A. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm.

1.5.3- Reversibilidad de la reacción de intercambio catalizado por RecA.

El reconocimiento de homología entre moléculas de ADN mediado por recombinasas de la familia RecA involucra cambios conformacionales en el ADN y efectos alostéricos en la proteína que intercambia las cadenas [9, 159, 160]. Por lo tanto, la presencia de mismatches o loops durante la recombinación puede alterar la capacidad de las recombinasas para interactuar con el ADN^{FINAL} en el complejo post-sináptico.

Recientemente se ha demostrado la reversibilidad de la reacción de intercambio de cadenas *in vitro* y se ha postulado que la misma contribuye a la discriminación de heterologías, siendo más reversible cuando más heterologías existen [115]. Dicha reversibilidad se trata de un proceso verdaderamente “inverso”, a partir de la formación

inicial del complejo RecA-ADNdc que interacciona e intercambia cadenas con una molécula de ADNsc [160].

Así, con el propósito de determinar si la reversibilidad era uno de los factores por los cuales las recombinasas discriminan diferentes tipos de mismatches, particularmente en el extremo 5', se llevaron a cabo las reacciones inversas en presencia de RecA de *P. aeruginosa*. El esquema general de la reacción se muestra en la **Figura R15**. Los diferentes ADNdc^{FINAL} utilizados corresponden a los productos finales de las reacciones de intercambio previamente descritas y constan de: el oligonucleótido marcado con TAMRA (oligoTAMRA) + el oligonucleótido no marcado o ADNsc inicial (oligoNO-MARCADO) para generar los ADNdc^{FINAL} homólogos o conteniendo distintos mismatches.

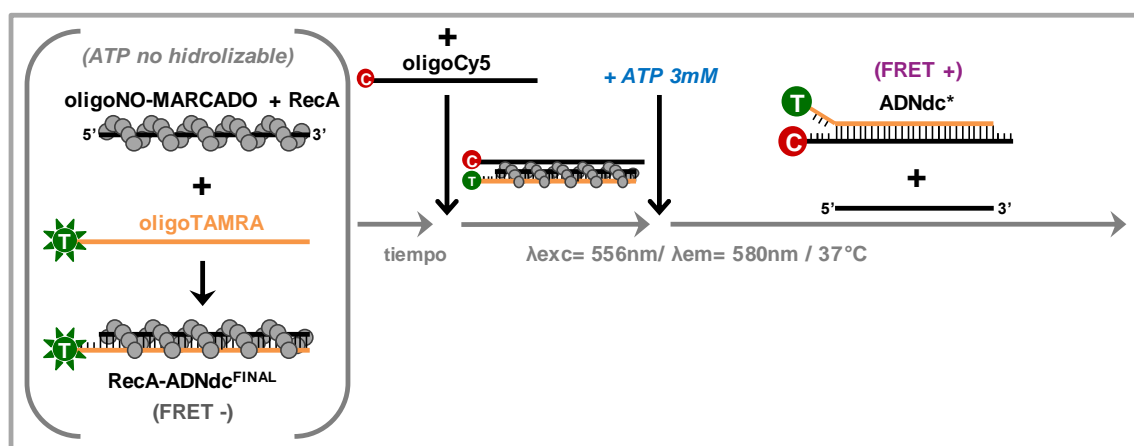


Figura R15. Esquema representativo de las reacciones llevadas a cabo para estudiar la reversibilidad de las reacciones de intercambio catalizadas por RecA. Se utilizaron diferentes "oligoNO-MARCADO" para generar distintos complejos ADNdc^{FINAL}-RecA en presencia o ausencia de mismatches.

Para reproducir las reacciones inversas, en primer lugar se preformaron los complejos RecA-ADNdc^{FINAL} en presencia de ATP no hidrolizable para mantener unido el complejo RecA-ADN. Con este fin, se incubó el oligoNO-MARCADO con RecA para permitir la formación del filamento RecA-ADNsc y luego se agregó el oligoTAMRA para que la recombinasa hibride ambos oligonucleótidos por complementariedad y permanezca unida al ADNdc a través de su sitio I de unión al ADN (por detalles ver Introducción) [160]. Posteriormente, se agregó el ADNsc marcado con Cy5 (oligoCy5) el cual se une al complejo RecA-ADNdc^{FINAL} a través del sitio II de unión al ADN de RecA, generando el complejo triple hebra "ADNdc^{FINAL}-RecA-ADNsc". Por último, se agregó ATP para desplazar al ATP no hidrolizable y permitir que ocurra la reacción inversa y disociación de RecA del ADN. Cuando RecA intercambia el oligoNO-MARCADO por el oligoCy5 se produce un acercamiento entre el par de fluoróforos (FRET+ y disminución en la emisión de fluorescencia de TAMRA). Así, mientras mayor sea la disminución en la emisión de TAMRA

mayor será la reversibilidad de la reacción, y esto podría explicarse por una mayor inestabilidad del complejo RecA-ADNdc^{FINAL} (con o sin mismatches).

Inicialmente se llevaron a cabo las reacciones inversas utilizando como oligoNO-MARCADO el ADN homólogo (Homo), heterólogo y otro que genera 3 mismatches TG distribuidos uniformemente (3MMunif) en presencia de RecA de *P. aeruginosa*.

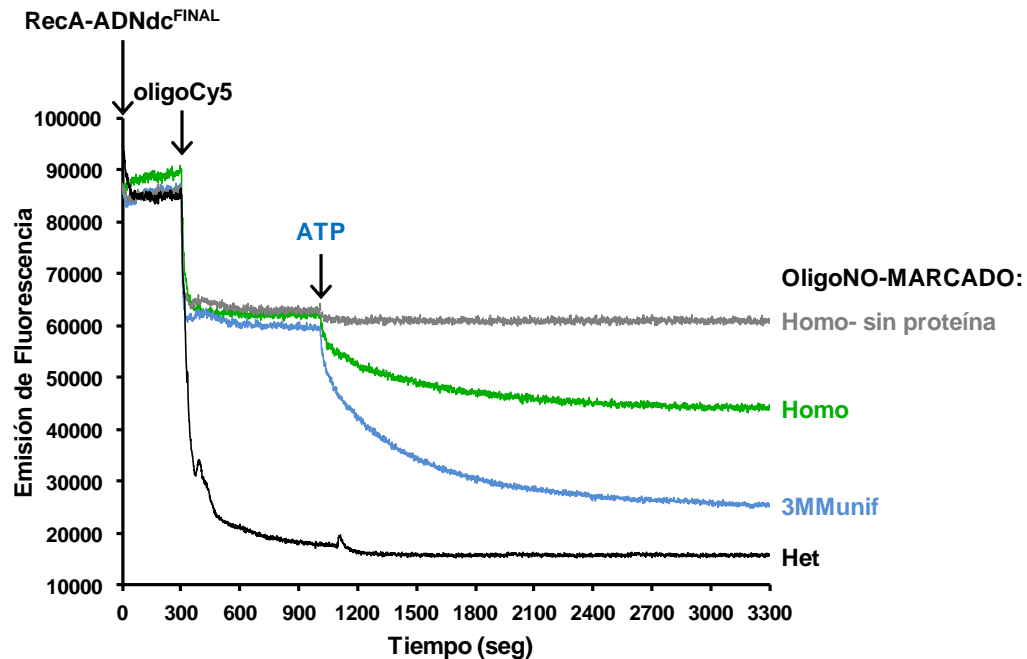


Figura R16. Reacciones de reversión utilizando como oligoNO-MARCADO el ADNsc 100% homólogo (Homo) en presencia o ausencia de RecA; el ADNsc que genera 3 mismatches distribuidos uniformemente (3MMunif) y el ADNsc heterólogo (Het). λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm.

En la **Figura R16** se muestran las reacciones inversas en función del tiempo. Se observa que en las reacciones con el ADN homólogo o conteniendo 3 mismatches hay una disminución en la intensidad de fluorescencia del TAMRA al agregar el oligoCy5 que se debe, por un lado, a la coexistencia de ambos fluoróforos en la misma mezcla de reacción y por otro lado a la hibridación del oligoTAMRA libre (ADNsc) con el oligoCy5 (ver **Figura A5**, Anexo). Cuando se agrega el ATP ocurre la reacción inversa y se observa que la disminución en la intensidad de fluorescencia es mucho mayor cuando el ADNdc^{FINAL} contiene 3 mismatches que cuando el ADNdc^{FINAL} es 100% homólogo, lo cual indicaría que la reversibilidad de la reacción es mayor en presencia de mismatches. Al analizar el ADN heterólogo (60% divergencia, 28 mismatches) se observa una gran disminución en la intensidad de fluorescencia inmediatamente después del agregado del oligoCy5 (**Figura R16**) indicando que todo el oligoCy5 se hibrida con el oligoTAMRA para formar el ADNdc* (FRET +). Este efecto se debería a que el complejo RecA-ADNdc^{FINAL} no se forma cuando el oligoNO-MARCADO es heterólogo ya que la falta de complementariedad con el oligoTAMRA

impide que la recombinasa se una a ambas cadenas de ADN por el mismo sitio, impidiendo de esta manera que se hibriden entre sí. Por lo tanto, todo el oligoTAMRA queda libre (ADNsc) y al agregar el oligoCy5 RecA acerca oligoTAMRA/oligoCy5 uniéndolos a través de su sitio I y permitiendo el apareamiento de ambos oligonucleótidos y la formación del ADNdc* homólogo (FRET +).

Posteriormente, se llevó a cabo el mismo tipo de análisis con los oligonucleótidos del grupo 1 (mismatches TG, TC o TT), utilizando aquellos que generaban un mismatch en el extremo 5' o 3'. Los resultados obtenidos con los mismatches en el extremo 5' muestran una mayor reversibilidad para mismatches TC y TG y menor reversibilidad para el mismatch TT y el ADN homólogo (**Figura R17-A**). Estos resultados indican que la reversibilidad de la reacción es inversamente proporcional a la EIC obtenida durante la reacción directa (ver **Figura R7**), es decir, a mayor inhibición del intercambio de cadena se observa mayor reversibilidad. Por otro lado, en el caso de los mismatches en el extremo 3', que prácticamente no inhibían la reacción de intercambio y la eficiencia era similar entre diferentes tipos de mismatches, se observa una reversibilidad levemente mayor que la del ADN homólogo y similar entre TC, TG y TT (**Figura R17-B**).

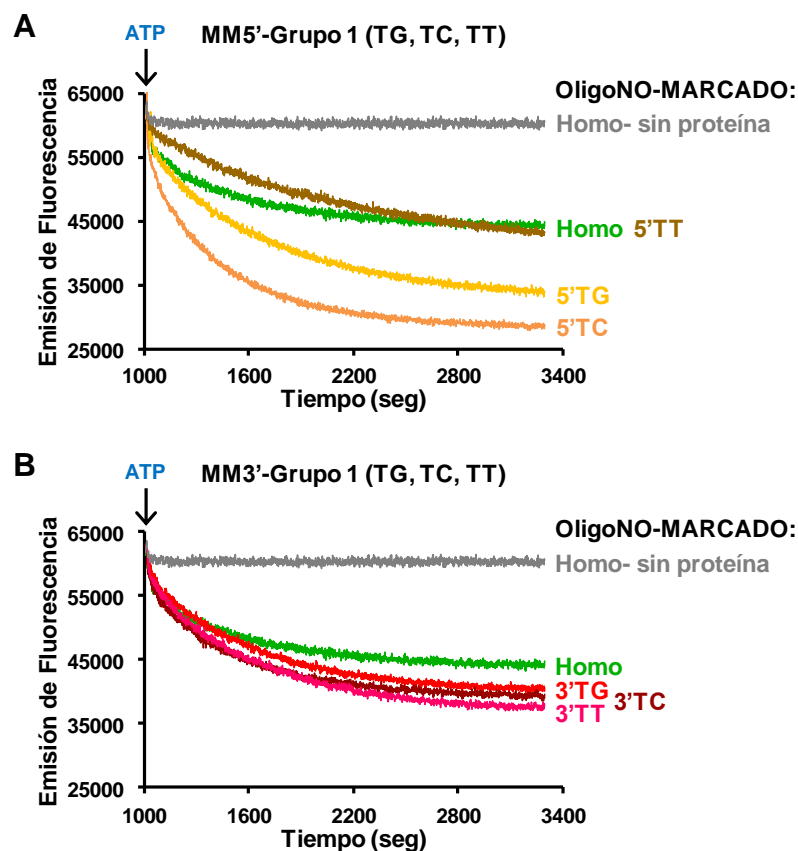


Figura R17. Reacciones de reversión utilizando los oligonucleótidos del grupo 1. Se utilizó el oligoNO-MARCADO 100% homólogo (Homo) en presencia o ausencia de RecA y los que generan 1 mismatch (TG, TC o TT) en el extremo 5' (**A**) o 3' (**B**). Se muestran las mediciones de fluorescencia a partir del agregado de ATP ($t=1000$ seg) (ver esquema **Figura R16**). λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm.

Adicionalmente, y para corroborar que la relación entre la EIC obtenida y la reversibilidad del proceso no era sólo una propiedad de los mismatches del grupo 1, se llevó a cabo el mismo análisis con los oligonucleótidos del grupo 3 (mismatches CT, CC y CA) en el extremo 5'. Como se muestra en la **Figura R18**, se observó mayor disminución en la emisión de fluorescencia con los mismatches CC y CA y menor disminución con el mismatch CT. Por lo tanto, estos resultados demuestran una vez más que la reversibilidad es inversamente proporcional a la EIC obtenida durante la reacción directa (ver **Figura R7**).

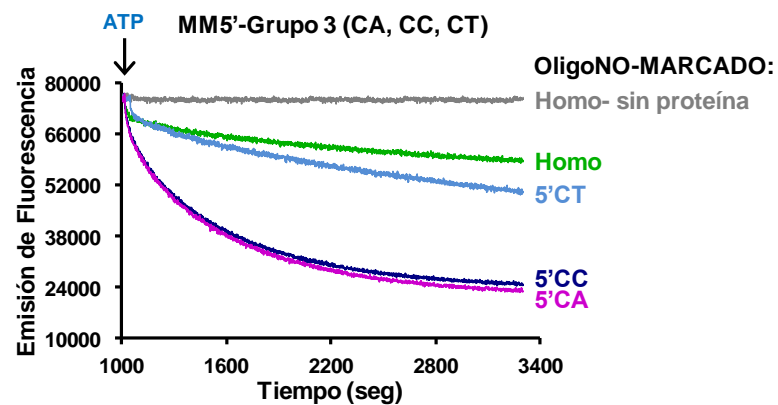


Figura R18. Reacciones de reversión utilizando los oligonucleótidos del grupo 3. Se utilizó el oligoNO-MARCADO 100% homólogo (Homo) en presencia o ausencia de RecA y los que genera 1 mismatch (CA, CC o CT) en el extremo 5'. Se muestran las mediciones de fluorescencia a partir del agregado de ATP (t=1000 seg) (ver esquema **Figura R16**). λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm.

CAPITULO 2. ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN EN *P. aeruginosa* MEDIANTE ENSAYOS *IN VIVO*. FUNCIÓN DEL MRS Y DE GENES INVOLUCRADOS EN RECOMBINACIÓN.

Si bien la etapa central del proceso de recombinación homóloga es el intercambio entre moléculas de ADN, catalizado por recombinasas de la familia RecA, se trata de un proceso complejo que involucra una gran cantidad de proteínas y complejos proteicos en estadios iniciales y finales de la recombinación. De esta manera, la eficiencia de recombinación dependerá del tamaño y grado de identidad que comparten las moléculas de ADN que recombinan y de las proteínas y mecanismos celulares encargados de llevar a cabo las distintas etapas del proceso. Adicionalmente, la recombinación homóloga es revisada por las proteínas del MRS. Así, cuando existe divergencia entre las secuencias que recombinan, la acción de MutS y MutL constituye la mayor barrera para dichos eventos de recombinación.

Aunque el proceso de recombinación ha sido estudiado en *E. coli*, al presente no se han realizado estudios de recombinación genética y su modulación por el MRS en *P. aeruginosa* ni en otras especies del género *Pseudomonas*. Asimismo, *P. aeruginosa* constituye un modelo interesante para la investigación del MRS dado que el mecanismo general del mismo presenta más similitud con eucariotas que con *E. coli*. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente capítulo se llevó a cabo el estudio de la recombinación genética entre secuencias homólogas u homeólogas en cepas de *P. aeruginosa* deficientes en genes involucrados en recombinación (*recA*, *recG*, *recF*, *recQ* y *recJ*) y en el MRS (*mutS*, *mutL* y *uvrD*), para comprender el rol de dichos genes en la regulación del proceso de recombinación entre secuencias de ADN divergentes. Con tal fin, se construyó en primer lugar un sistema que permite cuantificar los procesos de recombinación homóloga y homeóloga en bacterias Gram-negativas.

2.1- Construcción de un sistema para medir recombinación homóloga y homeóloga en bacterias Gram-negativas.

Se diseñó y construyó un sistema plasmídico que permitió medir la recombinación homóloga y homeóloga en *P. aeruginosa*. Dicho sistema contiene dos copias contiguas no funcionales del gen *lacZ* de *E. coli* separadas por una region espaciadora de 615 pb que contiene el terminador transcripcional T7 (Figura R19). Una de las copias posee una delección en la región C-terminal (*LacZ*ΔC) y otra una delección N-terminal (*LacZ*ΔN). Se han realizado dos construcciones: una en la que ambos fragmentos del gen *lacZ* comparten una

región de solapamiento de 1.26 kb con homología del 100% y otra en que la homología de esta región es del 95%, de tal manera de medir la recombinación homóloga y homeóloga. Hacia la región 3' de LacZ Δ N se encuentra un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a gentamicina. Asimismo, la expresión del sistema está bajo el control del promotor inducible *P_{tac}* y el represor LacI, por lo cual la expresión de los genes se produce en presencia de IPTG. De este modo, cuando ocurre un evento de recombinación simple entre las regiones de solapamiento se reconstituye el gen *lacZ* funcional y se elimina la región espaciadora que contiene el terminador transcripcional, permitiendo la expresión del gen de resistencia a gentamicina (ver **Figura R19**).

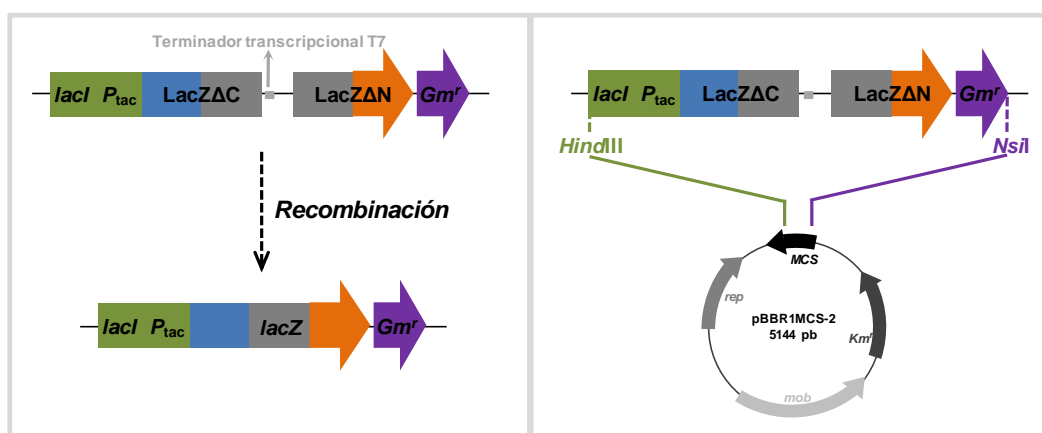


Figura R19. Sistema plasmídico para determinar la recombinación del gen *lacZ* in vivo.

Las regiones de solapamiento (1.26 kb) en LacZ Δ C y LacZ Δ N se indican en color gris. Los elementos que se grafican corresponden a: gen *lacI*, codifica la proteína represora Lac I; *P_{tac}*, promotor inducible; gen *lacZ*, codifica la enzima β -galactosidasa; gen *Gm^r*, gen que confiere resistencia a gentamicina. El sistema se expresa sólo en presencia de IPTG ya que el represor Lac I disminuye su afinidad por la región operadora permitiendo la transcripción a partir del promotor *P_{tac}*. Para una descripción detallada del sistema ver el texto.

Tanto el sistema de recombinación homólogo como homeólogo fueron subclonados en el plásmido pBBR1MCS-2 (**Figura R19**), que puede ser utilizado en diferentes especies de bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bordetella* spp., *Brucella* spp.; *Rhizobium meliloti*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, entre otras) [161] lo cual brinda la oportunidad de estudiar este proceso en varias especies bacterianas. Además, la presencia de dicho sistema en plásmido le otorga una amplia versatilidad y fácil manipulación ya que puede ser utilizado en gran cantidad de cepas silvestres y mutantes sin la necesidad de introducirlo al cromosoma.

Así, cuando el plásmido es introducido en bacterias Gram-negativas, se pueden seleccionar en presencia de IPTG y gentamicina aquellas células donde se llevó a cabo el proceso de recombinación y se puede calcular la tasa o frecuencia de recombinación mediante el recuento de células resistentes a dicho antibiótico. Además, el evento de

recombinación se puede confirmar mediante el ensayo de actividad β -galactosidasa *in situ* en presencia del sustrato X-Gal (Figura R20-A). Asimismo, se puede llevar a cabo el análisis molecular por tratamiento del plásmido (recombinado o no recombinado) con enzimas de restricción ya que el mismo deberá presentar una deleción de 1.87 kb (Figura R20-B) lo cual se ve reflejado en la desaparición de la banda de 4.37 kb y aparición de una banda de 2.48 kb en clones recombinantes (resistentes a gentamicina) (líneas 3 y 4, Figura R20-C).

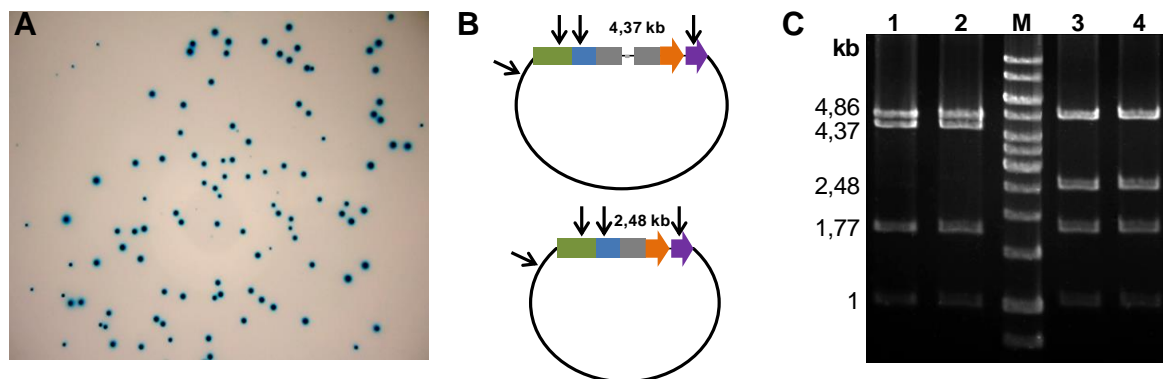


Figura R20. Análisis fenotípico y molecular utilizando el sistema de recombinación del gen *lacZ*. (A) Visualización de colonias azules en cápsulas de petri de LB-agar en presencia de X-Gal indicando actividad β -galactosidasa y reconstitución del gen *lacZ*. (B) Esquema representativo de los plásmidos no recombinado (arriba) y recombinado (abajo) en los cual se indican los sitios *EcoRV* y la región que identifica a cada uno. (C) Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos digeridos con *EcoRV*. Los plásmidos fueron purificados de células no recombinantes (sensibles a gentamicina) (líneas 1 y 2) y de células recombinantes (resistentes a gentamicina) (líneas 3 y 4). M: marcador de peso molecular 1Kb leader.

2.1.2- Determinación de la tasa de recombinación en cepas de *E. coli* silvestre y deficientes en *mutS* y *recA*.

En primer lugar, se verificó el funcionamiento del sistema de recombinación en la bacteria *E. coli*. Cabe mencionar que la determinación de la recombinación homóloga y homeóloga en *E. coli* había sido previamente estudiada utilizando un sistema similar al que construimos en este trabajo, que consta de las mismas regiones del gen *lacZ* (región recombinante), pero que tiene otros métodos de selección y se incorpora en el cromosoma de la cepa bacteriana que se quiere estudiar [127].

En nuestro estudio, se utilizaron las cepas de *E. coli* salvaje (wt) y deficientes en *mutS* y *recA*, las cuales fueron transformadas con los plásmidos que contenían el sistema de recombinación homólogo u homeólogo (con homología de 100% y 95% respectivamente). Luego, se determinó la tasa de recombinación mediante el recuento de células resistentes a gentamicina y de células totales. Para ello, se llevó a cabo un análisis de fluctuación, que consiste en determinar la distribución del número de recombinantes en cultivos paralelos utilizando el método “MSS de máxima probabilidad” (MSS Maximum-Likelihood Method)

[162] que eficientemente conjuga la distribución de Luria-Delbrück y Lea-Coulson. Para el cálculo del valor de la tasa y sus respectivos intervalos de confianza se utilizó el programa informático *Salvador* [163]. Así, la tasa de recombinación tiene en cuenta el número de eventos de recombinación que se producen por división celular.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R21** y **Tabla R2**. Se observa que la recombinación homeóloga es ~ 216 veces menor respecto a la homóloga en la cepa *E. coli* wt, mientras que dicha diferencia no se observa en la cepa *E. coli mutS*, en la cual aumenta considerablemente la tasa de recombinación homeóloga (diferencia relativa en la tasa de recombinación homeóloga respecto a la wt = 44.52). Por otro lado, los resultados obtenidos con la cepa de *E. coli* deficiente en el gen *recA* muestran una fuerte disminución en la tasa de recombinación homóloga y homeóloga. Los diferencias relativas entre dicha mutante y la cepa wt isogénica indican que el 99% de los eventos de recombinación homóloga y el 95% de los eventos de recombinación homeóloga en *E. coli* wt ocurren por una vía dependiente de RecA.

Tabla R2: Tasa de Recombinación en *E. coli*

Cepa <i>E. coli</i>	Tasa Recomb. <i>Homóloga</i>	Intervalos de Confianza (95%)	N	Tasa Recomb. <i>Homeóloga</i>	Intervalos de Confianza (95%)	N	Homo/Homeo ^a	Homo ^b cepa/wt	Homeo ^c cepa/wt
wt	3.64×10^{-4}	$(2.70; 4.60) \times 10^{-4}$	12	1.68×10^{-6}	$(1.35; 2.00) \times 10^{-6}$	12	216.7	1	1
<i>mutS</i>	3.96×10^{-4}	$(2.88; 5.14) \times 10^{-4}$	12	7.48×10^{-5}	$(6.10; 8.89) \times 10^{-5}$	12	5.3	1.09	44.52
<i>recA</i>	1.25×10^{-6}	$(1; 1.50) \times 10^{-6}$	12	8.41×10^{-8}	$(6.70; 10) \times 10^{-8}$	12	14.9	0.0034	0.05

^a Relación entre la tasa de recombinación homóloga y homeóloga de un misma cepa

^b Tasa de recombinación homóloga de diferentes cepas mutantes respecto a la wt

^c Tasa de recombinación homeóloga de diferentes cepas mutantes respecto a la wt

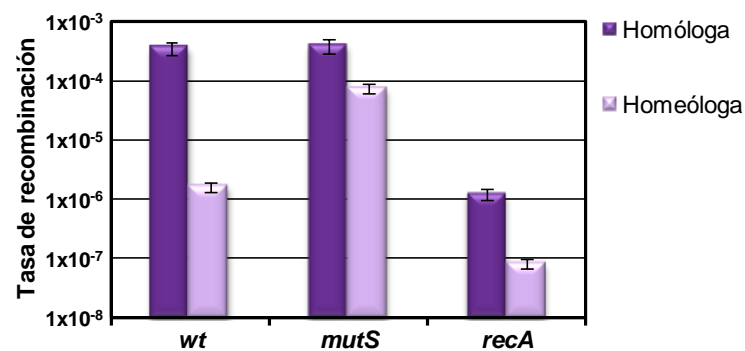


Figura R21. Tasa de recombinación homóloga y homeóloga de cepas wt, *mutS* y *recA* de *E. coli*. Las barras de error indican los Intervalos de Confianza del 95%. Ver valores en Tabla R2.

Si bien con nuestro sistema de recombinación plasmídico se determinó tasa de recombinación y con el sistema cromosomal se midió frecuencia de recombinación [127], las relaciones entre recombinación homóloga y homeóloga en una misma cepa de *E. coli*, como así también las diferencias relativas de las mutantes analizadas respecto a la cepa wt, son muy similares aunque se utilicen diferentes sistemas de medición. Por lo tanto, estos

resultados confirman la confiabilidad del sistema plasmídico construido para medir recombinación homóloga y homeóloga en distintas cepas mutantes y estudiar el rol de diferentes proteínas en la regulación de la recombinación entre secuencias de ADN divergentes.

2.2- Determinación de la recombinación homóloga y homeóloga en cepas de *P. aeruginosa* deficientes en genes involucrados en recombinación.

Una de las principales razones por la cual se construyó el sistema de recombinación en plásmido fue para medir la recombinación en *P. aeruginosa*, ya que al presente no se habían realizado estudios de recombinación genética en esta bacteria.

Inicialmente, quisimos determinar el grado de dependencia de dicho sistema con la proteína RecA de *P. aeruginosa*, para lo cual se determinó la tasa de recombinación homóloga y homeóloga en una cepa salvaje (wt) y deficiente en *recA*. Con ese fin, se introdujo el plásmido que contenía el sistema de recombinación en cada cepa (con homología de 100% o 95% respectivamente) y se calculó la tasa de recombinación tal como se detalló anteriormente para *E. coli*.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R22**, en la cual se observa una disminución de la recombinación en una cepa *recA* respecto a la wt (de ~ 57 veces cuando las repeticiones son homólogas y ~ 2 veces cuando son homeólogas). Se calcularon además las diferencias relativas de recombinación homóloga y homeóloga entre dichas cepas, considerando los valores obtenidos para la cepa wt como "1" (**Tabla R3**). Este análisis indica que durante la recombinación homóloga el 98% de los eventos ocurren por un mecanismo dependiente de RecA, mientras que durante la recombinación homeóloga el 50% ocurre vía RecA y el otro 50% por un mecanismo independiente de RecA. Por lo tanto, esto indicaría que existe una fracción importante de recombinación homeóloga que se llevaría a cabo por una vía independiente de RecA.

Tal como se mencionó anteriormente, si bien RecA es la proteína más importante del proceso de recombinación homóloga, necesita de otras proteínas que procesan el ADN y facilitan la unión de RecA al ADN simple cadena. Por otro lado, existen otras proteínas encargadas de resolver los intermediarios de recombinación para finalizar dicho proceso. Por lo tanto, quisimos determinar si algunas de estas proteínas, estudiadas previamente en *E. coli* e involucradas en el proceso de recombinación homóloga (ver **Figura I3**, Introducción) cumplían algún rol importante durante la recombinación entre secuencias de ADN divergentes en *P. aeruginosa*. Así, se midió la tasa de recombinación homóloga y

homeóloga en cepas deficientes en los genes *recG*, *recQ* y *recJ*, provistas por el Centro Genómico de la Universidad de Washington (ver **Tabla M1**, Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R22** y **Tabla R3**.

Tabla R3: Tasa de Recombinación en *P. aeruginosa*

Cepa MPAO	Tasa Recomb. Homóloga	Intervalos de Confianza (95%)	N	Tasa Recomb. Homeóloga	Intervalos de Confianza (95%)	N	Homo/Homeo ^a	Homo ^b cepa/wt	Homeo ^c cepa/wt
wt	3.98×10^{-5}	$(2.94; 5.07) \times 10^{-5}$	12	6.94×10^{-7}	$(5.05; 8.9) \times 10^{-7}$	10	57.3	1	1
<i>recA</i>	8.00×10^{-7}	$(5.22; 11.1) \times 10^{-7}$	10	3.48×10^{-7}	$(2.25; 4.9) \times 10^{-7}$	10	2.3	0.02	0.50
<i>regG</i>	6.00×10^{-6}	$(3.89; 8.32) \times 10^{-6}$	9	6.76×10^{-7}	$(4.7; 8.98) \times 10^{-7}$	10	8.9	0.15	0.97
<i>recQ</i>	7.93×10^{-5}	$(6.45; 9.35) \times 10^{-5}$	9	9.68×10^{-6}	$(7.6; 11.7) \times 10^{-6}$	9	8.2	1.99	13.95
<i>recJ</i>	6.08×10^{-5}	$(3.44; 9.87) \times 10^{-5}$	11	3.49×10^{-6}	$(2.54; 4.50) \times 10^{-6}$	12	17.4	1.53	5.03

^a Relación entre la tasa de recombinación homóloga y homeóloga de un misma cepa

^b Tasa de recombinación homóloga de diferentes cepas mutantes respecto a la wt

^c Tasa de recombinación homeóloga de diferentes cepas mutantes respecto a la wt

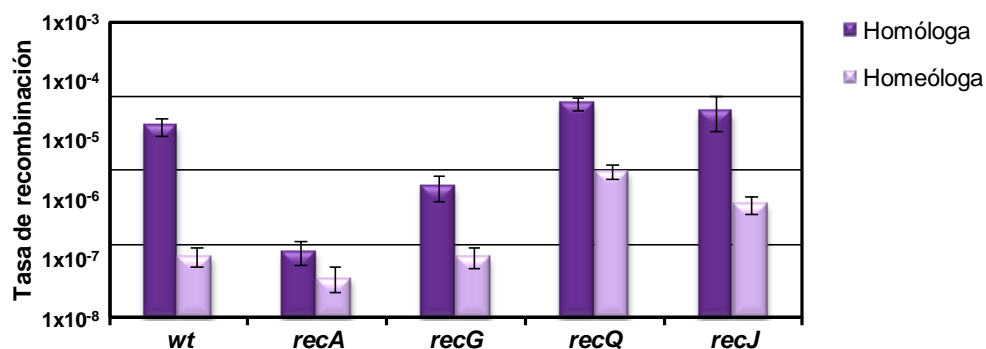


Figura R22. Tasa de recombinación homóloga y homeóloga en cepas de *P. aeruginosa* deficientes en genes involucrados en recombinación. Las barras de error indican los Intervalos de Confianza del 95%. Ver valores en **Tabla R3**

En primer lugar se analizó la cepa MPAO1 deficiente en el gen *recG*, el cual codifica para la helicasa RecG que está involucrada en estadios finales de la recombinación homóloga catalizando la conversión de las uniones de Holliday y ayudando al complejo RuvAB a finalizar el proceso de recombinación (ver **Figura I3**, Introducción). Dicha cepa mostró una disminución de la recombinación homóloga respecto a la cepa wt de ~ 6.6 veces, mientras que la tasa de recombinación homeóloga no se vio prácticamente modificada. Las diferencias relativas entre ambas cepas indican que la proteína RecG es necesaria para que ocurra el 85% de los eventos de recombinación homóloga en una cepa wt, mientras que sólo un 3% de los eventos de recombinación homeóloga involucran a dicha proteína.

Posteriormente se estudió la función de las proteínas RecQ (helicasa 3'-5') y RecJ (exonucleasa 5'-3') de *P. aeruginosa* durante la recombinación homóloga y homeóloga. Dichas proteínas están involucradas en la vía RecFOR y actúan en estadios iniciales de la recombinación, procesando el ADN dañado y permitiendo la unión de RecA al ADNsc (ver **Figura I3**, Introducción). Recientemente se ha determinado que RecJ y RecQ también

participan en estadios finales interviniendo en la resolución de los intermediarios de recombinación [74].

Cómo se muestra en la **Figura R22** y **Tabla R3**, la recombinación homóloga prácticamente no se ve afectada en las cepas deficientes en *recQ* y *recJ* en comparación a su wt isogénica. Por otro lado, se observó un aumento de la recombinación homeóloga en dichas mutantes con respecto a la wt, principalmente en la cepa deficiente en *recQ*. Así, estos resultados podrían sugerir algún rol de dichas proteínas en la regulación de la recombinación entre secuencias de ADN divergentes en *P. aeruginosa*.

2.3- Rol de las proteínas del MRS de *P. aeruginosa* en la regulación de la recombinación homeóloga.

Actualmente, se encuentra claramente establecido que la alteración en el funcionamiento de cualquiera de las proteínas del MRS resulta en un incremento en la tasa de mutaciones espontáneas y recombinación entre secuencias de ADN divergentes, tanto en bacterias como en eucariotas [110, 130, 164, 165]. Estudios *in vivo* en *E. coli* han determinado que el aumento de la recombinación homeóloga por inactivación del MRS ocurre tanto en la recombinación dependiente como independiente de RecA (recombinación ilegítima) [130]. Además, dichos estudios muestran que mientras MutS y MutL son potentes inhibidores de la recombinación homeóloga, MutH y la helicasa UvrD serían menos importantes en dicho proceso [125, 126, 164].

En los últimos años, nuestro laboratorio ha trabajado en la caracterización de las proteínas MutS y MutL de *P. aeruginosa* con respecto al funcionamiento del MRS en la reparación de errores posreplicativos y se han establecido diferencias importantes con el MRS de *E. coli* y algunas similitudes con eucariotas [124, 139]. Así, estos antecedentes y la falta de conocimiento del funcionamiento del MRS en la inhibición de la recombinación homeóloga en *P. aeruginosa* lo hacen interesante para su estudio.

2.3.1- Determinación de la tasa de recombinación en cepas de *P. aeruginosa* silvestre y deficientes en *mutS*, *mutL* y *uvrD*.

Para determinar el rol del MRS de *P. aeruginosa* en la regulación del proceso de recombinación de secuencias de ADN divergentes se introdujo el sistema de recombinación homólogo y homeólogo (con homología de 100% y 95% respectivamente) en cepas de *P. aeruginosa* salvajes (wt) y mutantes *mutS*, *mutL* y *uvrD* y se determinó la tasa de recombinación tal como se describió previamente.

Los resultados obtenidos indican que la recombinación homeóloga es ~ 57.3 veces menor respecto a la homóloga en la cepa wt (**Figura R23** y **Tabla R4**). Esta diferencia no se observa en las cepas mutantes *mutS*, *mutL* y *uvrD* indicando que la disminución en la recombinación homeóloga observada en la cepa wt se debe a la actividad inhibitoria de las proteínas del MRS.

En la **TablaR4** se muestran las relaciones entre recombinación homóloga y homeóloga de una misma cepa como así también las diferencias relativas de cada mutante con la salvaje. Dichos valores dejan en evidencia el gran aumento que existe en la recombinación homeóloga en las cepas mutantes, principalmente en aquellas deficientes en *mutL* y *uvrD*. Sorprendentemente, también se observó un leve aumento en la tasa de recombinación homóloga de las mutantes del MRS con respecto a la cepa wt.

Tabla R4: Tasa de Recombinación en *P. aeruginosa*

Cepa MPAO	Tasa Recomb. Homóloga	Intervalos de Confianza (95%)	N	Tasa Recomb. Homeóloga	Intervalos de Confianza (95%)	N	Homo/Homeo ^a	Homo ^b cepa/wt	Homeo ^c cepa/wt
wt	3.98×10^{-5}	$(2.94; 5.07) \times 10^{-5}$	12	6.94×10^{-7}	$(5.05; 8.9) \times 10^{-7}$	10	57.3	1	1
<i>mutS</i>	6.63×10^{-5}	$(4.69; 8.74) \times 10^{-5}$	9	1.32×10^{-5}	$(0.97; 1.69) \times 10^{-5}$	9	5	1.67	19.02
<i>mutL</i>	2.69×10^{-4}	$(2.03; 3.33) \times 10^{-4}$	9	1.76×10^{-4}	$(1.37; 2.1) \times 10^{-4}$	6	1.5	6.76	253.6
<i>uvrD</i>	2.03×10^{-4}	$(1.76; 2.27) \times 10^{-4}$	12	7.39×10^{-5}	$(6.29; 8.34) \times 10^{-5}$	9	2.7	5.10	106.48

^a Relación entre la tasa de recombinación homóloga y homeóloga de un misma cepa

^b Tasa de recombinación homóloga de diferentes cepas mutantes respecto a la wt

^c Tasa de recombinación homeóloga de diferentes cepas mutantes respecto a la wt

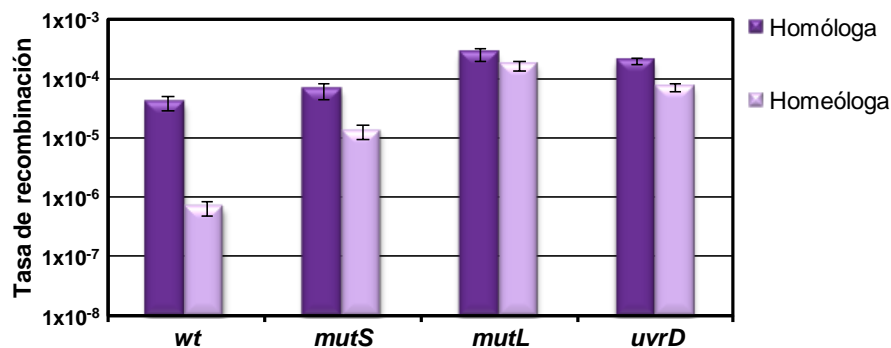


Figura R23. Tasa de recombinación homóloga y homeóloga de cepas wt, *mutS*, *mutL* y *uvrD* de *P. aeruginosa*. Las barras de error indican los Intervalos de Confianza del 95%. Ver valores en Tabla R4.

2.3.2- Determinación de los sitios de intercambio de cadena durante la recombinación homeóloga en cepas silvestre y deficiente en *mutS*.

En aquellos clones en los que ocurre la recombinación homeóloga se puede utilizar la secuencia de nucleótidos de la región de solapamiento para delimitar las posiciones aproximadas del inicio de intercambio de cadenas (ver alineamiento entre secuencia de nucleótidos en **Figura A6**, Anexo). En la **Figura R24** se esquematiza la región de solapamiento y las 64 posibles bases mal apareadas (mismatches, en colores) que se pueden generar durante el apareamiento entre secuencias de ADN divergentes (LacZ Δ C y LacZ Δ N).

De este modo, con el fin de analizar cómo el proceso de recombinación está regulado por el MRS a nivel molecular se amplificó por PCR la región de solapamiento del gen *lacZ* de una colección de clones wt y *mutS* recombinantes (resistentes a gentamicina) y se determinó la secuencia de nucleótidos de los mismos. En la parte superior de la **Figura R24**, con líneas continuas y punteadas, se muestran las regiones de inicio de intercambio de cadena durante el evento de recombinación en los clones analizados. Como se observa, ambas cepas (wt y *mutS*) presentan un patrón similar respecto a las regiones probables de inicio de intercambio de cadenas de ADN.

Si bien se necesitaría analizar una mayor cantidad de clones, este resultado indicaría que MutS no está controlando el proceso de recombinación en etapas iniciales (invasión e inicio del intercambio de cadenas).

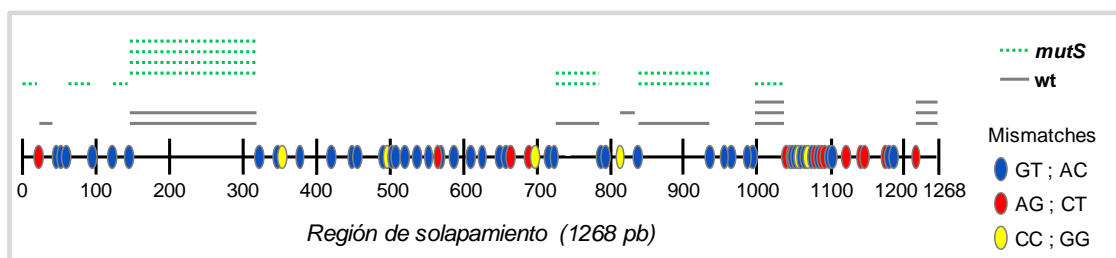


Figura R24. Determinación de las regiones de inicio de la recombinación en las zonas de solapamiento del gen *lacZ*. Las líneas superiores indican las regiones donde se inicia el intercambio de cadena de ADN durante el proceso de recombinación homeóloga en clones recombinantes (G_m^r) aislados de cepas wt (línea continua gris) o *mutS* (línea de puntos verde). En la parte inferior de la figura se grafica la región de solapamiento donde se muestran los 64 mismatches que podrían generarse durante el apareamiento entre secuencias de ADN divergentes y que son utilizados como marcadores para analizar y detectar las regiones donde el intercambio de cadena podría ocurrir.

2.3.3- Determinación de los dominios de MutS implicados en la regulación de la recombinación homeóloga.

- Eficiencia del dímero y el tetrámero de MutS en la inhibición de la recombinación homeóloga.

MutS es capaz de formar diferentes estructuras oligoméricas y en los últimos años varios laboratorios han determinado qué estado oligomérico es funcional *in vivo* y se han postulado diferentes mecanismos moleculares del MRS dependiendo del mismo. MutS de *P. aeruginosa* forma dímeros y tetrámeros en solución, sin embargo resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que el tetrámero sería el estado más activo y eficiente para unir heteroduplex de ADN y reparar mutaciones *in vivo* [139]. Dichos resultados fueron obtenidos a partir del análisis funcional *in vitro* e *in vivo* de la proteína MutS salvaje, que se

une como tetrámero al ADN, en comparación a la versión mutante MutSR842E cuya mutación impide su tetramerización y sólo es capaz de formar dímeros [139]. Por otro lado, estudios *in vivo* realizados en *E. coli* demuestran que la delección de los 53 aminoácidos C-terminales de MutS, la cual impide la formación de tetrámeros, sería crítico para la función antirecombinogénica de la proteína pero menos importante para la reparación de mutaciones [166].

En base a estos antecedentes, nos propusimos determinar la eficiencia del dímero de MutS de *P. aeruginosa* (MutSR842E) en la inhibición de la recombinación homeóloga. Así, se introdujo el sistema de recombinación homólogo y homeólogo en la cepa *mutSR842E* [139]. Se observó que la versión dimérica (*mutSR842E*) fue tan eficiente como la versión tetramérica (cepa wt isogénica) para inhibir la recombinación entre secuencias de ADN divergentes, ya que la disminución en la tasa de recombinación homeóloga respecto a la homóloga fue de ~ 50 veces en ambas cepas (Figura R25, Tabla R5). A su vez, los Intervalos de Confianza (IC) obtenidos para cada cepa se solapan indicando que no existen diferencias significativas entre las tasas de recombinación de las mismas.

Tabla R5: Tasa de Recombinación en *P. aeruginosa*

Cepa MPAO1	Tasa de Recomb. <i>Homóloga</i>	Intervalos de Confianza (95%)	N	Tasa de Recomb. <i>Homeóloga</i>	Intervalos de Confianza (95%)	N	Homo/Homeo ^a
wt	4.39×10^{-6}	$(3.10; 5.86) \times 10^{-6}$	8	8.67×10^{-8}	$(5.65; 12.2) \times 10^{-8}$	10	50.6
<i>mutSR842E</i>	2.52×10^{-6}	$(1.08; 4.87) \times 10^{-6}$	10	4.27×10^{-8}	$(2.36; 6.72) \times 10^{-8}$	9	59.0

^a Relación entre la tasa de recombinación homóloga y homeóloga de un misma cepa

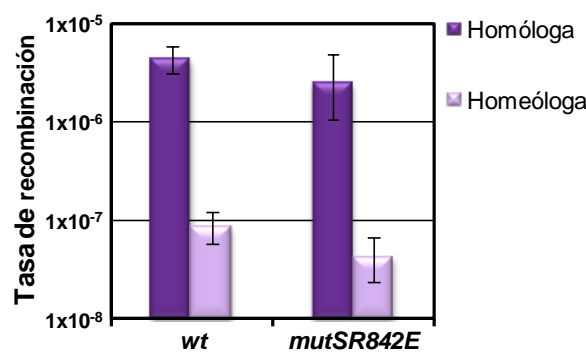


Figura R25. Tasa de recombinación homóloga y homeóloga de cepas wt y *mutSR42E* de *P. aeruginosa*. Las barras de error indican los Intervalos de Confianza del 95%. Ver valores en Tabla R5.

Así, estos resultados demuestran que tanto el estado tetramérico como dimérico de MutS de *P. aeruginosa* son activos *in vivo* para llevar a cabo su función antirecombinogénica.

- Análisis de la tasa de recombinación de la mutante de interacción con el β -sliding clamp, MutS_{ASDAA}

Algunos factores involucrados en la replicación del ADN han sido implicados en diferentes etapas del proceso de reparación y recombinación ya que interaccionan con diversas proteínas involucradas en estos procesos regulando su actividad [167, 168]. Uno de estos factores es el β -sliding clamp (β clamp) cuya función más conocida es mantener unidas a las ADN polimerasas sobre el ADN molde aumentando su procesividad. En bacterias, la mayoría de las proteínas que interaccionan con β clamp contienen el sitio de unión conservado QLxLF que se une a un bolsillo hidrofóbico presente en este factor replicativo [168].

Diferentes estudios proponen que la asociación de MutS con β clamp desempeña un papel importante en el inicio del proceso de reparación mediante la localización de MutS en las áreas de replicación activa así como en la discriminación de la hebra recién sintetizada [169, 170]. Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio demostraron que la interacción MutS- β clamp no es necesaria para un correcto funcionamiento del MRS en *P. aeruginosa*. Brevemente, dicha conclusión se obtuvo a partir del análisis funcional de versiones mutantes de MutS (855 aminoácidos) que no interaccionan con el factor replicativo, tal como la mutante puntual del motivo conservado ⁸¹⁶QSDLF⁸²⁰ de unión a β clamp denominada MutS ^{β} . El reemplazo del gen cromosomal *mutS* por una versión mutada que codifica MutS ^{β} (cepa *mutS ^{β}*) no aumenta la tasa de mutación espontánea en relación a la cepa salvaje aún bajo condiciones altamente mutagénicas [140].

Dado que la asociación MutS- β clamp no cumple un rol en la función antimutagénica de MutS de *P. aeruginosa*, quisimos determinar si dicha interacción era importante para que MutS llevara a cabo su función antirecombinogénica, es decir, la inhibición de la recombinación entre secuencias de ADN divergente. Para ello se utilizó la cepa *mutS ^{β}* de la cual se disponía en el laboratorio y se procedió a determinar la tasa de recombinación homóloga y homeóloga en dicha mutante y su cepa wt isogénica. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R26** y **TablaR6** donde se observa claramente que la disminución de la recombinación homeóloga respecto a la homóloga es aproximadamente igual en las cepas *mutS ^{β}* y wt (~ 34 veces en *mutS ^{β}* y ~ 37 veces en la cepa wt).

Tabla R6: Tasa de Recombinación en *P. aeruginosa*

Cepa PAO1	Tasa de Recomb. <i>Homóloga</i>	Intervalos de Confianza (95%)	N	Tasa de Recomb. <i>Homeóloga</i>	Intervalos de Confianza (95%)	N	Homo/Homeo ^a
wt	6.33×10^{-4}	$(5.28; 7.29) \times 10^{-4}$	10	1.70×10^{-5}	$(1.17; 2.50) \times 10^{-5}$	10	37.2
<i>mutS</i> ^β	7.52×10^{-4}	$(6.12; 8.83) \times 10^{-4}$	8	2.17×10^{-5}	$(1.40; 2.72) \times 10^{-5}$	9	34.7

^a Relación entre la tasa de recombinación homóloga y homeóloga de un misma cepa

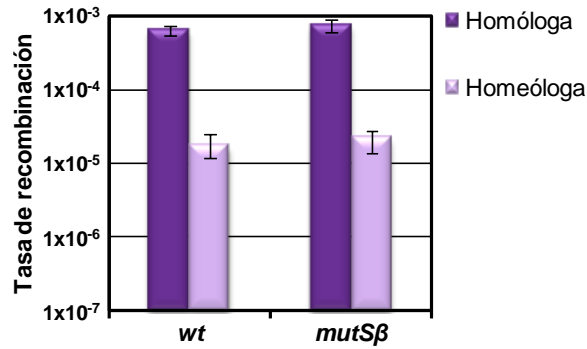


Figura R26. Tasa de recombinación homóloga y homeóloga de cepas wt y *mutS*^β de *P. aeruginosa*. Las barras de error indican los Intervalos de Confianza del 95%. Ver valores en Tabla R6.

Por lo tanto, la interacción entre MutS-β clamp no es importante para que MutS lleve a cabo dos de sus principales funciones como son la inhibición de la recombinación homeóloga y la reparación de errores posreplicativos.

DISCUSIÓN CAPITULO 1.

ESTUDIOS DE LA REACCIÓN DE INTERCAMBIO DE CADENAS DE ADN. EFECTO DE DIFERENTES SUSTRATOS CONTENIENDO DIVERGENCIAS Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RECOMBINASAS BACTERIANAS Y EUCARIOTAS.

La recombinación homóloga aumenta la variabilidad genética al permitir la creación de nuevas combinaciones de secuencias. Este proceso debe estar cuidadosamente controlado para asegurar el mantenimiento funcional del genoma y de las proteínas que serán codificadas. Por lo tanto, la habilidad de las recombinasas para buscar las secuencias homólogas y discriminar las heterologías durante el intercambio de cadenas será decisivo en estadios iniciales de la recombinación, principalmente cuando el MRS se encuentra inactivo o circunstancialmente reprimido.

Durante la búsqueda de homología, las recombinasas de la familia RecA interaccionan con el ADNsc y ADNdc y este proceso está acompañado de cambios en la conformación del ADN y de la proteína. En el año 2008 se publica por primera vez la estructura cristalina de los complejos pre y post sinápticos (RecA-ADNsc y RecA-ADNdc respectivamente) [9] y la información obtenida en ese estudio permitió avanzar en el conocimiento de los mecanismos que utiliza RecA para discriminar las secuencias homólogas. Así, se postula que la fidelidad de la recombinación homóloga está asegurada por dos mecanismos que cooperan entre sí. En primer lugar, la conformación ADN-B impuesta por RecA al interaccionar con el ADNsc y ADNdc discrimina aquellas estructuras que no sean del tipo de Watson y Crick, tales como los desajuste de Hoogsteen o pares de bases no complementarias. En segundo lugar, la estructura del complejo RecA-ADNdc reveló que la hebra complementaria prácticamente no está en contacto con la proteína RecA, indicando que dicha hebra permanece en el dúplex a través de las interacciones que mantiene con la hebra primaria (ADNsc inicial), lo cual dependerá de la complementariedad entre las bases de ambas hebras [9, 10].

En el Capítulo 1 del presente trabajo se utilizó un sistema *in vitro* con oligonucleótidos de ADN para estudiar el intercambio de cadenas catalizado por las recombinasas bacterianas de *E. coli* y *P. aeruginosa* y por la recombinasa eucariota Dmc1 de humanos en presencia de diferentes tipos de heterologías. La utilización de la técnica de FRET (Fluorescencia por transferencia de energía resonante) para determinar la eficiencia de intercambio de cadenas permite detectar diferencias sutiles en presencia de dichas heterologías, lo cual lo diferencia de otros sistemas que determinan el intercambio de cadenas por identificación del ADN en geles de agarosa [115, 151]. Así, la gran sensibilidad del sistema utilizado permite estudiar en detalle la discriminación de las recombinasas

frente a pequeños defectos en el ADN, cómo son los mismatches y pequeñas inserciones o deleciones de 1 ó 2 bases.

Inicialmente, se analizó el efecto que producía la presencia de uno o tres mismatches “TG” ubicados en distintas posiciones del ADNsc inicial con las tres recombinasas estudiadas. Se demostró que las tres recombinasas son sensibles a la posición y distribución del mismatch TG y que la eficiencia de la reacción de intercambio disminuye cuando el mismatch se localiza en el extremo 5’ del ADNsc inicial. Además, se observó que tres mismatches localizados en el extremo 3’ prácticamente no inhibían la reacción, mientras que un solo mismatch localizado en el extremo 5’ producía una fuerte inhibición (Resultados, Figura R3). Por lo tanto, se determinó que era más importante la posición del mismatch TG que la cantidad de mismatches durante la reacción de intercambio.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio sistemático del intercambio de cadenas catalizado por las tres recombinasas estudiadas en el cual se analizaron los 12 tipos de mismatches (TG, TC, TT, AG, AC, AA, GT, GA, GG, CT, CA, CA) en diferentes posiciones (extremo 5’, en el medio o extremo 3’), cantidad (uno, dos o tres por molécula) y distribución. Si bien se han encontrado leves diferencias entre RecA y Dmc1, en general, los patrones de inhibición en la eficiencia de intercambio de cadenas fueron similares para las recombinasas bacterianas y eucariotas, sugiriendo que ambas recombinasas utilizan los mismos principios para el reconocimiento de heterologías durante el intercambio de cadenas de ADN, lo cual sería una propiedad conservada entre organismos procariotas y eucariotas. Es importante mencionar que si bien se ha postulado que RecA de *P. aeruginosa* es hiperrecombinogénica en células de *E. coli in vivo* y que *in vitro* se ha determinado que posee mayor afinidad por el ADNsc que RecA de *E. coli* [141, 142], en nuestro estudio las recombinasas bacterianas no presentaron diferencias significativas en cuanto a su capacidad de intercambio de cadenas (Resultados, Figuras R2, R4, A1), ni en cuanto a su actividad ATPasa (resultados no mostrados).

Cuando se analizó el efecto del tipo y posición de un mismatch, se mostró que la mayoría de los mismatches en el extremo 5’ producen una fuerte inhibición, a excepción de los mismatches TT, CT y GT que afectan mucho menos la reacción de intercambio catalizada por las recombinasas (Resultados, Figura R6). Sorprendentemente, la eficiencia de intercambio fue variable dependiendo el tipo de mismatch analizado, lo cual sugiere que las recombinasas estarían reconociendo estos mismatches de manera diferente. Estos resultados podrían explicarse por las diferencias que existen en la estructura de cada mismatch. En este sentido, diferentes estudios han demostrado que si bien los mismatches

tienen diferentes propiedades e interacciones a los apareamientos de Watson y Crick, no todos desestabilizan al ADN y muchos de ellos se ajustan dentro de la conformación ADN-B de la doble hélice sin causar distorsiones [150, 171, 172]. Por lo tanto, dependerá del grado de distorsión estructural que genere cada mismatch para que sean reconocidos o no por las recombinasas.

Por otro lado, la mayoría de los mismatches en el extremo 3' no afectaron significativamente la eficiencia de intercambio, la cual fue similar entre diferentes tipos de mismatches. Estos resultados indican que un mismo tipo de mismatch tiene diferentes efectos en la eficiencia de intercambio si se encuentra en uno u otro extremo del ADNsc inicial. De acuerdo con estos resultados, se ha demostrado que un mismo tipo de mismatch puede adoptar diferentes estructuras o conformaciones que dependen del pH y del contexto de secuencia y que algunos tipos de mismatches son más sensibles a dichas condiciones que otros [146, 171, 172]. Por ejemplo, se ha determinado que la configuración que adopta el mismatch GG depende de las bases vecinas [173]. La conformación $G(\textit{anti})G(\textit{syn})$ produce pequeños cambios a nivel local y poca distorsión global de la doble hebra con respecto a la conformación ADN-B; mientras que la conformación $G(\textit{anti})G(\textit{anti})$ es fuertemente desestabilizante y presenta un apilamiento (en inglés, *stacking*) de bases limitado dentro de la doble hélice perturbando la estructura global del ADN [146, 173]. Igualmente, se ha observado que los mismatches GA, AG y TT pueden adoptar diferentes estructuras que dependen del pH y el contexto de secuencia. Por el contrario, los mismatches CT y CC son desestabilizantes en todos los contextos de secuencias en los que han sido estudiados [146, 172].

Un trabajo reciente en el que analizan los 12 tipos de mismatch en tres contextos de secuencia diferentes, determinó que un mismatch interno en un dúplex de 13 pb de longitud no produce cambios en la estructura global de la doble hélice, sino que genera perturbaciones locales que puede afectar las bases vecinas al mismatch. A su vez, el modo y la magnitud de dichas perturbaciones dependerá de la naturaleza del mismatch y especialmente de la flexibilidad del contexto de secuencia [147]. Así, un mismo mismatch produce diferentes perturbaciones en diferentes contextos.

De esta manera, si se tiene en cuenta que en los oligonucleótidos utilizados en este trabajo el contexto de secuencia no es exactamente igual en el extremo 5' o 3', la estructura que adopta un determinado mismatch en distintos contextos podría ser una de las razones por la cual se observan diferentes efectos. Además, esto podría explicar los resultados obtenidos en el extremo 5', donde los mismatches TG y TC fueron muy inhibitorios mientras que los mismatches GT y CT no afectaron prácticamente la eficiencia de intercambio. Si bien

se trata de las mismas bases que componen el mismatch, la ubicación en diferentes hebras podría modificar la configuración que adopta el mismatch, como así también el tipo de interacciones entre las bases [147].

Cuando se analizó la distribución de dos o tres mismatches (Resultados, Figura R7 y R8), se observó que el efecto en la eficiencia de intercambio fue determinado principalmente por el tipo de mismatch presente en el extremo 5' y no por la cantidad de mismatches. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el tipo y la posición del mismatch serían los factores más importantes que definen si el intercambio de cadenas mediado por las recombinasas es inhibido o no.

Otro tipo de heterologías analizadas en este estudio fue la presencia de inserciones o deleciones de 1 o 2 bases (denominadas “loops”) sobre el intercambio de cadenas catalizado por las recombinasas de la familia RecA. Si bien se había postulado que RecA de *E. coli* detecta loops de 4 nt (+/- AGCT) atenuando el proceso de intercambio de cadenas entre oligonucleótidos de ADN *in vitro*, en dicho estudio no se observó inhibición de la recombinación cuando se analizaron loops de 1 o 2 nt. Sin embargo, la técnica de medición utilizada se basaba en la identificación del ADN por geles de agarosa [151].

En nuestro trabajo se examinaron loops ricos en “T” que se formaban en la hebra del ADNsc inicial (inserción) o en la hebra complementaria (delección). Nuestros resultados demuestran la sensibilidad de las recombinasas a la presencia de pequeños loops durante el intercambio de cadenas. Además, se muestra que Dmc1 es mucho más tolerante que RecA a la presencia de dichos loops (Resultados, Figura R10). Para ambas recombinasas la inhibición aumentó con el tamaño del loop (de 1 a 2 bases) y dicho efecto fue aún mayor cuando el loop se generó en la hebra del ADNsc inicial (denominada “inserción”). Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta las características de la estructura cristalográfica del complejo post-sináptico RecA-ADNdc [9, 10]. En este sentido, la presencia de un loop en el ADNdc desestabilizará el complejo post-sináptico y la reacción de intercambio se verá desfavorecida. Así, mientras mayor sea el tamaño de ese loop mayor será la desestabilización e inhibición de la reacción de intercambio. Como se mencionó anteriormente, en el complejo RecA-ADNdc la recombinasa se encuentra principalmente unida al ADNsc inicial, mientras que el contacto con la hebra complementaria es mínimo [9, 174]. Estas características podrían explicar el aumento de la inhibición observado por la presencia de un loop en la hebra del ADNsc inicial (inserción).

La determinación de las temperaturas de fusión de los dúplex generados durante el intercambio de cadenas (ADNdc^{FINAL}) reveló que no existe una relación lineal entre la eficiencia de intercambio y dichas temperaturas (Resultados, Figura R13). Cabe mencionar

que la temperatura de fusión aporta datos sobre la estabilidad termodinámica de los dúplex analizados, al igual que los valores de entalpía y entropía obtenidos utilizando el programa informático MELTING 5 [153, 154]. Así, estos resultados demuestran que el efecto observado entre distintos tipos de mismatches en el extremo 5', como así también las diferencias obtenidas con un mismo mismatch en el extremo 3' o 5', no se debe a la estabilidad termodinámica de los dúplex (ADN_{dc}^{FINAL}). Por lo tanto, nuestra hipótesis sería que los factores estructurales del ADN son las propiedades más importantes para asegurar la fidelidad de las recombinasas durante el intercambio de cadenas.

Dentro del pequeño grupo de proteínas que reconocen mismatches en el ADN se encuentran, además de RecA, las ADN polimerasas y la proteína MutS constituyente del MRS. Estudios previos en los cuales se ha estudiado la fidelidad de las ADN polimerasas de *E. coli* y su relación con los mismatches han establecido que los factores geométricos son las propiedades más importantes para asegurar la fidelidad de la replicación, mientras que la estabilidad termodinámica de dichos mismatches sería menos importante [172, 175, 176]. Con respecto al MRS, se ha establecido que este sistema no repara todos los tipos de mismatches con la misma eficiencia [150] y se postula que tanto los factores termodinámicos como estructurales cumplen un rol importante en dicha diferenciación [148, 172]. En este sentido, se ha determinado que MutS se une con diferente afinidad a distintos mismatches aunque la afinidad de unión no siempre se correlaciona con la eficiencia de reparación [149]. Es difícil establecer una relación directa entre la naturaleza del mismatch y la eficiencia de reparación ya que el contexto de secuencia también afecta la habilidad de las proteínas del MRS para detectar los mismatches [150].

El efecto observado con RecA y Dmc1 entre distintos tipos de mismatches en el extremo 5', y particularmente las diferencias obtenidas con un mismo mismatch en uno u otro extremo (5' o 3') nos hacían suponer que la búsqueda de homología y por lo tanto la direccionalidad de la reacción podría estar ocurriendo en dirección 5'-3'. Sin embargo, el estudio de la direccionalidad de las reacciones de intercambio de cadenas catalizadas por RecA y Dmc1 reveló que dichas recombinasas promueven el intercambio de cadenas en direcciones opuestas. Mientras RecA lo hace preferentemente en dirección 5'-3', Dmc1 lo hace en dirección 3'-5' (Resultados, Figura R14). Si bien las secuencias de ADN para llevar a cabo los ensayos de direccionalidad son diferentes a las utilizadas para estudiar la presencia de mismatches, estos resultados sugieren que la direccionalidad de la reacción de intercambio no sería el motivo principal de las diferencias observadas en uno u otro extremo en presencia de mismatches.

Con el propósito de determinar si la reversibilidad era uno de los factores por los cuales las recombinasas discriminan diferentes tipos de mismatches, particularmente en el extremo 5', se estudiaron las reacciones inversas utilizando diferentes "ADNsc iniciales" para generar los complejos RecA-ADNdc^{FINAL} en presencia de diferentes mismatches. Este análisis demostró que la reversibilidad de la reacción era inversamente proporcional a la eficiencia de intercambio de cadenas (EIC) obtenida durante la reacción directa ya que se obtuvo mayor reversibilidad mientras mayor efecto inhibitorio tenía el mismatch. Al analizar los mismatches del grupo 1 en el extremo 5' (EIC = homólogo > TT > TG > TC), se observó que TC y TG muestran mayor reversibilidad que TT y el ADN homólogo (Reversibilidad = TC > TG > TT ≈ homólogo). El análisis de la reacción inversa con los mismatches del grupo 1 en el extremo 3' (EIC = homólogo ≥ TC ≈ TG ≈ TT) reveló que la reversibilidad es similar entre ellos y levemente mayor a la del ADN homólogo, lo cual se relaciona a los resultados obtenidos durante la reacción directa (Resultados, FiguraR17). Por otro lado, el análisis de la reversibilidad de los mismatches del grupo 3 en el extremo 5' mostraron la misma relación entre reversibilidad y EIC (EIC = homólogo ≥ CT > CC ≈ CA; Reversibilidad = CA ≈ CC > CT ≥ homólogo).

De esta manera, la reversibilidad de la reacción sería una propiedad fundamental de las recombinasas y contribuiría a discriminar entre diferentes tipos de heterologías durante la reacción de intercambio. Nuestra hipótesis es que la presencia de mismatches o loops durante el intercambio de cadenas desestabiliza el complejo post-sináptico RecA-ADNdc^{FINAL}, promoviendo la reversibilidad de la reacción y disminuyendo la eficiencia de intercambio. La desestabilización será la consecuencia de cambios en la estructura del ADN-B (apareamientos del tipo Watson y Crick) por la presencia de bases mal apareadas en el nuevo dúplex. En este sentido, la estructura que adopte un determinado mismatches según su naturaleza y el contexto de secuencia (tipo y posición), modificará en mayor o menor medida al ADN y se verá reflejado en la eficiencia de intercambio de cadenas obtenida. Por otro lado, la presencia de loops también afectará la estructura del ADNdc^{FINAL} en complejo con RecA y la estabilidad de ese complejo dependerá de la estructura del loop (1 o 2 bases) y de la hebra en la cual se genere dicho loop (inicial o complementaria). Para confirmar esta hipótesis actualmente se están realizando experimentos tendientes a determinar la estabilidad de los complejos RecA-ADNdc^{FINAL} en presencia y ausencia de mismatches mediante la técnica de "Resonancia de Plasmones de Superficie" (en inglés Surface Plasmon Resonance) en BIACORE y se planea llevar a cabo simulaciones de dinámica molecular de dichos complejos. Adicionalmente, será interesante llevar a cabo la reacción de intercambio de cadenas utilizando nuevas secuencias de ADN con el fin de evaluar el efecto

de un determinado tipo de mismatch en una determinada posición con diferentes contextos de secuencia.

Como se ha mostrado a lo largo de este trabajo de tesis, RecA y Dmc1 muestran patrones de inhibición similares con respecto a la presencia de heterologías, lo cual sugiere que ambas recombinasas utilizan los mismos principios de reconocimiento de homología durante el intercambio de cadenas. Sin embargo, Dmc1 es mucho menos activa que RecA y más tolerante a la presencia de mismatches y loops, indicando que la recombinasa eucariota es más permisiva que las recombinasas procariontas a la presencia de heterologías. Esto concuerda con estudios recientes en los cuales utilizan ensayos de “molécula única” (en inglés, *single-molecule*) han determinado que RecA, Rad51 y Dmc1 estabilizan los intermediarios de recombinación en etapas de tres nucleótidos denominados tripletes, las cuales están asociadas a cambios en la energía libre ($\Delta \Delta G^\ddagger$) de la reacción de intercambio de cadenas. La estabilidad de cada triplete depende del correcto apareamiento de Watson y Crick y si bien las tres recombinasas estudiadas fueron capaces de tolerar un mismatch en el interior del triplete, sólo Dmc1 es capaz de estabilizar energéticamente tripletes que contienen un mismatch [177]. De esta manera, postulan que la habilidad de Dmc1 para estabilizar dúplex que contienen mismatches permitiría que ocurra la recombinación entre alelos polimórficos durante la meiosis y evitaría la reversión de la recombinación por acción del MRS [177]. En este sentido, Dmc1 está involucrada en la recombinación meiótica entre cromosomas homólogos maternos y paternos entre los cuales existirán alelos polimórficos que deberán ser tolerados para asegurar que ocurra el intercambio de información genética entre dichos cromosomas.

La baja actividad de Dmc1 respecto a las RecA bacterianas podría deberse a las propiedades intrínsecas de dicha proteína como consecuencia de las condiciones experimentales elegidas para llevar a cabo los ensayos de intercambio, o al requerimiento de proteínas accesorias que afectan la actividad de Dmc1 y son esenciales para llevar a cabo su función *in vivo* e *in vitro* [5, 76, 77]. Una de estas proteínas accesorias es el heterodímero Hop2-Mnd1, cuya presencia fue estudiada en este trabajo durante las reacciones de intercambio catalizadas por Dmc1 con ADN homólogo o conteniendo mismatches. Se observó que la presencia de Hop2-Mnd1 aumenta el intercambio de cadenas *in vitro* con ADN homólogo o conteniendo un mismatch TG en el extremo 5' o 3', y dicho aumento es similar con ambos sustratos de ADN. Por tanto, estos resultados confirman la hipótesis de que Hop2-Mnd1 estimula a Dmc1 independientemente de la homología del ADN ya que prolonga el tiempo de vida del intermediario de reacción (unión del ADNdc con el filamento pre-sináptico Dmc1-ADNsc) [105, 178]. Sin embargo, si la actividad de Dmc1 es fuertemente

inhibida por la presencia de 3 mismatches TG más allá de que Hop2-Mnd1 estabilice dicho intermediario, no es capaz de revertir esta inhibición.

Por otro lado, el análisis de distintas versiones mutantes de Hop2 y Mnd1 reveló que el sitio de unión al ADN presente en la proteína Mnd1 es esencial para que el heterodímero estimule la eficiencia de intercambio de cadenas catalizada por Dmc1. Un resultado que nos llamó la atención durante este análisis fue que la mutante HopR176A-Mnd1 fue capaz de llevar a cabo el intercambio de cadenas en ausencia de Dmc1. Con respecto a estos resultados, se ha demostrado recientemente que Hop2 tiene actividad recombinasa por sí sola, es decir, cuando no forma parte del complejo Hop2-Mnd1 [179]. Por lo tanto, una de nuestras hipótesis sería que la mutante HopR176A-Mnd1 podría afectar la interacción entre Hop2 y Mnd1 y favorecer la presencia de Hop2 libre, sin embargo, se necesitarán experimentos adicionales para confirmar dicha hipótesis.

DISCUSIÓN CAPITULO 2.

ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN EN *P. aeruginosa* MEDIANTE ENSAYOS *IN VIVO*. FUNCIÓN DEL MRS Y DE GENES INVOLUCRADOS EN RECOMBINACIÓN.

En los últimos años, y debido a los rápidos avances en la secuenciación de los genomas bacterianos, se ha puesto de manifiesto que las bacterias, a diferencia de los eucariotas, han obtenido una proporción significativa de diversidad genética a través de la adquisición de secuencias o fragmentos de ADN a partir de otras bacterias más o menos alejadas taxonómicamente. Esta transferencia génica horizontal entre células de bacterias diferentes produce genomas extremadamente dinámicos en los que una porción sustancial del ADN puede ser añadido o deletado de un genoma bacteriano en un único evento de recombinación [1]. Entre las múltiples secuencias que pueden adquirirse por transferencia horizontal, una de las más frecuentes e importantes son precisamente las que codifican distintos factores de virulencia, pudiendo ganarse grandes fragmentos de ADN que incluso pueden transformar una cepa inicialmente avirulenta en una cepa capaz de producir una infección [35, 180]. Por otro lado, el alto contenido de secuencias repetitivas en los genomas bacterianos [15] también constituye un mecanismo de diversificación genómica y un riesgo para la estabilidad de los genomas que es aún mayor si esas secuencias repetitivas son parcialmente homólogas (divergentes) entre sí. En este sentido, la recombinación entre secuencias divergentes es precisamente la que tiene mayor importancia evolutiva, ya que éste tipo de recombinación es la que puede aportar nuevos genes y por lo tanto nuevas funciones a la bacteria. A su vez, se ha postulado que la recombinación homeóloga es fundamental en la diversificación y adaptación de las especies [107]. Como se ha mencionado previamente, hay evidencias de que los eventos de recombinación son los principales responsables de la diversificación fenotípica y genotípica en aislados de FQ crónicamente infectados con *P. aeruginosa*, mientras que las mutaciones espontáneas no tendrían ningún rol importante en dicha diversificación [137]. Por lo tanto, conocer el fenómeno de recombinación genética a nivel molecular en diversas bacterias, y particularmente en *P. aeruginosa*, es de suma importancia para entender el impacto que dicho proceso ha tenido en la evolución, función y estructura de sus genomas.

En el Capítulo 1 se abordó el análisis del intercambio de cadenas de ADN *in vitro* catalizado por las recombinasas de la familia RecA y se determinó que las recombinasas de *E. coli* y *P. aeruginosa* utilizan los mismos principios de reconocimiento durante el proceso de intercambio y que además la actividad y tolerancia a distintas heterologías en el ADN es similar en ambas proteínas. Sin embargo, el proceso de recombinación homóloga en las

células bacterianas *in vivo* es mucho más complejo ya que involucra gran cantidad de factores proteicos y eventos regulatorios en las distintas etapas de la recombinación. Por este motivo surgió el interés de llevar a cabo estudios de recombinación *in vivo* en *P. aeruginosa*, ya que al momento no se habían realizado estudios de recombinación homóloga y homeóloga en esta bacteria. Con este propósito en el Capítulo 2 de este trabajo de tesis se diseñó y construyó un sistema plasmídico para medir recombinación homóloga y homeóloga en bacterias Gram-negativas (Resultados, Figura R19). Mediante el empleo de cepas de *E. coli* salvaje y deficientes en los genes *recA* y *mutS* se demostró la confiabilidad del sistema construido ya que los resultados de este trabajo fueron similares a los obtenidos en estudios previos en los cuales utilizaban las mismas regiones recombinantes del gen *lacZ* pero en el cromosoma bacteriano [127]. Si bien los valores absolutos obtenidos con diferentes sistemas de medición no fueron idénticos, la comparación entre la recombinación homóloga y homeóloga en una misma cepa, como así también las diferencias entre la cepa salvaje y las mutantes fueron similares. Por lo tanto, estos resultados demuestran que más allá de que la recombinación se determine en plásmido o en cromosoma, ambos sistemas permiten estudiar el rol de las proteínas MutS y RecA en la regulación de la recombinación homóloga y homeóloga. La ventaja adicional del sistema plasmídico construido en este estudio es que permite analizar una gran cantidad de cepas mutantes mediante la transformación de dichas cepas con el plásmido que contiene el sistema homólogo u homeólogo, lo cual le otorga amplia versatilidad. Además, los eventos de recombinación se pueden verificar por diferentes métodos como la resistencia al antibiótico gentamicina, la actividad β -galactosidasa en presencia del sustrato X-Gal (colonias azules), y el patrón de restricción del plásmido purificado.

El presente trabajo aporta, por primera vez, información sobre la tasa de recombinación homóloga y homeóloga en cepas de *P. aeruginosa* salvajes y deficientes en proteínas de la maquinaria de recombinación y del MRS. El análisis de la cepa de *P. aeruginosa* deficiente en el gen *recA* muestra que la disminución en la tasa de recombinación entre secuencias idénticas es de ~ 50 veces con respecto a la cepa salvaje, mientras que esta disminución es sólo de la mitad cuando se trata de secuencias divergentes (Resultados, Tabla R3, Figura R22). Estas diferencias indican que el 98% de los eventos de recombinación homóloga ocurren por un mecanismo dependiente de RecA, mientras que durante la recombinación homeóloga el 50 % ocurre vía RecA y el otro 50 % por un mecanismo independiente de RecA.

Nuestra hipótesis es que estos eventos independientes de RecA se llevan a cabo por el mecanismo de “*apareamiento de simple hebra (SSA)*” (recombinación ilegítima). Cómo se

ha descrito en la introducción de este trabajo, el SSA involucra secuencias repetitivas de ADN que comparten una región homóloga u homeóloga causando la deleción de una de ellas, como sucede en nuestro sistema de recombinación del gen *lacZ*. El mecanismo general de SSA se muestra en la **Figura D1**. Como se puede observar, inicialmente ocurre la ruptura del ADNdc entre secuencias repetitivas, luego se lleva a cabo la degradación de los extremos romos por acción de exonucleasas que generan regiones de ADNsc. Estas regiones de ADNsc se hibridaran por complementariedad por la acción de proteínas específicas. Finalmente, el ligado de dichas moléculas lleva a la deleción de una de las secuencias repetitivas.

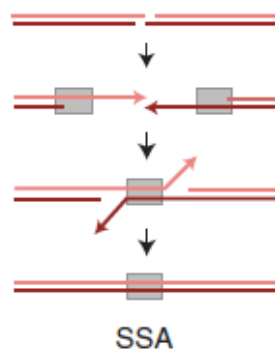


Figura D1. Esquema del mecanismo de apareamiento de simple hebra (SSA) entre secuencias de ADN repetitivas (ver descripción en el texto).

El mecanismo de SSA, independiente de las recombinasas de la familia RecA, ha sido previamente caracterizado en eucariotas, bacteriófagos y en la bacteria *Deinococcus radiodurans*, en los cuales se han identificado las proteínas involucradas en cada etapa [19, 181]. Si bien este mecanismo ha sido postulado en *E. coli*, se desconocen cuáles serían las proteínas involucradas en esta bacteria, particularmente la que lleva a cabo el apareamiento de las secuencias repetitivas [13].

Es importante mencionar que estas diferencias entre los mecanismos de recombinación homólogos y homeólogos no se observaron en la bacteria *E. coli*, en la cual los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el 99% de los eventos de recombinación homóloga y el 95% de los eventos de recombinación homeóloga estarían ocurriendo por un mecanismo dependiente de RecA (Resultados, Tabla R2, Figura R21). De esta manera, estos resultados plantean diferencias entre ambas especies bacterianas con respecto a los mecanismos involucrados en la recombinación homeóloga y sugieren que los mecanismos independientes de RecA tienen un rol preponderante en *P. aeruginosa*. Como una de las perspectivas de este trabajo se analizará, mediante estudios informáticos y experimentales, la existencia en *P. aeruginosa* de un sistema similar al descrito previamente (independiente de RecA), para identificar alguna proteína que se una al ADNsc y lleve a cabo el apareamiento de las hebras complementarias.

Como hemos mencionado anteriormente, RecA de *E. coli* y *P. aeruginosa* utilizan las mismas propiedades de reconocimiento de homología *in vitro* y la misma tolerancia a distintos tipos de heterologías (Resultados, Capítulo 1). Sin embargo, en el contexto celular el mecanismo dependiente de RecA es mucho más complejo por lo cual las diferencias entre ambas bacterias podrían estar relacionadas a mecanismos regulatorios, de expresión génica o bien a diferencias en el funcionamiento del mecanismo dependiente e independiente de RecA, los cuales involucran otras proteínas además de las recombinasas [3, 7, 8, 43-45].

En este contexto, nos propusimos determinar cuál era el rol de las proteínas RecG, RecJ y RecQ, las cuales habían sido involucradas en el proceso de recombinación homóloga en *E. coli* y otras especies, en la recombinación entre secuencias de ADN divergentes en *P. aeruginosa*.

Como se ha mencionado previamente, RecG es una helicasa que interviene en la etapa de post-sinapsis en las vías RecBCD y RecFOR. En *E. coli*, esta helicasa ayuda al complejo RuvAB a catalizar la migración de las ramas en la estructura de Holliday y es capaz de suplir la función de RuvAB en su ausencia [70, 71, 182]. Estudios bioquímicos con RecG de *E. coli* determinaron que esta proteína cumple otras funciones como la disrupción de los intermediarios de recombinación y la conversión de las uniones de Holliday y de las horquillas de replicación facilitando la conexión entre recombinación, replicación y reparación del ADN [72, 73]. La medición de la tasa de recombinación en una cepa de *P. aeruginosa* deficiente en el gen *recG* y las diferencias entre dicha cepa y la salvaje permitió determinar que la proteína RecG está involucrada en el 85% de los eventos de recombinación homóloga y sólo en el 3% de los eventos de recombinación homeóloga (Resultados, Tabla R3, Figura R22). Estos resultados indican que del total de los eventos de recombinación homóloga dependientes de RecA (98%), el 13% de los mismos sería independiente de la proteína RecG. Por otro lado, durante la recombinación homeóloga los eventos que ocurren por la vía dependiente de RecA son el 50% del total, y prácticamente no involucran a la proteína RecG.

Una vez más, los resultados obtenidos dan indicios de que existen diferencias mecánicas durante la recombinación homóloga y homeóloga en *P. aeruginosa* lo cual podría estar relacionado a los intermediarios de recombinación que se forman en presencia o ausencia de heterologías. Por ejemplo, la presencia de mismatches o bucles de inserción o deleción puede estimular o inhibir determinadas vías de recombinación o reparación, como sucede con las proteínas del MRS las cuales inhiben la recombinación homeóloga. Por lo tanto, lo mismo podría estar sucediendo con las proteínas del sistema de recombinación durante la recombinación homóloga u homeóloga. En este sentido, estudios *in vitro* han

demostrado que RuvAB de *E. coli* estimula el intercambio de cadenas de ADN catalizado por RecA de *E. coli* entre los genomas de los fagos “fd” y “M13” los cuales poseen una divergencia del 3%. Sin embargo, dicho efecto estimulador no se observa en la recombinación entre fagos “M13” de homología perfecta [183].

Por otro lado, la exonucleasa RecJ y la helicasa RecQ actúan en etapas iniciales y finales durante la vía RecFOR. En la etapa de pre-sinapsis, la actividad conjunta de ambas proteínas genera el sustrato ADNsc para que luego se forme el filamento RecA-ADNsc. En la etapa de post-sinapsis, RecJ estabiliza el intermediario de recombinación degradando el ADNsc que es desplazado [74, 75] y RecQ estaría involucrada en la disrupción de dichos intermediarios a través del desenrollamiento del ADN en dirección 3'-5' estimulando la formación de la estructura de Holliday [74]. La helicasa RecQ ha sido ampliamente estudiada en diversos organismos ya que cumple funciones importantes en el metabolismo del ADN y la inestabilidad genómica (Nakayama H. 2002). En humanos, existen 5 proteínas homólogas a RecQ (RECQL, BLM, WRN, RECQ4 y RECQ5) y defectos en alguna de estas proteínas están asociados a envejecimiento acelerado y predisposición al cáncer [184]. Por otro lado, estudios del efecto de mutaciones en el gen *recQ* en *E. coli* y *S. cerevisiae* reveló que dichas mutaciones aumentan considerablemente la recombinación ilegítima (entre 20 a 300 veces). De esta manera, se postula que la función de RecQ en bacterias y levaduras es inhibir la recombinación ilegítima independiente de RecA [185].

El análisis de la cepa de *P. aeruginosa* deficiente en el gen *recQ* muestra un aumento de ~ 2 veces en la tasa de recombinación homóloga con respecto a la cepa salvaje, mientras que este aumento es de ~ 14 veces en la tasa de recombinación homeóloga (Resultados, Tabla R3, Figura R22). Si se tienen en cuenta los resultados obtenidos previamente, en la cepa salvaje el 50% de los eventos de recombinación homeóloga estarían ocurriendo por recombinación ilegítima mientras que sólo un 2% de los eventos de recombinación homóloga ocurrirían por dicho mecanismo, lo cual podría explicar el gran aumento en la tasa de recombinación homeóloga de la cepa deficiente en el gen *recQ*. Por lo tanto, estos resultados y los antecedentes mencionados previamente sugieren que RecQ de *P. aeruginosa* estaría inhibiendo la recombinación independiente de RecA, la cual ocurre principalmente durante la recombinación homeóloga.

El estudio de la proteína RecJ mostró que la recombinación homóloga es prácticamente igual en la cepa deficiente en dicha proteínas con respecto a la cepa salvaje, ya que los intervalos de confianza de las tasas de recombinación obtenidas se solapan entre sí. Estos resultados no nos sorprendieron, ya que existen otras exonucleasas que puede

suplir la función de RecJ en ausencia de la misma [186]. Por otro lado, nos sorprendió que esta mutante mostrara un aumento en la tasa de recombinación homeóloga con respecto a la cepa salvaje de ~ 5 veces. Si bien actualmente no podemos explicar dicho aumento, una de nuestras hipótesis es que debido a que RecJ y RecQ actúan conjuntamente durante la recombinación, la ausencia de RecJ podría afectar la actividad inhibitoria de RecQ durante la recombinación ilegítima. Sin embargo, se deberán llevar a cabo estudios de recombinación *in vitro* para confirmar dicha hipótesis, como por ejemplo analizar la actividad inhibitoria de RecQ durante la recombinación en presencia de RecJ.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis permitieron corroborar la participación de las proteínas MutS, MutL y UvrD de *P. aeruginosa* en la inhibición de la recombinación homeóloga. La deficiencia en dichas proteínas se vio asociada a un gran aumento en la tasa de recombinación homeóloga con respecto a la cepa salvaje (wt), el cual fue mayor en las cepas deficientes en *mutL* y *uvrD* (Resultados Figura R23, Tabla R4). A su vez, en dichas mutantes se observó un aumento de la recombinación homóloga con respecto a la cepa wt.

En este sentido, se ha determinado que UvrD de *E. coli* además de llevar a cabo la reversión de los intermediarios de recombinación homeólogos [128], cataliza la disrupción del filamento RecA-ADNsc *in vitro* inhibiendo el intercambio de cadenas homólogo catalizado por RecA [65]. Con respecto a MutL de *E. coli*, se ha demostrado la interacción con RecA *in vitro* y el efecto inhibitorio de dicha proteína en la actividad ATPasa de la recombinasa, lo cual sugiere un rol regulatorio de MutL durante la recombinación homóloga [187]. Por lo tanto, los resultados y antecedentes mencionados sugieren algún rol adicional de MutL y UvrD en la regulación de la recombinación homóloga y homeóloga. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis deberíamos llevar a cabo estudios bioquímicos y verificar la interacción entre RecA y MutL de *P. aeruginosa* como así también el efecto de UvrD de *P. aeruginosa* en la formación del filamento RecA-ADNsc.

Por otro lado, el análisis de los sitios de inicio del intercambio de cadenas durante la recombinación homeóloga en cepas salvajes y deficientes en *mutS* reveló que ambas cepas presentan un patrón similar respecto a las regiones probables de inicio de intercambio (Figura R24). Si bien se necesitaría analizar una mayor cantidad de clones, este resultado indicaría que MutS no está controlando el proceso de recombinación en la etapa inicial de invasión e inicio del intercambio de cadenas, lo cual sugiere que la inhibición de MutS será independiente de la posición de los mismatches y se llevará a cabo una vez que ocurra la recombinación homeóloga (dependiente o independiente de RecA).

Finalmente, el análisis de la tasa de recombinación homóloga y homeóloga de cepas de *P. aeruginosa* con mutaciones puntuales en el gen *mutS*, una de las cuales impide su tetramerización (MutSR842E dimérica) y otra que impide la interacción de MutS con el β clamp (MutS ^{β}), mostraron que ambas versiones mutantes son tan eficientes como la proteína MutS salvaje para inhibir la recombinación homeóloga (Resultados, Figura R25 y R26). De esta manera, dichos resultados demuestran que tanto el estado tetramérico como dimérico de MutS de *P. aeruginosa* son activos *in vivo* para llevar a cabo su función antirecombinogénica, confirmando una vez más que el MRS de *P. aeruginosa* funciona diferente al presente en *E. coli* [166]. Asimismo, se demostró que la interacción entre MutS- β clamp no es importante para que MutS lleve a cabo sus funciones antimutagénicas y antirecombinogénicas. Actualmente en nuestro laboratorio se están llevando a cabo estudios en *P. aeruginosa* para establecer el verdadero rol de dicha interacción. En este sentido, se ha determinado que MutS regula el acceso de la ADN polimerasa de baja fidelidad (PolIV) a la horquilla de replicación a través su interacción con β clamp. Así, MutS impide la interacción de PolIV con β clamp, la cual es necesaria para la actividad de dicha polimerasa. Finalmente, estos estudios postulan un nuevo mecanismo en el cual MutS regula la fidelidad de la replicación [199].

CONCLUSIONES

CAPITULO 1

1- El estudio de la recombinación mediante el análisis del intercambio de cadenas entre oligonucleótidos de ADN *in vitro* permitió analizar gran variedad de heterologías y demostrar que tanto las recombinasas bacterianas como la recombinasa eucariota Dmc1 son capaces de detectar mismatches y pequeñas inserciones o deleciones (loops) durante el proceso de intercambio. El reconocimiento, y por lo tanto la inhibición de dichas heterologías dependerá de diferentes variables, entre las cuales el tipo y la posición del mismatch serían los factores más importantes; así como también el tamaño del loop y la hebra de ADN en la cual se ubica dicho loop.

2- Se determinó que el efecto inhibitorio observado para diferentes tipo y posición de mismatches no se debería a la estabilidad termodinámica (temperatura de fusión, entalpía y/o entropía) de los dúplex generados ni a la direccionalidad de la reacción de intercambio de cadenas catalizadas por las recombinasas.

3- El estudio de la reacción reversa de intercambio reveló que el nivel de inhibición se correlaciona con el grado de reversibilidad. Estos resultados darían indicios de que el complejo RecA-ADNdc es diferente en presencia de diferentes tipos y posiciones de mismatches y que la estabilidad de dicho complejo podría estar relacionado con las diferentes estructuras que puede adoptar un mismatch según su naturaleza y contexto de secuencia. Para confirmar esta hipótesis se están realizando experimentos tendientes a determinar la estabilidad de los complejos RecA-ADNdc en presencia y ausencia de mismatches mediante la técnica de “Resonancia de Plasmones de Superficie” (en inglés Surface Plasmon Resonance) en BIACORE y simulaciones de dinámica molecular de dichos complejos. Adicionalmente, será interesante llevar a cabo la reacción de intercambio de cadenas utilizando nuevas secuencias de ADN con el fin de evaluar el efecto de un determinado tipo de mismatch en una determinada posición con diferentes contextos de secuencia.

4- En general, diferentes mismatches mostraron patrones de inhibición similares en la eficiencia de intercambio de cadenas para RecA y Dmc1, sugiriendo que ambas recombinasas utilizan los mismos principios para el reconocimiento de heterologías durante el intercambio de cadenas de ADN, lo cual sería una propiedad conservada entre organismos procariontes y eucariotes. Sin embargo, las recombinasas bacterianas fueron más activas que la recombinasa eucariota Dmc1 para llevar a cabo el intercambio de cadenas

entre oligonucleótidos de ADN *in vitro*. A su vez, Dmc1 mostró mayor tolerancia a la presencia de mismatches y loops que las RecA de *E. coli* y *P. aeruginosa* lo cual indica que la recombinasa eucariota es más permisiva a la presencia de heterologías durante el intercambio de cadenas. Estos resultados concuerdan con un estudio de molécula única en el cual estudian RecA, Rad51 y Dmc1 y demuestran que sólo Dmc1 es capaz de estabilizar energéticamente una molécula de ADN que contiene un mismatch. Si bien estas observaciones están relacionadas con el rol biológico de Dmc1 durante la recombinación meiótica, aún se desconocen las razones bioquímicas y estructurales por las cuales Dmc1 es más tolerante a los mismatches y serán necesarios estudios adicionales para explicarlo.

5- Finalmente, el estudio de las reacciones de intercambio de cadenas catalizadas por Dmc1 reveló que si bien el heterodímero Hop2-Mnd1 aumenta la eficiencia de intercambio con ADN homólogo o conteniendo un mismatch TG, dicho aumento es similar con ambos sustratos. Por lo tanto, Hop2-Mnd1 no aumenta la tolerancia de Dmc1 a mismatches, sino que estimula la actividad de la recombinasa independientemente de la homología del ADN. Esta estimulación es moderada ya que cuando Dmc1 es fuertemente inhibida por la presencia de 3 mismatches, Hop2-Mnd1 no es capaz de revertir esta inhibición.

CAPITULO 2

1- El sistema de recombinación construido permitió medir la tasa de recombinación homóloga y homeóloga (5% de divergencia) en distintas cepas y especies bacterianas como *E. coli* y *P. aeruginosa*. Asimismo, este sistema puede ser utilizado en otras especies Gram-negativas.

2- Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permitieron corroborar la participación de las proteínas MutS, MutL y UvrD de *P. aeruginosa* en la inhibición de la recombinación homeóloga. Además, se determinó que tanto la versión tetramérica como dimérica de MutS de *P. aeruginosa* son eficientes para inhibir la recombinación homeóloga *in vivo* y esto confirma una vez más que el MRS de *P. aeruginosa* funciona diferente al presente en *E. coli*.

3- Los resultados obtenidos con la cepa de *P. aeruginosa* deficiente en el gen *recA* muestran que en la recombinación homeóloga el 50% de los eventos ocurren por un mecanismo dependiente de RecA y el otro 50% de manera independiente de RecA. Estas diferencias no se observaron en la bacteria *E. coli*, en la cual el 95% de los eventos de recombinación homeóloga ocurren por un mecanismo dependiente de RecA. Por lo tanto, estos resultados plantean diferencias entre ambas especies bacterianas con respecto a los

mecanismos involucrados en la recombinación homeóloga y sugieren que los mecanismos independientes de RecA tendrían un importante rol en *P. aeruginosa*. Nuestra hipótesis es que estos eventos independientes de RecA se llevan a cabo por el mecanismo de “*apareamiento de simple hebra (SSA)*”, el cual ha sido previamente caracterizado en eucariotas y bacteriófagos. Sin embargo, se desconocen actualmente cuales serían las proteínas de *P. aeruginosa* involucradas en este proceso. Mediante estudios informáticos y experimentales se analizará la existencia en *P. aeruginosa*, de un sistema similar al descrito en eucariotas y bacteriófagos.

4- Adicionalmente, el aumento de la recombinación homeóloga en cepas de *P. aeruginosa* deficientes en *recQ* y *recJ* podría sugerir algún rol de dichas proteínas en la regulación de la recombinación homeóloga en *P. aeruginosa*, principalmente de la proteína RecQ. En este sentido, RecQ ha sido previamente asociada a la inhibición de la recombinación ilegítima independiente de RecA en *E. coli* y levaduras, por lo que nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los mecanismos independientes de RecA tienen un importante rol durante la recombinación homeóloga en *P. aeruginosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPITULO 1

Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el Capítulo 1 se indican en la Tabla M1 [100, 103, 152, 188, 189].

Tabla M1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 1

Cepas	Características relevantes*	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 secuenciada, parental silvestre	[188]
<i>E.coli</i>		
BL21 (λ DE3)	Huésped para sobreexpresión de proteínas	Novagen
BL21 (λ DE3) pLysS	Huésped para sobreexpresión de proteínas	Novagen
Plásmidos		
pGEM-T Easy	Amp ^R ; vector de clonado	Promega
pET-15b	Amp ^R ; vector de expresión inducible en <i>E. coli</i>	Novagen
pET-16b	Amp ^R ; vector de expresión inducible en <i>E. coli</i>	Novagen
pET15-RecApa	Amp ^R ; pET-15b conteniendo el gen <i>recA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este trabajo
pET16-Dmc1	Amp ^R ; pET-16b conteniendo el gen <i>dmc1</i> de humanos	[100]
pET15-Hop2Mnd1	Amp ^R ; pET-15b conteniendo los genes <i>hop2</i> y <i>mnd1</i> de ratón	[103]
pET15-Hop2KYYK	Amp ^R ; pET15-Hop2Mnd1 con tres mutaciones puntuales en los residuos K63, Y65 y K67 de <i>hop2</i>	[152]
pET15-Hop2R176A	Amp ^R ; pET15-Hop2Mnd1 con una mutación puntual en el residuo R176 de <i>hop2</i>	[152]
pET15-Mnd1RYY	Amp ^R ; pET15-Hop2Mnd1 con tres mutaciones puntuales en los residuos R64, Y70 y Y71 de <i>mnd1</i>	[152]
pET15-Hop2KYYK-Mnd1RYY	Amp ^R ; pET15-Hop2Mnd1 con tres mutaciones puntuales en <i>hop2</i> y otras tres en <i>mnd1</i> para generar la doble mutante	[152]
pET15-MutSpa	Amp ^R ; pET-15b conteniendo el gen <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i>	[189]

*Marcadores de resistencia: Amp, ampicilina.

*Subrayados se encuentran los nucleótidos que fueron agregados con el objeto de generar sitios de restricción sin introducir cambios en los aminoácidos codificados.

Medios de cultivos, enzimas y reactivos químicos

Para el cultivo rutinario de bacterias se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al 1989). Se adicionó medio agar-agar 12 g/L para obtener medios de cultivo sólido. Los medios fueron suplementados con los antibióticos ampicilina, tetraciclina, estreptomycin, gentamicina o kanamicina cuando así se indica.

Las enzimas de restricción, ADN ligasa y los insumos para reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, «Polymerase Chain Reaction») utilizados fueron de las marcas comerciales Promega Corporation (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), New England

BioLabs Inc. (Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos) o Fermentas Inc. (Glen Burnie, Maryland, Estados Unidos).

Los plásmidos fueron purificados de los cultivos bacterianos utilizando el «GenElute™ Plasmid Miniprep Kit» (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Para purificar ADN genómico se utilizó el «Wizard genomic DNA Purification Kit» (Promega Corporation). La extracción de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el «QIAEX II Gel Extraction Kit» (Qiagen Inc., Valencia, California, Estados Unidos) o el «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» (Fermentas Inc.).

Las proteínas recombinantes con «tag» de poli-histidina fueron purificadas utilizando la resina «Probond™ Nickel-Chelating» (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos). El marcador de peso molecular para proteínas utilizado en SDS-PAGE fue de Bio-Rad. Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el «Bio-Rad protein assay» (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos). La estreptavidina marcada IRDye 800CW se obtuvo de LI-COR Biosciences.

El ATP hidrolizable (adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate) y no hidrolizable (adenosine 5'-(β , γ -imido) triphosphate lithium salt hydrate) utilizados fueron de Sigma-Aldrich S.R.L.

Clonado del gen *recA* de *Pseudomonas aeruginosa*

La secuencia codificante del gen *recA* de *P. aeruginosa* fue amplificada por PCR utilizando ADN genómico como templado y los oligonucleótidos RecAfor y RecArev como cebadores (RecAfor: 5'-GGGCATATGGACGAGAACAAGAAGCGC-3'; RecArev: 5'-GATGGATCCTCAATCGGCTTCGGCGTCAG-3'). El oligonucleótido RecAfor posee 6 nucleótidos extras que generan un sitio de restricción *NdeI* en el codón de inicio ATG, y RecArev posee 9 nucleótidos extras que incluyen un sitio de restricción *BamHI*. Así, el producto amplificado fue inicialmente clonado en el vector pGEM-T Easy y luego fue sub-clonado en los sitios *NdeI*-*BamHI* del vector de expresión pET-15b generando el plásmido pET15-RecApa.

La construcción fue verificada por secuenciación total de su ADN en «University of Chicago Cancer Research Center DNA Sequencing Facility» (<http://cancer-seqbase.uchicago.edu/>).

Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas con <<tag>> de histidina (RecA de *P. aeruginosa*, MutS de *P. aeruginosa*, Hop2-Mnd1 salvaje (wt) y mutantes de ratón) fueron purificadas luego de la

sobreexpresión del correspondiente plásmido derivado de pET-15b (**Tabla M1**) en la cepa *E. coli* BL21 (λ DE3). Brevemente, las cepas de *E. coli* transformadas con el correspondiente plásmido fueron crecidas a 37°C con agitación en medio LB suplementado con ampicilina (200 μ g/ml) y glucosa (0.5% p/v) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6-0.8. La expresión de las proteínas fue inducida agregando IPTG al medio, cuya concentración y tiempo de incubación variaron según la proteína. Para RecA se utilizó IPTG 0.05 mM durante 1h; para MutS IPTG 1 mM durante 1h; y para Hop2-Mnd1 wt y mutantes, IPTG 1 mM durante 3hs.

Luego del proceso de inducción, las células fueron colectadas y resuspendidas en los correspondientes «buffers de lisis»: «RecA» [Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM, NaCl 500 mM, Glicerol 15 %]; «MutS» [Tris-HCl (pH 7.5) 20 Mm, KCl 300 mM y Glicerol 10 %]; «Hop2-Mnd1» [Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, NaCl 500 mM, Triton 0.1 %, Imidazol 15 mM y Glicerol 15 %]. Dichos buffers fueron suplementados con los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM y benzamidina 80 μ g/mL.

Las células fueron lisadas en un homogeneizador de alta presión (C3 Emulsiflex, Avestin) y luego se realizó una centrifugación a 10000 rpm por 30 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos fueron incubados con 1mL de la resina de níquel ProBond™ (Invitrogen) durante 2h con agitación suave a 4°C y posteriormente se empaquetó en una columna. La columna con cada proteína fue sometida a lavados sucesivos con el «buffer de lisis» respectivo (sin adicionar los inhibidores de proteasas), conteniendo concentraciones crecientes de Imidazol (20, 40, 60 y 80 mM) con el objetivo de eliminar los contaminantes adheridos de forma inespecífica. Para realizar la elución de las proteínas se utilizaron soluciones de Imidazol 200-400 mM.

El protocolo de purificación de Dmc1 de humanos fue similar a lo descripto previamente, con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó el plásmido derivado de pET-16b (**Tabla M1**) y la sobreexpresión del mismo fue llevada a cabo en la cepa *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS. Esta cepa es isogénica a λ DE3 y a su vez contiene el plásmido “pLysS” con el gen que codifica para la lisozima T7 con el objetivo de disminuir la expresión basal del gen *dmc1* clonado en pET-16b sin interferir con la inducción con IPTG. Así, la cepa transformada con el correspondiente plásmido de expresión fue crecida a 37°C con agitación en medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4-0.6. La expresión de la proteína fue inducida agregando al medio INDUCER™ (molecula, VA 20166, Estados Unidos) a una concentración final de 2.5 ml/L e incubando con agitación (125 rpm) durante 16 h a 25°C. INDUCER™ es un análogo de IPTG que se utiliza para inducir la expresión del gen codificado en pET-16b de manera controlada evitando la “sobreexpresión” del mismo y aumentando así los niveles de proteína soluble.

Finalmente, los demás pasos de purificación fueron iguales a los detallados con las demás proteínas y se utilizó el mismo buffer de lisis de Hop2-Mnd1.

A continuación del proceso de elución de cada proteína, se utilizaron filtros Amicon ultra-15 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) para concentrar y equilibrar las proteínas en los «buffers de almacenamiento»: «RecA» [Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM y Glicerol 10 %]; «MutS» [Tris-HCl (pH 7.5) 25 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM y Glicerol 10 %]; «Hop2-Mnd1» [Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM, NaCl 300 mM y Glicerol 10 %]; «Dmc1» [Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, NaCl 150 mM, DTT 0.5 mM y Glicerol 10 %]. Los concentrados de proteínas resultantes fueron guardadas a -80°C. En todos los casos la concentración de proteína fue determinada mediante el ensayo colorimétrico de Bradford utilizando BSA como estándar.

Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas recombinantes purificadas fueron analizadas en geles SDS-PAGE al 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 aproximadamente 1h. El gel se tiñó con Coomassie Blue Stain y finalmente se lo destiñó con una solución de ácido acético (7,5%)-metanol (5%) para visualizar las bandas.

Sustratos de ADN para reacciones de intercambio de cadenas catalizadas por recombinasas

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville IA, Estados Unidos) y sus secuencias se detallan en la **Tabla M2**. Los oligonucleótidos marcados con los fluoróforos tetrametilrodamina (TAMRA) o cianina5 (Cy5) fueron purificados por PAGE y HPLC, y los oligonucleótidos no marcados fueron purificados por PAGE. La concentración de los mismos fue determinada por medición de absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro “BioTek-Epoch” (microplaca Take3).

Los sustratos de ADN_{dc} fueron obtenidos por hibridación de dos oligonucleótidos complementarios. Así, los oligonucleótidos fueron mezclados en cantidades equimolares (2 µM cada uno) en buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM; y las muestras fueron calentadas a 100°C por 10 min y posteriormente enfriadas lentamente hasta alcanzar una temperatura de 30°C.

Tabla M2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de intercambio de cadena *in vitro*. Los oligonucleótidos marcados con los fluoróforos Cy5 y TAMRA fueron utilizados para generar los ADNdc* de los diferentes grupos y los oligonucleótidos no marcados fueron utilizados como ADNsc iniciales (ver Figura R15 y A2). Las modificaciones entre oligonucleótidos se marcan en rojo.

ADNdc*		
TAMRA -3' -ATTAAATGAGTAAAAGGCGGTCGTCAGTTGAAGCTAAATTAAGCATTGT-5'	Grupo 1	
Cy5 -5' -AACTATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACAGATCT-3'		
TAMRA -3' -ATTAAAGGAGTAAAAGGCGGTCGTCAGTGAAGCTAAATTAAGCATTGGT-5'	Grupo 2	
Cy5 -5' -AACTATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACAGATCT-3'		
TAMRA -3' -ATTAAACGAGTAAAAGGCGGTCGTCAGTGAAGCTAAATTAAGCATTCGT-5'	Grupo 3	
Cy5 -5' -AACTATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACAGATCT-3'		
TAMRA -3' -ATTAAAGAGTAAAAGGCGGTCGTCAGATGAAGCTAAATTAAGCATTAGT-5'	Grupo 4	
Cy5 -5' -AACTATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAATCAGATCT-3'		

ADNsc inicial para estudiar mismatches

AAA:	5' ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA 3'	Homólogo Grupo 1
CCC:	5' ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA 3'	Homólogo Grupo 2
GGG:	5' ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA 3'	Homólogo Grupo 3
TTT:	5' ATTATTTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA 3'	Homólogo Grupo 4
AGA:	5' ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA 3'	
ATA:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
ACA:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
AAG:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
AAT:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
AAC:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
AGG:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
ACG:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
ATG:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
AGC:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
ACC:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
ATC:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
AGT:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
ACT:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
ATT:	ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GAA:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GGA:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GCA:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GTA:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GAG:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GCG:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GTG:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GAC:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GGC:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GCC:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GTC:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GAT:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GGT:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GCT:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
GTT:	ATTATTGTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CAA:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CGA:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CCA:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CTA:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CAG:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CGG:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CCG:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CTG:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CAC:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CGC:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CTC:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CAT:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CGT:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CCT:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA	
CTT:	ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA	

TAA: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA
TGA: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACA
TCA: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACA
TTA: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACA
TAG: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAAGCA
TGG: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAAGCA
TCG: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAAGCA
TTG: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAAGCA
TAC: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACCA
TGC: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAACCA
TCC: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAACCA
TTC: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCTACTTCGATTTAATTCGTAAACCA
TAT: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAATCA
TGT: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCGACTTCGATTTAATTCGTAAATCA
TCT: ATTATTCTCATTTCGCCAGCAGTCCACTTCGATTTAATTCGTAAATCA

ADNsc inicial para Inserciones/Deleciones

5' ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	3'	Homólogo Grupo 1
5' ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	3'	Del1T
5' ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCTTTCGATTTAATTCGTAAACA	3'	Del2T
5' ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCTAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	3'	In1T
5' ATTATTACTCATTTCGCCAGCAGTCTTAACTTCGATTTAATTCGTAAACA	3'	In2T

Reacciones de intercambio de cadenas

Antes de llevar a cabo la reacción de intercambio de cadena, la recombinasa debe ser incubada con “ADNsc inicial” para formar un complejo núcleo-proteína estable. De esta manera, se pre-incubó la recombinasa (RecA 0.8 µM o Dmc1 6 µM) con ADNsc no marcado (0.2 µM) a 37°C en el buffer de reacción: Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM, MgCl₂ 20 mM, BSA 100 µg/ml y ATP (1 mM para RecA y 3 mM para Dmc1) (buffer R). Los tiempos de pre-incubación fueron 2 min para RecA y 8 min para Dmc1, ya que la recombinasa eucariota posee menor afinidad por el ADN que las recombinasas bacterianas. La reacción de intercambio se inició con el agregado de ADNdc marcado (ADNdc*) (0.1 µM) a la mezcla de reacción y se midió la emisión de fluorescencia de TAMRA en el tiempo (λ exc= 556 nm; λ em= 580 nm). La reacción se monitoreo durante 22 min para RecA y 40 min para Dmc1. Cabe mencionar que cuando nos referimos al “ADNdc marcado” es aquel que está constituido por el par de fluoróforos donador(3'TAMRA)-aceptor(5'Cy5).

Para las reacciones de intercambio en presencia de Hop2-Mnd1, Dmc1 fue incubada con el ADNsc en buffer R por 5 min, y luego se agregó el heterodímero Hop2-Mnd1 (versión salvaje o mutada) y se incubó por 5 min más. La relación molar entre Dmc1 y Hop2-Mnd1 fue 4:1 para todas las mediciones, mientras que la concentración utilizada varió con el experimento (detallado en cada figura de Resultados). Por último, se agregó ADNdc marcado para dar inicio a la reacción de intercambio.

Para las reacciones de intercambio en presencia de MutS se utilizaron las mismas condiciones de buffer y ADN variando las concentraciones de proteína (relaciones molares entre recombinasas y MutS), temperatura y sustratos de ADN. En algunos experimentos la proteína MutS fue agregada a la mezcla de reacción junto con la recombinasa, es decir,

durante la formación del filamento ADNsc-recombinasa; mientras que en otros ensayos MutS se adicionó con el ADNdc.

Para estudiar la direccionalidad de las reacciones de intercambio de cadenas catalizado por RecA y Dmc1, se utilizaron los oligonucleótidos RG1 y RG2 de 83 nt de longitud (ver secuencias en la Figura R14, Resultados). Dichas reacciones se llevaron a cabo en el buffer R, a 37°C y utilizando las concentraciones de ADN mencionadas en las reacciones de intercambio previas, pero se utilizaron cantidades mayores de proteína (RecA 1.6 µM o Dmc1 12 µM).

Mediciones de FRET y análisis de datos

Un fluoróforo o sonda fluorescente es una molécula que posee un grupo que adsorbe energía a una determinada longitud de onda (λ_{exc}) y que emite a otro valor determinado (λ_{em}). Cuando el rango de λ al cual ocurre la emisión de un fluoróforo, denominado "dador", se encuentra superpuesto con el rango de λ al cual ocurre la adsorción de otro fluoróforo del sistema, denominado "aceptor", se produce transferencia de energía entre ambas moléculas, fenómeno que se denomina "transferencia de energía resonante" (del inglés RET: Resonance Energy Transfer), la cual se traduce en una señal de fluorescencia emitida por el aceptor. Esta señal dependerá del grado de solapamiento de los espectros de emisión y adsorción de ambas sondas fluorescentes, de la eficiencia cuántica del dador, de la orientación que posean en el sistema en el que se encuentren y de la distancia que separa a ambas moléculas.

En este trabajo, se utilizó como fluoróforo donador Tetrametilrodamina (TAMRA; λ_{exc} = 556 nm; λ_{em} = 580 nm) y como fluoróforo aceptor Cianina5 (Cy5; λ_{exc} = 649 nm; λ_{em} = 665 nm). Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo utilizando los espectrofluorómetros "FluoroMax-P (Horiba Jobin Yvon)" y "ISS-PC₁ photon counting (ISS Inc.)". Se llevaron a cabo espectros de emisión (intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda, λ_{exc} =556 nm) y curvas cinéticas de la reacción de intercambio (intensidad de fluorescencia en función del tiempo, manteniendo λ_{exc} =556 nm y λ_{em} a 580nm). Los parámetros utilizados fueron: slits (excitación y emisión): 1.2 nm; tiempo de integración: 0.150 segundos; incremento (cinéticas): 1 nm.

La fracción del ADNdc que es intercambiado durante la reacción (FI, fracción de intercambio) se calculó utilizando la siguiente ecuación: $d2*FI + d1*(1 - FI) = d$, en la cual "d1" representa la emisión de fluorescencia del donador (TAMRA) antes de que ocurra la reacción de intercambio por lo que el ADNdc está constituido por el par de fluoróforos donador(3'TAMRA)-aceptor(5'Cy5). Por otro lado, "d2" representa la emisión de fluorescencia

del donador en una muestra en la cual los oligonucleótidos marcados están totalmente separados y el ADN_{dc} está constituido por el oligonucleótido marcado con TAMRA y el oligonucleótido complementario no marcado (ADN_{dc}^{FINAL}) simulando un 100% de intercambio de cadenas; y “d” es la emisión de fluorescencia del donador obtenida en cada reacción de intercambio respectivamente.

La Eficiencia de Intercambio de Cadena relativa (EIC) se calculó como el incremento en la emisión de fluorescencia del donador (a 580 nm) al final de la reacción (t_f) en relación al incremento de fluorescencia obtenido con el ADN_{sc} homólogo, el cual fue considerado como “1”. Así, la ecuación utilizada fue: $(EF_{t_f} - EF_{t_0}) \text{ ADN}_{sc} / (EF_{t_f} - EF_{t_0}) \text{ homólogo}$.

Reversión de la reacción de intercambio

Con el propósito de determinar la reversibilidad de las reacciones de intercambio detalladas previamente, se llevaron a cabo las reacciones inversas en presencia de RecA de *P. aeruginosa* utilizando diferentes “ADN_{sc} iniciales” (denominado oligoNO-MARCADO). El buffer de reacción fue el “buffer R” que se utilizó para las reacciones directas de intercambio de cadenas, modificando el tipo (hidrolizable o no hidrolizable) y concentración de ATP. En primer lugar se preformaron los complejos ADN_{dc}^{FINAL}-RecA en presencia de ATP no hidrolizable (0.5 mM). Así, se incubó el oligoNO-MARCADO (0.1 μM) con RecA (0.8 μM) para permitir la formación del filamento RecA-ADN_{sc} y luego se agregó el oligoTAMRA (0.1 μM) para que la recombinasa hibride ambos oligonucleótidos por complementariedad. Posteriormente, se agregó el ADN_{sc} (0.1 μM) marcado con Cy5 (oligoCy5), generando el complejo con las tres hebras de ADN “ADN_{dc}^{FINAL}-RecA-ADN_{sc}”. Por último, se agrega ATP hidrolizable para que ocurra la reacción inversa. Una descripción detallada del proceso se realiza en Resultados, (Figura R15).

La intensidad de fluorescencia se monitoreó en el tiempo desde el incubado inicial del oligoTAMRA con RecA ($t=0$) manteniendo $\lambda_{exc}=556$ nm y $\lambda_{emisión}=580$ nm constantes.

Análisis de las reacciones de intercambio de cadena en geles nativos de poliacrilamida

Para verificar que el intercambio de cadenas calculado anteriormente mediante la técnica de FRET se debiera a una separación real entre hebras de ADN, se analizaron los productos de la reacción de intercambio de cadena en geles nativos de poliacrilamida (no

desnaturalizantes). Así, se llevó a cabo la reacción de intercambio de cadenas con RecA (0.8 μM) en las mismas condiciones de ADN y buffer que se detallaron anteriormente para la reacción directa. Una vez que se agregó el ADNdc marcado para dar inicio a la reacción las muestras se mantuvieron a 37°C por 30 min y finalmente se agregó una solución que contenía SDS 0.5 % p/v - Proteinasa K 1 mg/ml y se incubó por 15 min más a 37°C, para detener la reacción y desnaturalizar y digerir la proteína.

Finalmente las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no-desnaturalizantes (16 % p/v), preparados en buffer TAE 1X. La corrida electroforética se llevó a cabo en el mismo buffer, a 100 V durante 2 hs. Luego de la misma los geles fueron analizados en Molecular Dynamics Storm[®] 860 para detectar moléculas de ADN marcadas con Cy5 (Cy5; $\lambda_{\text{exc}}= 649 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}= 665 \text{ nm}$).

Cálculo de la Temperatura de Fusión de diferentes ADNdc

Para calcular la Temperatura de Fusión de diferentes ADNdc (100% homólogo o conteniendo diferentes tipos de mismatches en distintas posiciones), se utilizó el programa informático “MELTING 5” (www.ebi.ac.uk/compneur-srv/melting/) [153, 154]. Este programa utiliza un conjunto de modelos termodinámicos para calcular la entalpía y entropía de los dúplex de ADN y finalmente la Temperatura de Fusión de los mismos. Uno de los principales modelos de predicciones termodinámicas utilizada en MELTING 5 se denomina “modelo del vecino más próximo” (the Nearest-Neighbor model, en inglés) [190]. Este modelo considera que la interacción entre las bases de diferentes hebras depende de las bases vecinas, es decir, del contexto de secuencia. A su vez, el modelo se extiende más allá de los pares de bases de Watson y Crick incluyendo parámetros termodinámicos para bases apareadas incorrectamente (mismatches y/o loops).

Por otro lado, el programa MELTING 5 provee métodos de corrección para la concentración de sales del buffer utilizando el algoritmo de Owczarzy [191].

CAPITULO 2

Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 2 se indican en la **Tabla M3**. La cepa MPAO1 y las mutantes isogénicas fueron adquiridas en el Centro Genómico de la Universidad de Washington (Estados Unidos). Estas cepas fueron obtenidas mediante disrupción de los correspondientes genes por inserción de un transposón de 4.8 Kb con resistencia a tetraciclina (ISphoA/hah) [139, 140, 161, 188, 192-195].

Tabla M3. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 2

Cepas	Características relevantes*	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>		
MPAO1	Parental silvestre, prototrófica	[192]
MPAO1 <i>mutS</i>	Tc ^R ; <i>mutS</i> ::ISphoA/hah derivada de MPAO1	[192]
MPAO1 <i>mutL</i>	Tc ^R ; <i>mutL</i> ::ISphoA/hah derivada de MPAO1	[192]
MPAO1 <i>uvrD</i>	Tc ^R ; <i>uvrD</i> ::ISphoA/hah derivada de MPAO1	[192]
MPAO1 <i>recA</i>	Mutante de delección derivada de MPAO1	Este trabajo
MPAO1 <i>recG</i>	Tc ^R ; <i>recG</i> ::ISphoA/hah derivada de MPAO1	[192]
MPAO1 <i>recF</i>	Tc ^R ; <i>recF</i> ::ISphoA/hah derivada de MPAO1	[192]
MPAO1 <i>recQ</i>	Tc ^R ; <i>recQ</i> ::ISphoA/hah derivada de MPAO1	[192]
MPAO1 <i>recJ</i>	Tc ^R ; <i>recJ</i> ::ISphoA/hah derivada de MPAO1	[192]
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 secuenciada, parental silvestre	[188]
PAO1 <i>mutSR842E</i>	<i>P. aeruginosa mutSR842E</i>	[139]
PAO1 <i>mutS</i> ^β	<i>P. aeruginosa mutS</i> mutado en el sitio de unión a β-clamp	[139]
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	Huésped para manipulación de ADN	Invitrogen
DH5 α	Huésped para manipulación de ADN	Invitrogen
SY327 (λ pir)	Huésped para la replicación de pKNG101	[193]
SM10 (λ pir)	Cepa donora para la conjugación de pKNG101	Dra. G.Lucchesi
Plásmidos		
pGEM-T Easy	Amp ^R ; vector de clonado	Promega
pKNG101	Sm ^R ; vector suicida para la sustitución alélica de genes en <i>P. aeruginosa</i>	[194]
pKNG- <i>recA</i> _{del}	Sm ^R ; pKNG101 conteniendo una delección del gen <i>recA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	Este trabajo
pEx	Gm ^R ; vector de expresión inducible por IPTG	[140]
pUC18-miniTn7T-C	Gm ^R ; vector pUC18-miniTn7T-Gm	[195]
p2	Km ^R ; pBBR1MCS-2; vector de clonado de amplio rango de huésped	[161]
p2-LacZhomólogo	Km ^R , Gm ^R ; p2 conteniendo el sistema de recombinación homólogo	Este trabajo
p2-LacZhomeólogo	Km ^R , Gm ^R ; p2 conteniendo el sistema de recombinación homeólogo	Este trabajo
Oligonucleótidos		
RecAmutF	GCTGGTTCGAGGCTGGCTAC	Este trabajo
RecAmutR	CTGGGACTGAAGCTGCCGC	Este trabajo
LacZ Δ C-for	ATTCATATGACCATGATTACGGATTCCTGGC	Este trabajo
LacZ Δ C-rev	GCGACTCCTGCATTAGGAAGCAG	Este trabajo
LacZ Δ N-for	CGTGGGTATGGTGGCAGGC	Este trabajo
LacZ Δ N-rev	GCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATATGTATATCTCCTTCTTAATTAAGGTTATT	Este trabajo
Gm-for	ATGTTACGCAGCAGCAACGATG	Este trabajo
Gm-rev	TAAATGCATATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGG	Este trabajo

*Marcadores de resistencia: Tc, tetraciclina; Amp, ampicilina; Sm, estreptomycin; Km, kanamicina; Gm, gentamicina.

* Subrayados se encuentran los nucleótidos que fueron agregados con el objeto de generar sitios de restricción.

Medios de cultivos, enzimas y reactivos químicos

El medio de cultivo para bacterias, enzimas y kits para purificación de plásmidos y ADN genómico fueron los mismos que se utilizaron en el Capítulo 1.

Los oligonucleótidos utilizados fueron de Sigma-Aldrich o Genbiotech SRL (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por la «University of Chicago Cancer Research Center DNA Sequencing Facility» (<http://cancer-seqbase.uchicago.edu/>).

Construcción de una cepa de *P. aeruginosa* MPAO1 con delección del gen *recA*

La cepa de *P. aeruginosa* MPAO1 deficiente en *recA* se construyó reemplazando el gen endógeno por una versión delecionada, mediante doble recombinación homóloga utilizando el plásmido suicida pKNG101 [194].

Se amplificó por PCR el gen *recA* conteniendo la delección utilizando como templado ADN genómico de la cepa PAO1recAdel [196] y como cebadores los oligonucleótidos RecAmutF y RecAmutR listados en la **Tabla M3**. A continuación, el producto de PCR fue ligado al plásmido pGEM-T Easy y luego subclonado en los sitios de restricción *ApaI-SalI* de pKNG101. El plásmido resultante se denominó pKNG-recA_{del}.

Para la transferencia del plásmido a la cepa de *P. aeruginosa* MPAO1, se realizó una conjugación biparental utilizando la cepa donora *E. coli* SM10 (λ pir) mediante el método de apareamiento en filtro [197]. La mezcla obtenida del apareamiento fue sembrada en LB-agar placas 50 μ g/ml estreptomicina (Sm) para seleccionar eventos de recombinación homóloga simples, y 50 μ g/ml ampicilina para contra-seleccionar la cepa donora *E. coli*. Las cepas transconjugantes, las cuales exhiben sensibilidad a sacarosa, se crecieron en medio LB. El segundo evento de recombinación se seleccionó sembrando en medio LB suplementado con sacarosa 20% y confirmadas mediante sensibilidad a Sm.

Para verificar la presencia del alelo mutado en el genoma de *P. aeruginosa* MPAO1, se amplificó *recAdel* y los productos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción, utilizando como control la cepa MPAO1 salvaje. Por otro lado, la deficiencia del gen *recA* en las cepas mutantes se confirmó por sensibilidad a cisplatina [198] mediante ensayos de difusión en medio sólido de acuerdo a un protocolo previamente descrito. Para ello, cultivos saturados de la cepa salvaje y deficiente en *recA* fueron diluidos en LB hasta alcanzar una densidad celular de alrededor 4×10^8 células/ml. Alícuotas de 100 μ l de estas diluciones fueron mezcladas con 7 ml de LB-agar 0.7% (a 41°C) y posteriormente

distribuidos en placas de LB-agar 1.3% cubriendo toda la superficie. Luego de la solidificación del medio, se colocaron discos de papel absorbente de 6 mm de diámetro embebidos en 10 μ l de cisplatina a distintas concentraciones (5 μ g/ μ l ó 10 μ g/ μ l). El diámetro de la zona de inhibición del crecimiento celular en cada caso fue determinado luego de 16 h de incubación de las placas a 37°C, observándose un diámetro de 1.3 cm para la cepa *recA* y 0.7 cm para la cepa salvaje (no se muestra).

Construcción de los plásmidos p2-LacZ_{homo} y p2-LacZ_{homEo} para medir recombinación homóloga y homeóloga en bacterias Gram-negativas.

Para la obtención de las construcciones plasmídicas conteniendo los sistemas de recombinación homólogo y homeólogo se purificó ADN genómico de las cepas ME12 (LacZ homólogos) y ME12C (LacZ homeólogos) de *E. coli* provistas por el Dr. Ivan Mattic de la Universidad de París [127]. Con tal fin, se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos listados en la **Tabla M3**.

Por un lado, se amplificó la región LacZ Δ C utilizando como templado ADN genómico de *E. coli* ME12 y como cebadores los oligonucleótidos LacZ Δ C-for (genera un sitio *NdeI* en el codón de inicio ATG) y LacZ Δ C-rev (hibrida en la región espaciadora). El producto de esta amplificación (3388 pb) fue inicialmente clonado en el vector pGEM-T Easy y luego sub-clonado en los sitios *NdeI-SphI* del vector pEx [140] generando pEx-LacZ Δ C. El plásmido pEx es un plásmido inducible por IPTG que fue construido en nuestro laboratorio y contiene el promotor P_{lac} y el gen *lacI* que codifica para el represor LacI. De esta manera, el plásmido pEx-LacZ Δ C fue digerido con *HindIII-SphI* y el fragmento conteniendo LacI-P_{lac}-LacZ Δ C fue sub-clonado en pUC18-miniTn7T-Gm, generando el plásmido pUC18-PtacLacZ Δ C.

Por otro lado, se amplificó la región LacZ Δ N utilizando como templado ADN genómico de *E. coli* ME12 (homólogo) o *E. coli* ME12C (homeólogo) y como cebadores los oligonucleótidos LacZ Δ N-for (hibrida en la región espaciadora) y LacZ Δ N-rev (con 28 nucleótidos extras que contienen la secuencia invertida de Gm-for). Paralelamente, se amplificó el gen que codifica la resistencia a gentamicina (Gm^R) utilizando como templado el plásmido pUC18-miniTn7T-Gm y como cebadores los oligonucleótidos Gm-for y Gm-rev (genera un sitio *NsiI*). Ambos fragmentos de PCR fueron purificados y posteriormente se llevó a cabo un “overlap PCR” obteniéndose el fragmento LacZ Δ N-Gm (2300 pb). Dicho fragmento fue inicialmente clonado en el vector pGEM-T Easy y luego sub-clonado en los sitios *SphI-NsiI* del vector pUC18-PtacLacZ Δ C.

Finalmente, la construcción de 7196 pb que incluye el represor LacI, el promotor Ptac, LacZ Δ C, la región espaciadora, LacZ Δ N (homólogo u homeólogo) y el gen Gm^R fue sub-clonada en los sitios *Hind*III-*Nsi*I del vector de clonado pBBR1MCS-2 generando los plásmidos p2-LacZ_{homo} y p2-LacZ_{homEo} según la secuencia homóloga u homeóloga entre LacZ Δ C y LacZ Δ N respectivamente. Las construcciones fueron verificadas por secuenciación del ADN en la «University of Chicago Cancer Research Center DNA Sequencing Facility» (<http://cancer-seqbase.uchicago.edu/>).

Determinación de la tasa de recombinación

Diferentes cepas de *P. aeruginosa* (salvajes y mutantes) se transformaron con los plásmidos p2-LacZ_{homo} o p2-LacZ_{homEo} para medir recombinación homóloga u homeóloga respectivamente.

La tasa de emergencia de recombinantes resistentes al antibiótico gentamicina (Gm^R) y los intervalos de confianza del 95% (IC) fueron determinados mediante análisis de fluctuación (Rosche WA 2000, Methods). Inicialmente, colonias individuales de cada cepa (conteniendo los plásmidos p2-LacZ_{homo} o p2-LacZ_{homEo}) fueron cultivadas ON (16 hs) en medio LB suplementado con kanamicina (250 μ g/ml) a 37°C con agitación (200 rpm). A partir de cada ON se realizaron ocho a doce cultivos paralelos por cada cepa, cada cultivo fue inoculado con un número pequeño de células (~ 20 cel/ml) con el objetivo de evitar la introducción de cualquier recombinante preexistente. Dichos inóculos fueron crecidos en medio LB-kanamicina (100 μ g/ml) hasta alcanzar una DO ~ 0.02-0.07 (entre 2-7x10⁷ cel/ml) y se adicionó IPTG (1 mM) en las últimas 3hs de crecimiento para permitir la expresión de los genes bajo el control del promotor inducible P_{tac} y el represor LacI.

Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de los cultivos y alícuotas apropiadas fueron sembradas en cápsulas de LB-agar con kanamicina (100 μ g/ml), IPTG (1 mM) y X-Gal (50 μ g/ml) para determinar el número total de células viables, o en cápsulas de LB-agar-kanamicina-IPTG-X-Gal suplementado con 160 μ g/ml de gentamicina para determinar el número de células resistentes a dicho antibiótico. Luego de incubar dichas cápsulas a 37°C entre 24-36 hs, se contaron las colonias desarrolladas y se determinó la tasa de recombinación a partir de la distribución del número de recombinantes en los cultivos mediante el método de máxima similitud MSS [162], utilizando el programa SALVADOR 2.3 [163]. Así, la tasa de recombinación tiene en cuenta el número de eventos de recombinación que se producen por unidad de tiempo, es decir, el número de recombinaciones que se producen por división celular. Cabe mencionar que en el momento en el que se prepararon los inóculos, se sembraron paralelamente 80 cel/ml de dicho

cultivo en placas LB-kanamicina-IPTG suplementadas con gentamicina para asegurarnos la inexistencia de células recombinantes (Gm^R). Aquellos clones con colonias Gm^R fueron descartados del análisis de fluctuación.

Para la determinación de la tasa de recombinación en cepas de *E. coli* salvaje y mutantes, se procedió de la misma manera que para las cepas de *P. aeruginosa*, llevando a cabo los controles respectivos. La única diferencia fue la concentración de antibióticos utilizada, ya que *E. coli* es más sensible a altas concentraciones de los mismos. Así, en estos casos se utilizó kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ y gentamicina 40 $\mu\text{g/ml}$.

ANEXO

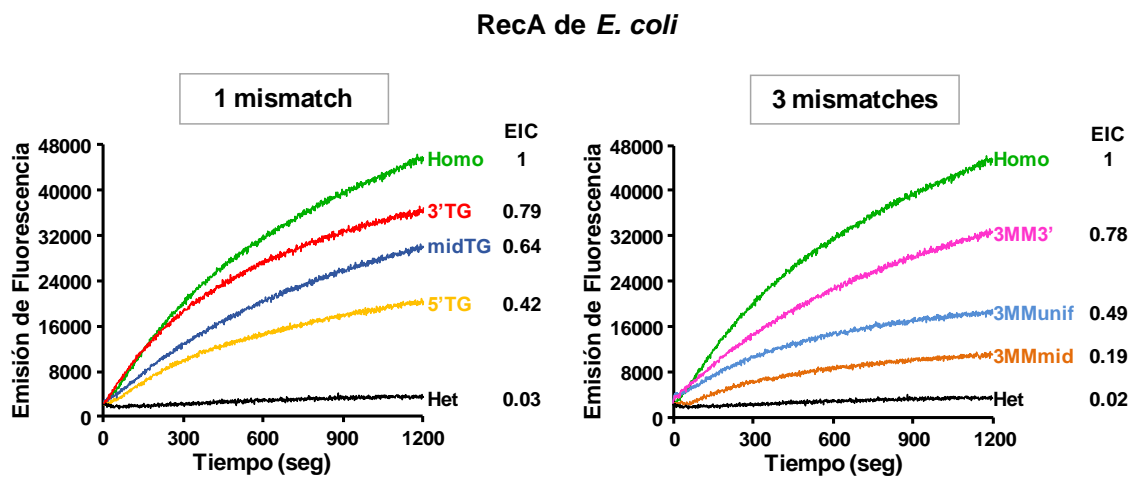


Figura A1. Cinéticas de las reacciones de intercambio catalizadas por RecA de *E. coli* en presencia de uno o tres mismatches TG en distintas posiciones. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm. Se muestra la eficiencia de intercambio de cadena (EIC) obtenida para cada reacción. Los detalles de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Figura R4**.

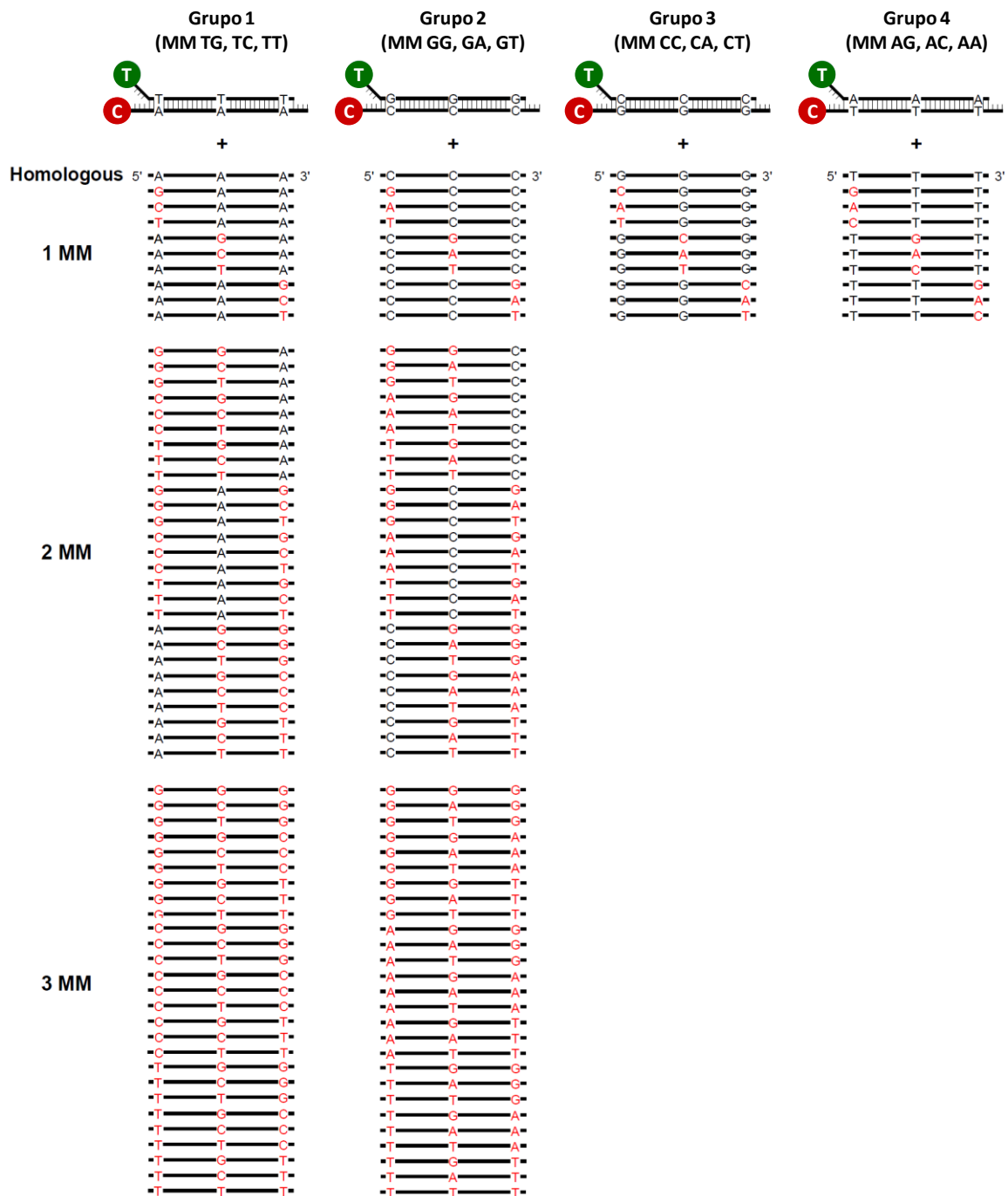


Figura A2. Esquema de los sustratos de ADN utilizados para estudiar diferentes tipos, posición, cantidad y distribución de mismatches durante las reacciones de intercambio de cadena catalizadas por recombinasas. Se muestra el listado completo de DNAsc iniciales utilizados, indicando las modificaciones de nucleótidos en rojo.

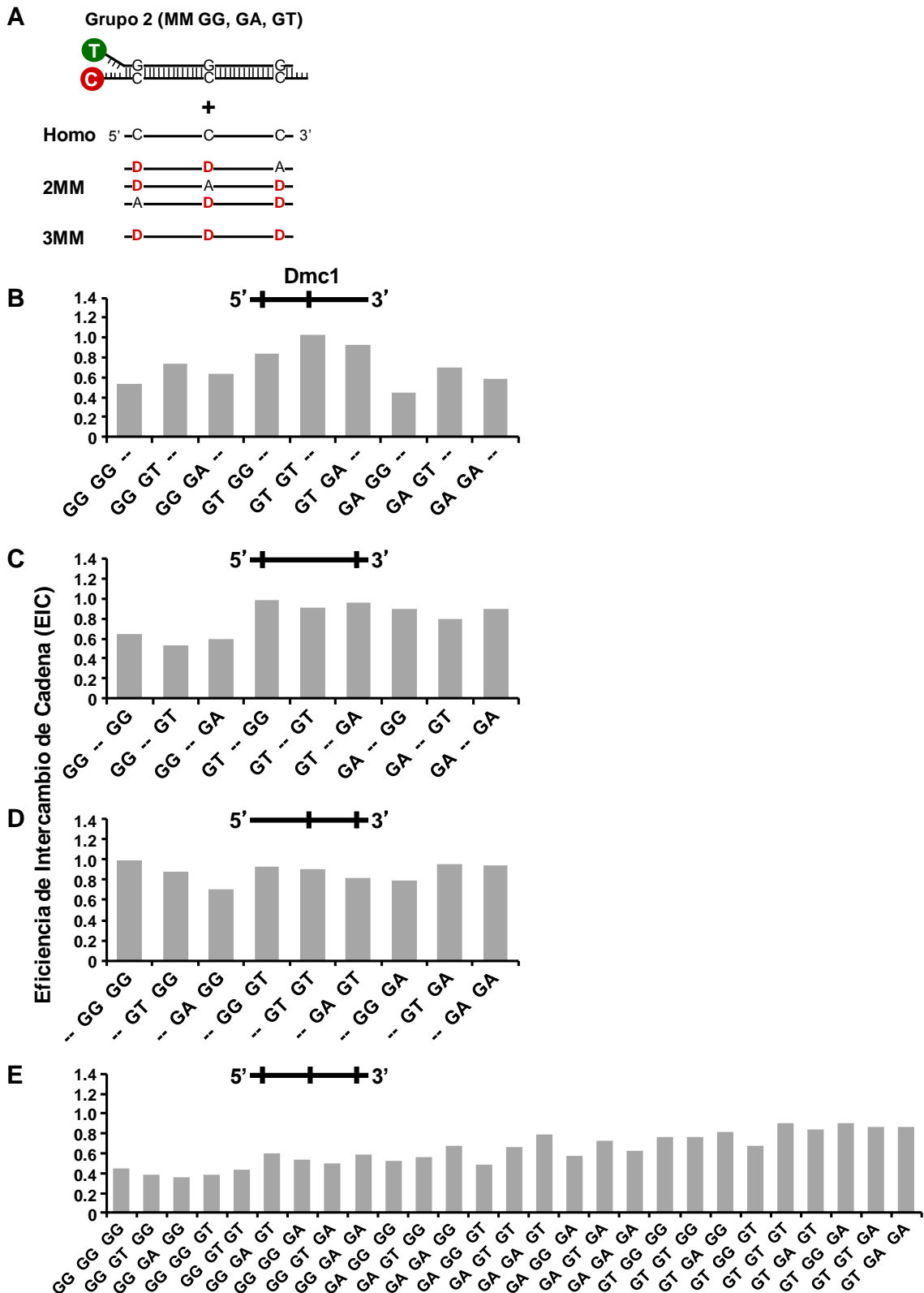


Figura A3. Efecto de la distribución de dos y tres mismatches del grupo 2 (GT, GA y GG) en el intercambio de cadenas catalizado por Dmc1. (A) Esquema de los sustratos de ADN utilizados para estudiar dos y tres mismatches del grupo 2 (GT, GA y GG) en distintas posiciones del ADNsc inicial. “D” representa a los nucleótidos T, A ó G. (B-E) Eficiencia de Intercambio de cadena obtenida en las reacciones catalizadas por Dmc1 en presencia de dos o tres mismatches en diferentes posiciones del ADNsc inicial. En el eje X se indica el tipo de mismatch en cada posición (extremo 5', medio o extremo 3'). Los guiones indican la ausencia de mismatch en esa posición.

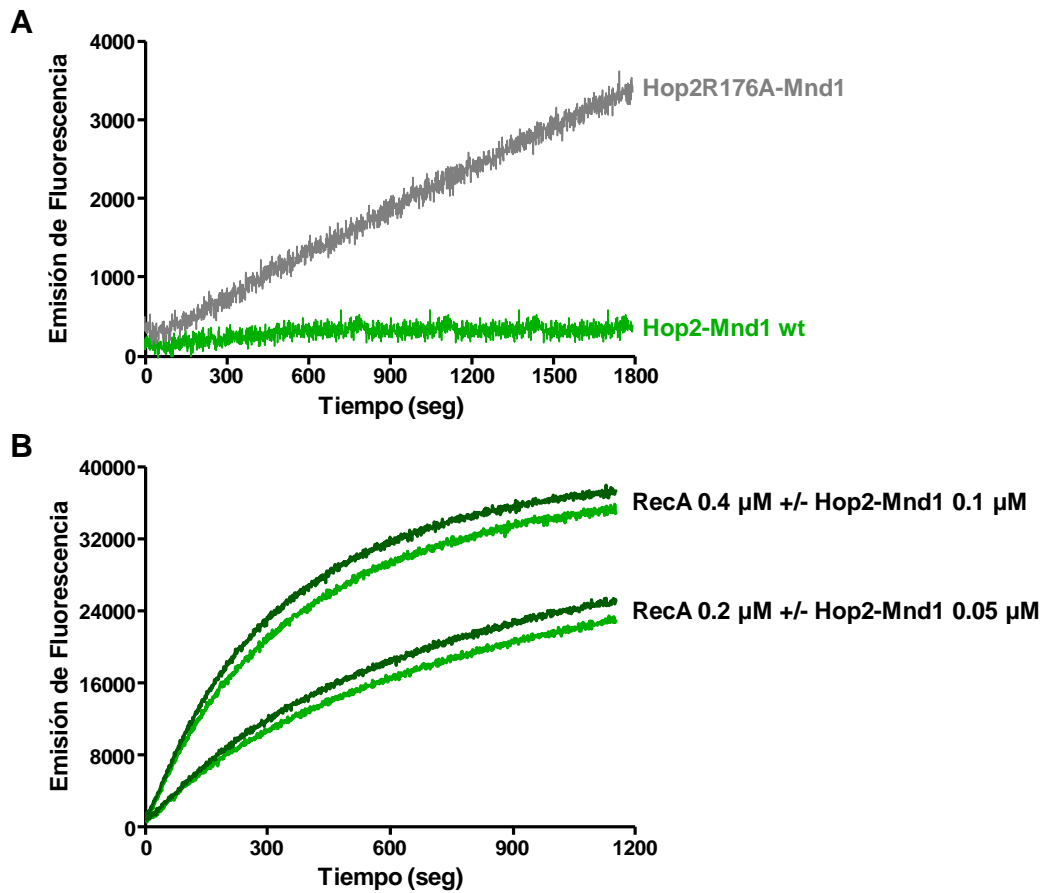


Figura A4. (A) Reacciones de intercambio de cadenas catalizadas por Hop2-Mnd1wt y Hop2R176A-Mnd1 en ausencia de Dmc1. Se utilizó ADN 100% homólogo y 0.75 μ M de cada proteína. (B) Cinéticas de las reacciones de intercambio catalizadas por RecA entre ADN 100% homólogo en presencia o ausencia de Hop2-Mnd1wt. λ exc: 556 nm, λ em: 580 nm.

Tabla A1. Temperatura de Fusión, Entalpía y Entropía de los ADNdc^{FINAL} que contenían un mismatch en el extremo 5' o 3' y el ADN homólogo de cada grupo. Los valores fueron obtenidos con el programa informático MELTING 5

ADNdc ^{FINAL}	Temperatura de Fusión (° C)	Entalpía (J/mol)	Entropía (J/mol K)
Tipo y posición de mismatch			
5'TG ¹	73.13	-355000	-967.9
3'TG ¹	72.93	-353100	-963.1
5'TC ¹	71.87	-350400	-958.6
3'TC ¹	72.03	-347500	-949.9
5'TT ¹	71.95	-356100	-974.5
3'TT ¹	72.26	-352500	-963.4
5'GG ²	74.55	-356600	-968.1
3'GG ²	74.41	-351200	-953.3
5'GA ²	75.11	-350000	-947.9
3'GA ²	74.78	-345600	-936.5
5'GT ²	74.64	-350400	-950.4
3'GT ²	74.71	-350800	-951.3
5'CA ³	74.65	-344900	-934.9
3'CA ³	74.47	-342800	929.5
5'CC ³	72.8	-353600	-964.8
3'CC ³	74.15	-347700	-944.2
5'CT ³	74.06	-352900	-959.1
3'CT ³	73.88	-352600	-958.8
5'AG ⁴	72.09	-350700	-958.8
3'AG ⁴	72.22	-350100	-956.7
5'AC ⁴	71.48	-343200	-939.3
3'AC ⁴	71.95	-342800	-936.8
5'AA ⁴	71.78	-345800	-945.8
3'AA ⁴	72.6	-343000	-935.5
Homólogo			
TA ¹	73.99	-364100	-991
GC ²	76.47	-364400	-984.2
CG ³	76.52	-371100	-1002.8
AT ⁴	76.52	-361800	-986.5

Superíndice: indica el grupo al cual pertenece cada ADNdc^{FINAL} analizado (ver Fig. R6)

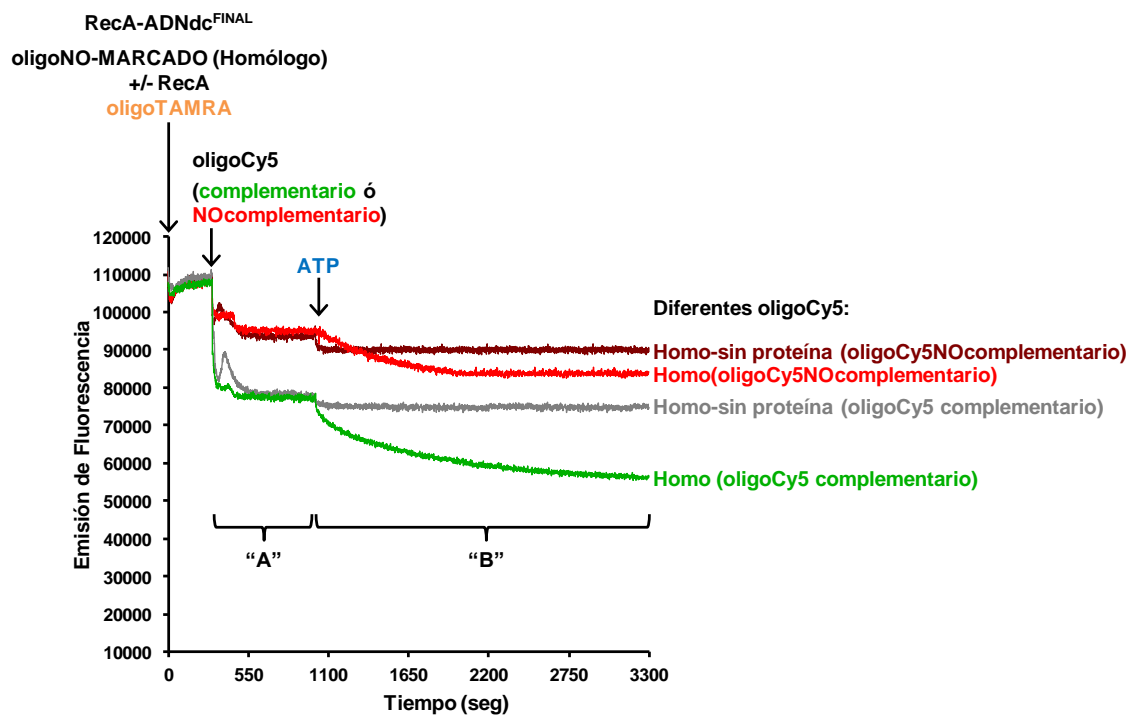


Figura A5. Análisis de las reacciones reversas utilizando oligoCy5complementario o no complementario (heterólogo) al oligoTAMRA. El gráfico muestra la cinética de la reacción en presencia y ausencia de RecA.

Disminución de fluorescencia en las etapas "A" y "B" de las reacciones reversas

oligoCy5	"A"	"B"
Homo-sin proteína (Cy5 NOcomplementario)	15259,3	4042,7
Homo (oligoCy5 NOcomplementario)	13185,7	11256
Homo-sin proteína (Cy5 complementario)	31707	3620,7
Homo (oligoCy5 complementario)	31499,4	20458,6

Al utilizar el oligoCy5 NO complementario se observa una disminución de fluorescencia de ~15000 en la etapa "A" la cual se debería a la presencia de los dos fluróforos en el mismo tubo de reacción.

Al utilizar el oligoCy5 complementario se observa una disminución de fluorescencia de ~31000 en la etapa "A" la cual se debería, por un lado, a la presencia de los dos fluróforos en el mismo tubo de reacción (~15000), y por otro lado, a la hibridación entre el oligoTamra que queda libre (que no se hibridó con el oligoNO-MARCADO) y el oligoCy5 complementario. Esta hibridación sería independiente de RecA, ya que se observa la misma disminución en presencia o ausencia de RecA.

Figura A6. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos de las regiones de solapamiento de LacZ Δ C y LacZ Δ N homeólogas. Las bases mal apareadas entre dichas secuencias (64 bases; 5% de divergencia) se indican en amarillo. Dichos cambios son utilizados como marcadores para determinar las regiones probables del inicio del intercambio de cadenas (**Figura R25**).

```

LacZC      ATGAAGACCAGCCCTTCCCAGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTAC 60
LacZN      ATGAAGACCAGCCCTTCCCAGGCGGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTGC 60
*****

LacZC      CTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCACGCGATGGGTAAACAGTCTTG 120
LacZN      CTGGAGAAATGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATATGCCACGCGATGGGTAAACAGTCTTG 120
*****

LacZC      GCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCGCTTACAGGCGGCTTCG 180
LacZN      GCGGCTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTACCCCGCTTACAGGCGGCTTCG 180
****

LacZC      TCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGG 240
LacZN      TCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGG 240
*****

LacZC      CTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGG 300
LacZN      CTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGG 300
*****

LacZC      TCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAACAGCAGTATT 360
LacZN      TCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCGGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAACAGCAGTATT 360
*****

LacZC      TCCAGTTCGGTTTATCCGGGCAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATA 420
LacZN      TCCAGTTCGGTTTATCCGGGCGAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATA 420
*****

LacZC      GCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGTTAAGCCGCTGGCAAGCGGTG 480
LacZN      GCGATAACGAGTTCTGCACTGGATGGTGGCACTGGATGGCAAGCCGCTGGCAAGCGGTG 480
*****

LacZC      AAGTGCCTCTGGATGTGCTCCAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGC 540
LacZN      AAGTGCCTCTGGATGTTGGCCGCAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTGCCG 540
*****

LacZC      AGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACCGGACCG 600
LacZN      AGCCGGAGAGCGCCGGACAACTCTGGCTAACGGTACGCGTAGTGCAACCGAACCGGACCG 600
*****

LacZC      CATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCA 660
LacZN      CATGGTCAGAAGCCGGACACATCAGCGCCTGGCAGCAATGGCGTCTGGCGGAAAACCTCA 660
*****

LacZC      GTGTGACGCTCCCCGCCGCTCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATT 720
LacZN      GCGTGACACTCCCCCTCCGCTCCACGCCATCCCTCAACTGACCACCAGCGAACGGATT 720
*

LacZC      TTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACC GCCAGTCAGGCTTCTTTTCAC 780
LacZN      TTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACC GCCAGTCAGGCTTCTTTTCAC 780
*****

LacZC      AGATGTGGATTGGCGATAAAAACAACGCTGACGCCGTGCGCGATCAGTTCACCCGTG 840
LacZN      AGATGTGGATTGGCGATGGAAAACAACGCTGACC GCCGTGCGCGATCAGTTCACCCGTG 840
*****

LacZC      CACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGATTGACCCTAACGCCTGGG 900
LacZN      CGCCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGATTGACCCTAACGCCTGGG 900
*

```

```

LacZC      TCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGG 960
LacZN      TCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGG 960
*****

LacZC      CAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGA 1020
LacZN      CAGATACACTTGCTCGACGCGGTGCTGATTACAACCGCCACGCGTGGCAGCATCAGGGGA 1020
*****

LacZC      AAACCTTATTTATCAGCCGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTA 1080
LacZN      AAACCTTATTTATCAGCCGAAAACCTACCGGATTGATGGGCACGGTGAGATGGTCATCA 1080
*****

LacZC      CCGTGATGTTGAAAGTGGCGAGCGATACCCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCC 1140
LacZN      ATGTGGATGTTGCGGTGGCAAGCGATACCCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGACTGCC 1140
** *

LacZC      AGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAAGGCCGCAAGAAAACATC 1200
LacZN      AGCTGGCGCAGGTCTCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGCCTGGGCCGCAAGAAAACATC 1200
*****

LacZC      CCGACCGCCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCTAGACATGTATA 1260
LacZN      CCGACCGCCTTACTGCAAGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCTAGACATGTATA 1260
*****

LacZC      CCCCCTAC 1268
LacZN      CCCCCTAC 1268
*****

```

REFERENCIAS

1. Soucy, S.M., J. Huang, and J.P. Gogarten, *Horizontal gene transfer: building the web of life*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(8): p. 472-82.
2. Brown, T.A., in *Genomes*. 2002: Oxford.
3. Kowalczykowski, S.C., et al., *Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1994. **58**(3): p. 401-65.
4. Smith, G.R., *Homologous recombination in procaryotes*. Microbiol Rev, 1988. **52**(1): p. 1-28.
5. Neale, M.J. and S. Keeney, *Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination*. Nature, 2006. **442**(7099): p. 153-8.
6. Kowalczykowski, S.C. and A.K. Eggleston, *Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 991-1043.
7. Cox, M.M., *The bacterial RecA protein as a motor protein*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 551-77.
8. Cox, M.M., *Motoring along with the bacterial RecA protein*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 127-38.
9. Chen, Z., H. Yang, and N.P. Pavletich, *Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 489-4.
10. Renkawitz, J., C.A. Lademann, and S. Jentsch, *Mechanisms and principles of homology search during recombination*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(6): p. 369-83.
11. Prentiss, M., C. Prevost, and C. Danilowicz, *Structure/function relationships in RecA protein-mediated homology recognition and strand exchange*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(6): p. 453-76.
12. Bzymek, M. and S.T. Lovett, *Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8319-25.
13. Bzymek, M. and S.T. Lovett, *Evidence for two mechanisms of palindrome-stimulated deletion in Escherichia coli: single-strand annealing and replication slipped mispairing*. Genetics, 2001. **158**(2): p. 527-40.
14. Lovett, S.T., *Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences*. Mol Microbiol, 2004. **52**(5): p. 1243-53.
15. Rocha, E.P., *An appraisal of the potential for illegitimate recombination in bacterial genomes and its consequences: from duplications to genome reduction*. Genome Res, 2003. **13**(6A): p. 1123-32.
16. Levinson, G. and G.A. Gutman, *Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution*. Mol Biol Evol, 1987. **4**(3): p. 203-21.
17. Levinson, G. and G.A. Gutman, *High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in Escherichia coli K-12*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(13): p. 5323-38.
18. Michel, B., *Replication fork arrest and DNA recombination*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(4): p. 173-8.

19. Ithurbide, S., et al., *Single Strand Annealing Plays a Major Role in RecA-Independent Recombination between Repeated Sequences in the Radioresistant Deinococcus radiodurans Bacterium*. PLoS Genet, 2015. **11**(10): p. e1005636.
20. Moore, J.K. and J.E. Haber, *Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2164-73.
21. Lieber, M.R., *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 181-211.
22. Mao, Z., et al., *Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(10): p. 1765-71.
23. Grindley, N.D., K.L. Whiteson, and P.A. Rice, *Mechanisms of site-specific recombination*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 567-605.
24. Nunes-Duby, S.E., M.A. Azaro, and A. Landy, *Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination*. Curr Biol, 1995. **5**(2): p. 139-48.
25. Feschotte, C., N. Jiang, and S.R. Wessler, *Plant transposable elements: where genetics meets genomics*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(5): p. 329-41.
26. Kazazian, H.H., Jr., *Mobile elements: drivers of genome evolution*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1626-32.
27. Khanna, K.K. and S.P. Jackson, *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 247-54.
28. Keeney, S., C.N. Giroux, and N. Kleckner, *Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family*. Cell, 1997. **88**(3): p. 375-84.
29. Neale, M.J., J. Pan, and S. Keeney, *Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 1053-7.
30. Keeney, S., *Mechanism and control of meiotic recombination initiation*. Curr Top Dev Biol, 2001. **52**: p. 1-53.
31. Kleckner, N., *Meiosis: how could it work?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8167-74.
32. Hassold, T.J. and P.A. Jacobs, *Trisomy in man*. Annu Rev Genet, 1984. **18**: p. 69-97.
33. Hunt, P.A. and T.J. Hassold, *Human female meiosis: what makes a good egg go bad?* Trends Genet, 2008. **24**(2): p. 86-93.
34. Wiedenbeck, J. and F.M. Cohan, *Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches*. FEMS Microbiol Rev, 2011. **35**(5): p. 957-76.
35. Groisman, E.A. and H. Ochman, *Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps*. Cell, 1996. **87**(5): p. 791-4.
36. !!! INVALID CITATION !!!
37. Atkinson, J. and P. McGlynn, *Replication fork reversal and the maintenance of genome stability*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(11): p. 3475-92.
38. Kuzminov, A., *DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8461-8.

39. Kuzminov, A., *Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8241-6.
40. Meselson, M.S. and C.M. Radding, *A general model for genetic recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(1): p. 358-61.
41. Holliday, R., *A mechanism for gene conversion in fungi*. Genet Res, 2007. **89**(5-6): p. 285-307.
42. Santoyo, G. and D. Romero, *Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(2): p. 169-83.
43. Nowosielska, A., *Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability*. Acta Biochim Pol, 2007. **54**(3): p. 483-94.
44. Kowalczykowski, S.C., *Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(4): p. 156-65.
45. Handa, N., et al., *Direct visualization of RecBCD movement reveals cotranslocation of the RecD motor after chi recognition*. Mol Cell, 2005. **17**(5): p. 745-50.
46. Cox, M.M., *Regulation of bacterial RecA protein function*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007. **42**(1): p. 41-63.
47. Arnold, D.A. and S.C. Kowalczykowski, *Facilitated loading of RecA protein is essential to recombination by RecBCD enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12261-5.
48. Taylor, A.F. and G.R. Smith, *RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity*. Nature, 2003. **423**(6942): p. 889-93.
49. Anderson, D.G. and S.C. Kowalczykowski, *The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a chi-regulated manner*. Cell, 1997. **90**(1): p. 77-86.
50. Georgescu, R.E., et al., *Mechanism of polymerase collision release from sliding clamps on the lagging strand*. EMBO J, 2009. **28**(19): p. 2981-91.
51. Lovett, S.T. and R.D. Kolodner, *Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the recJ gene of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2627-31.
52. Shan, Q., et al., *RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins*. J Mol Biol, 1997. **265**(5): p. 519-40.
53. Sandler, S.J., *Overlapping functions for recF and priA in cell viability and UV-inducible SOS expression are distinguished by dnaC809 in Escherichia coli K-12*. Mol Microbiol, 1996. **19**(4): p. 871-80.
54. Webb, B.L., M.M. Cox, and R.B. Inman, *ATP hydrolysis and DNA binding by the Escherichia coli RecF protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15367-74.
55. Rangarajan, S., R. Woodgate, and M.F. Goodman, *Replication restart in UV-irradiated Escherichia coli involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins*. Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 617-28.
56. Courcelle, J. and P.C. Hanawalt, *Participation of recombination proteins in rescue of arrested replication forks in UV-irradiated Escherichia coli need not involve recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8196-202.
57. Amundsen, S.K. and G.R. Smith, *Interchangeable parts of the Escherichia coli recombination machinery*. Cell, 2003. **112**(6): p. 741-4.

58. Meyer, R.R. and P.S. Laine, *The single-stranded DNA-binding protein of Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1990. **54**(4): p. 342-80.
59. Bork, J.M., M.M. Cox, and R.B. Inman, *The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single-stranded DNA*. EMBO J, 2001. **20**(24): p. 7313-22.
60. Hobbs, M.D., A. Sakai, and M.M. Cox, *SSB protein limits RecOR binding onto single-stranded DNA*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11058-67.
61. Kowalczykowski, S.C., et al., *Effects of the Escherichia coli SSB protein on the binding of Escherichia coli RecA protein to single-stranded DNA. Demonstration of competitive binding and the lack of a specific protein-protein interaction*. J Mol Biol, 1987. **193**(1): p. 81-95.
62. Lusetti, S.L., et al., *The DinI protein stabilizes RecA protein filaments*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30037-46.
63. Drees, J.C., S.L. Lusetti, and M.M. Cox, *Inhibition of RecA protein by the Escherichia coli RecX protein: modulation by the RecA C terminus and filament functional state*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 52991-7.
64. Lusetti, S.L., et al., *The RecF protein antagonizes RecX function via direct interaction*. Mol Cell, 2006. **21**(1): p. 41-50.
65. Veaute, X., et al., *UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in Escherichia coli*. EMBO J, 2005. **24**(1): p. 180-9.
66. Tsaneva, I.R., et al., *Purification and properties of the RuvA and RuvB proteins of Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1992. **235**(1): p. 1-10.
67. West, S.C., *Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 213-44.
68. West, S.C., *Molecular views of recombination proteins and their control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 435-45.
69. Eggleston, A.K. and S.C. West, *Cleavage of holliday junctions by the Escherichia coli RuvABC complex*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26467-76.
70. McGlynn, P. and R.G. Lloyd, *RecG helicase activity at three- and four-strand DNA structures*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(15): p. 3049-56.
71. McGlynn, P. and R.G. Lloyd, *Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression*. Cell, 2000. **101**(1): p. 35-45.
72. McGlynn, P. and R.G. Lloyd, *Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8227-34.
73. Briggs, G.S., et al., *Interplay between DNA replication, recombination and repair based on the structure of RecG helicase*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004. **359**(1441): p. 49-59.
74. Handa, N., et al., *Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of E. coli*. Genes Dev, 2009. **23**(10): p. 1234-45.
75. Corrette-Bennett, S.E. and S.T. Lovett, *Enhancement of RecA strand-transfer activity by the RecJ exonuclease of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6881-5.
76. Masson, J.Y. and S.C. West, *The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(2): p. 131-6.

77. Kagawa, W. and H. Kurumizaka, *From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmc1*. FEBS J, 2010. **277**(3): p. 590-8.
78. Sehorn, M.G. and P. Sung, *Meiotic recombination: an affair of two recombinases*. Cell Cycle, 2004. **3**(11): p. 1375-7.
79. Stasiak, A. and E. Di Capua, *The helicity of DNA in complexes with recA protein*. Nature, 1982. **299**(5879): p. 185-6.
80. Story, R.M. and T.A. Steitz, *Structure of the recA protein-ADP complex*. Nature, 1992. **355**(6358): p. 374-6.
81. Kelley De Zutter, J., et al., *Phe217 regulates the transfer of allosteric information across the subunit interface of the RecA protein filament*. Structure, 2001. **9**(1): p. 47-55.
82. Kurumizaka, H., et al., *A possible role of the C-terminal domain of the RecA protein. A gateway model for double-stranded DNA binding*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33515-24.
83. Howard-Flanders, P., et al., *Molecular mechanisms of general genetic recombination: the DNA-binding sites of RecA protein*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1984. **49**: p. 571-80.
84. Mazin, A.V. and S.C. Kowalczykowski, *The specificity of the secondary DNA binding site of RecA protein defines its role in DNA strand exchange*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10673-8.
85. Bell, C.E., *Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase*. Mol Microbiol, 2005. **58**(2): p. 358-66.
86. Menge, K.L. and F.R. Bryant, *Effect of nucleotide cofactor structure on recA protein-promoted DNA pairing. 1. Three-strand exchange reaction*. Biochemistry, 1992. **31**(22): p. 5151-7.
87. Menge, K.L. and F.R. Bryant, *Effect of nucleotide cofactor structure on recA protein-promoted DNA pairing. 2. DNA renaturation reaction*. Biochemistry, 1992. **31**(22): p. 5158-65.
88. Haruta, N., et al., *A DNA pairing-enhanced conformation of bacterial RecA proteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52710-23.
89. Qi, Z., et al., *DNA sequence alignment by microhomology sampling during homologous recombination*. Cell, 2015. **160**(5): p. 856-69.
90. Bishop, D.K., *RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1081-92.
91. Dresser, M.E., et al., *DMC1 functions in a Saccharomyces cerevisiae meiotic pathway that is largely independent of the RAD51 pathway*. Genetics, 1997. **147**(2): p. 533-44.
92. Shinohara, A., et al., *Saccharomyces cerevisiae recA homologues RAD51 and DMC1 have both distinct and overlapping roles in meiotic recombination*. Genes Cells, 1997. **2**(10): p. 615-29.
93. Schwacha, A. and N. Kleckner, *Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1123-35.
94. Conway, A.B., et al., *Crystal structure of a Rad51 filament*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(8): p. 791-6.
95. Gupta, R.C., et al., *Polarity of DNA strand exchange promoted by recombination proteins of the RecA family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9843-8.
96. Mazin, A.V., et al., *Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing*. EMBO J, 2000. **19**(5): p. 1148-56.

97. Bishop, D.K., et al., *DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of E. coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression*. Cell, 1992. **69**(3): p. 439-56.
98. Gupta, R.C., et al., *The synaptic activity of HsDmc1, a human recombination protein specific to meiosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8433-9.
99. Sehorn, M.G., et al., *Human meiotic recombinase Dmc1 promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 433-7.
100. Masson, J.Y., et al., *The meiosis-specific recombinase hDmc1 forms ring structures and interacts with hRad51*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6552-60.
101. Kinebuchi, T., et al., *Structural basis for octameric ring formation and DNA interaction of the human homologous-pairing protein Dmc1*. Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 363-74.
102. Sheridan, S.D., et al., *A comparative analysis of Dmc1 and Rad51 nucleoprotein filaments*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(12): p. 4057-66.
103. Petukhova, G.V., et al., *The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 449-53.
104. Pezza, R.J., et al., *Molecular activities of meiosis-specific proteins Hop2, Mnd1, and the Hop2-Mnd1 complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18426-34.
105. Pezza, R.J., et al., *Hop2/Mnd1 acts on two critical steps in Dmc1-promoted homologous pairing*. Genes Dev, 2007. **21**(14): p. 1758-66.
106. Pezza, R.J., R.D. Camerini-Otero, and P.R. Bianco, *Hop2-Mnd1 condenses DNA to stimulate the synapsis phase of DNA strand exchange*. Biophys J, 2010. **99**(11): p. 3763-72.
107. Spratt, B.G., W.P. Hanage, and E.J. Feil, *The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(5): p. 602-6.
108. Sagi, D., T. Tlusty, and J. Stavans, *High fidelity of RecA-catalyzed recombination: a watchdog of genetic diversity*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(18): p. 5021-31.
109. Modrich, P. and R. Lahue, *Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 101-33.
110. Fukui, K., *DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**.
111. Holmes, V.F., et al., *Bypass of heterology during strand transfer by Saccharomyces cerevisiae Rad51 protein*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(24): p. 5052-7.
112. Bazemore, L.R., et al., *RecA tests homology at both pairing and strand exchange*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 11863-8.
113. Gupta, R.C., et al., *Rapid exchange of A:T base pairs is essential for recognition of DNA homology by human Rad51 recombination protein*. Mol Cell, 1999. **4**(5): p. 705-14.
114. Folta-Stogniew, E., et al., *Exchange of DNA base pairs that coincides with recognition of homology promoted by E. coli RecA protein*. Mol Cell, 2004. **15**(6): p. 965-75.
115. Volodin, A.A., et al., *Reversibility, equilibration, and fidelity of strand exchange reaction between short oligonucleotides promoted by RecA protein from escherichia coli and human Rad51 and Dmc1 proteins*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1495-504.
116. Kunkel, T.A. and D.A. Erie, *DNA mismatch repair*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 681-710.
117. Schofield, M.J. and P. Hsieh, *DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 579-608.

118. Jiricny, J., *The multifaceted mismatch-repair system*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 335-46.
119. Spampinato, C.P., et al., *From bacteria to plants: a compendium of mismatch repair assays*. Mutat Res, 2009. **682**(2-3): p. 110-28.
120. Lahue, R.S. and P. Modrich, *Methyl-directed DNA mismatch repair in Escherichia coli*. Mutat Res, 1988. **198**(1): p. 37-43.
121. Eisen, J.A. and P.C. Hanawalt, *A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes*. Mutat Res, 1999. **435**(3): p. 171-213.
122. Kadyrov, F.A., et al., *Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair*. Cell, 2006. **126**(2): p. 297-308.
123. Kadyrov, F.A., et al., *Saccharomyces cerevisiae MutLalpha is a mismatch repair endonuclease*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37181-90.
124. Correa, E.M., et al., *Some amino acids of the Pseudomonas aeruginosa MutL D(Q/M)HA(X)(2)E(X)(4)E 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.
125. Stambuk, S. and M. Radman, *Mechanism and control of interspecies recombination in Escherichia coli. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions*. Genetics, 1998. **150**(2): p. 533-42.
126. Junop, M.S., et al., *In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(4): p. 387-405.
127. Elez, M., M. Radman, and I. Matic, *The frequency and structure of recombinant products is determined by the cellular level of MutL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8935-40.
128. Tham, K.C., et al., *Mismatch repair inhibits homeologous recombination via coordinated directional unwinding of trapped DNA structures*. Mol Cell, 2013. **51**(3): p. 326-37.
129. Honda, M., et al., *Mismatch repair protein hMSH2-hMSH6 recognizes mismatches and forms sliding clamps within a D-loop recombination intermediate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(3): p. E316-25.
130. Lovett, S.T. and V.V. Feschenko, *Stabilization of diverged tandem repeats by mismatch repair: evidence for deletion formation via a misaligned replication intermediate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7120-4.
131. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature, 2000. **406**(6799): p. 959-64.
132. Moreau-Marquis, S., B.A. Stanton, and G.A. O'Toole, *Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway*. Pulm Pharmacol Ther, 2008. **21**(4): p. 595-9.
133. Macia, M.D., et al., *Detection and susceptibility testing of hypermutable Pseudomonas aeruginosa strains with the Etest and disk diffusion*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(7): p. 2665-72.
134. Oliver, A., et al., *High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection*. Science, 2000. **288**(5469): p. 1251-4.
135. 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.

136. Feliziani, S., et al., *Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis chronic airways infections*. PLoS One, 2010. **5**(9).
137. Darch, S.E., et al., *Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a Pseudomonas aeruginosa population during cystic fibrosis infection*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 7649.
138. Jacquelin, D.K., et al., *Pseudomonas aeruginosa MutL protein functions in Escherichia coli*. Biochem J, 2005. **388**(Pt 3): p. 879-87.
139. 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.
140. 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.
141. Baitin, D.M., E.N. Zaitsev, and V.A. Lanzov, *Hyper-recombinogenic RecA protein from Pseudomonas aeruginosa with enhanced activity of its primary DNA binding site*. J Mol Biol, 2003. **328**(1): p. 1-7.
142. Baitin, D.M., et al., *Distinguishing characteristics of hyperrecombinogenic RecA protein from Pseudomonas aeruginosa acting in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(16): p. 5812-20.
143. Worth, L., Jr., et al., *Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(8): p. 3238-41.
144. Calmann, M.A., J.E. Evans, and M.G. Marinus, *MutS inhibits RecA-mediated strand transfer with methylated DNA substrates*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(11): p. 3591-7.
145. Malkov, V.A. and R.D. Camerini-Otero, *Dissociation kinetics of RecA protein-three-stranded DNA complexes reveals a low fidelity of RecA-assisted recognition of homology*. J Mol Biol, 1998. **278**(2): p. 317-30.
146. Brown, J., T. Brown, and K.R. Fox, *Cleavage of fragments containing DNA mismatches by enzymic and chemical probes*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 3): p. 697-708.
147. Rossetti, G., et al., *The structural impact of DNA mismatches*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(8): p. 4309-21.
148. Kramer, B., W. Kramer, and H.J. Fritz, *Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of E. coli*. Cell, 1984. **38**(3): p. 879-87.
149. Joshi, A. and B.J. Rao, *MutS recognition: multiple mismatches and sequence context effects*. J Biosci, 2001. **26**(5): p. 595-606.
150. Sharma, M., et al., *DNA bending propensity in the presence of base mismatches: implications for DNA repair*. J Phys Chem B, 2013. **117**(20): p. 6194-205.
151. Bucka, A. and A. Stasiak, *RecA-mediated strand exchange traverses substitutional heterologies more easily than deletions or insertions*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(12): p. 2464-70.
152. Zhao, W., et al., *Mechanistic insights into the role of Hop2-Mnd1 in meiotic homologous DNA pairing*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(2): p. 906-17.
153. Le Novere, N., *MELTING, computing the melting temperature of nucleic acid duplex*. Bioinformatics, 2001. **17**(12): p. 1226-7.
154. Dumousseau, M., et al., *MELTING, a flexible platform to predict the melting temperatures of nucleic acids*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 101.

155. Sung, P. and D.L. Robberson, *DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA*. Cell, 1995. **82**(3): p. 453-61.
156. Friedman-Ohana, R. and A. Cohen, *Heteroduplex joint formation in Escherichia coli recombination is initiated by pairing of a 3'-ending strand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6909-14.
157. Baumann, P. and S.C. West, *Heteroduplex formation by human Rad51 protein: effects of DNA end-structure, hRP-A and hRad52*. J Mol Biol, 1999. **291**(2): p. 363-74.
158. Gupta, R.C., et al., *Activities of human recombination protein Rad51*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 463-8.
159. Stasiak, A., E. Di Capua, and T. Koller, *Elongation of duplex DNA by recA protein*. J Mol Biol, 1981. **151**(3): p. 557-64.
160. Volodin, A.A., H.A. Smirnova, and T.N. Bocharova, *Binding, annealing and strand exchange between oligonucleotides in different sites of the RecA protein filament*. FEBS Lett, 2000. **473**(1): p. 53-7.
161. 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.
162. Rosche, W.A. and P.L. Foster, *Determining mutation rates in bacterial populations*. Methods, 2000. **20**(1): p. 4-17.
163. Zheng, Q., *Statistical and algorithmic methods for fluctuation analysis with SALVADOR as an implementation*. Math Biosci, 2002. **176**(2): p. 237-52.
164. Rayssiguier, C., D.S. Thaler, and M. Radman, *The barrier to recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch-repair mutants*. Nature, 1989. **342**(6248): p. 396-401.
165. Evans, E. and E. Alani, *Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 7839-44.
166. Calmann, M.A., A. Nowosielska, and M.G. Marinus, *The MutS C terminus is essential for mismatch repair activity in vivo*. J Bacteriol, 2005. **187**(18): p. 6577-9.
167. Lopez de Saro, F.J., *Regulation of interactions with sliding clamps during DNA replication and repair*. Curr Genomics, 2009. **10**(3): p. 206-15.
168. 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.
169. Simmons, L.A., et al., *Beta clamp directs localization of mismatch repair in Bacillus subtilis*. Mol Cell, 2008. **29**(3): p. 291-301.
170. 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.
171. Patel, D.J., et al., *Dynamics of DNA duplexes containing internal G.T, G.A, A.C, and T.C pairs: hydrogen exchange at and adjacent to mismatch sites*. Fed Proc, 1984. **43**(11): p. 2663-70.
172. Peyret, N., et al., *Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches*. Biochemistry, 1999. **38**(12): p. 3468-77.
173. Lane, A.N. and B. Peck, *Conformational flexibility in DNA duplexes containing single G.G mismatches*. Eur J Biochem, 1995. **230**(3): p. 1073-87.

174. Peacock-Villada, A., et al., *Complementary strand relocation may play vital roles in RecA-based homology recognition*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(20): p. 10441-51.
175. Bloom, L.B., et al., *Fidelity of Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme. The effects of beta, gamma complex processivity proteins and epsilon proofreading exonuclease on nucleotide misincorporation efficiencies*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27919-30.
176. Goodman, M.F., *Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10493-5.
177. Lee, J.Y., et al., *DNA RECOMBINATION. Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases*. Science, 2015. **349**(6251): p. 977-81.
178. Chi, P., et al., *Bipartite stimulatory action of the Hop2-Mnd1 complex on the Rad51 recombinase*. Genes Dev, 2007. **21**(14): p. 1747-57.
179. Pezza, R.J., et al., *The dual role of HOP2 in mammalian meiotic homologous recombination*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(4): p. 2346-57.
180. Ochman, H., J.G. Lawrence, and E.A. Groisman, *Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation*. Nature, 2000. **405**(6784): p. 299-304.
181. Van Dyck, E., et al., *Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing*. EMBO Rep, 2001. **2**(10): p. 905-9.
182. Sharples, G.J., S.M. Ingleston, and R.G. Lloyd, *Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA*. J Bacteriol, 1999. **181**(18): p. 5543-50.
183. Fabisiewicz, A. and L. Worth, Jr., *Escherichia coli MutS,L modulate RuvAB-dependent branch migration between diverged DNA*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9413-20.
184. Nakayama, H., *RecQ family helicases: roles as tumor suppressor proteins*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 9008-21.
185. Hanada, K., et al., *RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3860-5.
186. Burdett, V., et al., *In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6765-70.
187. Zhang, M., et al., *MutL associates with Escherichia coli RecA and inhibits its ATPase activity*. Arch Biochem Biophys, 2012. **517**(2): p. 98-103.
188. Holloway, B.W., *Genetics of Pseudomonas*. Bacteriol Rev, 1969. **33**(3): p. 419-43.
189. Pezza, R.J., et al., *Nucleotides and heteroduplex DNA preserve the active conformation of Pseudomonas aeruginosa MutS by preventing protein oligomerization*. Biochem J, 2002. **361**(Pt 1): p. 87-95.
190. Nigsch, F., et al., *Melting point prediction employing k-nearest neighbor algorithms and genetic parameter optimization*. J Chem Inf Model, 2006. **46**(6): p. 2412-22.
191. Owczarzy, R., et al., *Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures*. Biochemistry, 2004. **43**(12): p. 3537-54.
192. Jacobs, M.A., et al., *Comprehensive transposon mutant library of Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14339-44.

193. Miller, V.L. and J.J. Mekalanos, *A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires toxR*. J Bacteriol, 1988. **170**(6): p. 2575-83.
194. 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.
195. 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.
196. Boles, B.R., M. Thoendel, and P.K. Singh, *Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16630-5.
197. 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.
198. Nowosielska, A., et al., *Spontaneous and cisplatin-induced recombination in Escherichia coli*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(7): p. 719-28.
199. Margara, L.M., M.M. Fernández, E.L. Malchiodi, C.E. Argaraña and M.R. Monti, *MutS regulates access of the error-prone DNA polymerase Pol IV to replication 2 sites: a novel mechanism for maintaining replication fidelity*. Nucleic Acids Research, 2016 (manuscrito enviado para su publicación, en consideración).