

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



# Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0  
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

## Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

**Adaptar** — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

## Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



**CompartirIgual** — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

## Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.

A24A3

**EVOLUCIÓN GENÓMICA DE POBLACIONES DE  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* HIPERMUTADORAS  
EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN  
PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
QUÍMICAS

POR

**LIC. EN QUÍMICA SOFÍA FELIZIANI**

DIRECTORA: DRA. ANDREA M. SMANIA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA (CIQUIBIC) - CONICET  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



2014

.....

.....

.....

.....

Fecha de dictado: 7/7/2014

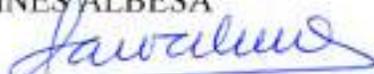
- DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ANDREA M. SMANIA

- COMISIÓN DE TESIS:



DRA. INÉS ALBESA



DRA. LAURA A. CERVI

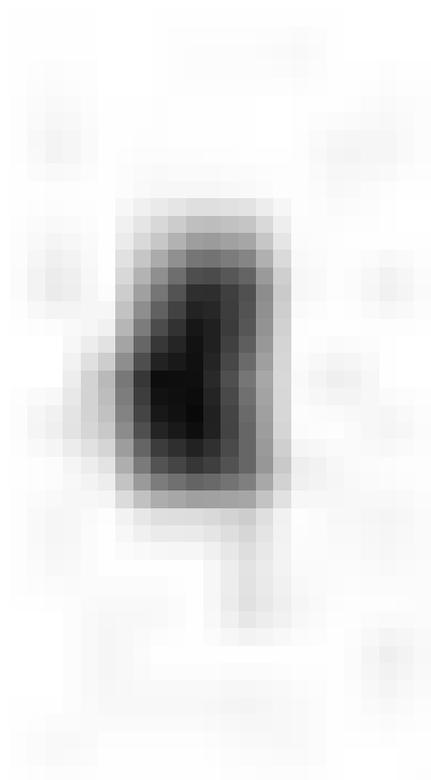


DR. JOSÉ R. ECHENIQUE

- EVALUADOR EXTERNO:



DR. FERNANDO SONCINI



*A mis padres, Graciela y José...*

*A mis hermanos, Constanza y Franco...*

*A Damián...*

*Porque los amo infinitamente.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Andrea Smania, por brindarme la posibilidad de realizar esta Tesis bajo su dirección, por su excepcional calidad humana, por su guía constante, por su confianza sincera, por su interminable paciencia y por transmitirme siempre su conocimiento y experiencia con humildad.

Al Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC) – CONICET y al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, por haberme permitido realizar mi trabajo de Tesis.

A los miembros de la Comisión de Tesis Dra. Inés Albesa, Dra. Laura A. Cervi y Dr. José R. Echenique por los valiosos aportes y seguimiento a lo largo de estos años, por su constante buena predisposición y por su crítica constructiva.

Al Dr. Fernando Soncini, quien generosamente aceptó ser el evaluador externo de esta Tesis.

Al CONICET, ANCYPT, UNC y ASM por el apoyo financiero brindado a través de sus programas de becas.

A Soren Molin por haberme brindado la posibilidad de realizar dos pasantías de investigación en su laboratorio.

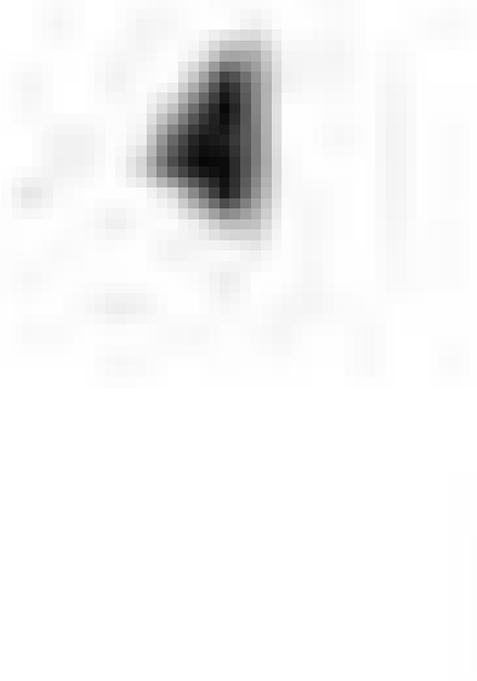
Al Dr. Carlos Argaraña por sus valiosos aportes.

A mis compañeros de laboratorio: Adela, Alejandro, Alin, Yanina, Maia, Luisina, Aranza, Lucía, Mariela, Natalia, Victoria, Virginia, Eugenia y Mariana, por haber propiciado un hermoso ambiente de trabajo, por brindarme su ayuda siempre que la necesité, y por haber compartido estos años con alegría y energías positivas.

A mis compañeros del CIQUI por la buena predisposición permanente, y por la amabilidad constante, permitiendo que este trabajo fuese más llevadero.

A mis amigos, especialmente a Ade, Luichi, Caró, Clau, Coty, Jime, Naty, Natacha, Gise, Laura, María y Anna, por escucharme siempre, por compartir momentos inolvidables y por brindarme su hermosa amistad que fue un sostén todos estos años.

A mis padres por su apoyo incondicional, por su amor constante, por su guía incansable, por su ayuda incondicional, y por ser siempre mis ejemplos de vida.



A mis hermanos, por su comprensión interminable, por su cariño, por su contención y apoyo en todo momento.

A Damián, por su hermosa compañía, por su ayuda permanente, por su paciencia eterna, y por estar a mi lado y brindarme su amor que es la razón de mi felicidad.

# TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. MECANISMOS DE MUTAGÉNESIS EN BACTERIAS.....	3
1.1. Hipermutabilidad estable: El Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS).....	4
1.2. Hipermutabilidad transiente.....	7
1.3. Hipermutabilidad localizada: Secuencias repetidas simples del ADN.....	8
2. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> EN INFECCIONES RESPIRATORIAS CRÓNICAS EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA.....	10
2.1. <i>P. aeruginosa</i> , un patógeno oportunista sumamente versátil.....	10
2.2. Fibrosis quística (FQ), características generales de la enfermedad.....	12
2.3. Microbiología de las infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ.....	13
2.4. Patofisiología de las infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ.....	14
2.5. Microevolución de <i>P. aeruginosa</i> en infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ.....	17
2.6. Hipermutabilidad estable en aislados FQ de <i>P. aeruginosa</i> .....	21
OBJETIVOS	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
RESULTADOS	24
<b>CAPÍTULO 1. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA HIPERMUTABILIDAD POR DEFICIENCIA EN EL MRS Y LA EMERGENCIA DE FENOTIPOS ADAPTATIVOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> EN AISLADOS OBTENIDOS DE PACIENTES ARGENTINOS FQ.....</b>	<b>24</b>
1.1. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados de <i>P. aeruginosa</i> obtenidos de una colección de pacientes argentinos FQ (colección CFL)...	25
1.2. Prevalencia de aislados de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en el MRS en la colección CFL.....	26

1.3. Análisis de mutaciones en los genes <i>mucA</i> , <i>lasR</i> y <i>mexZ</i> .....	28
1.4. Asociación entre hipermutabilidad estable y mutagénesis en los genes <i>mucA</i> , <i>lasR</i> y <i>mexZ</i> .....	32
1.5. Asociación entre hipermutabilidad estable y resistencia a antibióticos.....	33
1.6. Mutaciones en los genes <i>mucA</i> , <i>lasR</i> y <i>mexZ</i> y su relación con la resistencia a antibióticos.....	36
<b>CAPÍTULO 2. EVOLUCIÓN GENÓMICA Y ADAPTACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> DEFICIENTES EN EL MRS EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS</b> .....	38
2.1. Confección de colecciones longitudinales y transversales de aislados de <i>P. aeruginosa</i> obtenidos de pacientes FQ: Colecciones CFA y CFD	39
2.2. Prevalencia del fenotipo hipermutador por deficiencias en el MRS en las colecciones CFA y CFD de <i>P. aeruginosa</i> .....	41
2.3. Análisis genómico estructural de los aislados de <i>P. aeruginosa</i> de los linajes CFA y CFD.....	43
2.3.1. Análisis de las bases genéticas de la hipermutabilidad en los aislados de <i>P. aeruginosa</i> del linaje CFA.....	44
2.3.2. Análisis de las bases genéticas de la hipermutabilidad en los aislados de <i>P. aeruginosa</i> del linaje CFD.....	47
2.3.3. Evolución genómica de los linajes CFA y CFD de <i>P. aeruginosa</i> ....	49
2.3.4. Generación de diversidad genómica en las poblaciones hipermutadoras de <i>P. aeruginosa</i> durante su evolución en un mismo paciente FQ.....	51
2.3.5. Estudio de la mutagénesis en los reguladores globales <i>mucA</i> , <i>algU</i> , <i>lasR</i> , y <i>rpoN</i> , en las colecciones de <i>P. aeruginosa</i> CFA y CFD.....	59
2.3.6. Estudio global del espectro de mutación en los aislados de <i>P. aeruginosa</i> de los linajes CFA y CFD.....	61
2.3.7. Asociación entre hipermutabilidad estable e hipermutabilidad localizada durante la evolución de <i>P. aeruginosa</i> en infecciones pulmonares crónicas FQ.....	64



2.3.8. Genes patoadaptativos y evidencias de paralelismo evolutivo en las poblaciones de <i>P. aeruginosa</i> hipermutadoras CFA y CFD.....	71
---	----

2.4. Análisis global del metabolismo de los aislados de <i>P. aeruginosa</i> de los linajes CFA y CFD.....	74
--	----

---

DISCUSIÓN	76
-----------	----

1. Asociación entre la hipermutabilidad estable y la emergencia de mutaciones adaptativas en los genes <i>mucA</i> , <i>lasR</i> y <i>mexZ</i> en aislados de <i>P. aeruginosa</i> obtenidos de pacientes FQ.....	76
2. Selección y prevalencia del fenotipo hipermutador debido a la deficiencia en el MRS en aislados de <i>P. aeruginosa</i> obtenidos de pacientes FQ. Impacto de la hipermutabilidad estable en la evolución de <i>P. aeruginosa</i> en infecciones pulmonares crónicas.....	79
3. Diversidad genética a nivel poblacional y sesgo mutacional hacia genes con SSRs durante la evolución de <i>P. aeruginosa</i> en infecciones pulmonares crónicas FQ.....	84
4. Fenómeno de disminución de la frecuencia de mutación en cepas de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en el MRS en infecciones crónicas FQ.....	86
5. Hipermutabilidad estable y su asociación a la resistencia a antibióticos: el fenómeno de la emergencia de cepas hipermutadoras en infecciones crónicas FQ...	90

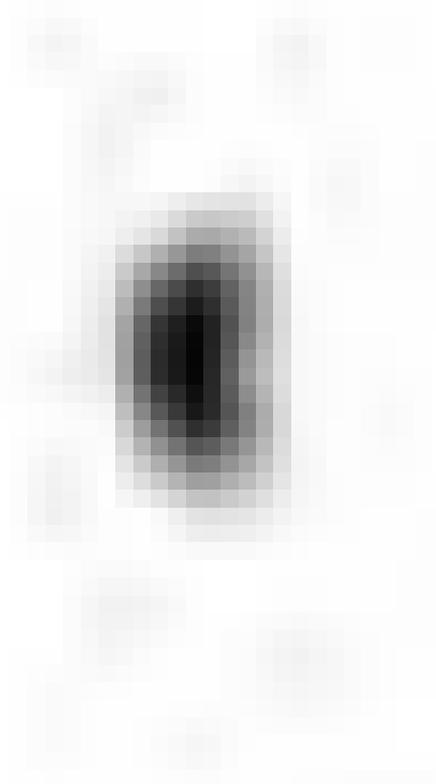
---

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	92
-----------------------------	----

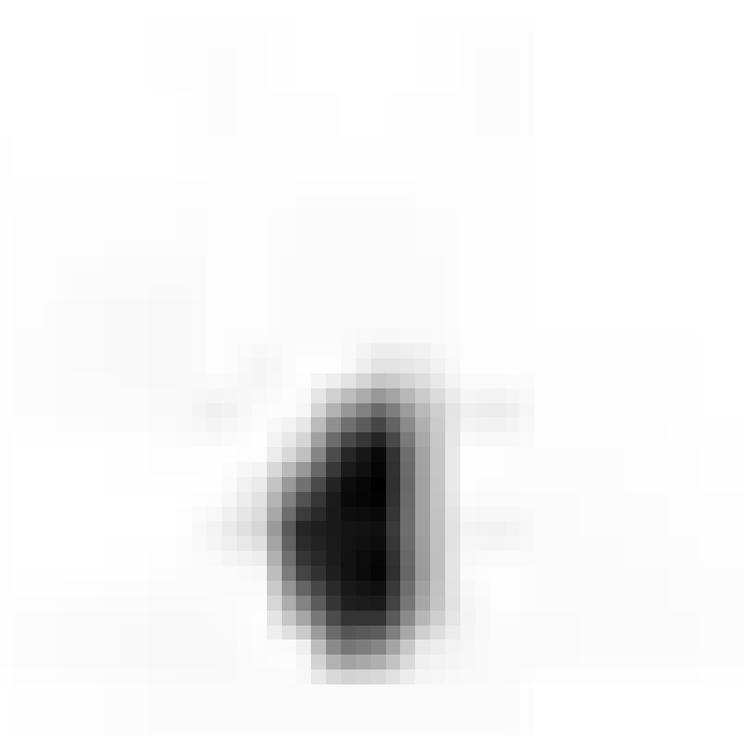
---

MATERIALES Y MÉTODOS	95
----------------------	----

- Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.....	95
- Obtención de las colecciones de aislados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de infecciones crónicas de pacientes FQ.....	95
- Genotipificación por Electroforesis en Geles de Campo Pulsado (PFGE).....	98
- Genotipificación por Amplificación al Azar de Polimorfismos en el ADN (RADP)...	99
- Genotipificación mediante la identificación de polimorfismos de nucleótidos únicos por tecnología de AT chips.....	99
- Determinación de la frecuencia de mutación.....	101
- Amplificación por PCR y secuenciamiento de los genes <i>mutS</i> , <i>mutL</i> , <i>mucA</i> , <i>lasR</i> ,	



<i>mexZ</i> , PA0929, PA1127, y de la región intergénica PA4568//PA4569.....	101
- Construcción de los plásmidos pMCS_ <i>mutS</i> <sup>CG1551</sup> y pMCS_ <i>mutS</i> <sup>CC334-CG1551</sup> .....	102
- Ensayos de complementación génica del fenotipo hipermutador con los plásmidos pMCS_ <i>mutS</i> , pMCS_ <i>mutL</i> , p5_ <i>mutS</i> <sup>CG1551</sup> y p5_ <i>mutS</i> <sup>CC334-CG1551</sup> .....	103
- Ensayos de susceptibilidad a antibióticos y cuantificación de las subpoblaciones de mutantes resistentes.....	103
- Determinación de la capacidad catabólica mediante el uso de microarreglos fenotípicos (BIOLOGS).....	104
- Secuenciamiento de genomas completos de aislados FQ de <i>P. aeruginosa</i> .....	105
- Análisis de secuencias genómicas: Construcción de genomas de referencia por ensamblados <i>de novo</i> , detección y caracterización de SNPs y mutaciones de inserción/delección.....	107
- Construcción de árboles filogenéticos de máxima parsimonia.....	108
- Construcción de árboles de distancias mínimas (MST).....	109
- Estimación de la tasa de mutación bacteriana.....	110
- Estimación de la fracción de SNPs en la región codificante del genoma de <i>P. aeruginosa</i> que resulta en sustituciones sinónimas.....	110
- Cálculo del cociente de selección dN/dS.....	110
- Análisis estadísticos.....	111
- Aspectos éticos.....	112
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>113</b>



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**AMPe:** Adenosín monofosfato cíclico.

**CFA:** Colección de aislados de *P. aeruginosa* del paciente con fibrosis quística argentino.

**CFD:** Colección de aislados de *P. aeruginosa* del paciente con fibrosis quística danés.

**CFL:** Colección de aislados de *P. aeruginosa* de diferentes pacientes argentinos con fibrosis quística.

**CFTR:** Proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística.

**CIM:** Concentración inhibitoria mínima.

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute.

**dN:** Tasa de sustituciones no sinónimas.

**DO:** Densidad óptica.

**dS:** Tasa de sustituciones sinónimas.

**EDTA:** Etilendiamida tetracetato de sodio.

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

**FQ:** Fibrosis quística.

**HABA:** Hospital Alemán de Buenos Aires.

**HNC:** Hospital de Niños Santísima Trinidad de Córdoba.

**Indel:** Mutación de inserción/delección.

**kb:** Kilobases.

**LB:** Luria-Bertani.

**LPS:** Lipopolisacárido.

**MRS:** Sistema de reparación de bases apareadas incorrectamente.

**MST:** Árbol de distancias mínimas.

**ON:** Incubación durante toda una noche.

**pb:** Pares de bases.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PFGE:** Electroforesis en geles de campo pulsado.

**PMN:** Leucocito polimorfonuclear.

**QS:** Sistema de quórum sensing.



**RAPD:** Amplificación al azar de polimorfismos en el ADN.

**RNS:** Especies reactivas del nitrógeno.

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno.

**rpm:** Revoluciones por minuto.

**SCV:** Variante de colonia pequeña.

**SMR:** Subpoblación de mutantes resistentes.

**SNP:** Polimorfismo de nucleótido único.

**SSR:** Secuencia repetida simple del ADN.

## RESUMEN

La mutagénesis es uno de los mecanismos esenciales involucrados en la generación de variabilidad genética y en la adquisición de fenotipos adaptativos en bacterias, por lo que el control y ajuste de la tasa de mutación resultan fundamentales para la optimización de procesos adaptativos. Particularmente, los microorganismos que presentan una tasa de mutación espontánea incrementada como consecuencia de la deficiencia en sistemas de reparación o prevención de errores del ADN se denominan hipermutadores. Curiosamente, las infecciones respiratorias crónicas producidas por el patógeno oportunista *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (FQ) constituyen un excelente modelo natural en el que las células hipermutadoras prevalecen a una alta frecuencia, significativamente mayor a las encontradas en otro tipo de infecciones o en el ambiente. En las infecciones pulmonares crónicas FQ, la hipermutabilidad resulta fundamentalmente de la emergencia de mutantes deficientes en el Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS).

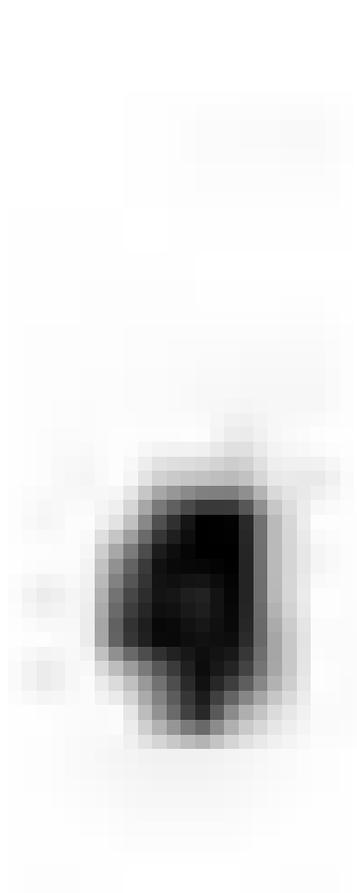
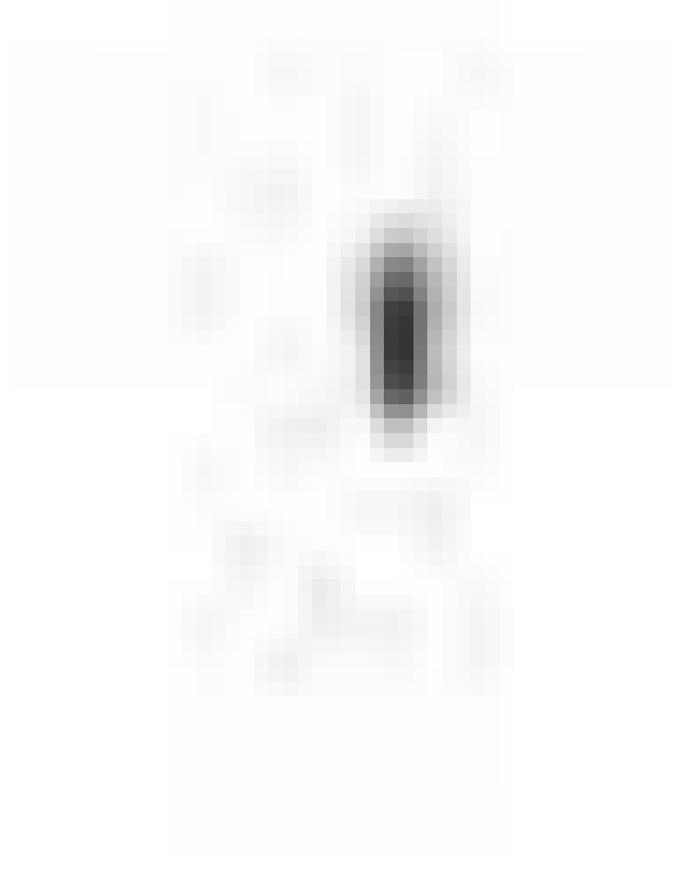
La mayoría de los pacientes FQ son infectados crónicamente por una única cepa de *P. aeruginosa* que persiste a lo largo de la vida del paciente a través de un proceso de diversificación que implica la emergencia, selección y fijación de múltiples variantes fenotípicas adaptadas, originadas a partir del clon ancestral. Los mecanismos involucrados en este proceso de diversificación fenotípica están basados en la mutación de genes específicos que conllevan a cambios relacionados principalmente con la formación de *biofilms*, virulencia, metabolismo y resistencia a antibióticos, y finalmente a la adaptación y persistencia.

Dentro de este marco, los principales objetivos del presente trabajo fueron analizar la asociación entre la hipermutabilidad estable y la emergencia de fenotipos adaptativos de *P. aeruginosa* en el contexto de un proceso infeccioso *in vivo*. El trabajo se centró en el estudio de la evolución genómica a largo plazo y la diversidad genética a nivel poblacional de linajes particulares de *P. aeruginosa* hipermutadores aislados de pacientes FQ durante el transcurso de la infección crónica.

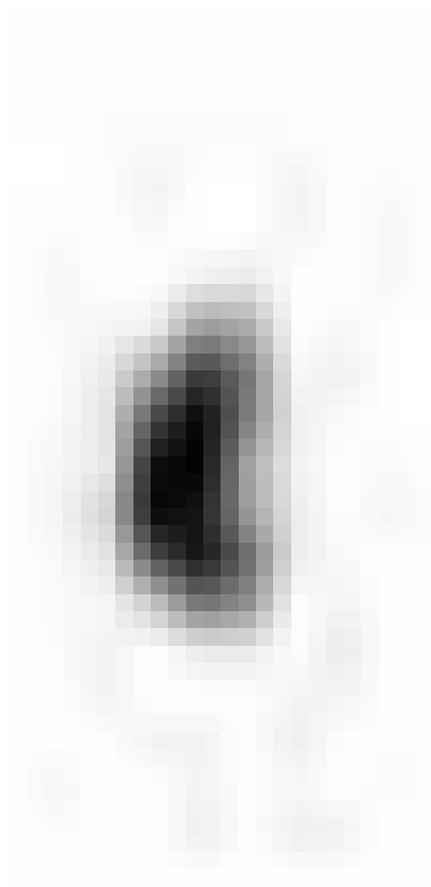
Durante la realización de este trabajo de tesis se obtuvieron resultados que confirman la fuerte selección y prevalencia del fenotipo hipermutador debido a la deficiencia en el MRS en aislados FQ de *P. aeruginosa*. Igualmente, se logró determinar

que la hipermutabilidad estable en este contexto *in vivo* no está asociada a la emergencia de mutaciones adaptativas en los genes *mucA*, *lasR* y *mexZ*, sugiriendo que la hipermutabilidad tendría un efecto general sobre los genes durante el proceso de adaptación de *P. aeruginosa* al ambiente FQ, sin estar relacionado con algún fenotipo adaptativo en particular. En este sentido, se determinó que la evolución a largo plazo de cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares crónicas está signada por una selección negativa y/o por deriva génica, destacándose asimismo una significativa diversidad genética a nivel poblacional basada en una marcada acumulación de mutaciones. No obstante esta diversificación, adicionalmente se observaron evidencias de evolución paralela en ciertos genes asociados con la patoadaptación, como así también una convergencia fenotípica en cuanto a la disminución de funciones relacionadas con el catabolismo. Por otra parte, se estableció que la deficiencia en el MRS produce una marcada inestabilidad de secuencias repetidas simples del ADN (SSRs) en *P. aeruginosa* particularmente de G:C, aumentando significativamente su propensión a sufrir deleciones pequeñas y sesgando la mutagénesis hacia vías génicas particulares a lo largo de su evolución en infecciones crónicas FQ. Finalmente, el trabajo describe un fenómeno de disminución de la frecuencia de mutación en una subpoblación de cepas deficientes en el MRS en infecciones crónicas FQ, ilustrando el dinamismo que *P. aeruginosa* sufre en cuanto a la tasa de mutación.

En conclusión, este trabajo constituye un importante aporte para el esclarecimiento del impacto de la hipermutabilidad por deficiencias en el MRS en la evolución genómica de poblaciones de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ.



# INTRODUCCIÓN



## 1. MECANISMOS DE MUTAGÉNESIS EN BACTERIAS

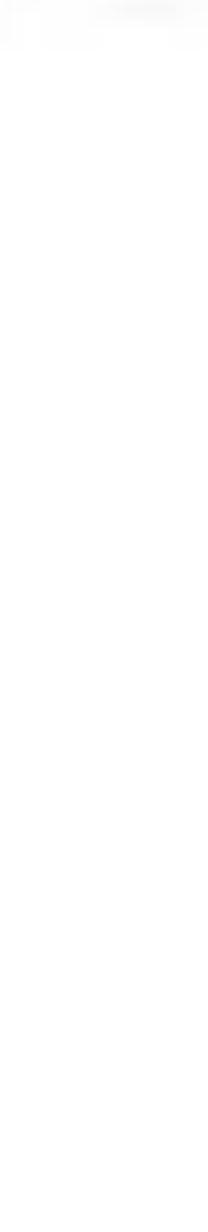
La evolución biológica, como propiedad inherente a los seres vivos, es el conjunto de cambios a través del tiempo que conllevan a la diversificación de los organismos como consecuencia directa de su adaptación al ambiente en el que viven.

La diversificación de las especies está basada en la variabilidad genética, la cual surge en las poblaciones naturales a partir de diversas fuentes tales como la mutación, la recombinación (en la que se incluye la reproducción sexual), el flujo genético dado por migraciones y la transferencia horizontal.

En poblaciones clonales, tales como las bacterias, la mayor fuente de variabilidad genética es la mutación, generando nuevos fenotipos sobre los cuales actúa la selección natural, como uno de los mecanismos que permiten su posterior adaptación. Así, el proceso evolutivo supone una constante interacción entre variabilidad a nivel genético y selección a nivel fenotípico.

Siendo la mutación la mayor fuerza evolutiva en bacterias, el control y ajuste de la tasa de mutación resultan fundamentales para la optimización del proceso adaptativo. En este sentido, las mutaciones nuevas que se generan pueden tener diferentes impactos en la capacidad reproductiva (*fitness*) de los microorganismos pudiendo resultar en mutaciones deletéreas, neutras o beneficiosas, dependiendo del ambiente en el que se encuentren. Sin embargo, debido a que la mayoría de las mutaciones son neutras o deletéreas, se ha postulado que la tasa de mutación ha evolucionado para ser lo más baja posible [6-8]. En este sentido, existen numerosos mecanismos genéticos que previenen el surgimiento de mutaciones y aseguran el mantenimiento de la estabilidad del ADN, tales como sistemas de replicación del ADN de alta fidelidad que minimizan los errores, así como sistemas que protegen y/o reparan el ADN [9-10].

Sin embargo, la ocurrencia de células con elevadas tasas de mutación (comúnmente llamadas hipermutadoras) tanto en poblaciones bacterianas de laboratorio [11-13], como en poblaciones naturales de distintas especies, como *Escherichia coli* [14], *Salmonella entérica* [15], *Neisseria meningitidis* [16], *Haemophilus influenzae* [17], *Staphylococcus aureus* [18], *Helicobacter pylori* [19], *Streptococcus pneumoniae* [20], y *P. aeruginosa* [21], es un fenómeno observado frecuentemente. Estudios teóricos [22] y experimentales



[23-24] indican que, bajo ciertas condiciones ambientales, la frecuencia de cepas hipermutadoras en aislados naturales es mucho más elevada que la esperada por el equilibrio de mutación/selección, lo cual sugiere que existen situaciones en la naturaleza en las cuales la hipermutabilidad confiere una ventaja selectiva. En este sentido, se ha postulado que las bacterias hipermutadores podrían conferir una ventaja evolutiva durante la adaptación a nuevos ambientes o bajo ciertas condiciones de estrés, ya que tendría la capacidad de adquirir mutaciones adaptativas más rápidamente [12, 15, 24-29].

Existen diferentes mecanismos que les permiten a las poblaciones bacterianas aumentar su tasa de mutación. Estos mecanismos a nivel temporal pueden ser de carácter estable o transiente, mientras que a nivel espacial pueden ser de carácter generalizado o localizado en regiones específicas del ADN. En bacterias, tales mecanismos de mutagénesis pueden clasificarse en: i) hipermutabilidad estable, debido a la deficiencia en sistemas de prevención y/o reparación de mutaciones; ii) hipermutabilidad transiente, generada por la acción de polimerasas del ADN de baja fidelidad e; iii) hipermutabilidad localizada, basada en la alta propensión de ciertas secuencias de ADN a ser mutadas.

### **1.1. HIPERMUTABILIDAD ESTABLE: EL SISTEMA DE REPARACIÓN DE BASES APAREADAS INCORRECTAMENTE (MRS)**

Se denomina hipermutabilidad estable o constitutiva a aquella cuyo incremento en la tasa de mutación se debe a alteraciones permanentes en las células, las cuales son a su vez heredables a las células descendientes [29-30]. Este tipo de hipermutabilidad es el resultado generalmente de deficiencias en los genes involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genética, que codifican para enzimas de reparación del ADN y/o para proteínas que aseguran la fidelidad de la replicación del mismo [9-10].

La mayoría de las cepas hipermutadoras estables encontradas en condiciones de laboratorio [23, 28] y en la naturaleza [14-16, 31], presentan deficiencias en un sistema de reparación de mutaciones, llamado Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS, de sus siglas en inglés, *Mismatch Repair System*). Este sistema tiene como función controlar la fidelidad de la replicación del ADN a través de la eliminación de aquellos errores que escapan a la actividad correctora (*proofreading*) de la ADN polimerasa producidos durante la síntesis del ADN, fundamentalmente mutaciones

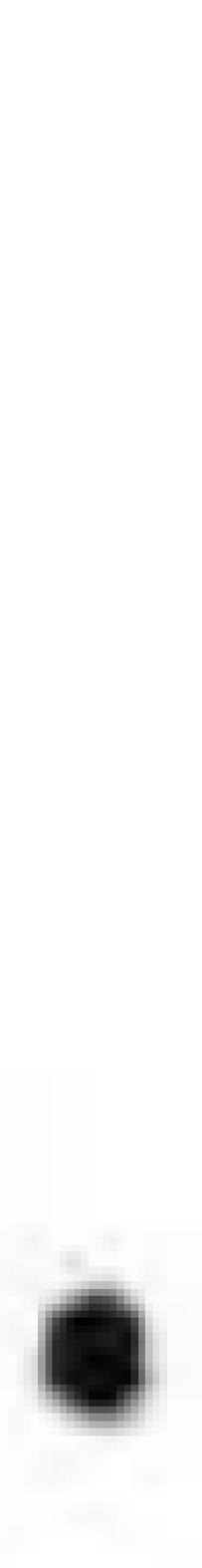
puntuales y pequeñas deleciones e inserciones (de 1 a 4 pb) [32-35]. Adicionalmente, el MRS está involucrado en el procesamiento de lesiones del ADN durante la reparación acoplada a la transcripción [36], así como en el mantenimiento de la integridad estructural del cromosoma y en el control de la transferencia génica horizontal, previniendo la recombinación entre secuencias del ADN no idénticas o divergentes (recombinación homeóloga) [37].

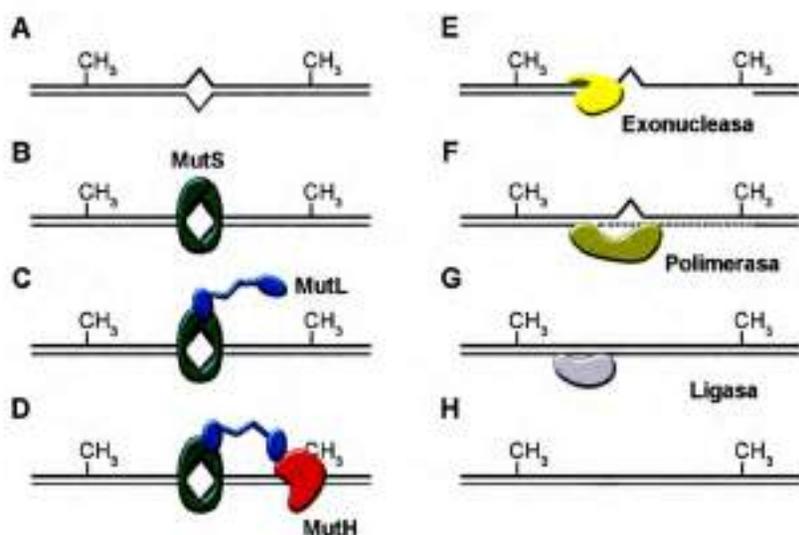
Este sistema es altamente conservado tanto en procariotas como eucariotas. Sin embargo, las proteínas específicas que componen el MRS (proteínas Mut), fueron identificadas inicialmente en organismos procariotas. El primer paso en la corrección de errores por el MRS consiste en el reconocimiento de distorsiones en la doble hélice (apareamientos incorrectos) que resultan de la incorporación de nucleótidos incorrectos por la ADN polimerasa, o de la falta de incorporación de nucleótidos por el patinado de la misma [33, 38]. Esta distorsión es reconocida por la proteína MutS la cual, al unirse al sitio donde se localiza el mal apareamiento, induce la unión de una serie de proteínas componentes del sistema y la consecuente remoción y re-síntesis de la base mal incorporada en la hebra recién sintetizada. Para ello, la discriminación de hebra es esencial, ya que sin ella, un error replicativo tendría las mismas posibilidades de ser corregido, o de ser utilizado como templado para la corrección y fijarse como mutación.

Mientras que los pasos finales del proceso de corrección por el MRS requieren de proteínas que son comunes a procesos metabólicos generales del ADN, los pasos iniciales de reconocimiento y remoción requieren de las proteínas específicas Mut, las cuales se encuentran altamente conservadas a nivel evolutivo [34]. El organismo modelo en el cual el MRS se encuentra caracterizado con mayor detalle es *E. coli* (Figura 11) [39]. En esta bacteria, la parte específica de corrección se lleva a cabo por tres proteínas MutS-L-H. Tal como se mencionó anteriormente, MutS reconoce y se une al sitio del error, iniciándose el proceso de reparación [33-34, 38]. Luego MutL se une a MutS y este complejo interactúa con MutH, la cual se encuentra unida al sitio consenso GATC más cercano con su residuo de adenina metilado, induciendo su actividad endonucleasa que produce el corte de la hebra recién sintetizada no metilada. Luego, se produce la escisión de la hebra nueva que incluye el error mediante la acción de la helicasa UvrD y la subsiguiente digestión por acción de una exonucleasa específica. Posteriormente, la cadena es resintetizada por la ADN

polimerasa III y el proceso finaliza con la acción de una ADN ligasa que restablece el enlace fosfodiéster de la cadena [33-34, 38]. De esta manera, en *E. coli*, el sistema de discriminación de hebra es dependiente del estado de metilación del ADN, mecanismo que sólo se encuentra en un grupo reducido de especies bacterianas. Particularmente en *P. aeruginosa*, el MRS comparte similitudes en cuanto a la existencia y la función de las proteínas MutS, MutL y UvrD; sin embargo, no se observa la metilación en sus sitios GATC, como así tampoco ningún ortólogo a MthH, por lo que el proceso de discriminación de hebra es aún desconocido. En este sentido, recientemente se ha demostrado que en *P. aeruginosa* la proteína MutL tendría actividad endonucleasa [40], al igual que en la mayoría de las proteobacterias y en organismos eucariotas tales como levaduras y humanos [41-45].

De acuerdo a lo expuesto, cualquier mutación o alteración que afecte el normal funcionamiento del MRS, repercutirá en la actividad correctora de todo el sistema, conllevando a una acumulación de mutaciones y al consecuente incremento en la tasa de mutación. Así, una bacteria mutante para los genes *mut* posee una tasa de mutación incrementada entre 20 a 1000 veces [21, 34], razón por la cual se denomina hipermutadora. Dado que la deficiencia en el MRS es debida a mutaciones en algunos de sus componentes, la hipermutabilidad es heredable y estable a lo largo de las generaciones.





**Figura 11.** Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS) en el organismo modelo *E. coli*. Luego del proceso replicativo, las bases mal apareadas (A) son reconocidas por MutS (B). Posteriormente, se forma un complejo constituido por el ADN, MutS y MutL (C), el cual activa la endonucleasa MuthH unida a sitios GATC con la adenina metilada (-CH<sub>3</sub>) (D), quien produce un corte en la hebra no metilada recién sintetizada. Posteriormente, exonucleasas específicas de simple hebra remueven la región que incluye la mutación (E), y la ADN polimerasa III re-sintetiza la nueva hebra (F). Finalmente, una ADN ligasa sella los extremos (G) restaurando la integridad de la hebra y eliminando la potencial mutación (H).

## 1.2. HIPERMUTABILIDAD TRANSIENTE

Se entiende por hipermutabilidad transiente a un estado fisiológico de la célula en el cual la tasa de mutación se encuentra incrementada de manera transitoria. Dicho estado fisiológico no es heredable sino que ocurre generalmente como respuesta a ciertos tipos de estrés y desaparece con la eliminación del mismo [46-49]. En este sentido, las bacterias pueden sentir el ambiente en el que se encuentran y responder en defensa a diferentes tipos de estrés. Como parte de esta respuesta se induce el aumento de la tasa de mutación, el cual se ha postulado permitiría la adaptación o supervivencia a la condición estresante [50]. Sin embargo, una vez que las condiciones ambientales dejan de ser estresantes, la célula retoma la tasa de mutación normal, sin el potencial inconveniente que implica la hipermutabilidad

estable de acumular indefinidamente mutaciones que pudieran resultar deletéreas. Entre los sistemas involucrados en este tipo de hipermutabilidad se pueden mencionar el sistema SOS [51-52] y el regulón controlado por el factor sigma de fase estacionaria RpoS [53], los cuales responden a condiciones de estrés causado por daños en el ADN por radiación UV y por privación de nutrientes en fase estacionaria, respectivamente. La implicancia de ambos sistemas en los mecanismos de hipermutabilidad transiente se debe a que son capaces de inducir la expresión y actividad de ADN polimerasas de baja fidelidad, las cuales poseen una mayor propensión a generar errores replicativos por carecer de actividad correctora incrementando consecuentemente la tasa de mutación [54-55].

Estas polimerasas tienen la capacidad de replicar bases dañadas o alteradas que en general bloquean la maquinaria de replicación por un mecanismo denominado translesión [56]. La translesión permite replicar la lesión, continuar el proceso replicativo y sobrevivir, pero trae aparejado la acumulación de mutaciones y el aumento en la tasa de mutación. En *E. coli* las principales polimerasas involucradas en este tipo de hipermutabilidad son las conocidas como PolIV y PolV, que están codificadas por los genes *dinB* y *umuCD*, respectivamente [55], y forman parte, junto a Pol II, de la respuesta SOS de esta bacteria [57]. En *P. aeruginosa*, la información en relación a estas ADN polimerasas es comparativamente escasa, habiéndose sólo y particularmente realizado estudios sobre Pol IV [58-59]. Por estudios de homología de secuencia *in silico* se observó que, a diferencia de *E. coli*, *P. aeruginosa* no posee ningún homólogo a Pol V sino que en su lugar posee un "cassette mutagénico", presente en la mayoría de las proteobacterias [60-61], que contiene dos ADN polimerasas mutagénicas: ImuB y DnaE2, las cuales han sido caracterizadas recientemente en el laboratorio (Luján, Urretaviscaya, Feliziani *et al.*, en redacción).

### 1.3. HIPERMUTABILIDAD LOCALIZADA: SECUENCIAS REPETIDAS SIMPLES DEL ADN

Aunque los procesos de mutagénesis son en general estocásticos, los mismos no se distribuyen necesariamente uniformemente en el genoma. Existen ciertos mecanismos de mutagénesis que ocurren en determinadas regiones con mayor frecuencia respecto a otras. Así, la hipermutabilidad localizada es el resultado de propiedades intrínsecas de ciertas

secuencias del ADN que las predisponen a ser mutadas con mayor frecuencia, localizando la mutabilidad en una región del genoma que se vuelve consecuentemente un punto caliente de mutación. Este incremento localizado de la tasa de mutación reduce considerablemente la desventaja de un incremento generalizado de mutaciones a lo largo del genoma [27], permitiendo así asegurar la conservación de funciones esenciales codificadas por otros genes, sin la necesidad de incrementar la carga total de mutaciones deletéreas.

Entre los principales elementos de la hipermutabilidad localizada se distinguen las secuencias repetidas simples del ADN (SSRs, de sus siglas en inglés, Simple Sequences Repeats), las cuales son repeticiones en tándem de motivos cortos, conformados por uno o más nucleótidos. Estas secuencias constituyen puntos calientes de mutación, debido a que experimentan tasas elevadas de inserciones y/o deleciones a través del mecanismo conocido como patinado de la ADN polimerasa ("*slippage*") durante el proceso de replicación, lo cual produce apareamientos inadecuados por desplazamiento de cadena y las consecuentes mutaciones de cambio en el marco de lectura [62-63].

Debido a su inestabilidad característica, las SSRs han sido consideradas como una fuente importante de variabilidad genética [63-64] con un rol importante en los procesos de mutagénesis adaptativa. En este sentido, la implicancia de las SSRs en los procesos de patogénesis de varias especies bacterianas ha sido ampliamente reportado, presentando frecuentemente roles cruciales en la variación antigénica o variación de fase que ocurre en locus contingentes [63, 65-66]. Los locus o genes contingentes permiten, a través de eventos de mutación anticipatorios, cambios fenotípicos que conllevan a la supervivencia y proliferación dentro del hospedador. De esta manera, la variación de fase constituye una estrategia de supervivencia exitosa que involucra la expresión diferencial de diversos genes contingentes, permitiendo la evasión del sistema inmune [67].

## 2. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN INFECCIONES RESPIRATORIAS CRÓNICAS EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

### 2.1. *P. AERUGINOSA*, UN PATÓGENO OPORTUNISTA SUMAMENTE VERSÁTIL

*P. aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa con una gran ubiquidad que le permite encontrarse ampliamente distribuida en diversos ambientes acuáticos y terrestres [68]. Presenta una extraordinaria versatilidad tanto genética como metabólica a través de la cual puede utilizar distintos compuestos como fuentes de carbono y de energía, incluyendo xenobióticos [69].

El genoma de *P. aeruginosa*, uno de los más grandes del mundo bacteriano [70], contribuye en gran medida a su versatilidad y elevada capacidad competitiva para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Presenta alrededor de 6000 genes, de los cuales un número considerablemente elevado (más de 500) constituyen genes reguladores [70]. El genoma de *P. aeruginosa* posee un tamaño entre 5,2 a 7 Mpb y está constituido por un único cromosoma circular y un número variable de plásmidos [71-73]. Una de las características distintivas de este genoma es su estructura en forma de mosaico, ya que está formado por regiones altamente conservadas y específicas de la especie, que componen la región denominada central o "core" del genoma, las cuales se encuentran interespaciadas por regiones variables y específicas de cada clon, que constituyen la región genómica accesoria o flexible. La región "core" comprende entre el 70 al 90% del genoma y se caracteriza por una sintenia de genes, un promedio bajo de divergencia nucleotídica (entre el 0,5 y el 0,7%), y por la existencia de pocos locus con alelos múltiples [71, 73-77]. Por el contrario, el genoma accesorio comprende entre el 10 y el 30 % del genoma y consiste tanto de elementos extracromosomales (como por ejemplo plásmidos), como de bloques de ADN insertos en el cromosoma en diferentes locus. Se caracteriza principalmente por presentar regiones altamente polimórficas a nivel de secuencia nucleotídica y codifica para funciones relacionadas a la adaptación [73, 78-82]. Además, a diferencia del genoma conservado, los elementos del genoma accesorio exhiben distinto uso de nucleótidos y

contenido G+C, por lo que se postula que los mismos habrían sido adquiridos por transferencia génica horizontal [83-84].

Este genoma característico en forma de mosaico, le confiere una plasticidad genética remarcable. En este sentido, tanto la adquisición de ADN foráneo como así también la generación de mutaciones puntuales e inserciones/deleciones cromosomales [71, 74-75, 85-88], afectan potencialmente tanto regiones conservadas como variables, modificando continuamente el genoma de *P. aeruginosa* y modulando el fenotipo característico de cada cepa. Así, mediante la utilización de diversos mecanismos genéticos que facilitan el movimiento y la alteración de material genético, *P. aeruginosa* es capaz de modificar su genoma de forma particular, logrando su ajuste a las necesidades de supervivencia en, virtualmente, cualquier ambiente.

Otra manifestación de su remarcada versatilidad y razón por la cual *P. aeruginosa* ha despertado un interés considerable, es su característica como patógeno oportunista, siendo capaz de causar infecciones tanto en plantas, animales y humanos [82, 89]. En condiciones normales, la colonización por *P. aeruginosa* es inocua, y la infección sólo tiene lugar cuando los mecanismos de defensa generales o locales del hospedador se ven afectados o están reducidos [68]. Particularmente en humanos, *P. aeruginosa* produce un amplio rango de infecciones que pueden variar desde locales a sistémicas, sub-agudas a crónicas, y superficiales a mortales [68], pudiendo infectar un gran número de órganos y tejidos, como así también dispositivos médicos (por ejemplo prótesis, catéteres y respiradores) [90]. Particularmente, *P. aeruginosa* infecta a individuos con quemaduras, cáncer, HIV o FQ, y es uno de los patógenos más comunes en infecciones intrahospitalarias [68, 91].

Entre las características principales que contribuyen al potencial patogénico de *P. aeruginosa* se encuentran su versatilidad metabólica, la resistencia a antibióticos intrínseca y/o adquirida, y la producción de múltiples factores de virulencia. En este sentido, la maquinaria de virulencia de *P. aeruginosa* está compuesta tanto de elementos asociados a la superficie de la célula bacteriana (flagelo, pili, y lipopolisacáridos), como de varios factores de secreción (elastasas, proteasas, exotoxinas, pigmentos, y polisacáridos extracelulares). Asimismo, *P. aeruginosa* posee numerosos sistemas regulatorios que promueven cambios en su expresión génica, facilitando la transición desde reservorios

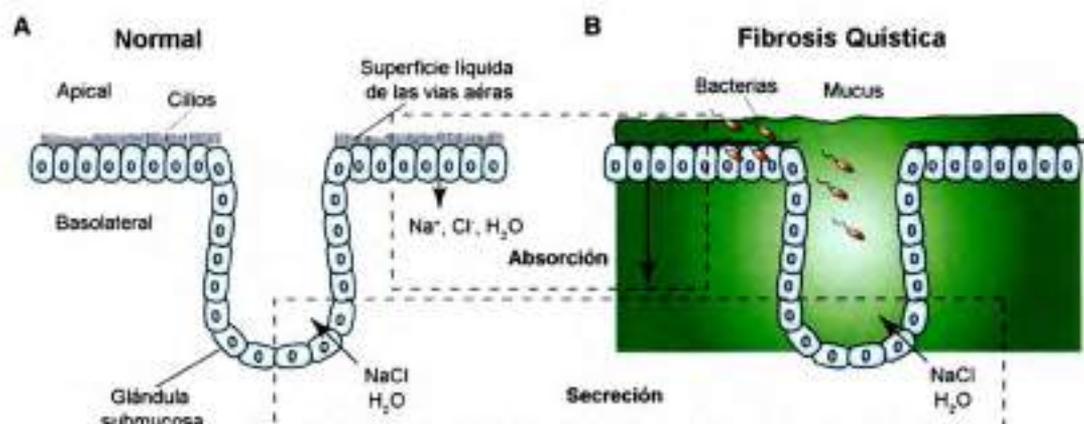
ambientales al ambiente del hospedador. De esta manera, la capacidad de *P. aeruginosa* de causar infecciones depende de una compleja serie de redes regulatorias globales que le permiten coordinar los cambios fenotípicos necesarios para su adaptación y virulencia.

## 2.2. FIBROSIS QUÍSTICA, CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ENFERMEDAD

Las infecciones pulmonares crónicas producidas por *P. aeruginosa* son la principal causa de morbilidad y mortalidad en la mayoría de los pacientes FQ, quienes presentan una esperanza de vida de ~38 años ([www.cff.org](http://www.cff.org)). La FQ es el desorden autosómico recesivo más común de las poblaciones caucásicas, con una incidencia en dicha población de aproximadamente 1 cada 2.500 nacidos vivos, siendo una de cada 25 personas de ascendencia europea portadora de un alelo no funcional [92]. Esta enfermedad genética se produce por mutaciones en un único gen que codifica para una proteína de 1480 aminoácidos, llamada proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) [93-96]. El gen CFTR posee 2500 pb y 27 exones, y está localizado en el brazo largo del cromosoma 7. Se han identificado alrededor de 1943 mutaciones en el gen CFTR que causan la enfermedad (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>), siendo la delección de una fenilalanina en el codón 508 (mutación  $\Delta F508$ ), la principal mutación encontrada a nivel mundial (en aproximadamente el 70% de los pacientes FQ) [97], y a nivel local en nuestro país [98].

La proteína CFTR forma parte de un canal iónico de cloruro regulado por AMP cíclico, el cual se encuentra localizado en las membranas apicales de las células epiteliales [95]. El mal funcionamiento de esta proteína altera la secreción epitelial del cloruro produciendo la hiper-reabsorción de sodio y agua, ocasionando una mucosidad espesa en la superficie de todos los epitelios secretorios [99]. De esta manera en forma general, la falta del CFTR genera una predisposición a manifestaciones clínicas multisistémicas, particularmente en los tractos hepatobiliar, gastrointestinal, seminal y respiratorio, que conllevan como características distintivas de la enfermedad FQ a la insuficiencia pancreática exocrina, mala absorción de los alimentos y desnutrición, infertilidad e infecciones crónicas de las vías aéreas. Particularmente en las vías aéreas, la mayor

densidad del mucus impide el normal movimiento de los cilios (Figura 12). Estas alteraciones interfieren en la limpieza eficaz de los epitelios, una primera barrera de inmunidad que es de suma importancia en la remoción de partículas y microorganismos que ingresan al sistema respiratorio.



**Figura 12.** Modelo del transporte iónico del epitelio secretorio en un individuo normal y FQ. En un individuo normal (A), la superficie líquida de las vías respiratorias junto con el normal movimiento de los cilios, remueve las bacterias que ingresan desde el ambiente. En un individuo FQ (B), la secreción reducida de  $\text{Cl}^-$  produce la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y agua con la consecuente deshidratación y acumulación de un mucus espeso en la superficie de las vías respiratorias, lo cual interfiere en el normal funcionamiento de los cilios, comprometiendo así la eficaz remoción de microorganismos.

### 2.3. MICROBIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN PACIENTES FQ

La mucosidad espesa acumulada en las vías respiratorias de los pacientes FQ constituye un medio ideal para el crecimiento de múltiples patógenos microbianos. Aproximadamente 45 años atrás, los patógenos predominantes eran *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*, pero debido al avance en las terapias antimicrobianas y mejoras en el estado nutricional de los pacientes FQ, la microbiología de las vías aéreas FQ ha cambiado considerablemente. Así, actualmente *S. aureus* y *H. influenzae* son frecuentes

durante la infancia temprana, mientras que patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* y el grupo de especies del complejo *Burkholderia* son más prevalentes en pacientes adultos FQ. Sin embargo, en los últimos años se ha observado la emergencia de nuevos patógenos bacterianos, tales como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes* sp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia mannitolilytica*, y *Pandoraea* sp., así como patógenos fúngicos, como *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium*, *Candida*, y *Exophiala* sp, bacteriófagos y virus patogénicos. De esta manera, la flora microbiana del tracto respiratorio en pacientes FQ representa un ecosistema complejo y diverso en el cual coexisten comunidades de múltiples especies [100], siendo el número de especies bacterianas encontrado de entre  $10^2$ - $10^3$  [101-102]. Sin embargo, el patógeno dominante y que se encuentra con mayor frecuencia en las vías aéreas FQ es *P. aeruginosa*, observándose en el 80% de los pacientes adultos FQ [103], por lo que constituye el agente etiológico más relevante y la mayor causa de morbilidad y mortalidad.

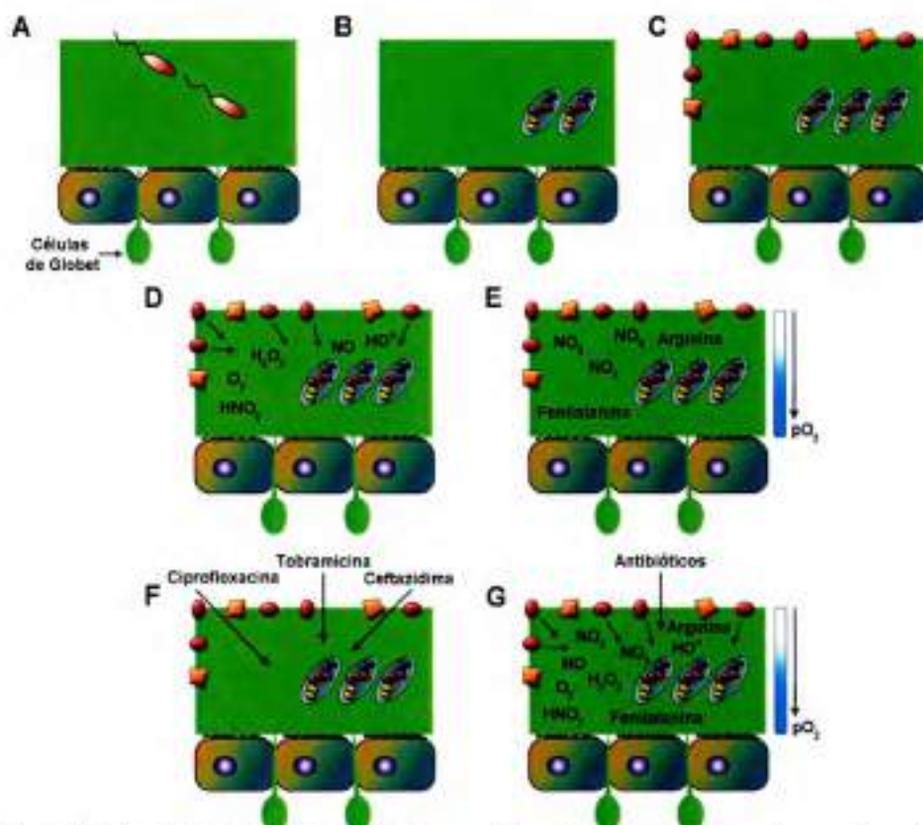
#### 2.4. PATOFISIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN PACIENTES FQ

Como se mencionó anteriormente, la mucosidad espesa acumulada en las vías respiratorias de los pacientes FQ favorece el crecimiento de patógenos microbianos, siendo *P. aeruginosa* el agente etiológico principal en las infecciones crónicas producidas en estos pacientes (Figura I3). Generalmente, las etapas iniciales de colonización se manifiestan como infecciones intermitentes durante la edad temprana de los pacientes. Sin embargo, posteriormente un clon ancestral de *P. aeruginosa* sufre una serie de cambios genéticos y fenotípicos, aún no claramente dilucidados, que producen el establecimiento de una infección crónica [104-105]. Una vez establecida una de las estrategias fundamentales que *P. aeruginosa* utiliza para persistir en el mucus de las vías respiratorias es el crecimiento en biopelículas (“*biofilms*”) en las que las bacterias se encuentran embebidas en una matriz de exopolisacáridos (Figura I3B). El sistema inmune del hospedador reacciona mediante una respuesta inflamatoria que se inicia a partir del reconocimiento de los antígenos de *P. aeruginosa*, como de los componentes de la superficie celular (lipopolisacárido (LPS) y/o el flagelo, [106]) y exoproductos secretados. Esto genera en la célula hospedadora una cascada de señalización que finalmente induce la transcripción de genes pro-inflamatorios y

la subsecuente secreción de varias citoquinas y quimiocinas [107] que amplifican la reacción inflamatoria [108]. Como consecuencia, en los pulmones de los pacientes FQ se produce el reclutamiento temprano de mediadores de la defensa inflamatoria, incluyendo neutrófilos, macrófagos y anticuerpos [109-111] (Figura I3C). Sin embargo, a pesar de la activación máxima de los neutrófilos y la fagocitosis mediada por los macrófagos, la eliminación de las bacterias no logra llevarse a cabo eficientemente, conllevando a una respuesta inflamatoria recurrente [99, 112]. De esta manera, se genera un proceso de autodestrucción del epitelio respiratorio por las defensas propias del hospedador [99]. Así, la activación de los neutrófilos y su degranulación libera, entre otros factores, especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), las cuales contribuyen significativamente y aún más al daño del tejido pulmonar (Figura I3D). A medida que la infección crónica progresa, y como resultado de la ventilación deteriorada y el consumo rápido de oxígeno por parte de los neutrófilos y los microorganismos [113-114], la tensión de oxígeno se reduce drásticamente, generándose ambientes microaeróbicos [115] e incluso anaeróbicos [116] (Figura I3E). A su vez, como parte del desbalance iónico y otras alteraciones se produce acumulación de  $\text{NO}_2$ , aminoácidos y disminución de  $\text{NO}$ . Así, el estado avanzado del síndrome pulmonar FQ causado por *P. aeruginosa* se caracteriza por un desbalance pronunciado entre las actividades de proteasas e inhibidores de proteasas, citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, agentes oxidantes y antioxidantes [117-118]. Los ciclos repetitivos de obstrucción, infección e inflamación producen bronquiectasia extensiva, enfisema destructivo y fibrosis del tejido pulmonar, y finalmente, falla respiratoria. Consecuentemente, la principal causa del deterioro tisular en las infecciones por *P. aeruginosa* en los pulmones FQ es el daño inmunopatológico generado por una respuesta inflamatoria neutrofílica agresiva pero fallida.

Además de la selección impuesta por el sistema de defensa del hospedador, *P. aeruginosa* se enfrenta regularmente con dosis elevadas de antibióticos (aminoglicósidos,  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, y polimixinas) (Figura I3F), y debe competir con otras especies bacterianas presentes en las secreciones pulmonares FQ [119-120]. De esta manera, el tracto respiratorio FQ es un ecosistema altamente complejo y dinámico en el cual *P. aeruginosa* debe adaptarse a múltiples desafíos que fluctúan tanto en

el tiempo como en el espacio (Figura 13G). La exposición crónica a este nicho sumamente característico y diverso desencadena una microevolución particular de *P. aeruginosa* durante el transcurso de la infección, que le permite su resistencia, dominancia y finalmente, su persistencia.



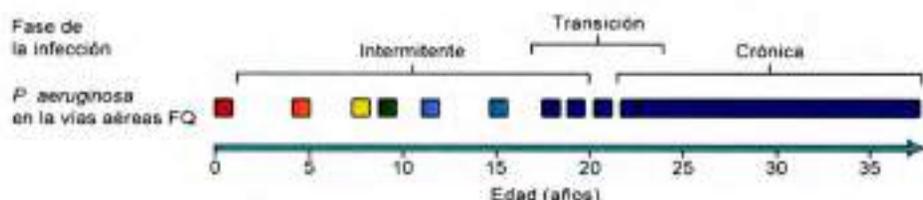
**Figura 13.** Patofisiología de las infecciones crónicas FQ causadas por *P. aeruginosa*. La acumulación de mucus viscoso, exacerbado por la hiperplasia de las células de Goblet, se convierte en un medio ideal para el crecimiento de múltiples patógenos dentro de los que se destaca y prevalece *P. aeruginosa* (A). *P. aeruginosa* se establece en forma crónica siendo imposible su erradicación debido a su diversificación en fenotipos altamente adaptados y a la capacidad de formar biofilms (B). La infección desencadena la afluencia permanente de neutrófilos y macrófagos que causan respuestas inflamatorias recurrentes (C). Como parte de la respuesta inflamatoria, *P. aeruginosa* es expuesta a altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (NOS) (D). La tensión del oxígeno se reduce generando ambientes micro y anaeróbicos a la vez que el desbalance iónico produce acumulación de  $NO_3$ , aminoácidos y disminución de  $NO$  (E). Los pacientes son sometidos a agresivas y sucesivas terapias con antibióticos (F). Así, las características del ambiente FQ son baja tensión de oxígeno, concentración disminuida de  $NO$ , abundante nitrato y aminoácidos, estrés oxidativo y nitrosativo elevado y exposición alta y permanente a antibióticos (G).



## 2.5. MICROEVOLUCIÓN DE *P. AERUGINOSA* EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN FIBROSIS QUÍSTICA

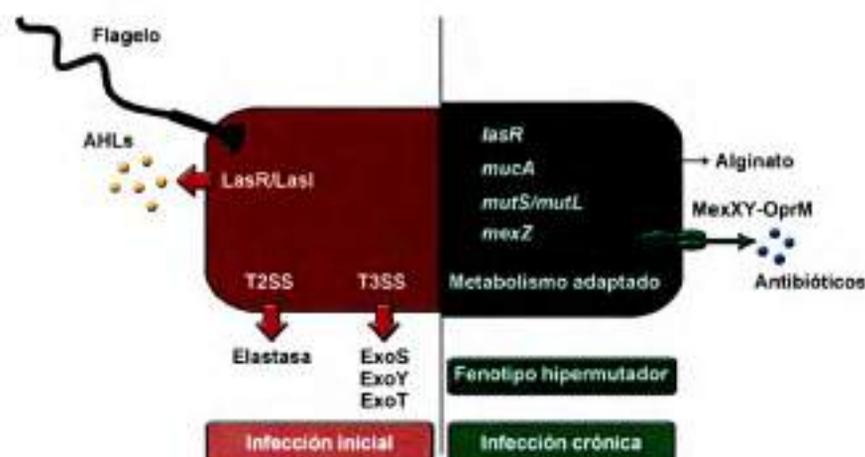
El desarrollo de las infecciones crónicas causadas por *P. aeruginosa* en pacientes FQ sigue un patrón característico y claramente diferenciable de las infecciones agudas. Tal como se mencionó anteriormente, generalmente existe un período inicial de colonización recurrente e intermitente de las vías respiratorias que precede al establecimiento de la infección crónica (Figura I4,) [104-105]. La mayoría de las cepas que colonizan inicialmente el tracto respiratorio de los pacientes FQ poseen genotipos distintos y provienen de diferentes reservorios del ambiente [121], presentando así el fenotipo de las cepas ambientales, tales como no mucoso, crecimiento rápido, movilidad celular, y cierta susceptibilidad a antibióticos [122] y por la expresión de múltiples factores de virulencia. En esta fase temprana, que puede perdurar años, las infecciones pueden ser combatidas efectivamente con terapias antimicrobianas agresivas, pudiéndose retrasar sustancialmente el comienzo de la infección crónica subsecuente [111, 123-125]. Por razones aún desconocidas, esta etapa de colonización intermitente es temporaria y, tarde o temprano, se convierte en una infección crónica donde eventualmente las vías aéreas en su totalidad son colonizadas permanentemente por un único clon de *P. aeruginosa*, el cual sufre un proceso adaptativo que le permite establecerse y persistir a lo largo de años, incluso décadas, sin poder ser erradicado por ninguna de las terapias antimicrobianas conocidas y conllevando a la muerte del paciente [104] (Figura I4). Este proceso de adaptación incluye importantes cambios fisiológicos, fenotípicos y genéticos, los cuales confieren ventajas selectivas para un crecimiento más favorable en los diversos nichos y microambientes presentes en las vías aéreas FQ. En este sentido, entre las estrategias adaptativas para la persistencia de *P. aeruginosa* se destacan el crecimiento en *biofilms* y la diversificación fenotípica.

Los *biofilms* son comunidades bacterianas sésiles [126] donde los microorganismos son encapsulados en una matriz extracelular producida por ellos mismos [127], la cual está compuesta por exopolisacáridos [128], ADN extracelular [129-130], material proteínico, y apéndices celulares [131]. Se ha propuesto que la ventaja selectiva para la bacteria asociada a los *biofilms* sería la protección contra diversas condiciones adversas del ambiente, el tratamiento con antibióticos, y la respuesta inmune del hospedador, fundamentalmente dada por la liberación de ROS [132-134].



**Figura 14.** Representación esquemática de la progresión de la infección por *P. aeruginosa* en un paciente hipotético FQ. En diferentes cuadros de colores están representados clones filogenéticamente independientes de *P. aeruginosa* provenientes de diferentes fuentes del ambiente. La colonización intermitente producida por estos clones puede ser erradicada, y los pacientes pueden incluso no presentar infecciones con *P. aeruginosa* por varios años. El proceso se repite hasta que se produce el establecimiento de la infección crónica (rectángulo azul), luego de un período de transición en el cual un clon ancestral sufre transformaciones que permiten su persistencia hasta conllevar a la muerte del paciente.

Por otra parte, el proceso de diversificación fenotípica, conocido igualmente con el nombre de radiación adaptativa [99, 121], está basado principalmente en eventos mutagénicos, y conduce a la emergencia, selección y fijación de múltiples variantes fenotípicas particularmente adaptadas al ambiente FQ [88, 135-136], las cuales descienden del clon de *P. aeruginosa* infectante ancestral. Así, las características fenotípicas de los aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes FQ crónicamente infectados son remarcablemente diferentes de aquellas exhibidas por el clon inicial proveniente del ambiente [88] (Figura 15). Los cambios fenotípicos incluyen: alteraciones en los antígenos de superficie, como la acilación del LPS, pérdida del antígeno O [121, 137-140], pérdida o disminución de ciertos factores asociados a la virulencia, la alteración de las funciones del sistema de quórum sensing (QS) [88, 141-142], auxotrofías de aminoácidos [143], conversión al fenotipo mucoso [99, 144], lento crecimiento, formación de variantes de colonia pequeña (SCV) [145], incremento de la resistencia a antibióticos, falta de movilidad [146], y la modulación de vías metabólicas fundamentalmente relacionadas al crecimiento microaeróbico [147]. Entre todas estas variantes, la emergencia de los fenotipos mucoso, deficiente en QS, y resistencia a antibióticos han sido ampliamente relacionados con la persistencia de *P. aeruginosa* en el ambiente FQ, como asimismo con una disminución de la función pulmonar, daño tisular y un pronóstico desfavorable para el paciente [142, 145, 148-149].



**Figura 15.** Transición de *P. aeruginosa* desde el patógeno infectante inicial del pulmón FQ al patógeno crónico característico de los estadios tardíos de la enfermedad. Este proceso incluye una variedad de cambios adaptativos tales como la resistencia incrementada a antibióticos (por la sobreexpresión de genes que codifican para bombas de eflujo, como MexYX, por mutaciones en *mexZ*), la conversión al fenotipo mucoso y sobreproducción de alginato (por mutaciones en *mucA*), la pérdida de factores celulares implicados en la virulencia (por mutaciones en *lasR*) y el fenotipo hipermutador, (por mutaciones en *mutS* y *mutL*).

Generalmente, los cambios genéticos asociados a los fenotipos mencionados involucran mutaciones de pérdida de función en genes específicos. Así, la transición al fenotipo mucoso está relacionada principalmente a mutaciones en el gen *mucA* [99, 144, 150-151]. MucA es un factor anti-sigma que secuestra al factor sigma AlgU, el cual por su lado induce la transcripción de un gran número de genes incluyendo aquellos relacionados con la síntesis del alginato. De esta manera, mutaciones que inactivan a MucA producen, por liberación de AlgU, una sobreproducción de alginato y por lo tanto la emergencia del fenotipo mucoso. A pesar de que la conversión al fenotipo mucoso puede producirse por la inactivación de otros factores regulatorios (MucB, MucD, RpoN), las mutaciones encontradas con mayor frecuencia en aislados FQ se localizan en el gen *mucA*. Por otra parte, cabe destacar que el fenotipo mucoso resulta característico de aislados FQ de *P. aeruginosa*, ya que raramente se encuentra en otros cuadros clínicos o en la naturaleza [99, 152-155]. En este sentido, la conversión al fenotipo mucoso es considerada particularmente beneficiosa para la bacteria en el contexto FQ por varios aspectos. Por un

lado, el alginato es uno de los componentes principales de la matriz de los *biofilms*, cuya sobreexpresión promovería la supervivencia de *P. aeruginosa* en condiciones de estrés oxidativo, estrés osmótico, y frente al tratamiento con antibióticos [156-158]. Además, las variantes mucosas tienen una producción reducida de diferentes factores de virulencia (como por ejemplo el flagelo) en comparación con los aislados isogénicos no mucosos, lo cual sería útil para la evasión del sistema inmune [159-160]. De esta manera, el fenotipo mucoso es de especial interés como indicador de la cronicidad, y su emergencia constituye una clara y primera señal de irreversibilidad de la infección [161].

Como parte del proceso de radiación adaptativa, mutaciones en el gen *lasR*, que codifica para uno de los reguladores transcripcionales principales del QS, son también altamente frecuentes en infecciones crónicas por *P. aeruginosa* [142]. El QS es un sistema de comunicación intercelular que utiliza moléculas pequeñas secretadas como señales químicas. Este sistema regula una gran cantidad de genes relacionados con la virulencia y el metabolismo, siendo fundamental en muchos procesos biológicos, tales como la secreción de factores de virulencia extracelulares, el desarrollo de *biofilms*, la interacción con el sistema inmune del hospedador y con otras especies bacterianas, entre otros [162]. Así, la alteración de *lasR* disminuye, entre otras cosas, la expresión de genes relacionados con virulencia característicos de infecciones agudas, lo cual se postula sería favorable para la persistencia a largo plazo dada en las infecciones crónicas FQ. Además, mutaciones en *lasR* conllevan a cambios metabólicos fundamentales que permiten el crecimiento de la bacteria en base a ciertos aminoácidos y en condiciones microaeróbicas, tales como las que se presentan en el pulmón FQ [141].

La diversificación fenotípica incluye igualmente la emergencia de variantes resistentes a antibióticos, las cuales imposibilitan aún más su eficiente erradicación. Se han identificado a partir de aislados FQ diversas mutaciones que confieren resistencia a antibióticos, siendo uno de los principales mecanismos de resistencia la sobreexpresión de sistemas de bombas de eflujo [163-164]. Dentro de los cuatro sistemas de bombas de eflujo que se han descrito en *P. aeruginosa*, MexAB-OprM y MexXY-OprM contribuyen a la resistencia intrínseca, mientras que MexCD-OprJ y MexEF-OprN son sobreexpresados en mutantes resistentes. Uno de los genes mutados con mayor frecuencia en aislados FQ de *P. aeruginosa* es el gen *mexZ* [88]. MexZ es un regulador negativo de la bomba de eflujo

MexYX-OprM, y su inactivación induce la expresión de la misma e incrementa la resistencia contra aminoglicósidos y otras drogas [88, 165]. Asimismo, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de adquirir resistencia antimicrobiana mediante genes codificados en plásmidos y transposones, adquiridos a su vez por transferencia génica horizontal desde otras bacterias Gram-negativas.

## 2.6. HIPERMUTABILIDAD ESTABLE EN AISLADOS FQ DE *P. AERUGINOSA*

Una característica notable y única de las infecciones crónicas causadas por *P. aeruginosa* es la elevada prevalencia de cepas hipermutadoras 16 al 31% [21, 135, 166-169] habiéndose observado sólo ocasionalmente en infecciones agudas o en aislados obtenidos del ambiente ( $\leq 1\%$ ) [21, 170]. Esta alta prevalencia se ha reportado en colecciones de aislados obtenidos a partir de pacientes FQ tanto de Europa como de América del Norte [21, 135, 166, 168-170], sugiriendo que el fenómeno podría ser de carácter universal. A pesar de que la tasa de mutación celular es contralada por diferentes vías, notablemente la mayoría de las cepas hipermutadoras identificadas en aislados FQ son deficientes en el MRS, principalmente por alteraciones en los genes *mutS* y *mutL* [21, 31, 135, 171]. Este fenómeno ha sido asociado con la posible contribución en la adaptación al ambiente FQ, fundamentalmente por su asociación con la adquisición de resistencia a antibióticos [21, 31, 166, 172-174]. Sin embargo, la resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* es un fenómeno igualmente asociado a infecciones agudas, en donde la prevalencia de hipermutadoras es irrelevante [21, 175]. De esta manera, cabe postular que características asociadas a la cronicidad de la infección serían las responsables de la selección y alta prevalencia de cepas deficientes en el MRS. En este sentido, en infecciones pulmonares crónicas causadas por *P. aeruginosa* diferentes a FQ, tales como la bronquiectasia y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), existe igualmente una alta prevalencia de cepas hipermutadoras [173, 176]. Asimismo, se ha descrito que particularmente en infecciones crónicas FQ es posible observar una alta prevalencia de cepas hipermutadoras de otras especies bacterianas, tales como *H. influenzae* [177], *S. aureus* [18], *S. pneumoniae* [20], y especies del complejo *B. cepacia* (Martina, Feliziani *et al.*, en redacción).

OBJETIVOS

**OBJETIVO GENERAL:**

El presente trabajo se encuentra enmarcado en un proyecto general abocado al estudio de aquellos sistemas implicados en el control de la tasa de mutación y su implicancia en procesos de diversificación fenotípica adaptativa en el patógeno oportunista *P. aeruginosa*. Particularmente refiriéndose a infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ, estos procesos de diversificación fenotípica, o radiación adaptativa, están basados en la mutación de genes específicos, y han sido asociados a la marcada persistencia de la bacteria. Entre ellos, se destacan la conversión al fenotipo mucoso, la alteración de funciones del QS y la resistencia a antibióticos. Asimismo, mutaciones que inactivan el MRS son seleccionadas frecuentemente en aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes FQ, generando un fenotipo hipermutador. Dentro de este contexto, en el presente trabajo se estudió la asociación entre la deficiencia en el MRS y el proceso de diversificación fenotípica en aislados FQ de *P. aeruginosa*. A su vez, el trabajo incluyó un estudio global del impacto de la hipermutabilidad por deficiencia en el MRS en la estructura del genoma de *P. aeruginosa* durante procesos evolutivos a largo plazo en infecciones pulmonares crónicas.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:****1) ANALIZAR LA ASOCIACIÓN *IN VIVO* ENTRE LA HIPERMUTABILIDAD ESTABLE Y LA EMERGENCIA DE FENOTIPOS ADAPTATIVOS DE *P. AERUGINOSA***

- Analizar la prevalencia del fenotipo hipermutador así como las bases genéticas del mismo en una población de aislados FQ argentinos de *P. aeruginosa*.
- Estudiar la presencia de mutaciones en los genes *mucA* (conversión mucosa), *lasR* (alteración de las funciones del QS), y *mexZ* (resistencia a antibióticos), implicados en la emergencia de fenotipos adaptativos característicos de infecciones crónicas FQ.
- Investigar la existencia de una correlación entre el fenotipo hipermutador y la mutagénesis en *mucA*, *lasR* y *mexZ* en aislados FQ de *P. aeruginosa*.

- Analizar la asociación entre hipermutabilidad estable debida a la deficiencia en el MRS y la resistencia a antibióticos en aislados FQ de *P. aeruginosa*.

## **2) ESTUDIAR LA EVOLUCIÓN A LARGO PLAZO Y LA DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL POBLACIONAL DE LINAJES PARTICULARES DE *P. AERUGINOSA* HIPERMUTADORES AISLADOS DE PACIENTES FQ DURANTE EL TRANCURSO DE LA INFECCIÓN CRÓNICA**

- Realizar un estudio evolutivo longitudinal y un estudio transversal a nivel poblacional de aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* pertenecientes a un mismo linaje bacteriano a través de análisis genómico estructurales, mediante el secuenciamiento de genomas completos.
- Investigar globalmente la asociación *in vivo* entre hipermutabilidad estable debida a la deficiencia en el MRS e hipermutabilidad localizada en SSRs.
- Estudiar globalmente el metabolismo de aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* en el marco del análisis evolutivo longitudinal y transversal.

# RESULTADOS

## CAPÍTULO 1

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA HIPERMUTABILIDAD POR DEFICIENCIA EN EL MRS Y LA EMERGENCIA DE FENOTIPOS ADAPTATIVOS DE *P. AERUGINOSA* EN AISLADOS OBTENIDOS DE PACIENTES ARGENTINOS FQ

Tal como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes FQ, produciendo infecciones pulmonares crónicas que pueden persistir por décadas [91, 99]. Durante el establecimiento de la infección, generalmente un único linaje de *P. aeruginosa* diversifica en diferentes fenotipos, específicamente adaptados al ambiente hostil del pulmón FQ, permitiendo consecuentemente su persistencia a largo plazo [178]. Estos fenotipos poseen características que se diferencian de aquellos observados en aislados del ambiente, sugiriendo la existencia de un patrón conservado de evolución durante el proceso adaptativo de *P. aeruginosa* al pulmón FQ [88, 179]. Ejemplos conocidos de este proceso de diversificación incluyen, entre otros, la conversión al fenotipo mucoso, la alteración de las funciones del sistema de QS [88, 141-142], la resistencia a antibióticos [180], y la pérdida (o disminución) de los mecanismos de reparación del ADN generando lo que se conoce como fenotipo hipermutador [21, 166, 171, 173].

Dado que esta diversificación fenotípica está basada en eventos de mutagénesis, es posible plantear que un aumento en la tasa de mutación podría acelerar o favorecer este proceso adaptativo. Así, la emergencia de cepas hipermutadoras podría estar directamente relacionada con la adquisición de fenotipos característicos FQ. En este sentido, la hipermutabilidad ha sido asociada con la adquisición de resistencia a antibióticos, tanto en aproximaciones *in vivo* como *in vitro* [21, 166-167, 172-174, 181]. Sin embargo, la resistencia a antibióticos es un fenómeno que no está restringido solamente a infecciones crónicas, ya que también es un fenotipo frecuente en infecciones agudas [175], en las que la emergencia y selección de cepas hipermutadoras es un fenómeno sumamente raro [21].

Investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio, mediante experimentos *in vitro* con cepas de *P. aeruginosa* deficientes en el MRS, establecieron una asociación entre la hipermutabilidad y la conversión al fenotipo mucoso [182] e hipermutabilidad y la

alteración del QS [183-184]. De esta manera, surgió la hipótesis de que, al igual que lo observado *in vitro*, la ocurrencia de mutaciones en *mucA* y *lasR*, como parte del proceso transformativo de *P. aeruginosa* al pulmón FQ, pudiera estar asociado con la hipermutabilidad estable. Dicho de otra manera, si la hipermutabilidad podría estar co-seleccionándose con las mutaciones en los genes mencionados, primariamente seleccionadas por su relación con la adaptación y persistencia en el pulmón FQ. Esta posibilidad se veía soportada por el hecho de que, a diferencia de la adquisición de resistencia a antibióticos, la conversión mucosa y la alteración del QS son fenómenos netamente relacionados a la cronicidad de la infección, al igual que la hipermutabilidad por deficiencia en el MRS.

Teniendo en cuenta los antecedentes existentes y la hipótesis planteada, en el presente capítulo se llevó a cabo una caracterización exhaustiva de mutaciones presentes en los genes *mucA*, *lasR*, *mexZ*, y los genes componentes del MRS, *mutS* y *mutL*, en una colección de aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes argentinos FQ, con la intención de investigar la posible asociación entre hipermutabilidad estable y la mutagénesis subyacente a la emergencia de los fenotipos mucoso, alteración en el QS y de resistencia a antibióticos.

### **1.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* OBTENIDOS DE UNA COLECCIÓN DE PACIENTES ARGENTINOS FQ (COLECCIÓN CFL)**

Con el objetivo de estudiar la asociación entre hipermutabilidad y emergencia de fenotipos adaptados *in vivo*, se procedió primeramente a la confección de una colección local de aislados FQ de *P. aeruginosa* (colección CFL). Para ello se recolectaron 38 aislados a partir de muestras de esputo de 26 pacientes FQ que cursaban infecciones pulmonares crónicas con *P. aeruginosa* (ver Materiales y Métodos).

Inicialmente, y con el objetivo de explorar el grado de clonalidad y las relaciones epidemiológicas entre los aislados de *P. aeruginosa* de la colección CFL, se realizaron ensayos de electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) en los 38 aislados mencionados. Los resultados obtenidos permitieron determinar que cada paciente estuvo infectado por un único linaje de *P. aeruginosa* que persistió a lo largo del tiempo, de

manera que aquellos aislados que fueron obtenidos del mismo paciente en diferentes años (pacientes 3 y 18) presentaron el mismo patrón de macro-restricción (Tabla R1). Por el contrario, los aislados provenientes de distintos pacientes no estuvieron relacionados epidemiológicamente entre sí, indicando que la infección en cada uno de ellos se estableció de manera independiente, a través de linajes bacterianos provenientes de distintos reservorios del ambiente. Excepciones a esta distribución fueron los aislados de los pacientes 1 y 2, los cuales exhibieron patrones de PFGE similares, indicando que corresponderían a clones relacionados entre sí epidemiológicamente. Este caso excepcional podría indicar una prevalencia muy baja, del 5%, de transmisión entre pacientes en la población argentina.

Posteriormente, todos los aislados de *P. aeruginosa* se caracterizaron en base a su mucosidad, iridiscencia mediante exposición a luz blanca, pigmentación, y tamaño de colonia. Tal como se observa en la Tabla R1, esta caracterización fenotípica exhibió una clara diversificación de variantes de colonias, lo cual difiere significativamente de las variantes de morfotipo único obtenidas en infecciones agudas de *P. aeruginosa* [88, 179].

## 1.2. PREVALENCIA DE AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* DEFICIENTES EN EL MRS EN LA COLECCIÓN CFL

Con la finalidad de establecer la prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras en la colección CFL, se determinó la frecuencia de mutación mediante el ensayo de resistencia al antibiótico rifampicina en los 38 aislados. Este ensayo, a pesar de que sólo permite la detección de sustituciones de base en el gen *rpoB* [185], es utilizado ampliamente como un método eficiente para detectar cepas deficientes en el MRS [15, 21].

Una vez determinadas, las frecuencias de mutación de cada aislado se compararon con aquellas obtenidos para la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 ( $2,4 \times 10^{-8} \pm 1,3 \times 10^{-8}$ ) y para las cepas hipermutadoras isogénicas MPAOMS ( $2,8 \times 10^{-6} \pm 1,6 \times 10^{-6}$ ) y MPAOML ( $1,3 \times 10^{-6} \pm 0,6 \times 10^{-6}$ ), mutantes de los genes *mutS* y *mutL* respectivamente. En este sentido, los aislados se consideraron hipermutadores cuando sus frecuencias de mutación fueron mayores o iguales que  $2 \times 10^{-7}$ , valor aproximadamente 20 veces mayor que el de PAO1 y previamente establecido para detectar cepas deficientes en el MRS [21]. Como se puede observar en la Tabla R1, se identificaron 16 aislados hipermutadores entre

los 38 aislados FQ de *P. aeruginosa* (42%), las cuales se distribuyeron en 12 pacientes FQ distintos (46%). Es importante mencionar que la prevalencia de aislados de *P. aeruginosa* hipermutadores fue muy elevada tanto en la población de pacientes FQ adultos (HABA) como en la de niños/adolescentes (HNC), siendo del 35 y 50%, respectivamente. Además, la prevalencia de aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* en la colección CFL fue una de las mayores observada en comparación con colecciones de otras partes del mundo, de las cuales se reportaron prevalencias de aislados hipermutadores en un rango del 16 al 31% [21, 135, 166-169].

Tal como se mencionó anteriormente, las cepas hipermutadoras encontradas en aislados FQ de *P. aeruginosa* son generalmente deficientes en genes pertenecientes al MRS, particularmente el gen *mutS* [31, 171]. De esta manera, una vez identificados los 16 aislados hipermutadores en la colección CFL, se procedió a explorar las bases genéticas de la hipermutabilidad en cada uno de ellos, tanto a través de ensayos de complementación génica como del secuenciamiento de los genes *mutS* y *mutL*. Tal como observa en la Tabla R2, se determinó que de los 16 aislados hipermutadores, 15 (94%) fueron deficientes en el MRS, ya que 6 presentaron mutaciones en el gen *mutS*, y 9 en *mutL*. Estos resultados fueron confirmados por ensayos de complementación génica con los genes *mutS* y *mutL* correspondientes. Cabe aclarar que con respecto al clon hipermutador restante (clon 3c, Tabla R2), la única alteración en los genes del MRS que pudo determinarse fue la imposibilidad de amplificar por PCR una de las regiones del gen *mutS*, lo cual sugiere que es *mutS* deficiente. Sin embargo, esta suposición no pudo ser confirmada por complementación génica debido a la resistencia natural del clon 3c a gentamicina, marcador de selección de los plásmidos utilizados en los ensayos de complementación.

Con respecto al espectro de mutación en los genes del MRS, se observó que mutaciones de inserción/delección que generan cambios en el marco de lectura fueron predominantes tanto en *mutS* como *mutL* alcanzando un 62,5% con respecto al total (Tabla R2, Figura R1D). Dentro de las restantes se observaron mutaciones de sustitución, tanto transiciones como transversiones, con cambio de sentido. Así, el aislado 5a tuvo una mutación puntual que generó el cambio de la tirosina 493 por prolina (T493P) (Tabla R2), ubicado en el dominio IV de unión al ADN en la proteína MutS; el aislado 10a presentó una mutación que sustituyó la glicina 618 en MutS por serina (Tabla R2), localizada en uno

de los residuos de contacto al ADP del dominio ATPasa V [186] que es altamente conservado en todas las ATPasa ABC inhibidas por vanadato [187]; mientras que por último, el aislado 2a exhibió una mutación puntual en *mutL*, la cual generó el cambio de la leucina 625 por glutamina (L625Q) (Tabla R2), uno de los últimos residuos del dominio C-terminal implicados en la homodimerización de MutL [188]. Cabe destacar que ninguna de las tres sustituciones descriptas han sido reportadas previamente, y que su ubicación en dominios estructurales claves para la actividad de ambas proteínas MutS y MutL, indica que serían las responsables de su inactivación y consecuente hipermutabilidad.

### 1.3. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *mucA*, *lasR* Y *mexZ*

Con el propósito de identificar mutaciones que podrían estar involucradas en la conversión a los fenotipos mucoso, deficientes en el sistema de QS y de resistencia a antibióticos (particularmente aminoglicósidos), se analizaron las secuencias codificantes de los genes *mucA*, *lasR* y *mexZ* respectivamente, en la colección de *P. aeruginosa* CFL. Es importante destacar que para este análisis sólo se consideraron las mutaciones no sinónimas, es decir aquellas que podrían causar la pérdida parcial o completa de la función génica (ver Materiales y Métodos).

Tal como se observa en la Tabla R2, *mexZ* fue el gen mutado con mayor frecuencia en la colección CFL, ya que 30 de los 38 aislados presentaron mutaciones en el mismo (79%). *mucA* fue el segundo gen más mutado, exhibiendo alteraciones en 24 de los 38 aislados (63%). Finalmente, *lasR* fue mutado en 15 aislados (39%). Estos resultados, junto con los observados respecto a la inactivación por mutación de los genes del MRS (42%), confirman que la emergencia de mutaciones en todos los genes analizados fue altamente prevalente entre aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de los pacientes argentinos con FQ.

Posteriormente, se examinó el espectro de mutación ocurrido en cada gen. Notablemente, se observaron grandes diferencias entre los espectros de mutación en los genes *mucA*, *lasR*, *mexZ*, e incluso comparándolos con los observados en los genes del MRS, *mutS* y *mutL* (Figura R1). En *mucA* prevalecieron las pequeñas deleciones (1-4 pb), siendo el resto de las mutaciones diferentes tipos de transiciones (25%) y transversiones (8,3%) (Figura R1A). Sin embargo, es importante destacar que tanto las mutaciones de deleción como las sustituciones generaron codones de terminación prematuros en el 92% de

los casos, todos ubicados en la región periplásmica de la proteína (Tabla R2), indicando que existiría una vía particular a través de la cual se produciría la inactivación/alteración de *mucA*. Por su parte, en *lasR* se observaron mayoritariamente sustituciones con cambio de sentido (86%), con una relación 2:1 de transiciones (57%) respecto a transversiones (29%), mientras que sólo el 14% fueron pequeñas deleciones (Figura R1B, Tabla R2). Contrariamente con lo observado en *mucA*, las mutaciones en *lasR* no tuvieron una localización particular, ubicándose a lo largo de los distintos dominios funcionales de la proteína. Con respecto a *mexZ*, se observaron fundamentalmente deleciones (65%), de las cuales la mayoría fueron grandes deleciones (>4 pb) (50%) en comparación con las deleciones pequeñas (1-4 pb) (15%), seguidas por transiciones (20%) y transversiones (15%) (Figura R1C). Sin embargo, sólo aproximadamente el 15% de las mutaciones analizadas en *mexZ* generaron codones de terminación prematuros (Tabla R2). Tal como se mencionó anteriormente, la mayoría de las alteraciones responsables de la inactivación de los genes *mutS* y *mutL* fueron indels (62,5%) (Tabla R2), las cuales incluyeron principalmente grandes deleciones (31,5%), pero también deleciones pequeñas (5,3%), inserciones pequeñas (10,5%), grandes inserciones (5,3%) y duplicaciones (5,3%), exhibiendo de esta manera un amplio espectro de mutaciones que producen cambios en el marco de lectura (Figura R1D).

Cabe destacar que los espectros de mutación para *mucA*, *lasR*, *mexZ*, *mutS* y *mutL* obtenidos en los aislados de *P. aeruginosa* argentinos son similares a los previamente reportados en otros estudios [88, 135, 189-191], indicando que mientras todos ellos son mutados con una alta frecuencia en aislados obtenidos a partir de infecciones crónicas FQ, los mecanismos responsables de la emergencia de mutaciones en cada uno de ellos serían claramente diferentes. En este sentido, cabe mencionar que los espectros de mutación observados para *mucA* y *lasR*, dominados por pequeñas deleciones y por transiciones respectivamente, coincide con el espectro previamente descrito para células deficientes en el MRS en *E. coli* [192], no así el determinado para el gen *mexZ* (Figura R1, Tabla R2).

**Tabla R1.** Caracterización genotípica y fenotípica de 38 aislados FQ de *P. aeruginosa* de la colección CFL.

Paciente	Aislado	Genotipo <sup>a</sup>	Fenotipo				Frecuencia de mutación <sup>b</sup>	Fuente	Año de aislamiento
			Mucoso	SCV	Pigmentado	Iridiscente			
1	a	ND	+	-	-	-	$(1,3 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	HNC	2004
	b	A1	+	-	-	-	$(1,6 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	HNC	2007
	c	A1	+	+	-	-	$(2,7 \pm 1,9) \times 10^{-9}$	HNC	2007
2	a	A1	-	+	-	+	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	HNC	2007
	b	A2	+	-	-	-	$(1,7 \pm 1,4) \times 10^{-9}$	HNC	2007
3	a	B1	+	-	-	-	$(1,0 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	HNC	2004
	b	B1	-	+	-	-	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	HNC	2007
	c	B1	+	-	+	(verde)	$(2,8 \pm 1,6) \times 10^{-7}$	HNC	2008
4	a	C1	+	-	-	-	$(2,8 \pm 1,4) \times 10^{-6}$	HNC	2007
	b	C1	-	-	-	-	$(9,0 \pm 6,3) \times 10^{-9}$	HNC	2007
5	a	D1	+	-	-	-	$(4,5 \pm 2,6) \times 10^{-6}$	HNC	2007
6	a	E1	-	-	-	-	$(6,4 \pm 4,5) \times 10^{-9}$	HNC	2007
7	a	Q1	-	-	+	(verde)	$(2,9 \pm 0,8) \times 10^{-6}$	HNC	2007
8	a	R1	+	-	-	-	$(2,2 \pm 0,5) \times 10^{-6}$	HNC	2007
9	a	F1	+	-	-	-	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	HNC	2004
10	a	L1	+	+	-	-	$(6,5 \pm 3,8) \times 10^{-6}$	HNC	2008
11	a	N1	+	-	-	-	$(1,0 \pm 0,5) \times 10^{-9}$	HNC	2008
12	a	O1	+	-	-	-	$(3,9 \pm 2,1) \times 10^{-9}$	HNC	2008
13	a	G1	-	-	+	+	$(4,1 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	HABA	2006
14	a	H1	-	-	+	(verde)	$(5,0 \pm 3,2) \times 10^{-9}$	HABA	2006
15	a	S1	+	+	+	(roja)	$(1,1 \pm 0,6) \times 10^{-7c}$	HABA	2006
16	a	I1	+	-	+	(verde)	$(6,7 \pm 1,8) \times 10^{-9}$	HABA	2006
17	a	J1	-	-	+	(verde)	$(2,6 \pm 1,5) \times 10^{-9}$	HABA	2006
	b	J1	+	-	-	-	$(6,0 \pm 2,8) \times 10^{-6}$	HABA	2006
18	a	K1	+	+	-	-	$(5,5 \pm 2,1) \times 10^{-9}$	HABA	2006
	b	K1	-	+	-	-	$(2,9 \pm 2,3) \times 10^{-6}$	HABA	2006
	c	K1	+	-	-	-	$(1,2 \pm 1,1) \times 10^{-9}$	HABA	2008
	d	K1	-	+	-	+	$(1,3 \pm 1,2) \times 10^{-6}$	HABA	2008
19	a	M1	+	-	-	-	$(2,6 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	HABA	2006
20	a	P1	+	-	+	(verde)	$(9,0 \pm 4,0) \times 10^{-10}$	HABA	2008
	b	P1	-	-	+	(verde)	$(2,2 \pm 1,6) \times 10^{-6}$	HABA	2008
21	a	T1	+	+	-	-	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	HABA	2008
	b	T1	-	+	-	+	$(1,1 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	HABA	2008
22	a	U1	+	-	-	-	$(3,7 \pm 2,2) \times 10^{-6}$	HABA	2008
23	a	V1	-	-	+	(verde)	$(1,9 \pm 1,3) \times 10^{-9}$	HABA	2008
24	a	W1	-	-	-	+	$(4,0 \pm 2,0) \times 10^{-10}$	HABA	2008
25	a	X1	-	-	-	+	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-7c}$	HABA	2008
26	a	Y1	+	-	-	-	$(2,3 \pm 1,7) \times 10^{-9}$	HABA	2008

<sup>a</sup>Todos los aislados se genotipificaron a través de PFGE empleando la enzima *SpeI*.

<sup>b</sup>La frecuencia de mutación se midió como la frecuencia de resistentes a rifampicina 300 µg/mL cada  $10^8$  células totales. Aquellos aislados con frecuencias de mutación  $\geq 2 \times 10^{-7}$  se definieron como hipermutadores y se indicaron en letra negra.

<sup>c</sup>Los aislados 15a y 25a con frecuencias de mutación por debajo pero cercanas al punto de corte ( $\geq 2 \times 10^{-7}$ ) no mostraron mutaciones en los genes *mutS* o *mutL* mediante secuenciamiento génico (ver TablaR2) y fueron considerados dentro del grupo no mutador.

SCV, variante de colonia pequeña; ND, no determinado; HNC, Hospital de Niños de Córdoba; HABA, Hospital Alemán de Buenos Aires.

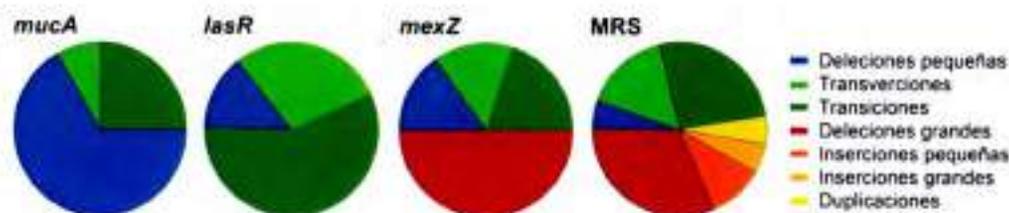
Las frecuencias de mutación de las cepas de referencia silvestre PAO1 y las cepas hipermutadoras MPAOMS y MPAOML fueron  $(2,4 \pm 1,3) \times 10^{-5}$ ,  $(2,8 \pm 1,6) \times 10^{-6}$ , y  $(1,3 \pm 0,6) \times 10^{-6}$  respectivamente.

**Tabla R2.** Mutaciones en los genes *mucA*, *lasR*, *mexZ*, *mutS* y *mutL* en los 38 aislados FQ de *P. aeruginosa* de la colección CFL.

	Mutaciones <sup>a</sup>			
	<i>mucA</i>	<i>lasR</i>	<i>mexZ</i>	MRS
1a	C349T (Stop a 116)	A587G (E196G)	C151G (H51D)	<i>mutS</i> , -11 pb a 1555 (Stop a 618); A1276G (T426A)
1b	C349T (Stop a 116)	A587G (E196G)	C151G (H51D)	<i>mutS</i> , -11 pb a 1555 (Stop a 618); A1276G (T426A)
1c	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	-1 pb a 261 (Stop a 110)	ND
2a	NF	-1 pb a 308 (Stop a 113)	-1 pb a 242 (Stop a 110)	<i>mutL</i> , T1874A (L625Q)
2b	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	-1 pb a 261 (Stop a 110)	ND
3a	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	NF	<i>mutL</i> , +2 pb a 619 (Stop a 261)
3b	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	NF	<i>mutL</i> , -11 pb a 619 (Stop a 260)
3c	NF	NF	NF	<i>mutS</i> , NA
4a	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	-10 pb a 595	ND
4b	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	-10 pb a 595	ND
5a	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	NF	<i>mutS</i> , A1477C (T493P)
6a	NF	NF	-2 pb a 60	ND
7a	-1 pb a 426 (Stop a 146)	A626G (N209S)	T110C (L37P)	ND
8a	C352T (Stop a 117)	NF	-10 pb a 184	ND
9a	C349T (Stop a 116)	-2 pb a 602 (Stop a 205)	-14 pb a 340	<i>mutL</i> , -17 pb a 1240 y G1632T (Stop a 544)
10a	C340T (Stop a 113)	NF	-11 pb a 328	<i>mutS</i> , G1852A (G618S)
11a	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	-1 pb a 609	ND
12a	NF	NF	NF	ND
13a	NF	NA	A633G (Stop 211)	ND
14a	NF	NF	A34G (T12A); G44A (G15D)	ND
15a	NF	NF	NA	NF
16a	-1 pb a 201 (Stop a 94)	NF	-11 pb a 365	ND
17a	NF	NF	-38 pb a 417	ND
17b	NF	NF	-13 pb a 340	<i>mutS</i> , +2 pb a 1611 (Stop a 562); T986C (L329P)
18a	-1 pb a 339 (Stop a 128)	NF	-4 pb a 595	ND
18b	-1 pb a 339 (Stop a 128)	NF	-4 pb a 595	ND
18c	-1 pb a 430 (Stop a 146)	NF	-15 pb a 60 ( $\Delta$ RVFLE a 22)	ND
18d	G421T (Stop a 140)	C617T (A206V)	NF	<i>mutS</i> , -1 pb a 1171 (Stop a 416)
19a	-1 pb a 426 (Stop a 146)	NF	-368 pb a 248	<i>mutL</i> , +5 pb a 627 (Stop a 260)
20a	C367T (Stop a 122)	T645G (I215M)	C187T (C63R)	ND
20b	NF	T645G (I215M)	C187T (C63R); C283T (Stop a 94)	<i>mutL</i> , 96 pb dup a 75 (Stop a 126)
21a	NF	C221T (P74L)	-21 pb a 631	<i>mutL</i> , -4 pb a 1475
21b	NF	C221T (P74L)	-21 pb a 631	<i>mutL</i> , -4 pb a 1475
22a	-1 pb a 358 (Stop a 128)	C280T (Stop a 93)	-12 pb a 425 ( $\Delta$ RAVE a 143; R142Q)	<i>mutL</i> , C1474T (Stop a 491)
23a	G304C (G102R)	A575G (K192R)	T413G y C414A (L150R); -7 pb a 451	ND
24a	NF	C317A (Stop a 105)	C494A (Stop a 164)	ND
25a	NF	A697T (N233Y)	NF	NF
26a	-1 pb a 201 (Stop a 94)	NF	-12 pb a 383 ( $\Delta$ PLEK a 128)	ND

<sup>a</sup>Se consideraron las mutaciones de SNPs no sinónimas e indels. Entre paréntesis se indican los cambios a nivel de aminoácidos.

NF, no se encontraron mutaciones; ND, no determinado; NA, no hubo amplificación por PCR; dup, duplicación; -, deflección; +, inserción.



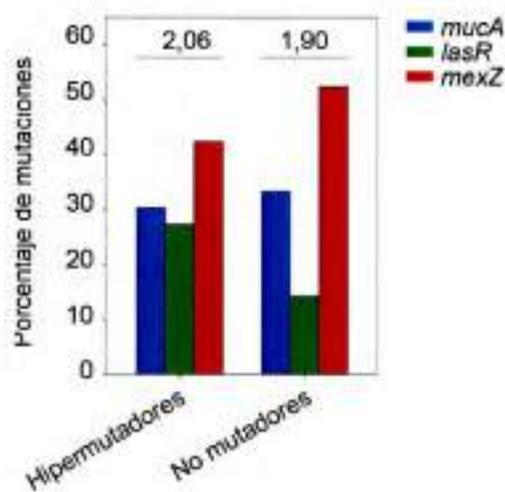
**Figura R1.** Espectros de mutación en los genes *mucA*, *lasR* y *mexZ* y los genes del MRS observados en los aislados de *P. aeruginosa* correspondientes a la colección CFL. Los gráficos de torta indican el porcentaje de cada tipo de mutación presentes en los genes *mucA*, *lasR*, *mexZ*, y los genes del MRS. El análisis de los genes del MRS incluye las mutaciones observadas tanto en *mutS* como en *mutL*.

#### 1.4. ASOCIACIÓN ENTRE HIPERMUTABILIDAD ESTABLE Y MUTAGÉNESIS EN LOS GENES *mucA*, *lasR* Y *mexZ*

Con el objeto de profundizar en la posible asociación *in vivo* entre la hipermutabilidad por deficiencia en el MRS y la emergencia de mutaciones en los genes *mucA*, *lasR*, y *mexZ*, a continuación se analizó la proporción de mutaciones ocurridas en cada gen en los aislados hipermutadores y en los no mutadores de la colección CFL. Como se observa en la Figura R2, en los aislados hipermutadores la proporción de mutaciones presentes en los genes *mexZ* y *mucA* no fue significativamente diferente de la observada en los aislados no mutadores ( $P = 0,17$  y  $P = 1,00$  respectivamente). En el caso de *lasR*, se observó que entre los hipermutadores el número de mutaciones por aislado fue claramente más elevada que en los no mutadores, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P = 0,09$ ). Estos resultados indican que no es posible establecer una asociación entre la generación de mutaciones en *mexZ*, *mucA*, y *lasR* y el fenotipo hipermutador en un contexto de infección *in vivo*. Más aún, como se muestra en la Figura R2, el número de mutaciones totales en los tres genes analizados por cada aislado hipermutador (2,06) no fue significativamente mayor que aquella observada por cada aislado no mutador (1,90).

Posteriormente, se analizó si la hipermutabilidad podría estar asociada con algún tipo particular de mutaciones considerando los tres genes *mucA*, *lasR* y *mexZ* en conjunto. En este sentido, a pesar de que los aislados hipermutadores presentaron una tendencia hacia las sustituciones (53%), tanto transiciones como transversiones, y los aislados no mutadores

exhibieron un mayor número de deleciones (62%), principalmente pequeñas deleciones (1-4 pb), las diferencias entre estos valores tampoco fueron estadísticamente significativas. De esta manera, no fue posible establecer una asociación *in vivo* entre la hipermutabilidad y las mutaciones generadas en *mucA*, *lasR* y *mexZ* durante el proceso de infección pulmonar crónica, sugiriendo que en la población analizada en este trabajo, la hipermutabilidad no estaría asociada específicamente a la emergencia de ninguno de los fenotipos adaptativos específicos estudiados.



**Figura R2.** Distribución del número de mutaciones en los genes *mucA*, *lasR* y *mexZ* en los aislados hipermutadores y no mutadores. El número de mutaciones presentes en los genes *mucA* (barras azules), *lasR* (barras verdes), y *mexZ* (barras rojas) está expresado como el porcentaje de mutaciones en los aislados hipermutadores y no mutadores respecto del número de mutaciones totales. Los números sobre las barras indican el número de mutaciones totales por cada uno de los aislados. La diferencia entre el porcentaje de mutaciones en los aislados hipermutadores y no mutadores no fue estadísticamente significativa en ninguno de los genes analizados ( $P < 0,05$ , test exacto de Fisher).

## 1.5. ASOCIACIÓN ENTRE HIPERMUTABILIDAD ESTABLE Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Tal como se mencionó anteriormente, diversas investigaciones plantean que las cepas hipermutadoras tendrían un rol principal en la adquisición de estas elevadas tasas de resistencia en los aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ [21, 174, 181]. De hecho,

se ha observado que aislados hipermutadores de pacientes con FQ no sólo poseen una resistencia a antibióticos mayor que los aislados no mutadores [21], sino que también incrementan la tasa de adquisición de resistencia hacia nuevos antibióticos [167]. De esta manera, con el objetivo de profundizar en el estudio de la asociación entre hipermutabilidad y resistencia a antibióticos, se analizó la susceptibilidad de los 38 aislados de la colección CFL a diferentes antibióticos mediante la medición de los diámetros de los halos de inhibición y la cuantificación de la subpoblación de mutantes resistentes (SMR) desarrolladas dentro de estos halos de inhibición (ver Materiales y Métodos). Para ello, se utilizaron los siguientes antibióticos: ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem, meropenem y tobramicina, teniendo en cuenta que los mismos son ampliamente utilizados en las terapias de pacientes con FQ. La proporción de aislados de *P. aeruginosa* hipermutadores con niveles detectables de resistencia a ciprofloxacina y ceftazidima fue significativamente mayor que la proporción observada en los aislados no mutadores ( $P = 0,02$  y  $P = 0,02$  respectivamente). En este sentido, el 62,5% de los aislados hipermutadores fueron resistentes a ciprofloxacina mientras que sólo se observó un 22,7% de aislados resistentes a este antibiótico entre los no mutadores. Por su lado, el 25% de los aislados hipermutadores fueron resistentes a ceftazidima, mientras que todos los aislados no mutadores fueron susceptibles a este antibiótico (Tabla R3). Con respecto a la proporción de aislados hipermutadores y no mutadores resistentes a imipenem, meropenem y tobramicina, se evidenció una mayor tendencia entre los hipermutadores, sin embargo la misma no fue estadísticamente significativa ( $P = 0,06$ ;  $P = 1,00$ ; y  $P = 0,61$  respectivamente). Es importante destacar que el único aislado resistente a todos los antibióticos analizados (aislado 19a), presentó un fenotipo hipermutador (Tabla R3).

Por otro lado, a través de la cuantificación de la emergencia de SMR [193], se observó que la mayoría de los aislados hipermutadores presentaron SMR dentro de los halos de inhibición obtenidos en los cinco antibióticos testeados. Por el contrario, raramente se detectaron SMR en los aislados no mutadores analizados con los mismos antibióticos (Tabla R3). Más aún, los aislados hipermutadores presentaron SMR en al menos tres antibióticos diferentes, siendo la proporción de aislados de *P. aeruginosa* que presentaron SMR significativamente mayor entre los hipermutadores con respecto a los aislados no mutadores ( $P = 0,001$ ) (Tabla R3).

**Tabla R3.** Ensayos de difusión en discos de antibióticos y cuantificación de las SMR en los 38 aislados FQ de *P. aeruginosa* de la colección CFL.

Aislado	Genes del MRS <sup>a</sup>	Ceftazidima		Ciprofloxacina		Imipenem		Meropenem		Tobramicina	
		DD	SMR	DD	SMR	DD	SMR	DD	SMR	DD	SMR
1a	-	S	+++	S	++	S	+++	S	+++	S	++
1b	-	S	+++	I	++	S	+++	S	+++	R	*
1c	+	S	++	S	-	S	-	S	++	S	-
2a	-	R	*	R	*	S	+++	S	+++	S	+++
2b	+	S	+	S	-	S	-	S	+	S	-
3a	-	I	++	I	-	S	+++	S	+++	I	+++
3b	-	R	*	I	++	I	+++	S	+++	I	+++
3c	-	S	+++	S	+++	S	+++	S	+++	S	++
4a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
4b	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
5a	-	S	-	R	*	S	++	S	+++	S	+
6a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
7a	+	S	-	I	-	S	-	S	-	S	-
8a	+	S	-	R	*	S	+++	S	+++	S	-
9a	-	S	++	S	+++	S	+++	S	+++	S	+++
10a	-	S	++	S	++	S	+++	S	-	S	+++
11a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	R	*
12a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
13a	+	S	-	R	*	S	-	S	-	R	*
14a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
15a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
16a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
17a	+	S	-	I	-	R	*	I	-	S	-
17b	-	S	-	S	-	I	+++	S	++	S	+
18a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
18b	+	S	-	R	*	S	-	S	-	S	-
18c	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
18d	-	S	+++	R	*	R	*	S	+++	R	++
19a	-	R	*	R	*	R	*	R	*	R	*
20a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
20b	-	S	+++	R	*	R	*	S	+++	S	+++
21a	-	S	+++	R	*	S	++	S	+++	S	+++
21b	-	S	+++	R	*	S	+++	S	+++	S	+++
22a	-	S	-	S	-	S	++	S	+++	S	+++
23a	+	S	-	S	-	S	-	S	++	S	-
24a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
25a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-
26a	+	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-

<sup>a</sup>(+) Indica que las secuencias génicas de *mutS* o *mutL* estaban inalteradas y corresponden a los aislados no mutadores; (-) indica que las secuencias génicas de *mutS* o *mutL* presentaban mutaciones de pérdida de función (sin sentido, con cambio de sentido e indels) y corresponden a los aislados hipermutadores.

DD, diámetro del halo de difusión/inhibición; SMR, subpoblación de mutantes resistentes; +, <10 mutantes; ++, 10-100 mutantes; +++, >100 mutantes; \*, ausencia del halo de inhibición lo cual impidió la cuantificación de la SMR.

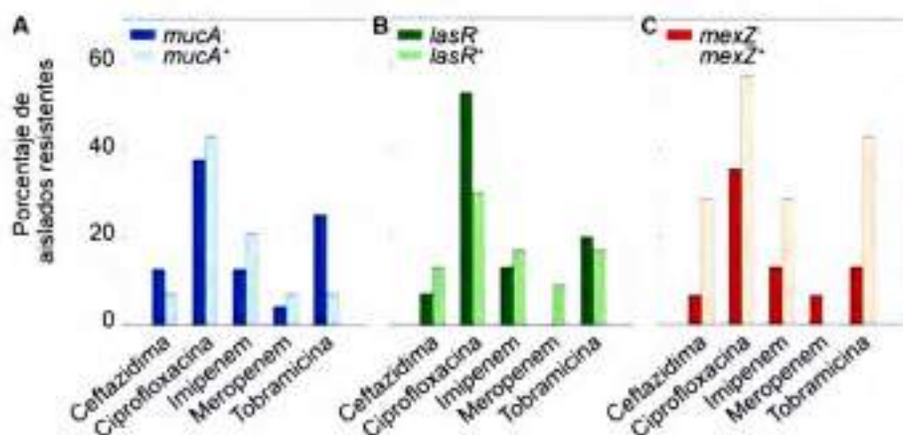
De esta manera, la asociación entre la hipermutabilidad y la resistencia a antibióticos se observó claramente con respecto a la presencia de SMR. Sin embargo, la asociación en relación a los niveles de susceptibilidad fue menos clara, manifestándose sólo con respecto a algunos antibióticos. En este sentido cabe remarcar que no fue posible establecer una asociación entre hipermutabilidad y resistencia a tobramicina, lo cual es coherente con la falta de asociación previamente establecida entre hipermutabilidad y la mutagénesis en el gen *mexZ* (Figura R2), directamente relacionado a la resistencia de aminoglicósidos.

## 1.6. MUTACIONES EN LOS GENES *mucA*, *lasR* Y *mexZ* Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Tal como se mencionó anteriormente, MexZ es el regulador negativo de los genes que codifican para la bomba de eflujo MexXY-OprM en *P. aeruginosa*, cuya inactivación conlleva a la sobreexpresión de los mismos y al consecuente aumento de resistencia hacia aminoglicósidos y otras drogas [165]. Por su parte, estudios previos han reportado un incremento en la resistencia a antibióticos en cepas de *P. aeruginosa* con fenotipo mucoso aisladas del esputo de pacientes FQ [194]. Además, se ha postulado que la inactivación del gen *lasR* estaría asociada con un aumento en la tolerancia a  $\beta$ -lactámicos, la cual a pesar de no ser suficiente para alterar la concentración inhibitoria mínima (CIM), resulta en una generación espontánea mayor de colonias resistentes [21]. También, se ha observado que mutaciones de pérdida de función en *lasR* confieren resistencia a ciprofloxacina y tobramicina en condiciones limitantes de oxígeno y utilización incrementada de nitrato [195].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, a continuación se analizó si la inactivación de *mucA*, *lasR* o *mexZ* podría estar asociada con una alteración en la resistencia hacia los antibióticos analizados en la colección CFL. Como se observa en la Figura R3, la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (ceftazidima, imipenem y meropenem), fluoroquinonas (ciprofloxacina), y aminoglicósidos (tobramicina), no estuvo asociada con la inactivación de ninguno de los genes *mucA*, *lasR* o *mexZ*. Además, cuando se analizó la SMR en los halos de inhibición de los cinco agentes antimicrobianos testeados, se observó que la misma no estuvo relacionada con la inactivación de ninguno de los tres genes, ni

quiera cuando se analizó la resistencia a  $\beta$ -lactámicos en las mutantes *lasR*, o la resistencia a tobramicina en las mutantes *mexZ*. Estos resultados sugieren que la adquisición de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* está basada en factores múltiples y ciertamente complejos que incluyen varias vías convergentes y/o redundantes mediante las cuales es posible lograr resistencia a algún antibiótico en particular.



**Figure R3.** Asociación entre resistencia a antibióticos y presencia de mutaciones en los genes *mucA*, *lasR* y *mexZ*. (A) Diferencias en la resistencia a antibióticos en los aislados de *P. aeruginosa* conteniendo mutaciones en *mucA* (*mucA*<sup>-</sup>) respecto de aquellos sin mutaciones en este gen (*mucA*<sup>+</sup>). Los datos están expresados como el porcentaje de aislados resistentes a ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem, meropenem, y tobramicina en los aislados *mucA*<sup>-</sup> y *mucA*<sup>+</sup>. (B) Los mismos análisis se realizaron en los aislados *lasR*<sup>-</sup> y *lasR*<sup>+</sup> y (C) *mexZ*<sup>-</sup> y *mexZ*<sup>+</sup>. En los tres genes las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ , test exacto de Fisher) para ninguno de los antibióticos ensayados.

## CAPÍTULO 2

### EVOLUCIÓN GENÓMICA Y ADAPTACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* DEFICIENTES EN EL MRS EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS

Las infecciones crónicas con *P. aeruginosa* en pacientes con FQ constituyen el primer modelo natural en revelar una elevada prevalencia de cepas hipermutadoras [21]. Se ha establecido incluso que las cepas hipermutadoras son altamente prevalentes en otras especies bacterianas que infectan pacientes con FQ [17-18, 177], a la vez que se ha reportado una selección importante de aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* en infecciones crónicas diferentes a la FQ, tales como la EPOC y bronquiectasia [173, 176]. De esta manera, es de esperar que factores relacionados con la cronicidad de la infección serían los implicados en la selección de cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa*.

Sin embargo, la comparación entre aislados FQ hipermutadores y no mutadores no evidenció una asociación clara entre la hipermutabilidad y la adquisición de mutaciones en genes marcadores de cronicidad (*mucA* y *lasR*), o genes relacionados con la resistencia a antibióticos (*mexZ*) (Figura R2). De esta manera, a continuación se planteó la posibilidad que, más que con mutaciones específicas, la hipermutabilidad tendría un efecto genético global que pudiera asociarse con la adaptación y persistencia, y permitir así su selección y alta prevalencia. Para ello, se plantearon estudios globales de genómica estructural que pudieran responder en primera instancia sobre cuál sería el impacto de la hipermutabilidad por deficiencia en el MRS en la evolución genómica de aislados FQ de *P. aeruginosa*. En este sentido, a pesar que varios estudios han analizado la hipermutabilidad en aislados FQ, los mismos se han centrado generalmente en el análisis de aislados obtenidos de distintos pacientes o bien estudios longitudinales a partir de aislados de un mismo paciente, incluyendo en todos los casos sólo pocos aislados obtenidos en un mismo momento de la infección.

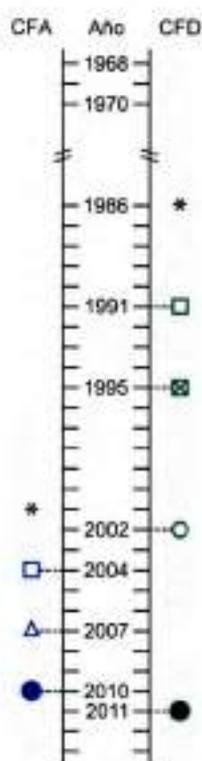
Teniendo en cuenta que en las infecciones crónicas generalmente el mismo linaje de *P. aeruginosa* coloniza y persiste a lo largo del tiempo, un único paciente puede ser considerado como un reservorio natural a partir del cual pueden llevarse a cabo análisis evolutivos a largo plazo. Asimismo, si a esto se suma el hecho de la alta prevalencia de

hipermutadoras, las infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ ofrecen oportunidades únicas para estudios evolutivos particularmente en hipermutadoras. Así, en el presente capítulo se estudió el impacto de la hipermutabilidad en la diversificación fenotípica (a través análisis global del metabolismo) y en la estructura del genoma del *P. aeruginosa* (a través del secuenciamiento masivo de los genomas de 27 aislados FQ). Para ello, el diseño experimental se basó en la construcción de grandes colecciones de aislados de *P. aeruginosa* a partir de pacientes con FQ, que permitieron abordar un análisis longitudinal y transversal de la evolución de *P. aeruginosa* hipermutadoras en las infecciones pulmonares crónicas.

## **2.1. CONFECCIÓN DE COLECCIONES LONGITUDINALES Y TRANSVERSALES DE AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* OBTENIDOS DE PACIENTES FQ: COLECCIONES CFA Y CFD**

Con el objeto de describir cuantitativamente el proceso de evolución que experimentan aislados deficientes en el MRS durante la infección crónica en pacientes FQ, se llevaron a cabo análisis longitudinales, es decir a lo largo del tiempo, y transversales, los cuales incluyeron una población obtenida en un mismo momento de la infección a partir de una misma muestra de esputo. Para ello se construyeron colecciones de aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de distintos pacientes con FQ: un paciente argentino (CFA) y un paciente danés (CFD) (Figura R4) (ver Materiales y Métodos). Estos pacientes fueron seleccionados en base a que estuvieran infectados crónicamente por un único linaje de *P. aeruginosa* no transmisible, y que hubieran presentado cepas hipermutadoras durante el transcurso de la infección. La colección CFA incluyó dos aislados secuenciales de *P. aeruginosa* obtenidos en los años 2004 (CFA\_2004/01) y 2007 (CFA\_2007/01), los cuales fueron caracterizados como hipermutadores deficientes en el MRS en base al análisis de la frecuencia de mutación y de la secuencia de los genes *mutS* y *mutL* y una población adicional de 90 aislados de *P. aeruginosa* obtenidos al azar a partir de una misma muestra de esputo en el año 2010 (CFA\_2010). Por su lado, la colección CFD incluyó tres aislados secuenciales de *P. aeruginosa*, previamente caracterizados [196]: uno no mutador obtenido en 1991 (CFD\_1991/01), y dos aislados mutadores deficientes en el MRS obtenidos en los años 1995 (CFD\_1995/01) y 2002 (CFD\_2002/01). Asimismo, se adicionó a la colección

CFD una población de 90 aislados de *P. aeruginosa* obtenidos al azar a partir de una misma muestra de esputo en el año 2011 (CFD\_2011). De esta manera, los aislados obtenidos para CFA y CFD cubrieron periodos de 6 y 20 años a partir del primer aislamiento, abarcando ~36.500 y 91.400 generaciones respectivamente, de acuerdo a estimaciones calculadas en base a aproximaciones experimentales reportadas previamente [197].



**Figura R4.** Colecciones de aislados de *P. aeruginosa* CFA y CFD. En la figura se indican en una escala de tiempo los puntos de muestreo (símbolos) y los tiempos de vida de los pacientes (barras grises). Los aislados de *P. aeruginosa* se recolectaron a partir de dos pacientes FQ los cuales están representados en azul (CFA) y verde (CFD). Los aislados únicos se indican con símbolos vacíos mientras que las poblaciones transversales de 90 aislados se indican con círculos llenos. El tiempo estimado del comienzo de la infección crónica en cada paciente está representado por asteriscos.

Una vez confeccionadas, se confirmó que las colecciones estuvieran conformadas por un único linaje de *P. aeruginosa*. Para ello se llevaron a cabo distintos métodos moleculares, incluyendo amplificación al azar de polimorfismos en el ADN (RAPD) y tipificación por polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (Figura R5) (ver Materiales y Métodos). El uso combinado de estas metodologías permitió confirmar que cada paciente fue infectado crónicamente por un único linaje de *P. aeruginosa*, el cual persistió a lo largo del periodo analizado. De esta manera, se logró un diseño experimental que permitió analizar las historias evolutivas de dos cepas diferentes de *P. aeruginosa* que prosperaron en ambientes FQ paralelos. A su vez, el esquema longitudinal permitió un análisis global de los cambios genéticos adquiridos a lo largo del tiempo que subyacen la adaptación, mientras el transversal permitió el análisis de la estructura genética a nivel poblacional en un momento dado de la infección crónica.

## 2.2. PREVALENCIA DEL FENOTIPO HIPERMUTADOR POR DEFICIENCIAS EN EL MRS EN LAS COLECCIONES CFA Y CFD DE *P. AERUGINOSA*

Con la finalidad de analizar la prevalencia del fenotipo hipermutador en las poblaciones de 90 aislados de *P. aeruginosa* en las colecciones de CFA\_2010 y CFD\_2011, se determinó la frecuencia de mutación a través del cálculo de frecuencia de resistentes a rifampicina para cada uno de ellos (ver Materiales y Métodos). Sorprendentemente, el 100% de los aislados CFA\_2010 presentaron un fenotipo hipermutador, con frecuencias de mutación que estuvieron en el rango de  $1,7 \times 10^{-5}$  -  $7,6 \times 10^{-6}$ . De manera similar, en la población CFD\_2011, el 94% de los aislados exhibieron un fenotipo hipermutador (con un intervalo de frecuencias de  $1,4 \times 10^{-5}$  -  $8,3 \times 10^{-6}$ ), mientras que los aislados restantes presentaron una frecuencia de mutación cercana a la observada en la cepa de referencia PAO1 no mutadora, en un rango de  $3 \times 10^{-8}$  -  $1 \times 10^{-7}$ . Con el propósito de descartar la posibilidad de que tan elevada proporción de cepas hipermutadoras fuera debida a que la toma de muestras se hubiesen realizado a partir de nichos focales puntuales que pudieran contener cepas estrechamente relacionadas, se analizaron tanto para CFA como para CFD, nuevas colecciones de 90 aislados de *P. aeruginosa* obtenidos al azar, a partir de nuevas muestras de esputo tomadas con una diferencia de al menos 6 meses con respecto a las anteriores (CFA\_2011 y CFA\_2012). Sin embargo, la determinación de la frecuencia de



### 2.3. ANÁLISIS GENÓMICO ESTRUCTURAL DE LOS AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* DE LOS LINAJES CFA Y CFD

Con el propósito de estudiar la evolución genómica de los dos linajes de *P. aeruginosa* de CFA y CFD en el transcurso de la infección pulmonar crónica, se llevó a cabo el secuenciamiento masivo de los genomas completos de 13 aislados de CFA y 14 aislados de CFD (ver Materiales y Métodos).

En este sentido, de la colección de CFA se seleccionaron el aislado hipermutador inicial CFA\_2004/01, el aislado hipermutador intermedio CFA\_2007/01, como así también 11 aislados hipermutadores de la población del 2010, elegidos al azar: CFA\_2010/01, CFA\_2010/11, CFA\_2010/26, CFA\_2010/31, CFA\_2010/32, CFA\_2010/40, CFA\_2010/43, CFA\_2010/72, CFA\_2010/78, CFA\_2010/82, CFA\_2010/87.

Con respecto a la colección de CFD, se seleccionaron el aislado no mutador inicial CFD\_1991/01, los aislados intermedios hipermutadores CFD\_1995/01 y CFD\_2002/01, mientras que de la población del 2011 se seleccionaron los únicos 5 aislados no mutadores CFD\_2011/04, CFD\_2011/11, CFD\_2011/45, CFD\_2011/57, CFD\_2011/95, y 6 aislados hipermutadores seleccionados al azar, CFD\_2011/27, CFD\_2011/28, CFD\_2011/33, CFD\_2011/34, CFD\_2011/83, CFD\_2011/94.

Las secuencias genómicas se obtuvieron utilizando la tecnología Illumina (ver Materiales y Métodos). Si bien existen genomas secuenciados de *P. aeruginosa* disponibles en las bases de datos, y si bien las cepas de *P. aeruginosa* tienen aproximadamente un 80% de su genoma altamente conservado, existe un ~20% que constituye el genoma accesorio variable que incluye componentes particulares de cada cepa. Teniendo esto en consideración, fue necesario el ensamblado *de novo* de los genomas de los aislados ancestrales de cada paciente (CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01), para luego utilizarlos como genomas de referencia en el análisis evolutivo. En el caso de CFA\_2004/01, se obtuvo un genoma ensamblado en 844 contigs, los cuales alcanzaron un tamaño de 6.294.248 pb. Por su lado, para CFD\_1991/01, se logró ensamblar el genoma en 601 contigs logrando un tamaño de 6.313.855 pb (Tabla R4). Asimismo, se obtuvieron coberturas de 172,3 y 207,2 para CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01 respectivamente, lo cual significa que cada posición cubierta del genoma estuvo representada 172,3 veces en CFA\_2004/01 y 207,2 veces en CFD\_1991/01 (Tabla R4).

**Tabla R4.** Ensamblado *de novo* de los genomas de los aislados de *P. aeruginosa* CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01.

Genoma	Lecturas generadas	Lecturas ensambladas (%)	Tamaño del genoma	Cobertura <sup>a</sup>	N° de contigs	Contenido GC (%)	Mapeo con PAO1 <sup>b</sup>
CFA_2004/01	12.936.678	95,4	6.294.248	172,3	844	66,3	93,9
CFD_1991/01	14.633.218	99,3	6.313.855	207,2	601	66,6	94,3

<sup>a</sup>La cobertura fue calculada para aquellas posiciones representadas en el genoma de referencia (PAO1) por los distintos contigs obtenidos.

<sup>b</sup>Porcentaje de lecturas que se alinearon con el genoma de referencia PAO1.

### 2.3.1. ANÁLISIS DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA HIPERMUTABILIDAD EN LOS AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* DEL LINAJE CFA

A partir de los secuenciamientos obtenidos, el primer análisis realizado tuvo el objeto de investigar las bases genéticas responsables del fenotipo hipermutador en ambas colecciones CFA y CFD, a través del análisis de las secuencias de los genes *mutS* y *mutL*, y de ensayos de complementación génica. Estos estudios se hicieron a su vez extensivos a una proporción mayor de aislados obtenidos en las colecciones CFA\_2010 y CFD\_2011.

Los aislados CFA\_2004/01 y CFA\_2007/01 fueron caracterizados como deficientes en el MRS, por la ocurrencia de mutaciones de cambio de sentido en ambos genes *mutS* y *mutL* que fueron las mismas encontradas en 7 de los 11 aislados CFA\_2010 (Tabla R5). Se llamó a esta combinación alélica SL1 (compuesta por las mutaciones T247P en MutS y H469R en MutL). En los 4 aislados restantes se observaron dos mutaciones adicionales en *mutS* y una en *mutL*, dando lugar a la generación de dos nuevas combinaciones alélicas, SL2 y SL3 respectivamente. SL2 estuvo compuesta por las mutaciones T247P y L794P en MutS, y L389S y H469R en MutL; mientras que SL3 estuvo compuesta por las mutaciones W160R y T247P en MutS, y H469R en MutL (Tabla R5).

A través de ensayos de complementación con plásmidos que contenían los genes *mutS* y *mutL* silvestres (ver Materiales y Métodos), se confirmó que la mutación H469R en MutL fue la responsable del fenotipo hipermutador en todos los aislados, independientemente que presentaran las combinaciones alélicas SL1, SL2 o SL3. La mutación H469R se encuentra ubicada en un motivo altamente conservado DMHIAHERITYE, que ha sido relacionado con la actividad endonucleasa de la proteína

MutL [40]. En este sentido, se ha demostrado que el residuo H469, junto con D467 y E473, tendrían un rol esencial para la función *in vivo* de MutL y para la reparación de bases mal apareadas, no sólo en *P. aeruginosa* [40] sino también en levaduras y humanos [43, 45, 198]. Cabe destacar que, conformando la combinación alélica SL1, la mutación H469R en MutL estuvo siempre asociada con la mutación T247P en MutS, (Tabla R5), aunque esta última, localizada en un dominio conector de la proteína [188], no estaría implicada en la pérdida de función del MRS y ser causa de la hipermutabilidad, de acuerdo a los ensayos de complementación génica. Lo mismo se observó respecto a la mutación L389S en MutL, la cual se encuentra en una región desestructurada flexible que cumple la función de unir los dominios C- y N- terminal entre sí, pero cuya delección se demostró previamente no afectaría la función *in vivo* de MutL [199]. Por su lado, las mutaciones W160R y L794P en MutS, formando parte de las combinaciones alélicas SL2 y SL3 respectivamente (Tabla R5), están ubicadas en el dominio conector y en el dominio hélice-giro-hélice de MutS respectivamente [186], lo cual, sumado al hecho de que pudieron ser complementadas con la sola expresión de *mutL*, indica que ninguna de ellas produciría la inactivación del MRS. De esta manera, la acumulación y fijación de las mutaciones en el gen *mutS* y *mutL*, diferentes a H469R, resulta muy interesante, ya que las mismas, de no ser meramente silenciosas, podrían estar relacionadas con funciones no relacionadas a la reparación del ADN dependiente del MRS. De todas maneras, y a pesar de las distintas combinaciones alélicas observadas, es importante volver a resaltar que a nivel fenotípico la población de aislados CFA\_2010 estuvo dominada en su totalidad por un fenotipo hipermutador.

Posteriormente y con el objetivo de analizar en mayor profundidad la prevalencia de cada combinación alélica de los genes del MRS en la población de CFA, se secuenciaron los genes *mutS* y *mutL* en 19 aislados CFA\_2010 adicionales con el fin de cubrir el 30% de la colección transversal (30 aislados de un total de 90). A partir de este análisis, se observó que 14 de estos nuevos aislados presentaron la combinación ancestral SL1, 5 la SL3, y ninguno presentó la combinación SL2. De esta manera, la prevalencia en la población total analizada de CFA fue del 70%, 27% y 3% para SL1, SL2 y SL3 respectivamente (Tabla R5). Estas observaciones indicaron que a pesar de la coexistencia de distintas variantes alélicas, una de ellas (SL1) dominó la población y persistió a lo largo del tiempo en el paciente CFA.

Tabla R5. Mutaciones en los genes *mutS* y *mutL* en los aislados de *P. aeruginosa* de las colecciones CFA y CFD.

Aislado	Mutaciones en los genes del MRS <sup>a</sup>		Alelo del MRS	Prevalencia de cada alelo del MRS <sup>b</sup> (%)			
	<i>mutS</i>	<i>mutL</i>					
2004/01	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1	70		
2007/01	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1			
2010/40	A739C (T247P)	T2381C (L794P)	T1166C (L389S)	A1406G (H469R)		SL2	3
2010/31	T478A (W160R)	A739C (T247P)	T1166C (L389S)	A1406G (H469R)		SL3	27
2010/01	T478A (W160R)	A739C (T247P)	T1166C (L389S)	A1406G (H469R)		SL3	
2010/78	T478A (W160R)	A739C (T247P)	T1166C (L389S)	A1406G (H469R)		SL3	
2010/82	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1		70	
2010/43	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1			
2010/72	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1			
2010/87	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1			
2010/32	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1			
2010/26	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1			
2010/11	A739C (T247P)		A1406G (H469R)	SL1			
1991/01					94		
2011/33		-CG a 1551		SL1			
2002/01		-CG a 1551		SL1			
1995/01		-CG a 1551		SL1			
2011/95	+CC a 334	-CG a 1551		SL2		6	
2011/04	+CC a 334	-CG a 1551		SL2			
2011/45	+CC a 334	-CG a 1551		SL2			
2011/11	+CC a 334	-CG a 1551		SL2			
2011/57	+CC a 334	-CG a 1551		SL2			
2011/83		-CG a 1551		SL1			
2011/27		-CG a 1551		SL1			
2011/34		-CG a 1551		SL1			
2011/28		-CG a 1551		SL1			
2011/94		-CG a 1551		SL1			

<sup>a</sup>Se consideraron las mutaciones de SNPs no sinónimas e indels. Entre paréntesis se indican los cambios a nivel de aminoácidos. Las celdas resaltadas en distintos colores distinguen las diferentes combinaciones alélicas de *mutS* y *mutL* para cada aislado de las colecciones CFA y CFD. -, delección; +, inserción.

<sup>b</sup>La prevalencia de cada alelo del MRS se calculó considerando las secuencias de *mutS* y *mutL* obtenida a partir de un total de 30 aislados pertenecientes a las poblaciones de *P. aeruginosa* CFA\_2010 y CFD\_2011.

### 2.3.2 ANÁLISIS DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA HIPERMUTABILIDAD EN LOS AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* DEL LINAJE CFD

De la misma manera que para CFA, con el objetivo de analizar las bases genéticas responsables del fenotipo hipermutador en la colección de *P. aeruginosa* de CFD, se analizaron las secuencias de los genes *mutS* y *mutL*, y se realizaron ensayos de complementación génica. Mientras, según lo esperado, el clon no mutador CFD\_1991/01 presentó las secuencias *mutS* y *mutL* inalteradas, los aislados CFD\_1995/01 y CFD\_2002/01, fueron caracterizados como deficientes en el MRS, debido a que presentaron una delección CG en *mutS* que produce un cambio en el marco de lectura (Tabla R5). Notablemente y tal como se muestra en la Tabla R5, todos los aislados CFD\_2011, incluyendo los no mutadores, presentaron la misma mutación de delección en el gen *mutS* (-CG<sub>1551</sub>) que produce un codón de terminación a 1854 pb del gen. Este codón de terminación prematuro resulta en la pérdida de los últimos 237 aminoácidos del dominio C-terminal de MutS, el cual ha sido relacionado con la oligomerización de la proteína y la interacción MutS-MutL [200]. En este sentido, se ha demostrado que la tetramerización de MutS en *P. aeruginosa* sería importante para la hidrólisis de ATP y la unión al ADN, ambos procesos esenciales para la función *in vivo* de MutS [201]. De hecho, el efecto de la pérdida de función causada por la mutación -CG<sub>1551</sub> fue confirmada por ensayos de complementación génica, ya que la actividad del MRS en los aislados CFD hipermutadores se vió restablecida luego de la transformación de cada una de las cepas con un plásmido que portaba el gen *mutS* silvestre no alterado.

Cabe destacar que, en los aislados no mutadores además de la mutación -CG<sub>1551</sub> se observó una inserción de dos CC en la posición nucleotídica 334, a partir del codón de iniciación ATG (+CC<sub>334</sub>) en una región homopolimérica de 5C, conformándose así un nuevo alelo *mutS*<sup>CC334-CG1551</sup> (Tabla R5). El cambio en el marco de lectura producido por la inserción +CC<sub>334</sub> no restauró aquel originado aguas abajo por la mutación -CG<sub>1551</sub>, sino que generó un codón de terminación prematuro a 347 pb del gen. Este codón de terminación prematuro da lugar a un péptido N-terminal de 116 aminoácidos, región que precisamente constituye el dominio I, involucrado en la unión de la proteína MutS al ADN [186]. Sin embargo, el cambio en el marco de lectura generado por +CC<sub>334</sub> produce asimismo la restauración de un codón ATG de inicio de la traducción a 1882 pb, lo cual origina un

péptido de 247 aminoácidos, incluyendo los dominios ATPasa V y C-terminal. De esta manera, el alelo *mutS*<sup>-CC334-CG1551</sup> codificaría para dos péptidos, incluyendo las regiones N-terminal (aminoácidos 1-116) y C-terminal (aminoácidos 608-885) de MutS. Es importante en este punto volver a destacar que si bien la adquisición de la nueva mutación +CC334 mantiene alterada la secuencia de *mutS*, y probablemente la alteración de su función, no obstante los aislados que presentaron el alelo *mutS*<sup>-CC334-CG1551</sup> exhibieron una reducción significativa en sus frecuencias de mutación. Por lo tanto y en base a la ausencia de correlación entre fenotipo y genotipo en los aislados CFD\_2011 no mutadores, se planteó la siguiente posibilidad: +CC334 está asociada con un mecanismo de reversión de la hipermutabilidad inicialmente producida por -CG1551; de modo que el fenotipo no mutador resultaría de la combinación de ambas mutaciones. Para indagar sobre esta posibilidad, los alelos *mutS*<sup>-CC334-CG1551</sup> y *mutS*<sup>-CG1551</sup> fueron clonados en plásmidos con el objeto de transformar la cepa PAO1MS hipermutadora mutante en *mutS* (Tabla M1). Como control del experimento se realizaron ensayos de complementación génica con el mismo plásmido portando el alelo *mutS* silvestre. Sin embargo, mientras este último fue capaz de reducir la frecuencia de mutación a valores normales (resultados no mostrados), las transformaciones con los alelos *mutS*<sup>-CC334-CG1551</sup> y *mutS*<sup>-CG1551</sup>, no produjeron ningún cambio en la frecuencia de mutación en la cepa PAOMS hipermutadora (resultados no mostrados), descartando la posibilidad de que la combinación de ambas mutaciones fuera la responsable de la reducción en la frecuencia de mutación observada en los aislados CFD no mutadores. Asimismo, como otro mecanismo posible para reducir la tasa de mutación en una cepa hipermutadora deficiente en el MRS, se descartó que el alelo hipermutador haya sido complementado por una copia del gen *mutS* silvestre adquirida espontáneamente por eventos de recombinación [202-203], ya que no se observaron duplicaciones del gen *mutS* en ninguno de los genomas de los aislados CFD\_2011 no mutadores. Todas estas observaciones sugieren que la reducción en la frecuencia de mutación observada en estos aislados se habría producido por mutaciones secundarias capaces de compensar el fenotipo hipermutador (ver Resultados, sección 2.3.4).

Posteriormente y tal como se realizó en la población de CFA, se secuenció el gen *mutS* en 19 aislados hipermutadores CFD\_2011 adicionales, y se determinó que el 100% de ellos presentó solamente la mutación -CG1551 en *mutS*, indicando que la proporción de

aislados en la colección CFD\_2011 que sufrió una reducción en la frecuencia de mutación fue mantenida en una proporción muy baja en la población (6%).

### 2.3.3 EVOLUCIÓN GENÓMICA DE LOS LINAJES CFA Y CFD DE *P. AERUGINOSA*

A continuación y con el propósito de identificar y caracterizar las mutaciones de SNPs y de inserción/delección (indels) acumulados durante el transcurso de la infección crónica en cada linaje bacteriano, se utilizaron los genomas de los clones ancestrales CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01 ensamblados *de novo* como referencias para el mapeo (o alineamiento) de las secuencias genómicas de los aislados restantes y correspondientes de CFA y CFD (ver Materiales y Métodos). De esta manera, se generaron más de 224 millones de lecturas pareadas, las cuales estuvieron representadas en promedio entre 33 - 207 veces en los genomas de referencia correspondientes (todas las coberturas genómicas promedio fueron  $\geq 82X$  con las excepciones de CFD\_2011/94 y CFD\_2011/27 con 33X y 52X, respectivamente) (Tabla R6). A partir de estos alineamientos se identificaron un total de 2.578 SNPs y 544 micro indels (de 1-10 pb) acumuladas en el linaje CFA (Tabla R7). Por su lado y cubriendo un período de evolución mayor, se observaron 5.710 SNPs y 1.078 micro indels acumulados en los clones CFD (Tabla R7). La elevada acumulación de mutaciones observada en los genomas CFA y CFD es claramente atribuible a su tasa de mutación incrementada, la cual se habría manifestado durante períodos evolutivos a largo plazo, comprendiendo 6 y 20 años respectivamente. En este sentido y con el propósito de estimar las tasas de mutación sufridas por los linajes CFA y CFD a lo largo del tiempo se aplicó la estadística Bayesiana [204], obteniéndose valores similares de 77 SNPs/año ( $3,07 \times 10^{-9}$  SNPs/pb por generación) para CFA y 78 SNPs/año ( $3,07 \times 10^{-9}$  SNPs/pb por generación) para CFD, las cuales fueron 30 veces mayores a las descritas previamente para aislados no mutadores (2,6 SNPs/año) que evolucionaron igualmente en infecciones pulmonares crónicas FQ [205].

**Tabla R6.** Secuenciamiento por Illumina de los genomas de los aislados CFA y CFD, y características de los alineamientos realizados en relación a los genomas ancestrales CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01.

	Aislado	Nº de lecturas pareadas	Lecturas alineadas <sup>a</sup> (%)	Cobertura <sup>b</sup>
CFA	2004/01	12.936.678	99,3	172,3
	2007/01	11.127.570	97,4	155,6
	2010/40	8.212.026	91,8	106,9
	2010/31	7.877.306	95,5	107,4
	2010/01	8.135.826	88,6	101,4
	2010/78	7.151.856	94,1	95,8
	2010/82	8.049.138	94,6	108,1
	2010/43	6.957.194	85,6	82,8
	2010/72	8.040.018	92,5	105,4
	2010/87	8.139.510	93,8	108,7
	2010/32	8.199.772	97,2	114,0
	2010/26	8.428.428	97,0	116,9
	2010/11	7.808.846	95,6	106,7
	1991/01	14.633.218	99,3	207,2
CFD	2011/33	7.390.194	96,3	101,8
	2002/01	8.314.242	97,6	117,1
	1995/01	8.390.310	91,9	108,7
	2011/95	10.324.514	95,4	139,7
	2011/04	7.813.744	98,0	109,8
	2011/45	6.234.390	96,3	85,3
	2011/11	8.934.472	96,8	123,5
	2011/57	9.097.206	93,5	120,7
	2011/83	8.473.348	95,5	101,8
	2011/27	3.805.430	95,0	51,6
	2011/34	6.928.696	94,5	93,3
	2011/28	8.639.182	95,7	118,1
	2011/94	4.500.106	96,1	32,7

<sup>a</sup>Las lecturas genómicas se mapearon con los genomas de referencia CFA\_2004/01 o CFD\_1991/01 según correspondiera.

<sup>b</sup>La cobertura fue calculada para aquellas posiciones representadas en el genoma de referencia por los distintos contigs obtenidos.

Los genomas de referencia CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01 presentaron 6.294.248 y 6.313.855 pb respectivamente.

A continuación, con el objeto de obtener información respecto de la fuerza selectiva que actuó en cada linaje de *P. aeruginosa* durante el proceso evolutivo, se clasificaron los SNPs de acuerdo a su distribución en las regiones codificantes y no codificantes y en base a su efecto en la traducción. Tal como se observa en la Figura R6, la mayoría de los SNPs de los linajes CFA y CFD se localizaron en regiones codificantes, siendo un 58% y un 60,2% de los mismos mutaciones no sinónimas respectivamente. Posteriormente, se estimó la proporción relativa de mutaciones no sinónimas y sinónimas (cociente dN/dS, ver

Materiales y Métodos), como medida de las fuerzas de selección que actuaron particularmente en las regiones codificantes. En este sentido, la teoría neutral de evolución molecular predice que el cociente entre la tasa de sustituciones no sinónimas (dN) y la tasa de sustituciones sinónimas (dS) se aproxima a la unidad durante un proceso de evolución neutra. De esta manera, cocientes mayores o menores a 1 podrían interpretarse como indicios de selección positiva o negativa (purificadora), respectivamente. Los cocientes de selección obtenidos en los linajes de CFA y CFD fueron 0,68 y 0,79 respectivamente. Ambos cocientes fueron significativamente menores a 1 ( $P = 5,2 \times 10^{-56}$  y  $P = 1,5 \times 10^{-47}$  respectivamente), lo cual sugiere que el elevado número de SNPs acumulados en ambos linajes hipermutadores de *P. aeruginosa* resultó o bien en pérdida del *fitness* de la bacteria, o bien en la fijación de la mayoría de los SNPs como mutaciones neutras, signando la evolución por un tipo de selección purificadora y/o por deriva génica.

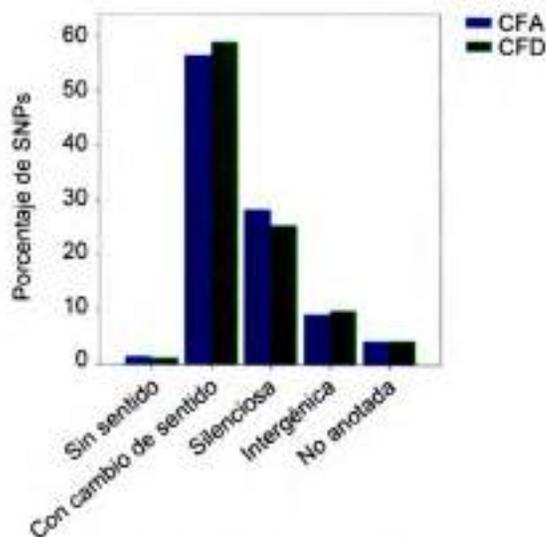
**Tabla R7.** Número de mutaciones de SNPs e indels totales por genoma secuenciado.

Genoma	Nº total de SNPs <sup>a</sup>	Nº total de indels <sup>b</sup>	Genoma	Nº total de SNPs <sup>c</sup>	Nº total de indels <sup>d</sup>
2007/01	294	72	2011/33	1103	202
2010/40	1080	209	2002/01	889	163
2010/31	678	161	1995/01	629	128
2010/01	680	160	2011/95	1885	309
2010/78	660	160	2011/04	1883	294
2010/82	517	106	2011/45	1886	304
2010/43	520	108	2011/11	1882	294
2010/72	515	104	2011/57	1885	307
2010/87	390	101	2011/83	1433	263
2010/32	452	120	2011/27	1537	229
2010/26	461	131	2011/34	1505	241
2010/11	459	125	2011/28	1718	273
			2011/94	1592	222

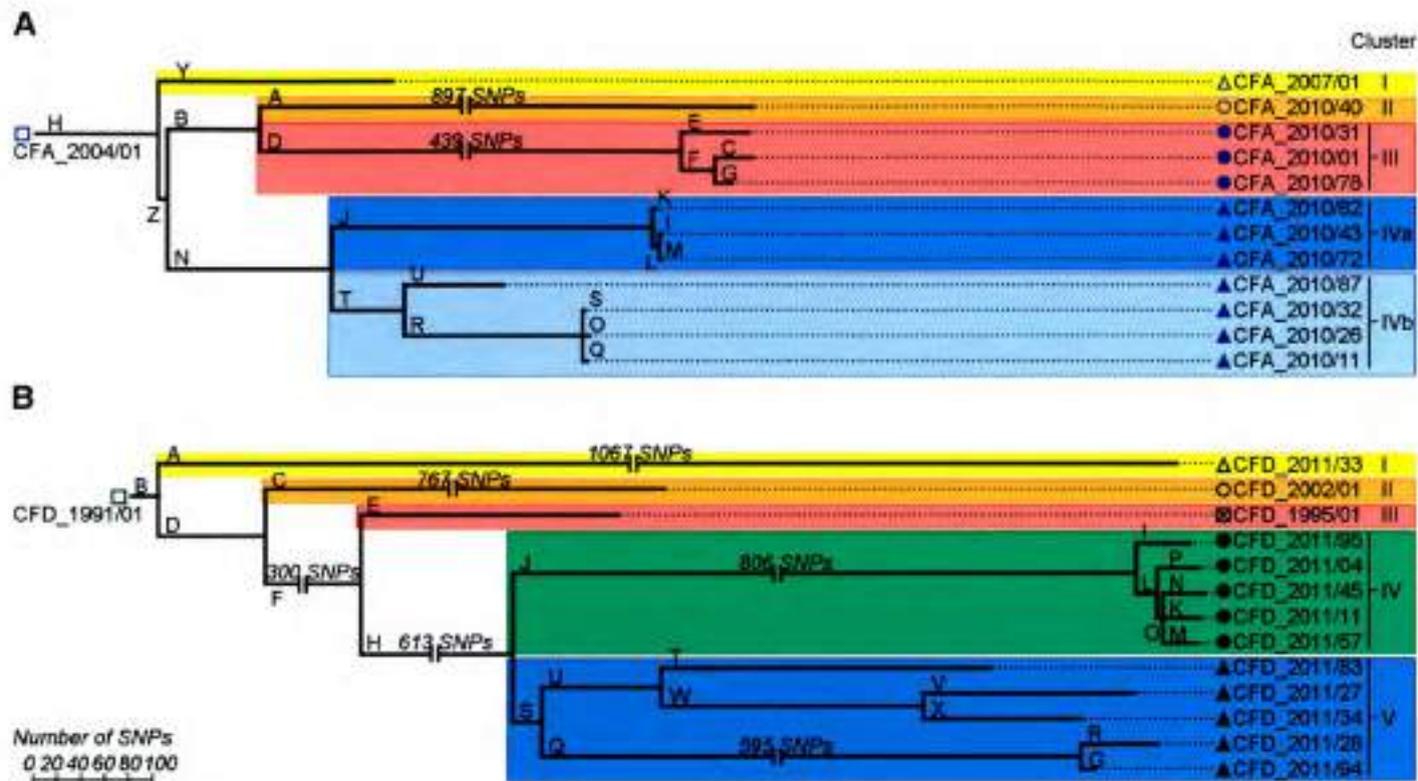
<sup>a,b,c,d</sup> Los SNPs y las indels (de 1-10 pb) se analizaron como la acumulación de mutaciones con respecto a los genomas de referencia CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01 según corresponde. El total de SNPs únicos acumulados en los linajes CFA y CFD fue 2.578 y 5.710, respectivamente; mientras que el total de indels únicos acumulados fue 544 y 1.078, respectivamente.

### 2.3.4. GENERACIÓN DE DIVERSIDAD GENÓMICA EN LAS POBLACIONES DE *P. AERUGINOSA* HIPERMUTADORAS DURANTE SU EVOLUCIÓN EN UN MISMO PACIENTE FQ

Posteriormente, con la finalidad de estudiar las relaciones evolutivas entre los aislados de cada linaje CFA y CFD, se construyeron árboles filogenéticos de máxima parsimonia, empleando SNPs como marcadores filogenéticos. El criterio de parsimonia conduce a la elección del árbol filogenético que explica la filogenia de un grupo con el menor número de cambios evolutivos. Así, a través de este método los cambios evolutivos pueden explicarse por simple acumulación de mutaciones puntuales a partir de un antecesor común. Cuando este supuesto no se cumple, la acumulación de mutaciones se puede explicar como el resultado de eventos de mutación idénticos pero independientes, como asimismo de reversiones directas o transferencia horizontal de ADN, y esas mutaciones se agrupan bajo el término homoplasia. En ambos linajes CFA y CFD (Figura R7), se observó que la mayoría de los SNPs (>95%) respaldaron favorablemente la obtención de un único árbol filogenético, observándose sólo unos pocos sitios homoplásticos, 5 SNPs en CFA (0,17%) y 27 SNPs en CFD (0,47%), los cuales no se utilizaron en la construcción de los árboles filogenéticos. Así, se lograron árboles consistentes que muestran evolutivamente la secuencia de los eventos de mutación ocurridos en cada linaje de *P. aeruginosa* estudiado.



**Figura R6.** Tipos de mutaciones de acuerdo a su efecto en la traducción a proteínas acumuladas en las regiones codificantes de los genomas secuenciados en los linajes de *P. aeruginosa* CFA y CFD. El análisis de mutaciones de SNPs se realizó a partir de las secuencias completas de los genomas CFA y CFD considerando el porcentaje de SNPs sin sentido, con cambio de sentido, silenciosos, intergénicos y no anotados. Los SNPs acumulados en los genomas CFA y CFD están representados en barras azules y verdes respectivamente.



**Figura R7.** Relaciones evolutivas entre los aislados de *P. aeruginosa* de los linajes de CFA y CFD. Los árboles de máxima parsimonia de CFA (A) y CFD (B) fueron construidos en base a la acumulación *de novo* de SNPs respecto a los genomas ancestrales CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01. La longitud de las ramas es proporcional al número de SNPs acumulados (ver escala). El nombre de las ramas se encuentra en letras capitales. En distintos colores se representan clusters diferentes.

Un resultado interesante del análisis transversal, fue la elevada diversidad genética encontrada en ambas poblaciones de aislados. En este sentido, los árboles filogenéticos mostraron que los clones contemporáneos de CFA\_2010 y CFD\_2011 se distribuyeron formando tres clusters claramente diferenciados: Clusters II, III, y IV, en el árbol de CFA (Figura R7A), y Clusters I, IV, y V, en el árbol de CFD (Figura R7B). Adicionalmente, se observó que las longitudes de las ramas distintivas de cada cluster (proporcionales al número de mutaciones acumuladas) se diferenciaron sustancialmente entre ellas, indicando, como otra muestra de la marcada diversificación, cargas mutacionales desiguales sufridas por las subpoblaciones contemporáneas de cada paciente FQ.

Notablemente, en el linaje CFD todos los aislados no mutadores fueron agrupados en el Cluster IV (Figura R7B). Sin embargo, a pesar de su fenotipo no mutador, este cluster presentó ramas en común tanto con los aislados hipermutadores ancestrales, CFD\_1995/01 y CFD\_2002/01, como con los clones hipermutadores contemporáneos (ramas D, F, y H, Figura R7B). A su vez y a pesar de su baja frecuencia de mutación, los aislados agrupados en el Cluster IV acumularon paradójicamente el número más elevado de SNPs durante el transcurso del proceso infeccioso (Tabla R7 y Figura R7B), lo cual se vio reflejado por su ubicación más distante en el árbol filogenético. Estas observaciones constituyen una notable evidencia de que los aislados no mutadores habrían surgido a partir de una población mutadora en algún punto indeterminado de la rama J. Esta posibilidad se ve respaldada por la observación de que los aislados no mutadores comparten la mutación ancestral en *mutS*-CG<sub>1551</sub>, responsable del fenotipo hipermutador en el resto de los aislados hipermutadores tanto ancestrales como contemporáneos (Tabla R5). De esta manera, a continuación y con el propósito de investigar la existencia de mutaciones compensatorias potenciales de la hipermutabilidad se analizaron todos aquellos SNPs no sinónimos únicos del Cluster IV (es decir aquellos presentes en la rama J, Figura R7B), como así también aquellos genes que fueron alterados por indels solamente en los aislados no mutadores. Para este análisis se consideraron particularmente genes involucrados la adaptación, la replicación, recombinación, modificación y del ADN, o respuesta a ROS [206-207], tales como *ada*, *ahpC*, *alkA*, *alkB1-2*, *coaC*, *dinB*, *dnaA-B-E-G-J-K-N-Q-X*, *dps*, *endA*, *fis*, *fur*, *glyQ-S*, *grpE*, *gyrA-B*, *himA-D*, *holB-C*, *hupB*, *iciA*, *katE*, *lexA*, *lig*, *nth*, *mfd*, *miaA*, *micA*, *mutT*, *mutY*, *ndh*, *nuoA-B-D-E-F-G-H-I-J-K-L-M-N*, *ogt*, *oxyR*, *parC-E*, *pnp*, *polA*, *priA*,

*radA-C, recA-B-C-F-G-N-O-Q-R, rep, rnhA-B, rnt, rpoS, rpsP, rivA-B-C, sbcB-D, sodC, ssb, sss, tag, topA, ung, uvrB-C-D, xerD, xseA-B, xthA, ahpF, mutM, polB, hola, recD, phr, dksA*, PA0669, PA0720, PA1405, PA3867, PA4172, PA4282, PA4400, PA2138 y PA5348. Dentro de este grupo, sólo los genes *ahpF*, *mutM*, *polB*, *hola*, *recD*, *phr*, *dksA* y PA2138 estuvieron particularmente mutados en el Cluster IV de CFD (Tabla R8). Sin embargo, al momento no existen evidencias previas de que, ya sea individualmente o en combinación, estas mutaciones complementen la deficiencia en el MRS.

**Tabla R8.** Mutaciones en genes y regiones intergénicas potencialmente involucrados en mutagénesis, reparación del ADN o respuesta a ROS presentes en el Cluster IV de CFD.

ID	Gen Nombre	Clasificación funcional <sup>a</sup>	Mutación <sup>b</sup>
PA0140	<i>ahpF</i>	Adaptación, Protección	T1477C (Y493H)
PA0357	<i>mutM</i>		A680G (Q227R)
PA1886	<i>polB</i>		G1120A (A374T)
PA2138		Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación	T2278C (Y760H)
PA3989	<i>hola</i>		G41C (G14A)
PA4283	<i>recD</i>		C377T (R13C)
PA4660	<i>phr</i>		G89A (R30H)
PA4723	<i>dksA</i>	Reguladores transcripcionales; Adaptación, Protección; Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación	G415A (A139T)
PA3724/ /PA3725	<i>lasB // recJ</i>	Factores secretados (toxinas, enzimas, alginato), Traducción, modificación post-traducciona, degradación // Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación	T→C, 111 pb aguas arriba de <i>lasB</i> // 176 pb aguas abajo de <i>recJ</i>
PA4233/ /PA4234	// <i>uvrA</i>	Proteínas de membrana; Transporte de pequeñas moléculas // Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación	C→G, 61pb aguas arriba de PA4233 // 153 pb aguas abajo de <i>uvrA</i>
PA3272/ /PA3274		Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación // Hipotético, sin clasificar, desconocido	G→A, 2 pb aguas arriba de PA3272 // 203 pb aguas abajo de PA3274
PA3596/ /PA3597		Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación // Proteínas de membrana; Transporte de pequeñas moléculas	G→A, 51 pb aguas arriba de PS3596 // 39 pb aguas abajo de PA3597
PA3940/ /PA3941		Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación // Hipotético, sin clasificar, desconocido	C→T, 42 pb aguas abajo de PA3940 // 82 pb aguas abajo de PA3941

<sup>a</sup>La clasificación funcional se realizó de acuerdo a las categorías descritas en The *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project (<http://www.pseudomonas.com>).

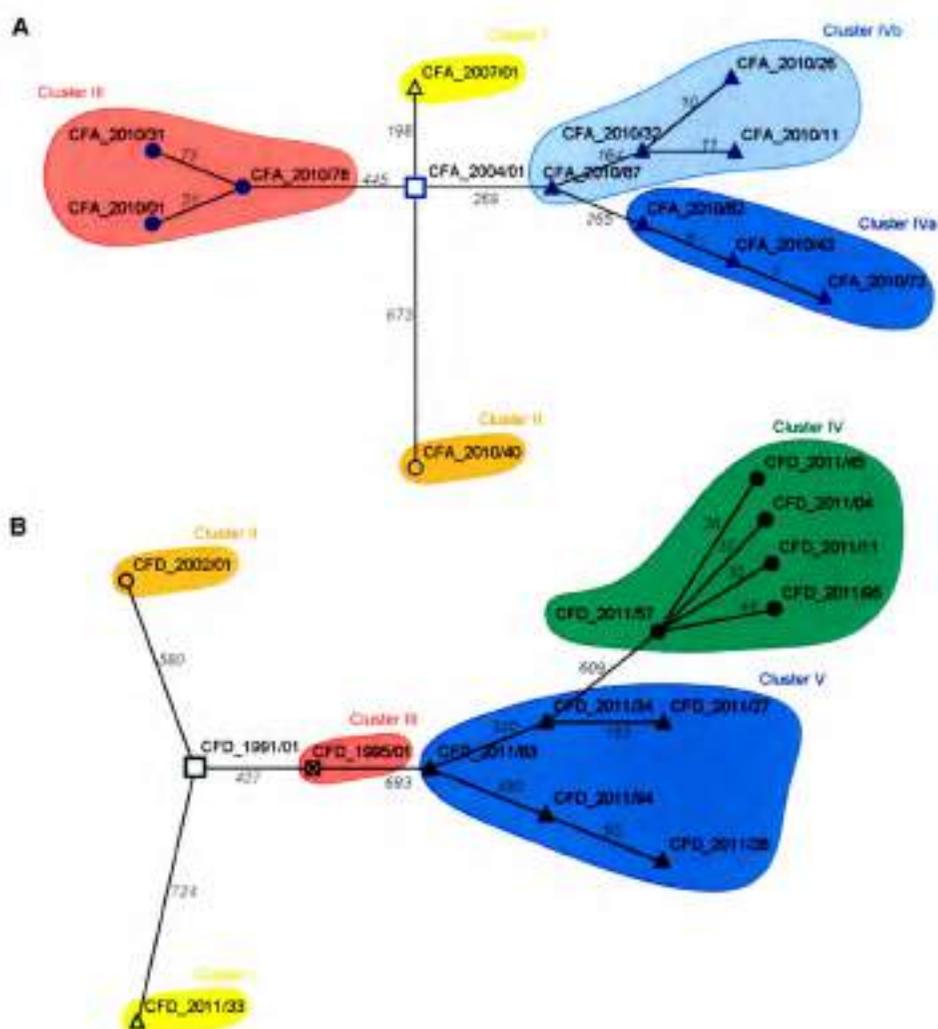
<sup>b</sup>Se consideraron las mutaciones de SNPs no sinónimas e indels (1-10 pb). Entre paréntesis se indican los cambios a nivel de aminoácidos.



Posteriormente se investigó si la diversidad genética observada en ambas poblaciones de CFA\_2010 y CFD\_2011 también se reflejaba en el repertorio de genes mutados entre los aislados contemporáneos de cada paciente FQ, o bien si algunos de los SNPs se acumularon en genes comunes entre los mismos. A tal efecto, se determinó para cada aislado CFA y CFD su "mutagenoma", el cual se definió como el constituido por el conjunto de genes alterados por mutaciones de SNPs no sinónimos y micro indels de 1-4 pb. Luego, se emplearon árboles de distancias mínimas (MSTs, de sus siglas en inglés, Minimum Spanning Trees) para ilustrar las relaciones entre los aislados contemporáneos y sus ancestros basándose en la identidad de sus "mutagenomas" (ver Materiales y Métodos). Es importante aclarar que en los MSTs construidos, cada nodo representa el mutagenoma de un aislado de *P. aeruginosa* FQ, y la distancia entre un par de mutagenomas se muestra como el número de genes mutados distintos entre ellos. Además, los nodos se conectan entre sí de tal manera que la suma de las distancias es la mínima obtenida (Tabla R9). Tal como se observa en las Figuras R8A y R8B, la estructura de ambos MSTs reveló que los aislados contemporáneos presentaron una marcada diversificación con respecto a sus mutagenomas, indicando que los mismos habrían experimentado vías evolutivas divergentes. Interesantemente, tanto los MSTs como los árboles filogenéticos exhibieron un patrón similar en cuanto a la formación de clusters. Así, considerando el conjunto de genes mutados, los aislados de la colección transversal CFA\_2010 estuvieron distribuidos en tres clusters principales (Figura R8A), mientras que en el linaje CFD también se observó una distribución divergente, con todos los aislados no mutadores nuevamente agrupados en un mismo cluster (Figura R8B). Así, el análisis comparativo de los mutagenomas de las poblaciones hipermutadoras de *P. aeruginosa* obtenidas de un mismo paciente FQ en un mismo momento de la infección crónica, demuestra un escenario de diversificación génica elevada, sugiriendo que, a pesar de provenir de ancestros comunes, las poblaciones hipermutadoras CFA y CFD se diferenciaron siguiendo distintas rutas evolutivas.

**Tabla R9.** Cantidad total de genes mutados diferencialmente entre los distintos mutagenomas de CFA y CFD. Estos números fueron utilizados como representación de las distancias mínimas observadas en los MST representados en la Figura R8.

		CFA													
		2004/01	2007/01	2010/01	2010/11	2010/26	2010/31	2010/32	2010/40	2010/43	2010/72	2010/78	2010/82	2010/87	
CFA	2004/01	0													
	2007/01	198	0												
	2010/01	450	472	0											
	2010/11	318	344	558	0										
	2010/26	321	343	555	15	0									
	2010/31	456	480	78	568	567	0								
	2010/32	317	337	553	11	10	563	0							
	2010/40	673	683	769	757	754	779	750	0						
	2010/43	350	374	588	306	305	596	303	763	0					
	2010/72	355	377	591	311	308	599	306	766	7	0				
2010/78	445	469	31	551	548	73	546	764	581	584	0				
2010/82	350	374	588	306	305	596	303	763	8	11	581	0			
2010/87	269	297	505	167	170	513	164	728	267	270	496	265	0		
		CFD													
		1991/01	1995/01	2002/01	2011/04	2011/11	2011/27	2011/28	2011/33	2011/34	2011/45	2011/57	2011/83	2011/94	2011/95
CFD	1991/01	0													
	1995/01	427	0												
	2002/01	580	733	0											
	2011/04	1108	899	1260	0										
	2011/11	1112	899	1262	40	0									
	2011/27	927	732	1093	625	629	0								
	2011/28	1025	836	1159	699	703	546	0							
	2011/33	724	909	1000	1364	1364	1263	1285	0						
	2011/34	912	721	1074	614	614	183	533	1234	0					
	2011/45	1121	908	1261	43	43	632	712	1375	613	0				
	2011/57	1117	900	1261	37	35	626	706	1365	609	36	0			
	2011/83	892	693	1032	618	622	351	503	1226	320	625	613	0		
	2011/94	974	795	1122	684	688	529	65	1264	508	701	695	480	0	
	2011/95	1115	904	1261	49	51	632	704	1369	617	52	44	625	693	0



**Figura R8.** Árboles de distancias mínimas de los linajes de *P. aeruginosa* CFA y CFD. Los árboles de distancias mínimas (MTS) para CFA (A) y CFD (B) se construyeron considerando el número total de genes mutados por SNPs no sinónimos e indels (1-10 pb) en cada uno de los genomas de CFA y CFD, respectivamente ("mutagenomas"). Cada nodo representa un mutagenoma mientras que las ramas entre los mutagenomas representan las distancias mínimas en términos de genes mutados. Los números encima de la cada rama representan la cantidad total de genes mutados diferencialmente entre dos mutagenomas conectados. Para las construcciones de los MTS, se consideraron como orígenes a los genomas CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01.



Es importante finalmente mencionar que el número de genes mutados por SNPs no sinónimos (1210 en CFA y 2308 en CFD) no disminuyó sustancialmente respecto al número de SNPs no sinónimos totales (1496 en CFA y 3438 en CFD), lo que estaría dando cuenta de mutaciones producidas al azar, lo cual concuerda con una evolución signada por deriva génica y/o selección negativa, tal cual lo determinado de acuerdo al cociente dN/dS. Sin embargo, al analizar los genes que fueron alterados por indels (212 en CFA y 301 en CFD), se observó una tendencia de mayor convergencia de las indels génicas totales de cada linaje (336 en CFA y 622 en CFD) a mutar los mismos genes (ver Resultados, sección 2.3.7).

### 2.3.5. ESTUDIO DE LA MUTAGÉNESIS EN LOS REGULADORES GLOBALES *mucA*, *algU*, *lasR*, Y *rpoN*, EN LOS LINAJES DE *P. AERUGINOSA* CFA Y CFD

De acuerdo a lo observado anteriormente, las vías genéticas evolutivas que conducen hacia la adquisición de un fenotipo persistente resultarían del efecto de diversas mutaciones producidas en varios genes a nivel global. Sin embargo, se ha demostrado que la adquisición de pocas mutaciones con efectos pleiotrópicos conduce asimismo a un fenotipo crónico FQ [136]. En este sentido, se ha reportado que la selección positiva de mutaciones de pérdida de función en genes que codifican para los reguladores transcripcionales globales *mucA*, *algU*, *lasR*, y *rpoN*, tienen un rol principal en la adaptación de *P. aeruginosa* al ambiente pulmonar FQ [208]. Como se describió anteriormente, el gen *mucA* codifica para un factor anti-sigma que secuestra al factor sigma AlgU ( $\sigma^{22}$ ), el cual por su parte controla la transcripción de varios genes incluyendo aquellos genes relacionados con la síntesis del alginato. Por otro lado, *lasR* codifica para uno de los reguladores transcripcionales principales del QS, el cual controla una serie de genes relacionados con la virulencia y el metabolismo. Por su parte, RpoN es un factor sigma alternativo ( $\sigma^{54}$ ) que posee roles regulatorios sobre la síntesis del flagelo, movilidad, transporte de nitrógeno, QS, virulencia, entre otros [209]. De esta manera, con el propósito de estudiar la ocurrencia de mutaciones en los reguladores globales *mucA*, *algU*, *lasR*, y *rpoN*, en los linajes de *P. aeruginosa* CFA y CFD, se analizaron las secuencias de estos genes a partir de los secuenciamientos de genomas obtenidos respecto a la secuencia del genoma de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 utilizada ahora como referencia. Como se

muestra en el Tabla R10, los patrones de mutación observados en los cuatro reguladores globales analizados presentaron distinto grado de complejidad en el linaje CFA comparativamente al linaje CFD. Así, en todos los aislados CFA, incluyendo el ancestral CFA\_2004/01, el gen *rpoN* estuvo inalterado, mientras que *mucA* estuvo mutado por la misma mutación de una delección -1G localizada en un SSR de 5G, la cual constituye una mutación encontrada en alta frecuencia tanto en aislados de pacientes FQ [189] (Tabla R2) como en cultivos en *biofilms in vitro* [182, 210]. Sin embargo, fue posible observar al menos 5 patrones de mutación diferentes al analizar en forma combinada las mutaciones encontradas en *lasR* y *algU*, patrones que se diferenciaron coincidentemente en relación a los clusters filogenéticos en los que se organizaron los distintos clones del linaje CFA (Figura R7 y R8). Por su lado, el patrón de mutaciones fue más simple y altamente conservado al analizar el linaje CFD, ya que todos los clones presentaron las mismas mutaciones en *lasR* y *rpoN*, e inalterado el gen *algU*. La única diferencia se observó con respecto al gen *mucA*, el cual mientras se mantuvo inalterado en la mayoría de los clones CFD, presentó una mutación puntual de transición sólo en aquellos clones agrupados en el Cluster IV, que incluye a los clones no mutadores que sufrieron una reducción en la frecuencia de mutación (Tabla R10). Cabe destacar que *mucA* en los clones CFA y *lasR/rpoN* en los clones CFD, presentaron mutaciones conservadas en los aislados más tempranos de cada linaje, lo cual sugiere que las mismas fueron seleccionadas en estadios tempranos de la infección y fijadas en la población a lo largo del proceso evolutivo. Además y particularmente en el linaje CFD, la adquisición de mutaciones en *lasR* ocurrió antes de la selección del fenotipo hipermutador, lo cual soporta la falta de asociación entre la hipermutabilidad y la mutagénesis en este gen previamente observada (Capítulo 1).

**Tabla R10.** Mutaciones en reguladores globales *mucA*, *algU*, *lasR*, y *rpoN* en los aislados FQ de *P. aeruginosa* de las colecciones CFA y CFD.

	Aislado	Mutaciones			
		<i>mucA</i>	<i>algU</i>	<i>lasR</i>	<i>rpoN</i>
CFA	2004/01	-G a 426	NF	NF	NF
	2007/01	-G a 426	NF	NF	NF
	2010/40	-G a 426	NF	A343G (T115A)	NF
	2010/31	-G a 426	NF	NF	NF
	2010/01	-G a 426	NF	NF	NF
	2010/78	-G a 426	NF	NF	NF
	2010/82	-G a 426	A170G (K57R)	C224T (T75M)	NF
	2010/43	-G a 426	A170G (K57R)	C224T (T75M)	NF
	2010/72	-G a 426	A170G (K57R)	C224T (T75M)	NF
	2010/87	-G a 426	A176G (Y59C)	NF	NF
	2010/32	-G a 426	A134G (Q45R)	A14G (D5G); C284T (T95M)	NF
	2010/26	-G a 426	A134G (Q45R)	A14G (D5G); C284T (T95M)	NF
	2010/11	-G a 426	A134G (Q45R)	A14G (D5G); C284T (T95M)	NF
CFD	1991/01	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/33	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2002/01	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	1995/01	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/95	A358G (T120A)	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/04	A358G (T120A)	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/45	A358G (T120A)	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/11	A358G (T120A)	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/57	A358G (T120A)	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/83	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/27	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/34	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
	2011/28	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)
2011/94	NF	NF	G314A (A105T)	A884G (D295G)	

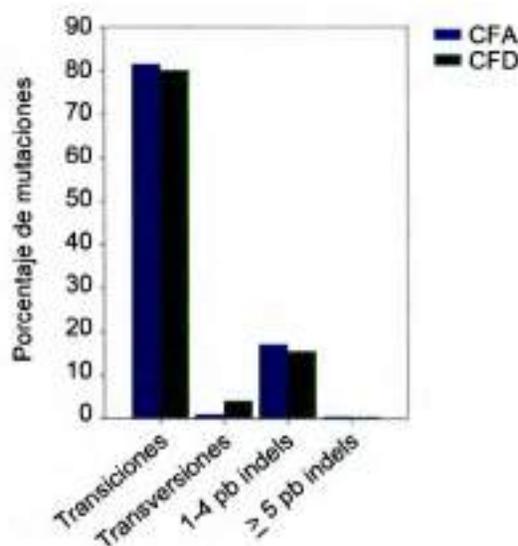
\*Se consideraron las mutaciones de SNPs no sinónimas e indels (1-10 pb). Entre paréntesis se indican los cambios a nivel de aminoácidos.

NF, no se encontraron mutaciones; -, delección.

### 2.3.6. ESTUDIO GLOBAL DEL ESPECTRO DE MUTACIÓN EN LOS AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* DE LAS COLECCIONES CFA Y CFD

Posteriormente y con la finalidad de investigar globalmente el espectro de mutación en los aislados de *P. aeruginosa*, se analizaron las mutaciones totales en ambos linajes CFA y CFD, incluyendo SNPs e indels entre 1-10 pb. Tal como se muestra en la Figura R9, el espectro de mutación estuvo fuertemente sesgado hacia las transiciones, las cuales alcanzaron alrededor del 80% del total de mutaciones, seguidas por las inserciones/delecciones pequeñas (de 1-4 pb). Más aún, considerando sólo los SNPs, se observó que las transiciones C:G→T:A y G:C→A:T constituyeron el 99% y 95% de las mutaciones entre los aislados de CFA y CFD, respectivamente. Este espectro característico observado en ambas colecciones de *P. aeruginosa* concuerda con lo documentado

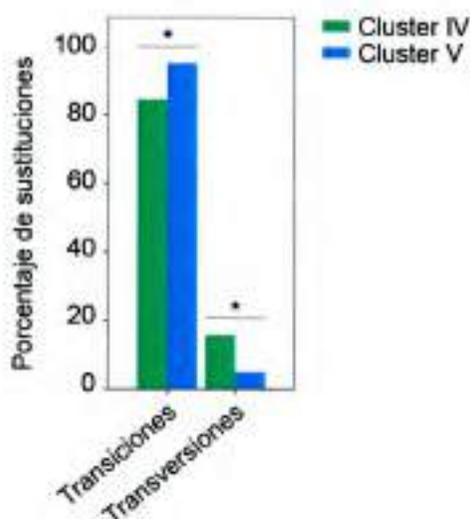
previamente para células deficientes en el MRS, donde se demostró que defectos en *mutS* y *mutL* producen específicamente transiciones C:G→T:A y G:C→A:T y pequeñas indels [33].



**Figura R9.** Espectro de mutaciones de los genomas secuenciados en los linajes de *P. aeruginosa* CFA y CFD. El análisis se realizó en ambos linajes considerando el porcentaje de transiciones, transversiones, y mutaciones de inserción/delección (indels). Las mutaciones acumuladas en los genomas CFA y CFD están representadas en barras azules y verdes respectivamente.

Por otra parte, se compararon los espectros de mutación entre cada rama del árbol filogenético de CFD, con el propósito de analizar el espectro de mutación particular de los aislados CFD\_2011 no mutadores pertenecientes al Cluster IV. Coincidentemente con lo descrito anteriormente (Figura R9), se observó que las nuevas mutaciones acumuladas en la mayoría de las ramas presentes en cada uno de los clusters IV y V estuvieron dominadas por transiciones (Figura R10). Sin embargo, los aislados CFD\_2011 del Cluster IV, mostraron un incremento en la proporción de transversiones que resultó estadísticamente significativo y alcanzó el 10,6% ( $P \leq 0,05$ , z-Test ajustado por la corrección de Bonferroni) respecto al 5,8% presentado por los aislados hipermutadores contemporáneos del Cluster V

(Figura R10). Este resultado indica que a la reducción en la frecuencia de mutación sufrida por los clones CFD agrupados en el Cluster IV se suma un cambio en el espectro, lo cual podría dar cuenta de un fenómeno de reversión del fenotipo hipermutador por deficiencia en el MRS sufrido en estos clones.



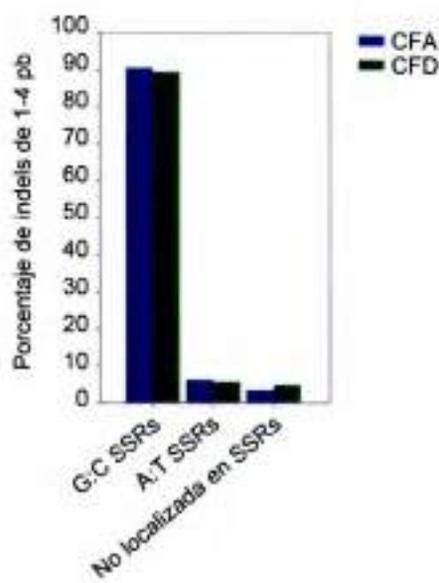
**Figura R10.** Espectro de mutaciones de los genomas de los aislados CFD no mutadores e hipermutadores, pertenecientes a los Clusters IV y V respectivamente. El análisis de SNPs se realizó considerando el porcentaje de transiciones y transversiones en los clusters IV (no mutadores, en barras verdes) y V (hipermutadores, en barras celestes). La suma de los SNPs acumulados en las ramas del árbol filogenético de CFD J-I-L-P-O-N-K-M y S-U-T-W-V-X-Q-R-G fueron considerados como el total de SNPs acumulados en los Clusters IV y V, respectivamente (ver Figura R7B). Las diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,05$ , z-Test ajustado con la corrección de Bonferroni) en el porcentaje de transiciones y transversiones en el Cluster IV con respecto al Cluster V están indicadas con \*.

### 2.3.7. ASOCIACIÓN ENTRE HIPERMUTABILIDAD ESTABLE E HIPERMUTABILIDAD LOCALIZADA DURANTE LA EVOLUCIÓN DE *P. AERUGINOSA* EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS FQ

Estudios *in vitro* previamente realizados en el laboratorio demostraron que bajo condiciones de deficiencia en el MRS, las SSRs mononucleotídicas G:C constituyen puntos calientes de mutación, haciendo que genes que contienen este tipo de secuencias sean más propensos a sufrir mutaciones [182, 210]. En este sentido, mediante el análisis de la frecuencia y distribución de SSRs mononucleotídicas G:C y A:T en las regiones codificantes y no codificantes del genoma de *P. aeruginosa*, se demostró que las SSRs G:C, y no las A:T, están considerablemente poco representadas en las regiones codificantes, sugiriendo que la contraselección en estas regiones estaría directamente relacionada con su inestabilidad, fenómeno que fue directamente proporcional a la longitud del SSR, haciéndose evidente a partir de SSRs G:C > 5 pb [211]. Asimismo y mediante un meta-análisis de datos de secuencias previamente publicados del genoma completo de distintos aislados de una única cepa de *P. aeruginosa* (PACS2) obtenidos secuencialmente de un paciente FQ [88], en el laboratorio se determinó que las SSRs G:C, y no las A:T, fueron mutadas frecuentemente durante el proceso infeccioso, con una frecuencia significativamente mayor en un *background* hipermutador por deficiencia en el MRS y con un incremento exponencial en función del tamaño del SSR [211].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y con el propósito profundizar en el análisis de la asociación entre deficiencia en el MRS y mutagénesis en SSRs a nivel poblacional, se evaluaron las mutaciones en SSRs homopoliméricas G:C y A:T en los aislados contemporáneos correspondientes a los dos linajes de *P. aeruginosa* CFA\_2010 y CFD\_2011. Como se mencionó anteriormente, los linajes CFA y CFD acumularon 544 y 1078 mutaciones de indels, las cuales constituyeron un 17,4% y 16% de las mutaciones totales observadas en CFA y CFD respectivamente (Figura R9). Notablemente, >95% de estas mutaciones de inserción/delección consistieron en indels pequeñas (1-4 pb), localizadas en SSRs homopoliméricas (Figura R11). Más aún, en ambos linajes, >89% de las mutaciones de indels de 1-4 pb se encontraron ubicadas en SSRs homopoliméricas G:C. Por el contrario, se evidenció un rol menor de las SSRs A:T en la evolución mutagénica de

CFA y CFD, ya que las mismas estuvieron afectadas por el 5,7% y 6,2% de las indels de 1-4 pb respectivamente (Figura R11).



**Figura R11.** Porcentaje de mutaciones de inserción/delección (indels) de 1-4 pb localizadas en secuencias repetidas simples (SSRs) homopoliméricas G:C y A:T en los genomas secuenciados de los linajes de *P. aeruginosa* CFA (barras azules) y CFD (barras verdes).

Considerando este espectro de mutación fuertemente sesgado hacia pequeñas deleciones en SSRs G:C, y con el propósito de analizar la dinámica mutacional de los mismos a nivel poblacional, se seleccionaron aquellas SSRs G:C  $\geq 6$  pb que presentaran mutaciones en al menos la mitad de los genomas secuenciados de los aislados contemporáneos de CFA\_2010 y CFD\_211, y que asimismo estuviesen altamente conservadas en otras 13 cepas de *P. aeruginosa* no mutadoras (PAO1, PA14, M18, NCGM2.S1, B136-33, RP73, 39016, CFD\_1991/01, PACSC2, 2192, C3719, DK2, LESB58; siendo las últimas 6 aislados no mutadores obtenidos de pacientes FQ), cuyos genomas han sido secuenciados previamente ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). La Tabla R11

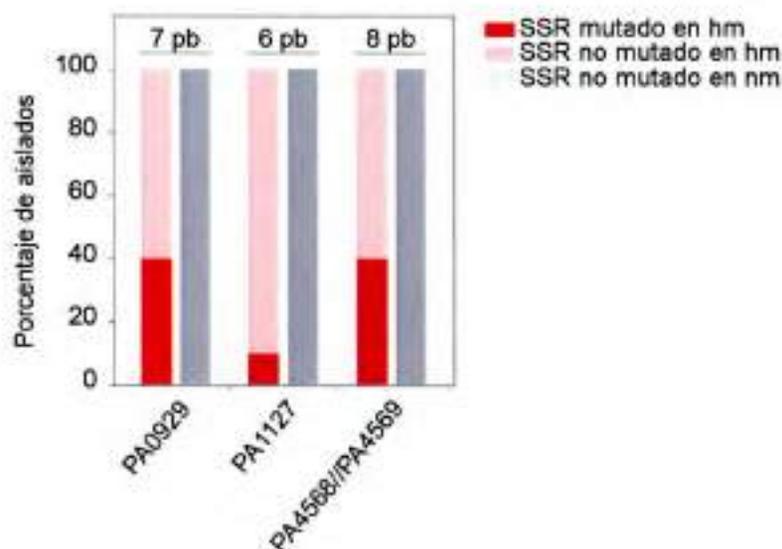
muestra 15 de los SSRs G:C más frecuentemente mutados, los cuales presentaron hasta 6 mutaciones de indels distintas, demostrando la existencia de eventos de mutación independientes y reflejando un elevado dinamismo mutacional y una alta inestabilidad de las SSRs G:C en ambas poblaciones hipermutadoras de *P. aeruginosa*.

Frente a este resultado y con el propósito de confirmar la asociación observada entre la hipermutabilidad estable y la hipermutabilidad localizada, se analizó el nivel de mutagénesis en tres de los SSRs G:C incluidos en la Tabla R11, seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios: (i) estar altamente mutados; (ii) estar incluidos en genes o regiones intergénicas lindantes a genes con potencial función en la patoadaptabilidad de la bacteria al pulmón FQ; (iii) estar inalterados en las secuencias de las cepas elegidas como referencia. De esta manera, las tres SSRs seleccionadas correspondieron a dos presentes en regiones génicas (PA0929 y PA1127), y otra ubicada en una región intergénica (PA4568//PA4569) (Tabla R11). Mediante secuenciamiento directo de las regiones que incluían las SSRs seleccionadas, se analizó parte de la colección CFL anteriormente descrita (Capítulo I), comparando 10 aislados hipermutadores deficientes en el MRS (aislados 1b, 2a, 5a, 9a, 10a, 17b, 18d, 20b, 21a y 22a) con 18 aislados no mutadores (1c, 2b, 4a, 6a, 7a, 8a, 11a, 12a, 13a, 14a, 16a, 17a, 18a, 18c, 20a, 23a, 24a y 26a), obtenidos de 22 pacientes argentinos distintos con FQ (Tabla R1). Notablemente, en las tres SSRs G:C estudiadas, sólo se observaron mutaciones de indels en los aislados hipermutadores. Tal como se muestra en la Figura R12, se observó que el 40% de los aislados hipermutadores analizados presentaron mutaciones de indels en la SSR G:C de 7 pb del gen PA0929, el 10% en la SSR G:C de 6 pb del gen PA1127 y el 40% en la SSR G:C de 8 pb de la región intergénica PA4568//PA4569. Contrariamente, ningún aislado no mutador mostró mutaciones en los SSRs mencionados, a pesar de que la longitud de los mismos fue mayor a 6 pb, dando nuevas evidencias de la mayor inestabilidad de estas secuencias en un *background* deficiente en el MRS y en un contexto de infección *in vivo*.

**Tabla R11.** SSRs homopoliméricos de G:C mutados en alta frecuencia en los aislados contemporáneos CFA 2010 y CFD 2011.

PAOI ID	Tamaño del SSR G:C <sup>a</sup>	Evaluación genómica del SSR G:C <sup>b</sup>	Índice de SSR G:C	Genomas analizados		Alisolados FQ	Genomas mutados <sup>c</sup>	Hipermutadores (%) <sup>d</sup>	No mutadoras (%) <sup>e</sup>
				CEA	CFD				
PA2029	6	2220499	-1G	2010_10	2011_05				
PA1490	6	1618240	-1C	2010_31	2011_05				
			+1C	2010_01	2011_05				
			+2C	2010_78	2011_05				
			-3C	2010_82	2011_05				
PA1626	6	1769229	-1C	2010_43	2011_05				
			-1C	2010_72	2011_05				
			-2C	2010_37	2011_05				
			-3C	2010_26	2011_05				
PA2203	6	2422132	-1C	2010_11	2011_05				
			-2C	2011_35	2011_05				
			-3C	2011_05	2011_05				
PA4071	6	4549285	-1G	2011_04	2011_05				
			-2G	2011_05	2011_05				
			+3G	2011_05	2011_05				
PA1127	6	1220454	-1G	2011_05	2011_05				
			+1G	2011_05	2011_05				
			+2G	2011_05	2011_05				
PA5335	6	3728299	+1C	2011_05	2011_05				
			+2C	2011_05	2011_05				
PA4709	7	5288317	-1G	2011_05	2011_05				
			+1G	2011_05	2011_05				
			+2G	2011_05	2011_05				
PA0929	7	1016527	-1G	2011_05	2011_05				
			-2G	2011_05	2011_05				
			+1G	2011_05	2011_05				
			+2G	2011_05	2011_05				
PA4311	7	4839640	-1G	2011_05	2011_05				
			-2G	2011_05	2011_05				
			+1G	2011_05	2011_05				
PA1169	7	127374	-1G	2011_05	2011_05				
			-2G	2011_05	2011_05				
			+1G	2011_05	2011_05				
			+2G	2011_05	2011_05				





**Figura R12.** Distribución de mutaciones de inserción/delección en SSRs G:C entre aislados hipermutadores y no mutadores de la colección CFL. Las SSR mutadas en los aislados hipermutadores están representadas en barras rojas oscuras, las SSR no mutadas en hipermutadores se muestran en barras rosadas, mientras que las SSR no mutadas en los aislados no mutadores están representadas en gris. Los números sobre las barras indican el tamaño del SSR en pares de bases. Los SSRs elegidos para el análisis están localizados en los genes ortólogos a la cepa de referencia PAO1, PA0929 y PA1127, así como en la región intergénica PA4568//PA4569. hm, hipermutadores; nm, no mutadores.

Cabe finalmente destacar que, de las 15 SSRs G:C analizadas, 12 se localizaron en regiones codificantes del genoma (Tabla R11). Considerando que las mutaciones de indels causan corrimientos en el marco de lectura, las mismas tienen la potencialidad de inactivar efectivamente la expresión génica o bien codificar para proteínas trunca con funciones alteradas. En este sentido, a pesar de que la mayoría de los genes incluidos en el análisis codifican para proteínas cuya función es aún desconocida, algunas de las SSRs se localizaron en genes con funciones relacionadas a reguladores transcripcionales (PA1490), protección-adaptación (PA1127), proteínas de membrana y transporte de moléculas pequeñas (PA1626, PA2203, PA4709), y sistemas reguladores de dos componentes (PA0929). Así, las alteraciones en la función de estos genes podrían estar involucradas

potencialmente en la adaptación al ambiente FQ. Estas observaciones indican que las SSRs G:C, como secuencias de ADN propensas a sufrir mutaciones, constituyen una fuente prolífica de variación genética, las que en combinación con estados de hipermutabilidad por deficiencias en el MRS, producirían un sesgo hacia la alteración de aquellos genes que las contienen.

### 2.3.8. GENES PATOADAPTATIVOS Y EVIDENCIAS DE PARALELISMO EVOLUTIVO EN LAS POBLACIONES DE *P. AERUGINOSA* HIPERMUTADORAS CFA Y CFD

Como se mencionó anteriormente, el cociente entre la tasa de sustituciones no sinónimas (dN) y la tasa de sustituciones sinónimas (dS) es una medida de las fuerzas de selección que actúan particularmente en las regiones codificantes. De esta manera, un cociente dN/dS mayor, igual, o menor a 1 se interpreta como indicios de selección positiva, neutra, o negativa (purificadora), respectivamente. Así, en base a los cocientes dN/dS < 1 obtenidos, se determinó que la evolución en el transcurso de la infección crónica de ambos linajes de *P. aeruginosa* CFA y CFD estuvo signada por una selección purificadora y/o por deriva génica. Sin embargo, puede esperarse que ciertas mutaciones beneficiosas seleccionadas positivamente hayan quedado ocultas entre la gran cantidad de mutaciones acumuladas. En este sentido, la selección de mutaciones diferentes producidas por eventos independientes en genes específicos es un indicio de evolución paralela [212], en la que la selección positiva de estas mutaciones estaría dirigida en última instancia hacia determinadas funciones implicadas en la adaptación [213].

Con el propósito de obtener información sobre aquellos genes relacionados con la adaptación al ambiente FQ (genes patoadaptativos), a continuación se analizaron los genes con mayor frecuencia de mutación por eventos independientes, seleccionando particularmente aquellos con un número de mutaciones diferentes  $\geq 7$ , considerando conjuntamente el total de SNPs únicos ocurridos por gen en ambos linajes CFA y CFD. Tal como se observa en la Tabla R12, 49 genes fueron mutados con este nivel de frecuencia por eventos independientes de mutación, algunos de ellos acumulando incluso más de 15 mutaciones distintas. Posteriormente, se analizó el cociente dN/dS para los SNPs totales presentes en los 49 genes mencionados, como una medida del tipo de presión selectiva que

actuó sobre ellos, observándose un valor de  $dN/dS = 0,95$ ; el cual fue significativamente mayor al cociente  $dN/dS = 0,74$  considerado para el total de los genes mutados restantes (312/109 vs. 4622/2073;  $P = 0.029$ , test exacto de Fisher). De esta manera y a pesar de que en términos generales la evolución de los aislados hipermutadores analizados estaría signada por evolución purificadora y/o deriva génica, el incremento significativo en el cociente  $dN/dS$  de los 49 genes listados en la Tabla R12 sugiere que los mismos habrían estado particularmente signados por una selección positiva durante la evolución. En este sentido, muchos de estos genes están asociados con funciones relacionadas a la adaptación al ambiente FQ (Tabla R12). Entre estas funciones, es importante destacar aquellos genes relacionados con la resistencia a antibióticos, tales como *ftsI*, *ampC*, *mexY* and *mexF*. Se ha demostrado que mutaciones en estos genes confieren resistencia a beta-lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, cloramfenicol, trimetoprim, e imipenem [172, 214-215]. Adicionalmente, cabe mencionar genes relacionados con la virulencia como *relA*, *fusA1*, *pvdL*, *gacS*, y *retS*. El gen *relA* codifica para un efector de la respuesta a estrés relacionado con la síntesis de (p)ppGpp [216], y el gen *fusA1* codifica para el factor de elongación FusA1 EF-G y está igualmente relacionado con la regulación de la virulencia a través de una respuesta dependiente de (p)ppGpp [217]. Por su parte, el gen *pvdL* está involucrado en la biosíntesis del sideróforo pioverdina [88, 218-219], mientras que *gacS* y *retS* pertenecen a sistemas de dos componentes que regulan un rango amplio de genes implicados en la virulencia y en la respuesta a distintos tipos de estrés [220-223]. Finalmente, se incluyen en la lista genes relacionados con la movilidad y la adhesión, tales como *morA*, *cupB3*, *cupC3* and *fleR* [224-231]. Cabe destacar que mutaciones en los genes *ftsI*, *mexY*, *relA*, *fusA1*, y *mr*, han sido previamente descritas en otros aislados FQ [205, 217].

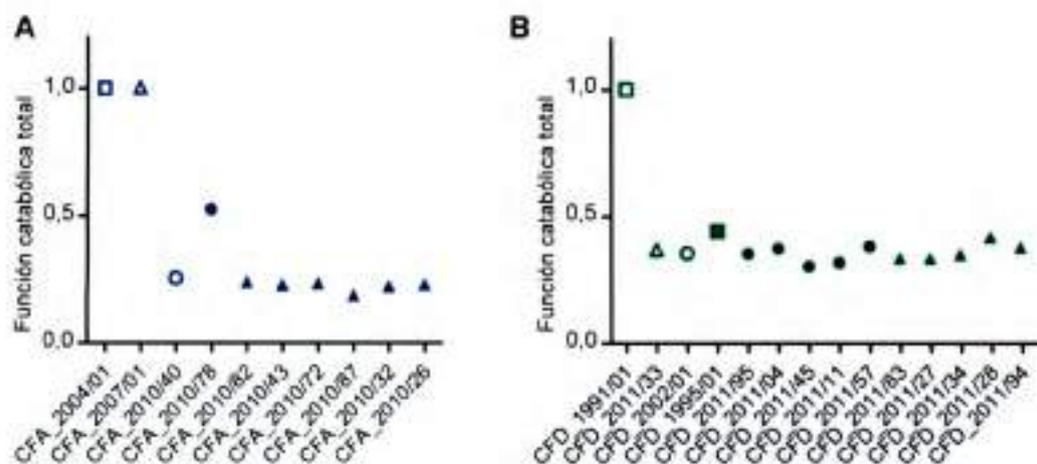
**Tabla R12.** Evidencias de evolución paralela. Genes que acumularon un número de SNPs únicos  $\geq 7$  en los linajes de *P. aeruginosa* CFA y CFD.

Gen		Clasificación funcional <sup>a</sup>	SNPs únicos <sup>b</sup>
ID	Nombre		
PA4418	<i>ftsI</i>		15
PA4110	<i>ampC</i>	Resistencia a antibióticos	7
PA2018	<i>mexY</i>		7
PA2494	<i>mexF</i>		7
PA0934	<i>relA</i>	Adaptación, protección	7
PA2424	<i>pvdL</i>		16
PA4266	<i>fusA1</i>	Traducción, modificación post-traduccional, degradación	16
PA0928	<i>gacS</i>		7
PA1336		Sistemas reguladores de dos componentes	7
PA3271			9
PA4856	<i>retS</i>		7
PA4601	<i>morA</i>		7
PA0994	<i>cupC3</i>	Movilidad y adhesión	7
PA4084	<i>cupB3</i>		7
PA1099	<i>fleR</i>		7
PA1613			7
PA1669		Proteínas de membrana	7
PA2072			7
PA4541			7
PA1634	<i>kdpB</i>	Transporte de moléculas pequeñas	7
PA3920		Proteínas de membrana; transporte de moléculas pequeñas	8
PA0413	<i>chpA</i>	Sistemas reguladores de dos componentes; movilidad y adhesión; quimotaxis	10
PA0794			7
PA4812	<i>fdnG</i>	Metabolismo de energía	7
PA4732	<i>pgi</i>	Catabolismo de compuestos del carbono; metabolismo de energía	7
PA3763	<i>purL</i>	Biosíntesis de nucleótidos y metabolismo	9
PA0091	<i>vgrG1</i>	Secreción de proteínas / aparato de exportación	8
PA2685	<i>vgrG4</i>		7
PA2138			7
PA4285	<i>recC</i>	Replicación del ADN, recombinación, modificación y reparación	8
PA3297			7
PA4937	<i>mr</i>	Transcripción, procesamiento y degradación del ARN	7
PA0041		Factores de secreción (toxinas, enzimas, alginato)	11
PA0620		Relacionado con fagos, transposones, o plásmidos	7
PA2378			7
PA2402		Enzimas putativas	7
PA4513			9
PA0454			7
PA0690			18
PA0788			8
PA1874			20
PA2057			7
PA2481		Hipotético, sin clasificar, desconocido	7
PA2635			9
PA2684			9
PA3728			7
PA3923			9
PA4489			7
PA4955			7

<sup>a</sup>La clasificación funcional se realizó de acuerdo a las categorías descritas en The *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project (<http://www.pseudomonas.com>).<sup>b</sup>Número de SNPs únicos localizados en la región codificante de cada gen.

## 2.4. ANÁLISIS GLOBAL DEL METABOLISMO DE LOS AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* DE LOS LINAJES CFA Y CFD

Se ha demostrado que el ambiente del pulmón FQ posee características microaeróbicas particulares, las cuales conducirían a cambios en las vías metabólicas de *P. aeruginosa* produciendo alteraciones particularmente en la transcripción de genes o proteínas involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos, y en la generación de energía [168, 232]. Adicionalmente, se ha postulado que el esputo purulento FQ representa un excelente sustrato para el crecimiento de *P. aeruginosa* [100, 233-234], ya que básicamente, las secreciones de las vías aéreas son una mezcla acuosa de electrolitos, glicoproteínas (por ejemplo mucinas), proteínas, aminoácidos, ADN y lípidos [235-236]. En base a estos antecedentes, se investigó globalmente el metabolismo en los aislados de *P. aeruginosa* de las colecciones CFA y CFD. Para ello, se utilizaron microarreglos fenotípicos para estudiar los perfiles catabólicos globales de cada aislado bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (ver Materiales y Métodos). Tal como se observa en la Figura R13A, cuando se analizaron los aislados contemporáneos CFA\_2010, se observó que la mayoría de ellos experimentaron una fuerte disminución en sus funciones catabólicas totales, alcanzando un promedio de disminución del 73,5%. Un escenario similar se observó en el linaje CFD, en el cual todos los aislados presentaron homogéneamente una marcada reducción en sus funciones catabólicas totales, con un descenso promedio del 63,8% (Figura R13B). De esta manera, la pérdida de las funciones catabólicas parecería ser un perfil fenotípico compartido entre los linajes CFA y CFD, posiblemente asociada a la alta acumulación de mutaciones que han derivado en distintas auxotrofias (ver Discusión).



**Figura R13.** Función catabólica total de aislados de *P. aeruginosa* de las colecciones CFA y CFD. Las funciones catabólicas totales se calcularon relativas a CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01 como un promedio ponderado entre todos los sustratos para cada aislado CFA (A) y CFD (B). Una función catabólica total igual a 1 constituye el valor de referencia (CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01), mientras que valores menores significan una disminución de dicha función. Los aislados CFA\_2010/01, CFA\_2010/11, y CFA\_2010/31 no se consideraron en el análisis debido a que se observó una dispersión significativa en los duplicados. Los símbolos utilizados para representar cada aislado CFA y CFD son los mismos empleados en la Figura R4.

# DISCUSIÓN

## 1. ASOCIACIÓN ENTRE LA HIPERMUTABILIDAD ESTABLE Y LA EMERGENCIA DE MUTACIONES ADAPTATIVAS EN LOS GENES *mucA*, *lasR* Y *mexZ* EN AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* OBTENIDOS DE PACIENTES FQ

Tal como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* establece infecciones crónicas en las vías respiratorias de pacientes FQ a través de un proceso de diversificación fenotípica que le permite adaptarse y sobrevivir a largo plazo dentro del hospedador. Debido a que este proceso está basado principalmente en mutaciones [88], un conocimiento más acabado de los mecanismos a partir de los cuales *P. aeruginosa* adquiere estas mutaciones podría ayudar a identificar las funciones requeridas para la supervivencia de la bacteria en el proceso infeccioso.

En el presente trabajo, se llevó a cabo inicialmente el estudio y la caracterización molecular de mutaciones producidas en genes que han sido relacionados con la adaptación de *P. aeruginosa* al ambiente FQ y previamente reportados como los más mutados entre aislados obtenidos a partir de estos pacientes [88]. En este sentido, se analizaron los genes *mucA*, *lasR*, y *mexZ*, como asimismo aquellos implicados en la inactivación del MRS, *mutS* y *mutL*, en una colección de aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes argentinos (colección CFL), constituyendo el primer estudio de esta naturaleza en América Latina. De acuerdo con los resultados obtenidos, los primeros tres genes mencionados fueron mutados con una frecuencia elevada entre los aislados CFL de *P. aeruginosa*, siendo *mexZ* el más mutado, seguido por *mucA* y *lasR* (Tabla R2). Adicionalmente, se observó en esta colección una prevalencia significativamente alta de aislados hipermutadores (Tabla R1), lo cual es coincidente con lo reportado previamente en otras regiones geográficas [21, 166, 171, 173]. Las bases moleculares de la hipermutabilidad en todos los aislados hipermutadores fue la deficiencia en el MRS, y a pesar de que distintos trabajos han descripto a las mutaciones en *mutS* como la principal causa de la hipermutabilidad, seguida por mutaciones en *mutL* y *uvrD* [31, 171], en la colección CFL, las mutaciones en *mutL* fueron la causa más frecuente de la deficiencia en el MRS (Tabla R2)

A través de experimentos *in vitro*, en el laboratorio se demostró previamente que la deficiencia en el MRS acelera la adquisición de mutaciones en *mucA* [182] y *lasR* [183-184]. En base a estos antecedentes se planteó la hipótesis de que tal asociación podría ocurrir igualmente en un contexto de infección *in vivo*. En línea con esto, Wayne y

colaboradores describieron una vinculación entre la hipermutabilidad y la emergencia del fenotipo mucoso en aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de una población de pacientes FQ provenientes de Inglaterra [169]. Sin embargo, en el presente trabajo, a través del análisis de las mutaciones observadas en los aislados hipermutadores y no mutadores de la colección CFL, no pudo establecerse ninguna asociación entre la hipermutabilidad y la mutagénesis, no sólo en *mucA* sino tampoco en *lasR* y *mexZ*. Una posible explicación de esta discrepancia es que en la investigación de Waine y colaboradores, el fenómeno no fue caracterizado a nivel genético, sin evaluarse de esta manera el fenómeno de reversión del fenotipo mucoso al no mucoso, el cual es muy frecuente entre aislados obtenidos de pacientes FQ [190]. De hecho, el análisis en la colección CFL demostró que el 37,5% de los aislados no mucosos presentaron mutaciones en *mucA*, indicando que los mismos habrían sido previamente mucosos antes de revertir su fenotipo. Asimismo, un análisis a nivel meramente fenotípico tiene la limitante de considerar variantes cuya mucosidad pueda estar basada en la sobreexpresión de otros exopolisacáridos diferentes al alginato, y estar basado por lo tanto en la alteración de vías genéticas diversas. Más aún, y contrariamente a los aislados CFL los cuales fueron epidemiológicamente diferentes, casi la mitad de los aislados en el trabajo mencionado fueron clones epidémicos [169], una característica que incrementa las disimilitudes entre ambas colecciones.

Por otro lado, trabajos contemporáneos a esta tesis postulan que las cepas hipermutadoras acelerarían la adaptación genética de *P. aeruginosa* al pulmón FQ, aumentando la acumulación de mutaciones beneficiosas [135]. Sin embargo, no se logra en ningún caso observar diferencias entre aislados hipermutadores y no mutadores con respecto a la distribución de mutaciones en varios genes secuenciados, sugiriendo que la hipermutabilidad tendría un efecto general sobre los genes durante el proceso de adaptación al ambiente FQ, sin estar relacionado con ningún fenotipo adaptativo en particular, ni siquiera con la resistencia a antibióticos [135]. De esta manera, y en concordancia con estas observaciones, en el presente trabajo se observó que tanto el número como el espectro de mutaciones fueron similares en los genes *mucA*, *lasR*, y *mexZ* entre los aislados hipermutadores y no mutadores de colección CFL. Sin embargo, los espectros de mutación variaron dependiendo del gen en cuestión: así, en *mucA* predominaron las pequeñas deleciones (de 1 pb), en *lasR* las sustituciones y en *mexZ* las grandes deleciones (> 4 pb).

Esta observación es interesante ya que sugiere la implicancia de mecanismos de mutagénesis diferentes en cada gen, los cuales operarían posiblemente de manera simultánea durante el proceso de la infección crónica FQ. Los espectros de mutación de los genes *mucA* y *lasR*, pero no de *mexZ*, se correspondieron no sólo con el espectro generado por la deficiencia en el MRS [191-192] sino también con la actividad de la polimerasa Pol IV, la cual es inducida bajo condiciones de estrés [58]. De esta manera, puede postularse que, dadas las condiciones estresantes del medio FQ, la hipermutabilidad transiente podría tener un papel importante en la mutagénesis, contribuyendo así a la adaptación genética de *P. aeruginosa* en este ambiente. Consistentemente con esa hipótesis, se ha demostrado previamente en el laboratorio que la actividad de Pol IV es esencial en el establecimiento de *mucA* como el principal blanco de mutagénesis para la conversión al fenotipo mucoso, presentando un rol prominente en la generación de deleciones -1 en una SSR homopolimérica de 5 Gs ( $G^5$ -SSR<sub>426</sub>), la cual es una de las mutaciones más prevalentes en aislados FQ mucosos [182]. Asimismo se estableció que la eliminación de  $G^5$ -SSR<sub>426</sub> no sólo reduce significativamente la frecuencia de mutaciones en *mucA*, sino que además hace que *mucA* deje de ser la principal vía de conversión al fenotipo mucoso [210].

En un trabajo de investigación llevado a cabo contemporáneamente al presente estudio, se demostró igualmente una falta de asociación entre la hipermutabilidad estable y la emergencia de mutaciones en *mucA* y *lasR* [196]. A través de un análisis longitudinal, en ese trabajo se observó que tanto los aislados mucosos como los deficientes en *lasR* emergen antes de la aparición de cepas hipermutadoras, las cuales se acumularían en los estadios tardíos de la infección [88, 237]. Por lo tanto, es posible postular que la selección de mutaciones en *mucA* y *lasR* sea importante para la supervivencia en etapas más tempranas de la infección crónica, cuando el efecto de las hipermutadoras es aún escaso.

De esta manera es posible concluir que las mutaciones que inactivan a los genes *mucA*, *lasR*, y *mexZ* surgen por mecanismos diferentes en cada gen, siendo los mismos independientes de la deficiencia en el MRS. No obstante, se requieren nuevas investigaciones para llegar a un mejor entendimiento de las complejas y variables estrategias mutagénicas que *P. aeruginosa* utiliza para adaptarse continuamente al ambiente FQ. A tal efecto, el siguiente capítulo de este trabajo incluyó el estudio del impacto de la

hipermutabilidad a nivel global en el genoma de *P. aeruginosa* durante su evolución a largo plazo en infecciones pulmonares crónicas FQ.

## 2. SELECCIÓN Y PREVALENCIA DEL FENOTIPO HIPERMUTADOR DEBIDO A LA DEFICIENCIA EN EL MRS EN AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* OBTENIDOS DE PACIENTES FQ. IMPACTO DE LA HIPERMUTABILIDAD ESTABLE EN LA EVOLUCIÓN DE *P. AERUGINOSA* EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS

Como parte del proceso de diversificación que *P. aeruginosa* experimenta durante su adaptación al ambiente pulmonar FQ, resulta notable la elevada prevalencia del fenotipo hipermutador estable, principalmente debido a deficiencias en el MRS [21, 31]. De hecho, mutaciones de pérdida de función en los genes *mutS* y *mutL* del MRS son a menudo parte del proceso de transformación que *P. aeruginosa* sufre durante la evolución de la infección crónica. De esta manera, la infección pulmonar crónica FQ no sólo ofrece una posibilidad sumamente interesante de estudiar aspectos de evolución bacteriana, sino que además provee la oportunidad única de focalizarse en el estudio de la evolución de cepas hipermutadoras en ambientes naturales. A pesar de que existen trabajos previos acerca de *P. aeruginosa* en el ambiente FQ, éstos se han basado principalmente en análisis interpacientes o bien longitudinales considerando pocos aislados obtenidos en un mismo momento de la infección. Por otra parte, a pesar de que el fenómeno de la hipermutabilidad en FQ ha sido un tema de gran interés durante mucho tiempo, poco es el conocimiento acerca de la evolución a largo plazo de cepas hipermutadoras deficientes en el MRS en este escenario *in vivo*, siendo una temática con muchas cuestiones aún sin resolver.

De esta manera, en el presente trabajo se investigó la evolución genómica de *P. aeruginosa* hipermutadoras deficientes en el MRS en el transcurso de infecciones pulmonares crónicas FQ. A tal efecto, este trabajo combina un estudio longitudinal de aislados obtenidos a lo largo de distintos tiempos de la infección, con un estudio transversal amplio, el cual incluye un número elevado de aislados obtenidos simultáneamente de muestras de esputo únicas, proporcionando de esta manera un análisis instantáneo de la estructura genética de poblaciones hipermutadoras.

Con este propósito, se obtuvieron aislados de *P. aeruginosa* a partir de dos pacientes FQ infectados crónicamente, un paciente de América Latina (CFA) y un paciente europeo (CFD). Estos pacientes fueron elegidos considerando principalmente dos criterios: (i) estar infectados por un clon único de *P. aeruginosa* no transmisible; (ii) presentar registros de haber albergado cepas hipermutadoras deficientes en el MRS. Los aislados fueron muestreados en diferentes puntos de la infección crónica, desde estadios tempranos a tardíos de la misma, cubriendo 6 y 20 años en el caso de CFA y CFD, respectivamente. El último punto de muestreo incluyó la obtención de 90 aislados seleccionados al azar a partir de una muestra de esputo única, permitiendo así lograr la colección de cepas para el análisis transversal.

Un resultado sumamente interesante fue que los aislados en CFA, tanto del muestreo longitudinal como transversal, fueron en su totalidad hipermutadores. Por otra parte, en CFD se obtuvieron por un lado, un primer aislado no mutador seguido por la recolección sucesiva de clones hipermutadores 9 años después del comienzo de la infección crónica (Figura R4). Por otro lado, el análisis transversal de los 90 aislados en CFD exhibió una proporción de cepas hipermutadoras igualmente alto del 94%. Notablemente, un segundo análisis transversal llevado a cabo un año después a partir de colecciones equivalentes de 90 aislados obtenidas a partir de nuevas muestras de esputo, confirmó que tanto CFA como CFD albergaban un 100% y 90% de aislados hipermutadores, respectivamente. Esta prevalencia de hipermutadoras es considerablemente mayor que la previamente reportada en un único estudio en el cual el porcentaje de hipermutadoras en un mismo paciente alcanzó un 40% [21]. El tamaño de las muestras analizadas en los análisis transversales descritos en el presente trabajo puede constituir una distinción crucial que de cuentas de las marcadas diferencias respecto a este previo antecedente. En este sentido, el cálculo de prevalencia de hipermutadoras por paciente en el trabajo mencionado estuvo basado en un muestreo a partir de varios pacientes, en algunos de los cuales se tomaron más de un aislado pero en diferentes tiempos de la infección y nunca superando un número mayor a 6, número remarcablemente menor que los 90 aislados analizados por paciente en el presente trabajo. Esto resalta la importancia de llevar a cabo estudios que involucren un número elevado de aislados obtenidos en forma simultánea, los cuales constituyen muestreos ciertamente más representativos y confiables. De esta manera, las colecciones

transversales aquí presentadas exhibieron la proporción de aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* intrapaciente más elevada en el ambiente FQ descripta hasta el momento, dando cuenta de que una vez seleccionados, los mismos fueron capaces de dominar completamente la población infectante en ambos pacientes CFA y CFD.

Es importante destacar que la elevada prevalencia de aislados hipermutadores se observó igualmente a nivel interpaciente en la colección de *P. aeruginosa* obtenida a partir de diferentes pacientes FQ argentinos (CFL), en la cual de un total de 38 aislados, el 42% fueron deficientes en el MRS, estando el 46% de los pacientes analizados infectados con cepas hipermutadoras.

En poblaciones naturales, los alelos hipermutadores se generan constantemente a partir de cepas no mutadoras, como consecuencia de mutaciones estocásticas en genes relacionados con la reparación del ADN. Ocasionalmente, la prevalencia de estos alelos en una población puede incrementarse por selección indirecta, debido a su asociación con mutaciones beneficiosas [29, 238-239]. Sin embargo, es necesario que los alelos beneficiosos sean lo suficientemente favorables a nivel adaptativo como para superar el costo acarreado por la hipermutabilidad.

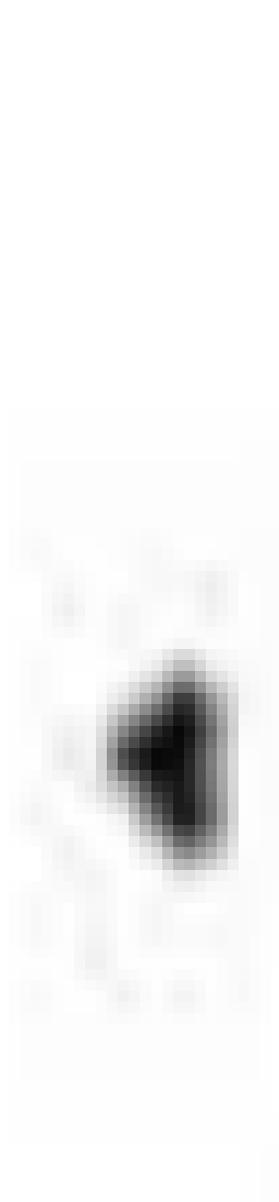
Los resultados obtenidos en el presente estudio constituyen una paradoja interesante, ya que la evolución a largo plazo de las cepas de *P. aeruginosa* en CFA y CFD por un lado condujo a la predominancia de hipermutadoras en las poblaciones naturales infectantes, pero por el otro demostró evidencias de una selección purificadora y/o deriva genética, indicando la acumulación de un número elevado de mutaciones deletéreas o neutras respectivamente. La paradoja podría resolverse si se plantea una historia evolutiva dominada por deriva génica en la que la mayoría del alto número de mutaciones acumuladas es de carácter neutro para el ambiente FQ, con sólo algunas de ellas deletéreas (cuyas células que las adquirieron habrían sido eliminadas/purificadas de la población) pero con algunas beneficiosas (Tabla R12), permitiendo en combinación una mayor competitividad y finalmente dominancia de los clones hipermutadores, tal cual se observa en el panorama instantáneo brindado por el análisis transversal realizado. Asimismo, una vez que los clones hipermutadores alcanzaron el nivel de dominancia observado (100% para CFA y  $\geq 90\%$  para CFD), la competencia con clones no mutadores habría

prácticamente desaparecido y sólo la población se vería afectada por fenómenos de interferencia clonal, pero entre clones hipermutadores.

Las vías aéreas FQ crónicamente infectadas constituyen un hábitat sumamente peculiar, en donde la bacteria se enfrenta a una respuesta agresiva constante del sistema inmune, a una intensa terapia con antibióticos y/o a una competencia con otros microorganismos. Sin embargo, la protección brindada por su crecimiento en *biofilms* finalmente permite su proliferación y persistencia. A esto se suma que por otro lado, este ambiente posee ciertas características que lo vuelven sumamente permisivo. En este sentido el esputo purulento FQ representa un excelente sustrato en términos nutritivos para el crecimiento de *P. aeruginosa* [100, 233-234], ya que básicamente constituye una mezcla acuosa de electrolitos, glicoproteínas, proteínas, aminoácidos, ADN y lípidos [235-236].

Así, los pulmones FQ ofrecen condiciones complejas donde múltiples mutaciones beneficiosas son posibles y necesarias para sobrevivir, dando ventajas a cepas hipermutadoras, pero donde asimismo, frente a condiciones nutritivas tan favorables, una importante cantidad de funciones dejan de ser necesarias para la supervivencia, haciendo que su inactivación sea neutra en el ambiente FQ en particular. En este sentido, se ha descrito que los aislados FQ acumulan un número muy elevado de auxotrofias, el más elevado observado en relación a otros ambientes [233]. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos al analizar las funciones catabólicas de los aislados de las colecciones CFA y CFD, donde se observa un patrón general de disminución de las actividades catabólicas totales (Figura R15), el cual parecería ser un fenotipo adaptado característico de cepas de *P. aeruginosa* evolucionando por largos períodos en el pulmón FQ, ya que se ha observado incluso en cepas no mutadoras que presentan una acumulación de mutaciones significativamente menor [136].

La adaptación bacteriana a las condiciones ambientales del hospedador en un sistema de evolución a largo plazo generalmente supone una evolución reduccionista, en la cual funciones génicas no esenciales para ese ambiente en particular pueden perderse a lo largo del tiempo conllevando a la formación de pseudogenes [240]. En este sentido, es posible especular que *P. aeruginosa* posee un potencial genómico suficiente para sufrir una evolución de tipo reduccionista, potencial que incluye una cantidad remarcable de genes



(~6000) cuyas funciones podrían ser redundantes y/o dispensables en el ambiente del hospedador.

De esta manera se podría hipotetizar que *P. aeruginosa*, en el contexto particular de las infecciones crónicas FQ, sufre un proceso de especialización en el cual, a través fundamentalmente de eventos mutagénicos y pseudogenización, se conforma un genoma mínimo esencial que le permite persistir en forma crónica en ese ambiente. En este sentido, se ha propuesto, a través del estudio de un clon epidémico de *P. aeruginosa* (DK2), que el proceso evolutivo a lo largo de 35 años de transmisión paciente/paciente ha conllevado a un grado de especialización tal que permitirían definir a este clon como un patógeno primario de pacientes FQ, incapaz de sobrevivir en otros ambientes [136].

Cabe destacar que existen antecedentes previos contradictorios con respecto a si la evolución de *P. aeruginosa* en el ambiente FQ es por selección positiva [88] o selección negativa [136]. Los resultados del presente trabajo coinciden claramente con la segunda posibilidad, lo cual sugiere que la selección negativa y/o deriva génica no es exclusivo de cepas hipermutadoras, sino característico de los procesos de adaptación genética que subyacen a la persistencia de *P. aeruginosa* en las infecciones pulmonares crónicas.

Conforme a la especulación de una evolución dominada por deriva génica con acumulación de mutaciones fundamentalmente neutras, en el presente trabajo se observó que la mayoría de las mutaciones se habrían distribuido al azar entre los ~6000 genes del genoma de *P. aeruginosa* (Figura R8). Sin embargo, en este contexto general de pseudogenización y evolución reduccionista, podría existir una selección positiva de ciertas mutaciones beneficiosas. Esto coincide con la observación de que existen genes que habrían sido positivamente seleccionados durante la evolución de ambos linajes de CFA y CFD (Tabla R12), los cuales codifican para funciones asociadas con la patoadaptación al ambiente FQ, tales como resistencia a antibióticos, virulencia, movilidad y adhesión. Es importante destacar que entre estos genes, *fisI*, *mexY*, *relA*, *fusA1* y *rnr* fueron previamente reportados por presentar mutaciones en un contexto de infección crónica FQ [205, 217], lo que amplía las evidencias del paralelismo evolutivo experimentado por otros linajes de *P. aeruginosa*.

En conclusión, se postula que la disponibilidad de ciertas mutaciones beneficiosas, combinada con evidencias de una evolución neutra, propició las condiciones que

conllevaron a incrementar la proporción de cepas hipermutadoras hasta su elevada predominancia en las poblaciones CFA y CFD.

### 3. DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL POBLACIONAL Y SESGO MUTACIONAL HACIA GENES CON SSRs DURANTE LA EVOLUCIÓN DE *P. AERUGINOSA* EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS FQ

Las vías genéticas evolutivas que conducen a la adquisición del fenotipo crónico FQ podrían consistir tanto de efectos aditivos producidos por diversas mutaciones en varios genes a nivel global, como por la adquisición de pocas mutaciones con efectos pleiotrópicos, por ejemplo en genes que codifican para reguladores transcripcionales. Así, la identificación de mutaciones adaptativas pleiotrópicas en genes regulatorios ha sido un descubrimiento recurrente en varios experimentos de evolución en poblaciones microbianas tanto en condiciones de laboratorio [241-244] como en poblaciones aisladas de sistemas *in vivo* [136]. En este sentido, se observó que los aislados de ambos linajes CFA y CFD estuvieron alterados en al menos uno de los reguladores globales, *mucA*, *algU*, *lasR*, y *rpoN* (Tabla R10), previamente descritos como claves en el proceso adaptativo al pulmón FQ [136, 208]. Sin embargo, no se observó una única vía de mutagénesis en los mismos, ya que en general, se evidenciaron distintas combinaciones de mutaciones entre los distintos clusters y en forma comparativa, entre los distintos linajes. De la misma manera, cuando se analizó de manera global la mutagénesis en cada uno de los genomas secuenciados, considerando por un lado el número total de SNPs acumulados y por otro el número total de genes mutados por SNPs no sinónimos e indels en cada uno de los genomas de CFA y CFD ("mutagenomas") (Figura R7 y R8), se observó una significativa diversidad genética. Por lo tanto, sería posible plantear que cada mutación en forma específica así como sus combinaciones particulares en cada genoma resultaron en fenotipos característicos pero igualmente exitosos en el ambiente FQ. En relación con esto, previamente se ha reportado que los genes requeridos para la patogenicidad en una cepa de *P. aeruginosa* pueden ser dispensables o no predictivos para la virulencia en otras, sugiriendo que la virulencia en *P. aeruginosa* es tanto multifactorial como combinatorial, y resulta de un grupo de genes relacionados con la patogenicidad que interactúan en varias combinaciones en diferentes *backgrounds* [71].

La variación genética observada en ambos linajes hipermutadores CFA y CFD, tanto entre aislados clonales de un mismo paciente (análisis transversal) como en aislados entre pacientes, indica que la adaptación al ambiente pulmonar ocurre a través de múltiples vías evolutivas. En este sentido, a pesar de que se ha estudiado recientemente la diversidad a nivel fenotípico en *P. aeruginosa* a partir de estudios poblacionales [245-247] no existen reportes previos con respecto al estudio de la estructura de la población a nivel genético. Una posible explicación de la diversidad genética observada podría estar relacionada con la capacidad de *P. aeruginosa* de crecer en comunidades de *biofilms*. Los *biofilms* constituyen ambientes estructurados espacial y temporalmente [248], en los cuales existen microambientes heterogéneos, definidos principalmente por limitaciones de oxígeno y nutrientes [249], de modo que la adaptación a este ambiente podría inducir a fenómenos de diversificación genética [250]. En línea con esto, en el laboratorio previamente se demostró *in vitro* que cepas de *P. aeruginosa* deficientes en el MRS tienen una adaptación incrementada en condiciones de crecimiento en *biofilms* con respecto a cepas silvestres, ventaja que estaría asociada con las tasas mayores de diversificación fenotípica que poseen las cepas hipermutadoras [251].

Así, la radiación adaptativa, a través de la evolución de múltiples linajes aptos para ocupar los diversos nichos disponibles [252-253], es tal vez la teoría más atractiva para explicar la emergencia de tal diversidad poblacional de *P. aeruginosa* en el ambiente FQ. En relación con esto, Lee y colaboradores observaron una gran diversificación en poblaciones de *E. coli* en un sistema de infección en ratón por un período de 1000 días, lo cual se corresponde con ~20.000 generaciones [254]. De manera similar, *P. fluorescens* rápidamente diversifica en varios especialistas de nicho en cuestión de días en un ambiente heterogéneo [250]. Estos ejemplos enfatizan aún más cómo la heterogeneidad temporo espacial y la compartimentación de nicho pueden llevar a la generación de diversidad, tal cual sucedería en el complejo y dinámico ambiente FQ. La diversidad genética observada en las poblaciones de ambos linajes CFA y CFD vuelve a remarcar la importancia de realizar estudios transversales incluyendo numerosos aislados para poder abordar conclusiones generales acerca de la estructura de una población bacteriana a las que no se podrían llegar a través de análisis de un número pequeño de muestras.

El impacto de la hipermutabilidad en la evolución de los linajes CFA y CFD de *P. aeruginosa* durante el transcurso de la infección pulmonar crónica se evidenció por su lado a través de una marcada propensión a la mutación de ciertas secuencias en regiones codificantes o intergénicas que poseen SSRs. Esta observación claramente indica que genes que mantienen SSRs en su región codificante pueden tener un rol en la patoadaptación de la bacteria, lo cual se ve favorecido en un *background* deficiente en el MRS. En este sentido, en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo y en conjunto con estudios previos del laboratorio [210] se puede concluir que existe una clara asociación entre la deficiencia en el MRS y la inestabilidad de las SSRs G:C, asociación en la que la hipermutabilidad ejerce un efecto global a lo largo de todo el genoma a través de la marcada tendencia a mutar de aquellos genes que contienen largas SSRs, particularmente de G:C. De esta manera, el impacto de la hipermutabilidad durante la evolución de *P. aeruginosa* en el ambiente FQ no es meramente una mayor y acelerada adquisición de mutaciones en términos cuantitativos, sino que la calidad de esas mutaciones, signada por un espectro dominado por deleciones pequeñas en SSRs G:C, tendría asimismo un rol relevante en el proceso evolutivo y en la consecuente competitividad de las cepas hipermutadoras. Si sumado a esto, se considera que la adaptación y persistencia a este ambiente tan particular se manifiesta a través de la selección de combinaciones genéticas múltiples [71], la hipermutabilidad como una fuente constante de variabilidad, podría ser seleccionada y sostenida a largo plazo durante el proceso infeccioso.

#### **4. FENÓMENO DE DISMINUCIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIÓN EN CEPAS DE *P. AERUGINOSA* DEFICIENTES EN EL MRS EN INFECCIONES CRÓNICAS FQ**

Entre los resultados relevantes de la presente investigación, cabe destacar el fenómeno de disminución de la frecuencia de mutación en 5 aislados deficientes en el MRS pertenecientes al linaje CFD. Notablemente, estos 5 aislados evolucionaron conformando un mismo cluster (Cluster IV, Figura R7B) y a pesar de sus bajas frecuencias de mutación (semejantes a las calculadas para la cepa de referencia PAO1), fueron paradójicamente los aislados que más SNPs acumularon durante el período evolutivo analizado (Tabla R7, Figura R7B). El análisis transversal de la población de *P. aeruginosa* CFD\_2011 reveló que

esta subpoblación no mutadora es pequeña, constituyendo el 6% del total, frente a una gran mayoría que presentó un fenotipo hipermutador. Sin embargo, ambas subpoblaciones hipermutadora y no mutadora fueron deficientes en el MRS, si se considera la presencia de mutaciones de pérdida de función en el gen *mutS* (Tabla R5). En este sentido, una mutación de delección (-CG<sub>1551</sub>) conservada a lo largo de la evolución, estuvo presente en todos los aislados CFD analizados, aunque los aislados no mutadores presentaron adicionalmente una inserción (+CC<sub>334</sub>) aguas arriba de esa delección (Tabla R5). Además de la presencia de la mutación -CG<sub>1551</sub>, el análisis filogenético demostró que los aislados CFD\_2011 no mutadores agrupados en el Cluster IV presentaron ramas en común tanto con los aislados hipermutadores ancestrales, CFD\_1995/01 y CFD\_2002/01, como los hipermutadores contemporáneos (ramas D, F, y H, Figura R7B), indicando que habrían surgido a partir de una población mutadora en algún punto indeterminado de la rama J.

La reducción de la tasa de mutación puede lograrse a través de varios mecanismos: (i) reversión de la mutación que genera la hipermutabilidad, (ii) readquisición de un alelo silvestre del gen anti-mutador a partir de una bacteria no mutadora a través de transferencia genética horizontal [202-203, 255], (iii) adquisición de mutaciones compensatorias en otros genes [256-258].

Particularmente, la disminución en la frecuencia de mutación en los aislados CFD\_2011 deficientes en el MRS se produjo por un mecanismo diferente a la restauración del gen alterado responsable de la hipermutabilidad, ya que no sólo no se produjo la reversión de la delección -CG<sub>1551</sub> en el gen *mutS*, sino que adicionalmente la nueva mutación de inserción +CC<sub>334</sub> no sólo no restableció el marco de lectura causado por -CG<sub>1551</sub> sino que tampoco restauró la función de *mutS*, de acuerdo a ensayos de complementación génica. La posibilidad de adquirir una copia silvestre de *mutS* en los aislados no mutadores fue otro mecanismo descartado, ya que no se encontró en ninguno de los genomas del Cluster IV una copia duplicada de *mutS*. En base a estos resultados, la explicación más probable del fenómeno observado sería la emergencia de mutaciones secundarias capaces de compensar la hipermutabilidad producida por la alteración de *mutS*. De ser este el mecanismo responsable, es de esperar que las mutaciones compensatorias se hayan producido en algún punto de la rama J durante la evolución de una de las subpoblaciones hipermutadoras del linaje CFD (Figura R7B). En este sentido, el análisis de mutaciones que

alteran 112 genes o regiones intergénicas, cuyas funciones están relacionadas con la replicación, recombinación y reparación del ADN, el estrés oxidativo, y la respuesta SOS, demostró que sólo 8 genes (*mutM*, *ahpF*, *phr*, *dxsA*, PA2138, *polB*, *hola*, y *recD*) estuvieron diferencialmente mutados en el Cluster IV de CFD (Tabla R8). Es importante destacar en este punto que no existen evidencias ni antecedentes previos con respecto a que, o bien individualmente o bien en distintas combinaciones, las mutaciones observadas en los 8 genes mencionados pudieran complementar la deficiencia en *mutS*. Notablemente, uno de los genes mutados fue *mutM*, quien junto con los genes *mutY* y *mutT*, es uno de los componentes del sistema de reparación GO, el cual previene mutaciones causadas por lesiones oxidativas en el ADN [259-260] y cuya inactivación produce un estado de hipermutabilidad débil, 4 veces superior respecto a clones no mutadores [261]. De esta manera, los aislados CFD no mutadores tendrían alterado tanto el MRS, por mutaciones en el gen *mutS* (Tabla R5), y el Sistema GO, específicamente a través de una mutación con cambio de sentido en el gen *mutM* (Tabla R8). Sin embargo, en lugar de esperar que la alteración en ambos sistemas pudiera complementarse, cabe suponer que las mismas incrementarían aún más la frecuencia de mutación. Por otra parte, el gen *polB* también estuvo alterado en los aislados no mutadores. *polB* codifica para Polimerasa II (Pol II) [262] y su función en *E. coli* está relacionada con la respuesta SOS bajo el control del represor LexA [263]. Como parte de la respuesta SOS, Pol II está involucrada en la reparación del ADN dañado por radiación UV [264] u oxidación [265], siendo capaz de catalizar el *bypass* de lesiones abásicas cuando no se inducen genes relacionados con shock térmico [266]. De esta manera, la alteración de la función de Pol II tampoco estaría dando indicios evidentes de que, en combinación con la deficiencia del MRS, podría reducir la tasa de mutación. En relación al resto de los genes, *ahpF* es un gen que codifica para la subunidad F de una alquil hidroperóxido reductasa [267], y está involucrado en defensa al estrés oxidativo; *phr* codifica para una fotoliasa [268]; mientras que el gen *dxsA* codifica para una proteína supresora, dosis dependiente, de una mutación de delección en el gen *dnaK* [269]. Por su lado, PA2138 posee una función putativa como ligasa dependiente de ATP [270]. Finalmente, resultan de particular interés las mutaciones observadas en los genes *hola* y *recD*. Particularmente, *hola* codifica para la subunidad delta de la Pol III [271], la cual participa en la replicación del ADN [272], constituyendo así un gen esencial

[273]. Por su parte, *recD* codifica para una de las subunidades de la exonucleasa V (ExoV) [274], la cual posee un rol crucial en la recombinación homóloga de ADN y el mantenimiento de la viabilidad celular [275]. Debido a esto, se podría sugerir que la pérdida de función simultánea de estos dos genes podría conducir a una marcada disminución en la viabilidad celular y/o muerte celular. Sin embargo, la viabilidad de los clones no mutadores incluidos en el Cluster IV no estuvo evidente y comparativamente alterada de acuerdo a curvas de crecimiento realizadas *in vitro* (resultados no mostrados). Teniendo en cuenta que las mutaciones observadas en *holA* y *recD* fueron puntuales y de cambio de sentido, puede especularse que las mismas no generen pérdida de función en las proteínas correspondientes, sino que, o bien son silenciosas a nivel funcional o alteran pero no inactivan las funciones de las mismas. Así, si la alteración de la función de estas proteínas produjera una mínima disminución en la viabilidad de las células, no perceptible en cultivos puros en medios nutritivos ricos de laboratorio, la frecuencia de mutación podría verse disminuida, produciéndose un fenómeno de compensación de la hipermutabilidad no directamente relacionado con el control de la tasa de mutagénesis sino con la viabilidad celular. En este sentido, es importante mencionar un trabajo muy reciente llevado a cabo con cepas de *E. coli* deficientes en *mutS* en ensayos de evolución *in vitro* en el que observan que un porcentaje de las mismas sufre una disminución en la frecuencia de mutación [206]. Las cepas en las que se produce el fenómeno mantienen la mutación en *mutS* y el mecanismo de compensación se produce a través de mutaciones secundarias en genes particularmente relacionados a protección contra el estrés oxidativo, incluyendo el regulador global *arcA* (involucrado en el control de la respiración aeróbica), *furA* (fumarato reductasa), y *atpF* (subunidad A de la ATP sintetasa). Notablemente, por análisis de transcriptoma, el trabajo determina que la alteración de los genes mencionados conlleva a la expresión incrementada de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, tales como KatG y SodA, y consecuentemente a la prevención de daños en el ADN a través de la eliminación de ROS endógenos. De esta manera, el mecanismo de disminución de la frecuencia de mutación no está directamente relacionado con el control de la tasa de mutación, sino indirectamente a través de la respuesta al estrés oxidativo [206]. En coincidencia con esto, se describió previamente que la sobreexpresión de genes

relacionados con la reducción intracelular de ROS disminuye la tasa de mutación [257, 276-277].

Si bien ninguno de los aislados no mutadores CFD deficientes en *mutS* presentaron mutaciones en los genes *arcA*, *furA*, y *atpF*, si presentaron mutaciones en el gen *ahpF*, implicado directamente en la defensa al estrés oxidativo [267]. Del mismo modo, es posible que la alteración de las funciones de las proteínas codificadas por alguno de los 7 genes restantes genere igualmente estados de estrés oxidativo, disparando mecanismos de respuestas que conlleven a la sobreexpresión de genes y la consecuente disminución de los niveles de ROS y daños en el ADN, e indirectamente disminuya la frecuencia de mutación. Ciertamente, las posibilidades planteadas quedan aún por dilucidar e investigaciones tendientes a explorar en forma global y comparativa la expresión génica en estos aislados, puede dar nuevas evidencias que permitan entender el mecanismo por el cual se produjo la disminución de la frecuencia de mutación en los mismos.

## 5. HIPERMUTABILIDAD ESTABLE Y SU ASOCIACIÓN A LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS: EL FENÓMENO DE LA EMERGENCIA DE CEPAS HIPERMUTADORAS EN INFECCIONES CRÓNICAS FQ

Tal como se mencionó anteriormente, una de las hipótesis que explica la alta prevalencia de cepas bacterianas hipermutadoras en determinadas condiciones o ambientes es su selección en segundo orden con mutaciones beneficiosas [29]. Particularmente referido a la alta prevalencia de hipermutadoras estables de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares crónicas FQ, la resistencia a antibióticos ha sido el rasgo más asociado con la hipermutabilidad, tanto por aproximaciones *in vitro* como *in vivo* [21, 167, 172-174, 181]. Así, se ha establecido en varios trabajos una asociación entre la hipermutabilidad y la emergencia de mutaciones que confieren resistencia a antibióticos en aislados FQ de *P. aeruginosa* [167-168, 172, 193, 237]. Asimismo, esta asociación no sólo se ha observado en cepas de *P. aeruginosa*, sino que la misma se ha extendido incluso a otras bacterias como *S. aureus* [18] y *H. influenzae* [177]. Adicionalmente, ha sido reportada en otras infecciones crónicas en pacientes no FQ, como aquellas producidas en pacientes con bronquiectasia o EPOC [173]. Sin embargo, la resistencia a antibióticos es un rasgo igualmente observado en infecciones agudas en las que la frecuencia de cepas

hipermutadoras es prácticamente indetectable [175], manteniéndose de este modo la controversia. De hecho, en un estudio realizado por Mena y colaboradores no se encuentran diferencias entre los aislados hipermutadores y no mutadores respecto a la distribución de mutaciones en genes que confieren resistencia a antibióticos [135].

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación se observó que la hipermutabilidad por deficiencia en el MRS estuvo asociada con una mayor resistencia, pero sólo con respecto a algunos antibióticos (Tabla R3). Asimismo, no fue clara su asociación con mutaciones en genes implicados en la generación de resistencia, tales como *mexZ* (Figura R2). Cabe recordar que la inactivación de *mexZ* produce una sobreproducción de la bomba de eflujo MexXY, constituyendo uno de los mecanismos más reportados en la adquisición de resistencia a aminoglicósidos y otras drogas en aislados FQ. De hecho, el análisis de la prevalencia de mutaciones en la colección de aislados de *P. aeruginosa* CFL, demostró que *mexZ* es el gen más mutado entre todos los analizados, confirmando su relevancia en la adquisición de resistencia a aminoglicósidos en infecciones FQ, a pesar de que la participación de otros mecanismos parecen ser igualmente importantes (Figura R3) [165, 278-279].

Respecto al estudio la evolución genómica de los dos linajes hipermutadores de *P. aeruginosa* de CFA y CFD en el transcurso de la infección pulmonar crónica FQ, se observó que en el conjunto de genes que habrían sufrido una selección positiva por su potencial rol en la patoadaptación, se encontraron 4, *fisI*, *ampC*, *mexY*, y *mexF*, relacionados con la resistencia a antibióticos (Tabla R12). Sin embargo, el bagaje de genes que *P. aeruginosa* posee para lograr adquirir resistencia a múltiples antibióticos es considerablemente mayor incluyendo aproximadamente 63 genes ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), por lo que los datos obtenidos no permiten nuevamente establecer una asociación clara entre estos mecanismos y la hipermutabilidad. De esta manera, aunque el debate permanece ciertamente abierto, los resultados del presente trabajo permiten concluir que la hipermutabilidad en infecciones pulmonares crónicas no estaría asociada a ningún rasgo o fenotipo adaptativo en forma específica o particular, ni siquiera los implicados en la resistencia a antibióticos, sino más bien con un efecto general ejercido en forma global sobre el genoma de *P. aeruginosa*.

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo constituye un avance importante hacia el esclarecimiento del impacto de la hipermutabilidad causada por deficiencias en el MRS en la estructura del genoma de poblaciones de *P. aeruginosa*, particularmente durante procesos evolutivos a largo plazo en infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ. Así, a partir de las investigaciones realizadas en esta tesis pueden destacarse las siguientes conclusiones:

1) Existe una fuerte selección, prevalencia y dominancia del fenotipo hipermutador debido a la deficiencia en el MRS en aislados FQ de *P. aeruginosa*.

2) La hipermutabilidad estable no está asociada a la emergencia de mutaciones adaptativas en los genes *mucA*, *lasR* y *mexZ*, sugiriendo que la misma tendría un efecto general sobre los genes durante el proceso de adaptación de *P. aeruginosa* al ambiente FQ, sin estar relacionado con algún fenotipo adaptativo en particular.

3) La evolución a largo plazo en infecciones pulmonares crónicas FQ de cepas de *P. aeruginosa* deficientes en el MRS está signada por una selección negativa y/o por deriva génica, destacándose una significativa diversidad genética a nivel poblacional basada en una marcada acumulación de mutaciones.

4) La adaptación al ambiente FQ revela fenómenos de evolución paralela en ciertos genes asociados con la patoadaptación, como así también una convergencia fenotípica en cuanto a la disminución de funciones relacionadas con el catabolismo.

5) La deficiencia en el MRS, en combinación con las SSRs, sesga la mutagénesis hacia determinadas vías génicas durante la evolución de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares crónicas FQ.

6) La evolución en el ambiente FQ de una población hipermutadora de *P. aeruginosa* deficiente en el MRS incluyó un fenómeno de disminución de la frecuencia de mutación. Si bien queda aún por elucidar el mecanismo subyacente a tal fenómeno, la adquisición de mutaciones compensatorias parecería ser la explicación más probable.

De esta manera, los resultados obtenidos en esta tesis, dan lugar a nuevos interrogantes que podrían constituir el punto de partida de futuros estudios, dentro de los que podría destacarse: i) ¿Cuál es el mecanismo implicado en la disminución de la frecuencia de mutación en aislados FQ de *P. aeruginosa* deficientes en el MRS? ii) ¿Cuál es la composición genómica mínima de *P. aeruginosa* necesaria para persistir en el ambiente FQ?

Investigaciones dirigidas a responder estos interrogantes ciertamente proporcionarán nuevos datos y evidencias que permitirán avanzar en el entendimiento de las distintas estrategias que *P. aeruginosa* despliega para lograr adaptarse y persistir en el particular ambiente del pulmón FQ, brindando potenciales herramientas que permitan finalmente el control de las infecciones por ella causadas.

Los resultados obtenidos en el transcurso de esta tesis dieron lugar a la redacción y publicación de los siguientes artículos científicos:

- **Feliziani S.**, Luján A.M., Moyano A.J., Sola C., Bocco J.L., Montanaro P., Fernández Canigia L., Argaraña C.E., Smania A.M. "Mucoidy, Quorum Sensing, Mismatch Repair and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Chronic Airways Infections". (2010). PLoS ONE, Volume 5: e12669. ISSN 1932-6203.

- Moyano A.J., **Feliziani S.**, Di Rienzo J.A., Smania A.M. "Simple sequence repeats together with mismatch repair deficiency can bias mutagenic pathways in *Pseudomonas aruginosa* during chronic lung infection". (2013). PLoS ONE, Volume 8: e80514. ISSN 1932-6203.

- **Feliziani S.**, Marving R.L., Luján A.M., Moyano A.J., Di Rienzo J.A., Krogh Johansen H., Molin S., Smania A.M. "Genomic evolution of *Pseudomonas aeruginosa* mutator populations in cystic fibrosis chronic airway infections". Trabajo inédito en redacción para ser enviado a la revista Genome Biology.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este estudio se detallan en la Tabla M1.

Para el cultivo rutinario de bacterias se utilizó medio rico Luria-Bertani (LB): peptona de soja, 10,0 g/L; extracto de levadura, 5,0 g/L; NaCl, 10,0 g/L. Para obtener los medios de cultivos sólidos se adicionó agar-agar 12,0 g/L (LB-agar).

Los antibióticos se utilizaron en las siguientes concentraciones, a menos que se indique de otra manera: rifampicina (Rf), 300 µg/mL; estreptomicina (Sm), 500 µg/mL; gentamicina (Gm), 150 µg/mL; kanamicina (Km), 250 µg/mL; ciprofloxacina (Cp), 1 µg/mL.

Las distintas cepas bacterianas fueron mantenidas y conservadas en stocks de glicerol al 15% a -70°C. Para los diferentes ensayos, las cepas de los stocks congelados fueron revividas rutinariamente en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB-agar (adicionado con antibióticos si fuera necesario), mediante incubación durante 24 hs a 37°C. Los inóculos fueron preparados mediante el uso de cultivos crecidos en medio LB líquido (adicionado con antibióticos si fuera necesario) durante toda la noche (ON) a 37°C con agitación constante a 250 rpm.

## OBTENCIÓN DE LAS COLECCIONES DE AISLADOS DE *P. AERUGINOSA* PROVENIENTES DE INFECCIONES CRÓNICAS DE PACIENTES FQ

En el presente trabajo se obtuvieron tres grandes colecciones de aislados FQ de *P. aeruginosa*. Por un lado, y con el objetivo de analizar la asociación *in vivo* entre la hipermutabilidad y la emergencia de los fenotipos mucóide, deficiente en quórum sensing y de resistencia a antibióticos (Capítulo 1), se confeccionó una colección de aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de varios pacientes argentinos con FQ (colección CFL). Por otro lado, se obtuvieron dos grandes colecciones de aislados obtenidos de dos pacientes FQ, uno argentino (colección CFA) y otro danés (colección CFD), con el propósito de estudiar la evolución genómica de *P. aeruginosa* deficientes en el MRS durante el transcurso de una infección pulmonar crónica, a través de un análisis longitudinal y transversal (Capítulo 2).

Tabla MI. Cepas bacterianas, vectores y oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Cepas	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	silvestre; fototrófica	[1]
PAO1MS	$\Delta mutS$ ; Km <sup>r</sup>	Oliver unpublished
PAO1ML	$\Delta mutL$ ; Km <sup>r</sup>	Oliver unpublished
MPAOMS	<i>mutS</i> :: <i>ISlacZA/hah</i> (MPA32417); Tc <sup>r</sup>	[2]
MPAOML	<i>mutL</i> :: <i>ISlacZA/hah</i> (MPA46306); Tc <sup>r</sup>	[2]
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Huésped para manipulación de ADN	Invitrogen
<b>Plásmidos</b>		
pMCS_ <i>mutS</i>	pBBR1MCS-5 conteniendo <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> ; Gm <sup>r</sup>	[3]
pMCS_ <i>mutL</i>	pBBR1MCS-5 conteniendo <i>mutL</i> de <i>P. aeruginosa</i> ; Gm <sup>r</sup>	[4]
pMCS_ <i>mutS</i> <sup>CG1551</sup>	pBBR1MCS-5 conteniendo <i>mutS</i> de CFD_2011/27; Gm <sup>r</sup>	Este estudio
pMCS_ <i>mutS</i> <sup>CC134-CG1551</sup>	pBBR1MCS-5 conteniendo <i>mutS</i> de CFD_2011/11; Gm <sup>r</sup>	Este estudio
<b>Oligonucleótidos</b>		
272	AGCGGGCCAA	[5]
<i>mucA</i> -for	GAAGCCTGACACAGCGGCAAATGC	Este estudio
<i>mucA</i> -rev	CCTCAGCGGTTTTCCAGGCTGGCTGC	Este estudio
<i>lasR</i> -for	CACGGGCGCATGCGCCTC	Este estudio
<i>lasR</i> -rev	AAGCTTCTATATAGAAGGGCA	Este estudio
<i>mexZ</i> -for	CGCGACAGTAGCATATAATC	Este estudio
<i>mexZ</i> -rev	TACATCGACGGCAAGCGCCT	Este estudio
<i>mutS</i> -for1	GCCCGTATGACCGACCTCT	Este estudio
<i>mutS</i> -rev1	CCGAGTCGCGATCGAAGT	Este estudio
<i>mutS</i> -for2	CCGCGCGCCATGGGACTTCGAT	Este estudio
<i>mutS</i> -rev2	TTCGGCGAGTTCGGGATA	Este estudio
<i>mutS</i> -for3	CACCACCATCGGCACCTAT	Este estudio
<i>mutS</i> -rev3	GTTGGCCACGAACGGTGT	Este estudio
<i>mutS</i> -for4	TGGTCGAGCAGGTGCTGG	Este estudio
<i>mutS</i> -rev4	ATTCTAGCAGCTTGTGCGG	Este estudio
<i>mutL</i> -for1	ACAGCCTGTCCAGCGACAAC	Este estudio
<i>mutL</i> -rev1	CTCGTCTCGCGCCTCGTGCA	Este estudio
<i>mutL</i> -for2	TGCACGAGGCGCGAGACGAG	Este estudio
<i>mutL</i> -rev2	TAACGGCGCGAAGTAGGCCTT	Este estudio
<i>mutL</i> -for3	AAGGCCTACTTCGCGCCGTTA	Este estudio
<i>mutL</i> -rev3	AGGCAGGGAAGACATCGGAAC	Este estudio
PA0929-for	GACGATTATCTGCCGAAGCCT	Este estudio
PA0929-rev	GGTATTCGGTCGGCGTCA	Este estudio
PA1127-for	GCAAGTCCGACCCGAAGTT	Este estudio
PA1127-rev	GTCCTTGAGAAAACCGCCA	Este estudio
PA4568//PA4569-for	TAAACCTGCTCACCCGACG	Este estudio
PA4568//PA4569-rev	TGTAGCCCAGGGTCTTGCC	Este estudio

Km<sup>r</sup>, resistencia a kanamicina; Tc<sup>r</sup>, resistencia a tetraciclina; Gm<sup>r</sup>, resistencia a gentamicina.

Para la confección de la colección local CFL, se obtuvieron 38 aislados de *P. aeruginosa* provenientes de 26 pacientes FQ crónicamente infectados. Dichos aislados fueron obtenidos tanto del Laboratorio de Bacteriología del Hospital de Niños Santísima Trinidad de Córdoba (HNC) (18 aislados; 12 pacientes; rango de edad, 5 a 20 años; edad promedio, 13,6) como del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán de Buenos Aires (HABA) (20 aislados; 14 pacientes; rango de edad, 15 a 43 años; edad promedio, 27,7). En todos los casos el material de partida para la obtención de los aislados fue esputo de los pacientes obtenido por expectoración, utilizando metodologías bacteriológicas de aislamiento convencionales, lo cual fue realizado en estrecha colaboración con la Dra. Patricia Montanaro (HNC) y la Dra. Liliana Fernández Canigia (HABA). Es importante destacar que para la confección de esta colección los aislamientos fueron realizados de acuerdo a los siguientes criterios: 1) aislados obtenidos a partir de pacientes con al menos cuatro años de colonización documentada con *P. aeruginosa*, lo cual asegura que la infección se ha establecido de forma crónica; 2) en caso de aislados provenientes del mismo paciente, se consideró como necesario que los mismos presentaran morfologías de colonia diferentes, fundamentalmente en relación a mucoidicidad, pigmentación, tamaño de colonia y/o diferencias en cuanto a la susceptibilidad a diversos antibióticos; 3) en caso de ser aislados provenientes del mismo paciente y con las mismas características morfotípicas, se consideró como necesario que las cepas se aislaran con una diferencia de al menos un año.

Para la construcción de las otras dos colecciones, los aislados de *P. aeruginosa* se obtuvieron a partir de dos pacientes FQ aquí denominados CFA del HNC y CFD del Copenhagen CF Center (Copenhague, Dinamarca). La infección crónica con *P. aeruginosa* fue documentada desde el año 2001 y 1986 en CFA y CFD respectivamente, siendo la misma definida a partir de la presencia persistente de *P. aeruginosa* en muestras de esputo por al menos 4 años consecutivos o la presencia de dos o más anticuerpos precipitantes contra *P. aeruginosa* [196]. En el momento del primer aislamiento los pacientes CFA y CFD tenían 8 y 23 años de edad respectivamente. Para abordar el análisis longitudinal, se obtuvieron distintos aislados recolectados en distintos tiempos a lo largo de varios años de la infección, abarcando 6 años en el paciente CFA y 20 años en CFD (Figura R4). Para lograr el análisis transversal, se obtuvieron 90 aislados contemporáneos de *P. aeruginosa*, los cuales fueron obtenidos simultáneamente al azar a partir de una única muestra de esputo

de cada paciente (Figura R4). Para ello, se recolectaron muestras de esputo de los pacientes FQ por expectoración durante visitas de rutina a los hospitales y una vez adquiridos fueron instantáneamente almacenados en hielo e inmediatamente procesados. El esputo fue licuificado por la adición de un volumen igual de Sputolysin (Calbiochem), diluido y sembrado en placas de LB-agar selectivas para especies de *Pseudomonas* (BD Biosciences). Es importante mencionar que para la construcción de las colecciones CFA y CFD, los pacientes fueron elegidos teniendo en cuenta los siguientes criterios: 1) estar infectados crónicamente por *P. aeruginosa*; 2) presentar un único linaje clonal de *P. aeruginosa* infectivo; 3) carecer de clones transmisibles de *P. aeruginosa*; 4) haber adquirido *P. aeruginosa* hipermutadoras deficientes en el MRS en el transcurso de la infección.

Todos los aislados clínicos fueron igualmente mantenidos y almacenados en stocks de glicerol al 15% a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para los diferentes ensayos, las cepas de los stocks congelados fueron revividas rutinariamente en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB-agar mediante incubación durante 24 hs a  $37^{\circ}\text{C}$  (48 hs para aquellos aislados de lento crecimiento). Los inóculos fueron preparados mediante el uso de cultivos crecidos en medio LB líquido ON a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante a 250 rpm.

## GENOTIPIFICACIÓN POR ELECTROFORESIS EN GELES DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Con el objeto de determinar el grado de clonalidad de los aislados FQ de *P. aeruginosa* de la colección CFL, se realizaron ensayos de genotipificación por Electroforesis en Geles de Campo Pulsado (PFGE). Estos ensayos fueron realizados con la enzima de restricción *SpeI* de acuerdo a protocolos particularmente descriptos para la genotipificación de cepas de *P. aeruginosa* [280]. Brevemente, las colonias de cada aislado crecidas ON en medio LB-agar a  $37^{\circ}\text{C}$  fueron inoculadas en una solución homogénea de buffer de suspensión (75 mM NaCl y 25 mM EDTA, pH 7,4). Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se efectuaron las correspondientes diluciones hasta llegar a una concentración aproximadamente de  $(1 - 1,5) \times 10^9$  células por mL (rango de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ : 0,6 - 1,2). Luego, 500  $\mu\text{L}$  de las células diluidas en el buffer de suspensión se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de agarosa 1% p/V para preparar moldes sólidos de agarosa, los cuales

seguidamente, se incubaron con la enzima *SpeI* durante 6 hs a 37°C. Estos moldes fueron colocados en un gel de agarosa al 1% p/V, y se efectuó la PFGE por 20 hs a velocidad 40 V/cm. Después de la corrida electroforética, los patrones de bandas fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio y fotografiados para su posterior análisis.

El criterio para discriminar los genotipos fue de acuerdo a Tenover [281], el cual considera que de 1 a 3 bandas de diferencias en los patrones de restricción los clones son estrechamente relacionados; de 3 a 6 son posiblemente relacionados y más de 7 disimilitudes son cepas epidemiológicamente diferentes.

### GENOTIPIFICACIÓN POR AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE POLIMORFISMOS EN EL ADN (RAPD)

La relación clonal de los aislados FQ de *P. aeruginosa* de las colecciones CFA y CFD fue analizada mediante la amplificación al azar de polimorfismos en el ADN (RAPD) a través de protocolos previamente descritos [5]. Brevemente, se utilizó como template para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ADN genómico de los distintos aislados FQ. Posteriormente, el ADN fue amplificado por PCR empleando el primer 272 (Tabla M1) bajo las siguientes condiciones de reacción: 4 ciclos de 5 min a 94°C, 5 min a 36°C y 5 min a 72°C; luego 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C y 2 min a 72°C; y finalmente un ciclo de 10 min a 72°C. El análisis de los productos de PCR se llevó a cabo mediante corridas electroforéticas a 9 V/cm por 3 hs en geles de agarosa 1,5% p/V en el buffer TBE 1X (Tris-borato 0,09 M, EDTA 2 mM, pH 8). Posteriormente, los patrones de bandas fueron analizados empleando el programa computacional GelPro, que permite reconocer la presencia o ausencia de bandas y determinar perfiles de amplificación específicos para cada aislado.

### GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDOS ÚNICOS POR TECNOLOGÍA DE AT CHIPS

Además de la técnica de RAPD, la genotipificación de aquellos aislados de las colecciones CFA y CFD elegidos para realizar el secuenciamiento completo de sus genomas, se llevó a cabo mediante la caracterización de polimorfismos de nucleótidos

únicos (SNPs) utilizando la tecnología de AT biochips (Clondiag Chip Technologies, Germany). La técnica de AT biochips permite la detección simultánea de 13 SNPs previamente identificados en regiones genómicas altamente conservadas de *P. aeruginosa*, tales como *oriC*, *citS*, *ampC*, *oprI*, *fliC*, *oprL*, y *alkB2* [282]. Cabe destacar que la precisión teórica de la genotipificación por esta técnica es del 99.7% [282] (Clondiag Chip Technologies, Germany). Adicionalmente, estos chips permiten la detección de varias islas génicas, factores de patogenicidad, y genes variables, permitiendo el análisis del repertorio genético presente en el genoma accesorio de un aislado dado. Aquellos aislados que presentaron el mismo patrón de SNPs fueron considerados clones pertenecientes al mismo linaje bacteriano.

El ensayo en AT chip está basado en la detección de hibridación del templado de ADN genómico biotinilado en un microarreglo de ADN conteniendo un conjunto de 77 sondas de oligonucleótidos específicos. La metodología se llevó a cabo según lo descrito previamente [282-283]. Brevemente, 0,5-2  $\mu$ g de ADN de *P. aeruginosa* purificado mediante un kit comercial (QIAGEN) se utilizó como templado de una amplificación lineal con un grupo de oligonucleótidos marcados con biotina. Las condiciones del PCR múltiple fueron las siguientes: un ciclo de 5 min a 96°C, seguido por 50 ciclos de 20 seg a 62°C, 40 seg a 72°C y 60 seg a 96°C. Posteriormente, el producto de PCR marcado con biotina fue transferido a un chip para su hibridación con un conjunto de 77 sondas de oligonucleótidos específicos presentes por duplicado en el microarreglo. La reacción de hibridación se llevó a cabo por 1 h a 60°C con agitación constante a 550 rpm. Posteriormente se realizó el lavado y bloqueo del chip. Los sitios hibridados se visualizaron mediante la utilización de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato del conjugado de estreptavidina-peroxidasa (HRP). Las señales de hibridación se detectaron empleando un microscopio Zeiss Axioplan-2 equipado con cámara Coolsnap Pro (charge-coupled device camera) controlada por el programa de análisis de imágenes Image Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). El análisis de la intensidad de la señal permitió distinguir distintas variantes de SNPs así como la ausencia o presencia de genes variables e islas génicas. La asignación genotípica de cada aislado se llevó a cabo mediante el análisis visual del arreglo empleando un código hexadecimal previamente descrito [283].

## DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIÓN

Con el propósito de determinar la frecuencia de mutación de los distintos aislados FQ de *P. aeruginosa*, se llevó a cabo la determinación del número de colonias resistentes a Rf siguiendo protocolos previamente descritos [31]. Brevemente, colonias individuales de cada cepa fueron cultivadas ON en medio LB a 37°C con agitación (250 rpm). Diluciones apropiadas de dichos cultivos se sembraron en placas de LB-agar para determinar el número total de células viables, o en LB suplementado con 300 µg/mL de Rf para contabilizar el número de células resistentes a dicho antibiótico, después de ser incubadas por 24 hs a 37°C (48 hs para los aislados de lento crecimiento). Luego, la frecuencia de mutación se calculó como el número de células resistentes a Rf cada 10<sup>8</sup> células viables. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado en dos experimentos independientes para cada cepa. De esta manera y siguiendo criterios previamente establecidos [21], aquellos aislados que presentaron una frecuencia de mutación al menos 20 veces mayor a la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 fueron considerados hipermutadores. Cabe aclarar que la deficiencia en el MRS produce un aumento en la tasa de mutación de entre 20 a 1000 veces.

La resistencia a Rf se produce a través de mutaciones en el gen *rpoB*, el cual codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa [185]. De esta manera, a mayor frecuencia de mutación, mayor es la probabilidad de adquirir mutaciones espontáneas en *rpoB* y como consecuencia mayor es la frecuencia de células resistentes a Rf que se generan en la población.

## AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIAMIENTO DE LOS GENES *mutS*, *mutL*, *mucA*, *lasR*, *mexZ*, PA0929, PA1127, Y DE LA REGIÓN INTERGÉNICA PA4568//PA4569

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región codificante de los genes *mutS*, *mutL*, *mucA*, *lasR*, *mexZ*, PA0929, PA1127, y de la región intergénica PA4568//PA4569 se detallan en la Tabla M1.

Como templado para la PCR se utilizó ADN genómico de los distintos aislados FQ de *P. aeruginosa* el cual fue purificado utilizando un kit comercial (QIAGEN). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo empleando la enzima *Taq* ADN polimerasa

(PROMEGA), de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción: un ciclo de 8 min a 95°C, seguido por 33 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C (hibridación de los oligonucleótidos *mutS*, *mutL*, *mucA*, *mexZ*, PA0929, PA1127, PA4568//PA4569) ó 50°C (hibridación de los oligonucleótidos *lasR*) y 2 min a 72°C; y finalmente un ciclo de 10 min a 72°C. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% p/V en buffer TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8) durante 30 min a 100 V. Los productos de PCR fueron purificados mediante el empleo de un kit comercial de purificación de geles (QIAGEN) y sometidos a análisis de secuenciamiento automático directo de ADN, a través del uso de servicios especializados (DNA Sequencing Facility, University of Chicago), utilizando los oligonucleótidos correspondientes y mencionados anteriormente.

Para la identificación de las mutaciones presentes en cada gen o en la región intergénica, se analizaron las homologías entre las secuencias obtenidas de los diferentes aislados y las secuencias correspondientes a las cepas de referencia PA01 y PA14, que se encuentran anotadas en el proyecto Genoma de *P. aeruginosa* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), mediante el uso del programa de análisis BLAST [284] obtenido en la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

### CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pMCS\_ *mutS*<sup>-CG1551</sup> Y pMCS\_ *mutS*<sup>+CC344-CG1551</sup>

Con el propósito de analizar si el alelo +CC<sub>344</sub>-CG<sub>1551</sub> del gen *mutS* en los aislados no mutadores de CFD estaba asociado a la disminución de la frecuencia de mutación, se construyeron los plásmidos pMCS\_ *mutS*<sup>-CG1551</sup> y pMCS\_ *mutS*<sup>+CC344-CG1551</sup> como se describe a continuación. Los alelos *mutS* de los aislados CFD\_2011/27 y CFD\_2011/11, conteniendo las mutaciones -CG<sub>1551</sub> y +CC<sub>344</sub>-CG<sub>1551</sub> respectivamente, se amplificaron por PCR empleando los oligonucleótidos *mutS*-for1 y *mutS*-rev4 (Tabla M1) y se ligaron en el vector pGEM-T Easy (Promega). Luego se realizaron digestiones de estos plásmidos utilizando las enzimas de restricción *NdeI/EcoRI* para su posterior clonado en el plásmido pMCS\_ *mutS* [3], el cual fue previamente linearizado con *NdeI/EcoRI* para liberar el inserto *mutS* silvestre. Ambos plásmidos se propagaron en cepas de *E. coli* DH5α transformadas por shock térmico según protocolos estándar.

## ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN GÉNICA CON LOS PLÁSMIDOS pMCS\_ mutS, pMCS\_ mutL, MCS\_ mutS<sup>CG1551</sup> Y p5MCS\_ mutS<sup>CC334-CG1551</sup>

Con el objeto de investigar las bases genéticas del fenotipo hipermutador en los aislados FQ hipermutadores identificados, se llevaron a cabo análisis de complementación génica. Para ello, las células competentes fueron transformadas mediante electroporación, según protocolos previamente descritos [285], con los plásmidos pMCS\_ mutS [3] y pMCS\_ mutL [4], los cuales contienen una copia silvestre de los genes *mutS* y *mutL* de *P. aeruginosa* respectivamente (Tabla M1), y los plásmidos p5\_ mutS<sup>CG1551</sup> y p5\_ mutS<sup>CC334-CG1551</sup>, los cuales contienen una copia mutada del gen *mutS* y cuya construcción fue descrita en el punto anterior.

Las células transformadas se seleccionaron en placas de LB-agar suplementado con Gm 100 µg/mL. Una vez que las células transformadas (Gm<sup>R</sup>) fueron aisladas, la complementación del fenotipo hipermutador se midió mediante la determinación de la frecuencia de células resistentes a Rf, de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Como cepas controles se utilizaron células transformadas con el plásmido pBBR1MCS-5 vacío (pMCS) [286]. En cada caso, la complementación fue analizada por triplicado, a partir de tres colonias transformadas de cada uno de los aislados.

## ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE MUTANTES RESISTENTES

La susceptibilidad a antibióticos de los aislados FQ de *P. aeruginosa*, se determinó mediante la medición de halos de inhibición para los antibióticos imipenem, meropenem, ceftazidima, ciprofloxacina y tobramicina. La selección de los antibióticos fue realizada en base a su uso frecuente en la terapia de pacientes FQ y a su empleo rutinario en la realización de antibiogramas en el ámbito clínico. Para los ensayos, se tomaron colonias bacterianas previamente crecidas en placas de LB-agar y se suspendieron en solución fisiológica hasta alcanzar una densidad celular equivalente al 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente 0,2 DO<sub>600nm</sub>). Posteriormente, estos inóculos estandarizados fueron sembrados con hisopos en placas Müeller-Hinton agar (MH-agar) sobre cuya superficie se dispensaron seguidamente discos (ROSCO) con concentraciones adecuadas de cada antibiótico. La disposición de los discos fue realizada de acuerdo a criterios establecidos en

función del tamaño de las placas de Petri utilizadas. Los diámetros de los halos de inhibición se midieron luego de 24 hs de incubación (48 hs para aquellos aislados de lento crecimiento) a 37°C. Los puntos de corte aplicados para definir las distintas categorías de sensibilidad (S, sensible; I, intermedia; R, resistente) fueron de acuerdo a criterios establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), tal como se detalla en la Tabla M2.

Por otra parte, se determinó para cada uno de los antibióticos, el número relativo de células crecidas dentro de los halos de inhibición, consideradas como una subpoblación de mutantes resistentes (SMR). La cantidad de colonias en la SMR fue determinada de forma semicuantitativa: <10, +; 10-100, ++; >100, +++. La cuantificación de la SMR fue realizada a partir de los mismos ensayos de susceptibilidad luego de 24 hs adicionales de incubación, de acuerdo a protocolos previamente descriptos [193].

Como controles se utilizaron la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 y sus derivadas hipermutadoras PAO1MS y PAO1ML, mutadas en los genes *mutS* y *mutL* respectivamente (Tabla M1). Todos los ensayos se realizaron en dos réplicas por duplicado.

**Tabla M2.** Diámetros de los halos de inhibición y categorías de sensibilidad aplicadas en los ensayos de susceptibilidad a antibióticos de acuerdo a criterios establecidos por CLSI para *P. aeruginosa*.

Antibiótico	Concentración	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		S	I	R
Imipenem	10 µg	≥ 16	15-14	≤ 13
Meropenem	10 µg	≥ 16	15-14	≤ 13
Ceftazidima	30 µg	≥ 18	17-15	≤ 14
Ciprofloxacina	5 µg	≥ 21	20-16	≤ 15
Tobramicina	10 µg	≥ 15	14-13	≤ 12

## DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CATABÓLICA MEDIANTE EL USO DE MICROARREGLOS FENOTÍPICOS (BIOLOGS)

Con el propósito de analizar globalmente el metabolismo de distintos aislados FQ durante el transcurso de la infección crónica, se analizó el catabolismo de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno empleando los microarreglos fenotípicos PM1 y PM3B

respectivamente (Biolog Hayward, CA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor [287-288]. Brevemente, colonias crecidas en placas de LB-agar se suspendieron en un fluido de inoculación (IF-0 GN Base 1,2X) hasta obtener una densidad celular correspondiente al 42% de transmitancia. Las suspensiones celulares fueron diluidas 1:6 en el medio mínimo IF-0 conteniendo una mezcla de colorantes redox (tetrazolium) (Biolog Dye mix D 100X). Posteriormente, alícuotas de 100  $\mu$ L de estas diluciones se colocaron en placas con fuentes de carbono (PM1). Por otra parte, para las placas con fuentes de nitrógeno (PM3B), las inoculaciones fueron suplementadas con glucosa 30 mM y citrato férrico 2  $\mu$ M. Las placas fueron incubadas a 37°C en un lector OmniLog (Biolog) durante 72 hs para realizar la medición cinética del crecimiento/respiración a través de la determinación de la reducción colorimétrica del tetrazolium. La exportación de los datos desde el lector OmniLog se realizó utilizando el programa OmniLog OL-FM/Kin 1.20.02 (Biolog). Los fenotipos se determinaron teniendo en cuenta el área media por debajo de cada curva cinética, en la que la reducción del colorante fue considerada como crecimiento bacteriano en función del tiempo.

El análisis de datos y la estadística se llevó a cabo utilizando la versión 2.10.0 del programa R (R Development Core Team (2009) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: <http://www.R-project.org>), del cual se emplearon los siguientes paquetes: “bioDist” (B. Ding, R. Gentleman and V. Carey) y “squash” (A. C. Eklund) para el análisis de la formación de grupos jerárquicos. La función catabólica total fue calculada según lo descrito previamente [289].

## SECUENCIAMIENTO DE GENOMAS COMPLETOS DE AISLADOS FQ DE *P. AERUGINOSA*

El secuenciamiento masivo de los genomas de *P. aeruginosa* fue llevado a cabo por Illumina. Para ello, fue necesaria inicialmente la construcción de librerías genómicas para su posterior secuenciamiento. Brevemente, aproximadamente 3  $\mu$ g de ADN genómico de cada aislado, purificado empleando un kit de purificación de ADN genómico (PROMEGA), fue digerido en fragmentos de 300 pb utilizando el equipo Covaris E-series (E110, E210). La digestión se realizó según protocolos estándares: ciclo de trabajo, 10%; intensidad, 4; ciclos por explosión, 200; tiempo 80 seg; temperatura inicial del tanque de

agua, 6-8°C. Una vez digeridos, los fragmentos de ADN genómico se purificaron empleando un kit comercial de purificación (QIAquick). Posteriormente, se llevó a cabo la reparación de los extremos del ADN de los fragmentos generados, potencialmente dañados durante el proceso de fragmentación, mediante la utilización de un kit comercial (End-It™ DNA End-Repair Kit, EPICENTRE). Este proceso permite la obtención de ADN con extremos romos a través de la actividades polimerasa 5'→3', exonucleasa 3'→5' y fosfatasa 3' presentes en una mezcla enzimática, la cual está compuesta por la polimerasa del ADN T4, el fragmento Klenow y la polinucleótido kinasa T4. A continuación, se purificaron los productos de la reacción de reparación empleando un kit comercial (AMPure XP). Luego, se llevó a cabo la adenilación de los extremos 3' con el fragmento Klenow exo<sup>-</sup> (FERMENTAS) para evitar el autoligado de los fragmentos de ADN en una reacción de ligado posterior y además para proveer complementariedad con los adaptadores, que poseen un único nucleótido de timina en su extremo 3'. Una vez adenilados, se purificaron los fragmentos de ADN (AMPure XP) y se ligaron sus extremos con adaptadores indexados (Illumina) utilizando un kit comercial (Fast-link DNA ligation kits, EPICENTRE). Para esta reacción de ligado se utilizó una relación adaptador:inserto de >20:1. Cabe destacar que para la construcción de cada una de las librerías genómicas se utilizó un adaptador diferente con el propósito de identificar luego las secuencias genómicas de cada uno de los aislados correspondientes. Posteriormente, se realizó una purificación (AMPure XP) y una PCR de enriquecimiento con el objeto de amplificar los fragmentos de ADN conteniendo en sus extremos los adaptadores indexados ligados. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo utilizando una polimerasa de ADN de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity PCR Master Mix, FINNZYMES) y los oligonucleótidos correspondientes para cada adaptador (Illumina), de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción: un ciclo de 30 seg a 98°C, seguido por 18 ciclos de 10 seg a 98°C, 30 seg a 65°C y 30 seg a 72°C; y por último, un ciclo de 5 min a 72°C. Luego, se purificaron los productos de PCR (AMPure XP) y se analizó la cantidad y calidad de las librerías genómicas empleando tres metodologías distintas: 1) mediante electroforesis en geles de agarosa 1% p/V, para la estimación semi-cuantitativa de la concentración del ADN y la visualización del tamaño de los fragmentos; 2) a través un método fluorimétrico (Fluorómetro Qubit® 2.0, Invitrogen), para la determinación más precisa de la

concentración del ADN 3) y finalmente, con el propósito de determinar cuantitativamente tanto la concentración de cada muestra como la longitud del inserto de ADN en cada librería genómica, se empleó un chip de alta sensibilidad al ADN (AGILENT), cuya lectura se realizó en el aparato Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer.

Finalmente, una vez generadas las librerías de ADN genómico y analizadas su concentración y calidad, cada una de ellas se mezcló en una misma proporción final (para alcanzar una concentración de 10 nM cada una) y se enviaron para su secuenciamiento al servicio brindado por Illumina (Hong Kong). El secuenciamiento se llevó a cabo utilizando la plataforma Illumina HiSeq2000, lo cual generó lecturas pareadas de 100 pb utilizando un protocolo múltiple.

#### **ANÁLISIS DE SECUENCIAS GENÓMICAS: CONSTRUCCIÓN DE GENOMAS DE REFERENCIA POR ENSAMBLADOS *DE NOVO*, DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SNPS Y MUTACIONES DE INSERCIÓN/DELECIÓN**

Las secuencias genómicas de los aislados FQ de *P. aeruginosa* obtenidas en este trabajo se depositaron en el European Nucleotide Archive (ENA/SRA ERP002379). Para el análisis de las mismas, los genomas de los aislados ancestrales (CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01, Figura R4) se ensamblaron *de novo* para ser utilizados como genomas de referencia. En este sentido se empleó el programa Velvet versión 1.2.07 [290] utilizando los siguientes parámetros (en todos los casos los primeros valores se utilizaron para CFA\_2004/01, mientras que los segundos valores se emplearon para CFD\_1991/01; en aquellos casos donde se especifica un solo valor, el mismo fue empleado tanto para CFA\_2004/01 como para CFD\_1991/01): longitud del inserto (-ins\_length) 238 y 244; desviación estándar de la longitud del inserto (-ins\_length\_sd) 54,4 y 50,3; cobertura esperada (-exp\_cov) 291,1 y 296,7; cobertura mínima (-cov\_cutoff) 10; longitud mínima del contig (-min\_contig\_lgth) 500. Por otro lado se seleccionaron tamaños de kmer de 51 y 39 para CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01, respectivamente.

Con el propósito de identificar las mutaciones de SNPs y de inserción/delección (indels) acumuladas durante el transcurso de la infección crónica, se utilizaron los genomas ensamblados *de novo* como referencias para el mapeo de las secuencias genómicas de los aislados seleccionados y correspondientes a las colecciones CFA y CFD. Para ello, se

empleó el programa de alineamiento Novoalign versión 2.08.02 (Novocraft Technologies) [291]. Los archivos generados conteniendo el mapeo de las lecturas (llamados archivos pileups) se procesaron con el programa SAMtools release 0.1.7 [292]. Para ello, los SNPs se clasificaron utilizando el algoritmo varFilter de SAMtools (samtools.pl varFilter), empleando los parámetros de cobertura mínima de lecturas (-d) 3 y de cobertura máxima de lecturas (-D) 10000. Asimismo, sólo se retuvieron los SNPs inequívocos con índices de calidad en la escala de Phred de al menos 50 ( $P \leq 10^{-5}$ ), lo cual significa una precisión del 99,999% en la identificación de los nucleótidos. Además, con el objeto de optimizar la precisión de los resultados, se llevó a cabo el realineamiento de las lecturas genómicas alrededor de todos los sitios putativos con indels, utilizando el programa GATK versión 1.0.5083 [293]. Por otro lado, se extrajeron las mutaciones de inserción/delección pequeñas, de 1 a 10 pb, (microindels) del archivo pileup, teniendo en cuenta los siguientes criterios: índices de calidad de Phred de al menos 500; raíz cuadrada media de las calidades de mapeo (RMS) de al menos 25; y el sustento como mínimo de una quinta parte de las lecturas cubriendo esa región. Por otra parte y como control de falsos positivos, se mapearon las lecturas genómicas de CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01 con los genomas ensamblados *de novo*. De esta manera, se excluyeron todos los sitios con polimorfismos putativos resultantes de estos alineamientos, los cuales podrían ser causados ya sea por errores en los ensamblados o en los alineamientos. Finalmente, se anotaron las mutaciones de acuerdo con sus posiciones relativas con genes o regiones génicas ortólogas de las cepas de referencia de *P. aeruginosa* PAO1, PA14, y LEBS58 cuyos genomas han sido secuenciados y anotados [207]. En aquellos casos en los que no se encontraron ortólogos en estas cepas de referencia, para describir la mutación se tuvieron en cuenta secuencias homólogas del banco de datos de Genbank ID (Genbank\_ID:ORF\_name: Position), o la mutación fue descrita como "No Anotada".

## CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS DE MÁXIMA PARSIMONIA

Con el objetivo de analizar la relación evolutiva entre los genomas de los distintos aislados de *P. aeruginosa*, se construyeron árboles de máxima parsimonia para cada linaje (CFA y CFD) utilizando como marcadores filogenéticos las mutaciones de SNPs identificadas en los alineamientos de cada genoma respecto al aislado ancestral

correspondiente. Para ello, se compararon los SNPs presentes en cada uno de los aislados de un mismo linaje y se determinaron las ramas donde se acumularon los diferentes SNPs individuales. Por ejemplo, un mismo SNP observado en varios aislados se asignó a una rama del árbol común a todos ellos. De la misma manera, aquellos SNPs encontrados en los genomas de todos los aislados excepto en el genoma del aislado ancestral (CFA\_2004/01 ó CFD\_1991/01) se asignaron a las ramas ancestrales en cada uno de los árboles filogenéticos. Excepto por 5 SNPs en CFA (0,17%) y 27 SNPs en CFD (0,47%), todos los SNPs (>99,5%) se acumularon de una manera parsimoniosa en ambos linajes, por lo que pudieron construirse árboles consistentes que muestran la secuencia de los distintos eventos de mutación. Esto significa que si un SNP dado se observa acumulado en una rama en particular, entonces todos los aislados descendientes a partir de esa rama contienen ese alelo mutado en particular. Aquellos SNPs que no se ajustaron a la acumulación secuencial observada (5 en CFA y 27 en CFD), exhibiendo por la tanto una distribución evolutiva aberrante, se denominaron SNPs homoplásticos y no se consideraron para la construcción de los árboles filogenéticos de máxima parsimonia. La distribución irregular de los SNPs homoplásticos podría haber sido resultado de eventos de mutación idénticos pero independientes, como asimismo de reversiones directas o transferencia horizontal de ADN.

### CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES DE DISTANCIAS MÍNIMAS (MST)

Con el objeto de analizar el nivel de diversidad genética, en términos de genes mutados, entre los genomas de los linajes de CFA y CFD, se construyeron árboles de distancias mínimas (MST, de sus siglas en inglés, Minimum Spanning Tree) mediante la utilización del algoritmo de PRIM [294] implementado en el programa Info-Gen [295]. La red conecta cada genotipo con todos los otros genotipos a través de ramas que representan los genes mutados entre ellos. Se utilizaron los genomas CFA\_2004/01 y CFD\_1991/01 como punto de partida de cada red en los correspondientes MSTs de cada linaje. El número de genes mutados a lo largo de la red fue utilizado como una medida de la divergencia entre dos genotipos dados.

## ESTIMACIÓN DE LA TASA DE MUTACIÓN BACTERIANA

Con el objeto de estimar la tasa de mutación sufridas por los linajes de *P. aeruginosa* de CFA y CFD durante el transcurso de la evolución, se realizó una aproximación estadística bayesiana de las tasas de evolución utilizando el programa BEAST v1.7.2 [204]. Básicamente, el cálculo de la tasa de mutación bacteriana se basa en el número total de sustituciones sinónimas observadas en regiones codificantes, el número estimado de generaciones, el tamaño del genoma y el número esperado de mutaciones sinónimas. Asimismo, utilizando el programa BEAST se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: modelo de reloj molecular relajado "lognormal", a partir del cual se asume una tasa de mutación no constante a lo largo de la evolución del linaje, donde las tasas de sustitución asociadas con cada rama son obtenidas independientemente a partir de una distribución lognormal única y discreta [296]; y un modelo de sustitución HKY (Hasegawa-Kishino-Yano), que asume frecuencias de bases variables y una tasa de transición y una tasa de transversión diferentes [297].

## ESTIMACIÓN DE LA FRACCIÓN DE SNPS EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GENOMA DE *P. AERUGINOSA* QUE RESULTA EN SUSTITUCIONES SINÓNIMAS

El cálculo de la probabilidad de que una mutación al azar sea sinónima se realizó asumiendo que la tasa de cambio de las diferentes bases es la misma [298] y según el uso de codones en *P. aeruginosa* de la cepa de referencia PAO1 [299], según lo descrito previamente [136]. De esta manera, se consideró que el número total de posibles SNPs en regiones codificantes es 16.779.042, (5.593.014 pb de secuencias codificantes multiplicado por 3 posibles mutaciones en cada posición), de los cuales un 25% (4.237.247) resultaron que generarían un cambio sinónimo al azar.

## CÁLCULO DEL COCIENTE DE SELECCIÓN dN/dS

Con el objeto de analizar las fuerzas de selección que actuaron en las regiones codificantes de los genomas de *P. aeruginosa* durante la evolución, se calculó el cociente de selección dN/dS en ambos linajes CFA y CFD. Para ello se consideró un uso de codones idéntico a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, en el cual, tal como lo estimado en el punto

anterior, el 25% de las mutaciones al azar podrían generar un cambio sinónimo. De esta manera, asumiendo una teoría neutral de evolución molecular, es posible estimar el número esperado de SNPs no sinónimos de la región codificante del genoma de *P. aeruginosa*, basándose en el número de SNPs sinónimos de la región codificante (Kimura M 1983). En este sentido, la teoría neutral de evolución molecular predice que el cociente entre la tasa de sustituciones no sinónimas (dN) y la tasa de sustituciones sinónimas (dS) se aproxima a la unidad durante un proceso de evolución neutra. La probabilidad de obtener el número observado de SNPs no sinónimos, dado el número esperado de SNPs, se calcula a través de una distribución de Poisson. De esta manera, cocientes mayores o menores a uno podrían interpretarse como indicios de selección positiva o negativa, respectivamente.

Las mutaciones no sinónimas abarcaron mutaciones de cambio de sentido (aquellas que producen la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente) y mutaciones sin sentido (aquellas que producen la aparición de un codón de terminación), mientras que las mutaciones sinónimas sólo comprendieron mutaciones silenciosas (aquellas que producen la aparición de un codón que codifica para un mismo aminoácido).

Es importante destacar que el cociente de selección dN/dS se calculó de manera relativa a las tasas de sustituciones no sinónimas y sinónimas esperadas. De esta manera, para el caso de *P. aeruginosa*, donde la probabilidad de que una mutación al azar genere un cambio no sinónimo es tres veces mayor a la probabilidad de que esa misma mutación genere un cambio sinónimo (teniendo en cuenta que el 25% de las mutaciones al azar podrían generar un cambio sinónimo), el cálculo dN/dS se realizó de la siguiente manera:  $dN/dS = ((CS+SS)/3)/SL$ , donde CS y SS son mutaciones con cambio de sentido y sin sentido respectivamente, y SL significa mutaciones silenciosas.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Particularmente, en el análisis de las diferencias significativas entre los espectros de mutación de las distintas ramas del árbol de CFD se aplicó el T-test bilateral ajustado con la corrección de Bonferroni, considerando valores de  $P \leq 0.05$  como significativos.

El resto de los análisis estadísticos llevados a cabo en el presente trabajo se realizaron utilizando el test exacto de Fisher, considerando un valor de  $P < 0.05$  como significativo.

## ASPECTOS ÉTICOS

Los aislados de *P. aeruginosa* utilizados en este estudio fueron obtenidos de los laboratorios de Bacteriología del HNC (Córdoba), del HABA (Buenos Aires) de Argentina, y del Copenhagen CF Center (Copenhague, Dinamarca). En todos los casos los aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras de esputo proporcionados por pacientes FQ durante distintas visitas de rutina. De esta manera, la toma de muestras de esputo no se realizó con el propósito de llevar a cabo la investigación descripta en el presente trabajo, sino que los aislados fueron recuperados a partir de muestras de esputo utilizadas para controles terapéuticos habituales de los pacientes FQ.

Es importante destacar que los tratamientos terapéuticos de los pacientes no se modificaron en ningún caso como consecuencia de los resultados obtenidos en este estudio.

Los protocolos de investigación utilizados en el presente trabajo estuvieron aprobados y revisados por la Junta de Revisión Institucional del Centro de investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET) y por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud (C.I.E.I.S) del Niño y del Adulto del Polo Hospitalario, HNC.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Holloway, B.W., *Genetic recombination in Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol, 1955. **13**(3): p. 572-81.
2. 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.
3. 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.
4. Jacquelin, D.K., et al., *Pseudomonas aeruginosa MutL protein functions in Escherichia coli*. Biochem J, 2005. **388**(Pt 3): p. 879-87.
5. Mahenthiralingam, E., et al., *Random amplified polymorphic DNA typing of Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from patients with cystic fibrosis*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(5): p. 1129-35.
6. Drake, J.W., *A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7160-4.
7. Kimura, M., *On the evolutionary adjustment of spontaneous mutation rates*. Genet. Res., 1967(9): p. 23-34.
8. Leigh, E.G., Jr., *The evolution of mutation rates*. Genetics, 1973. **73**: p. Suppl 73:1-18.
9. Horst, J.P., T.H. Wu, and M.G. Marinus, *Escherichia coli mutator genes*. Trends Microbiol, 1999. **7**(1): p. 29-36.
10. Miller, J.H., *Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: p. 625-43.
11. Chao, L.a.C., E. C., *Competition between high and low mutating strains of Escherichia coli*. Evolution, 1983(37): p. 125-134.
12. Cox, E.C. and T.C. Gibson, *Selection for high mutation rates in chemostats*. Genetics, 1974. **77**(2): p. 169-84.
13. Gibson, T.C., M.L. Scheppe, and E.C. Cox, *Fitness of an Escherichia coli mutator gene*. Science, 1970. **169**(3946): p. 686-8.
14. Matic, I., et al., *Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic Escherichia coli*. Science, 1997. **277**(5333): p. 1833-4.
15. LeClerc, J.E., et al., *High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens*. Science, 1996. **274**(5290): p. 1208-11.
16. Richardson, A.R., et al., *Mutator clones of Neisseria meningitidis in epidemic serogroup A disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6103-7.
17. Watson, M.E., Jr., J.L. Burns, and A.L. Smith, *Hypermutable Haemophilus influenzae with mutations in mutS are found in cystic fibrosis sputum*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 9): p. 2947-58.
18. Prunier, A.L., et al., *High rate of macrolide resistance in Staphylococcus aureus strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains*. J Infect Dis, 2003. **187**(11): p. 1709-16.
19. Bjorkholm, B., et al., *Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14607-12.
20. del Campo, R., et al., *Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of Streptococcus pneumoniae isolates from cystic fibrosis patients*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2207-14.
21. Oliver, A., et al., *High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection*. Science, 2000. **288**(5469): p. 1251-4.
22. Boe, L., et al., *The frequency of mutators in populations of Escherichia coli*. Mutat Res, 2000. **448**(1): p. 47-55.
23. LeClerc, J.E., et al., *Detection of mutator subpopulations in Salmonella typhimurium LT2 by reversion of his alleles*. Mutat Res, 1998. **400**(1-2): p. 89-97.

24. Mao, E.F., et al., *Proliferation of mutators in A cell population*. J Bacteriol, 1997. **179**(2): p. 417-22.
25. Giraud, A., et al., *Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut*. Science, 2001. **291**(5513): p. 2606-8.
26. Ishii, K., et al., *Evolutionarily stable mutation rate in a periodically changing environment*. Genetics, 1989. **121**(1): p. 163-74.
27. Leigh, E.G., *Natural selection and mutability*. Am. Nat., 1970(104): p. 301-305.
28. Sniegowski, P.D., P.J. Gerrish, and R.E. Lenski, *Evolution of high mutation rates in experimental populations of E. coli*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 703-5.
29. Taddei, F., et al., *Role of mutator alleles in adaptive evolution*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 700-2.
30. Taddei, F., et al., *To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly*. Trends Microbiol, 1997. **5**(11): p. 427-8; discussion 428-9.
31. 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.
32. Iyer, R.R., et al., *DNA mismatch repair: functions and mechanisms*. Chem Rev, 2006. **106**(2): p. 302-23.
33. Modrich, P. and R. Lahue, *Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 101-33.
34. Schofield, M.J. and P. Hsieh, *DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 579-608.
35. Umar, A. and T.A. Kunkel, *DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells*. Eur J Biochem, 1996. **238**(2): p. 297-307.
36. Mellon, I. and G.N. Champe, *Products of DNA mismatch repair genes mutS and mutL are required for transcription-coupled nucleotide-excision repair of the lactose operon in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1292-7.
37. Matic, I., C. Rayssiguier, and M. Radman, *Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species*. Cell, 1995. **80**(3): p. 507-15.
38. Kunkel, T.A. and D.A. Erie, *DNA mismatch repair*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 681-710.
39. Lu, A.L., S. Clark, and P. Modrich, *Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(15): p. 4639-43.
40. Correa, E.M., et al., *Some amino acids of the Pseudomonas aeruginosa MutL D(Q/M)HA(X)2E(X)4E conserved motif are essential for the in vivo function of the protein but not for the in vitro endonuclease activity*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(11): p. 1106-13.
41. Correa, E.M., et al., *Analysis of DNA structure and sequence requirements for Pseudomonas aeruginosa MutL endonuclease activity*. J Biochem, 2013. **154**(6): p. 505-11.
42. Duppatla, V., et al., *The C-terminal domain is sufficient for endonuclease activity of Neisseria gonorrhoeae MutL*. Biochem J, 2009. **423**(2): p. 265-77.
43. Fukui, K., et al., *Bound nucleotide controls the endonuclease activity of mismatch repair enzyme MutL*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 12136-45.
44. Kadyrov, F.A., et al., *Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair*. Cell, 2006. **126**(2): p. 297-308.
45. Kadyrov, F.A., et al., *Saccharomyces cerevisiae MutLalpha is a mismatch repair endonuclease*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37181-90.
46. Foster, P.L., *Stress-induced mutagenesis in bacteria*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007. **42**(5): p. 373-97.
47. Galhardo, R.S., P.J. Hastings, and S.M. Rosenberg, *Mutation as a stress response and the regulation of evolvability*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007. **42**(5): p. 399-435.

48. Kivisaar, M., *Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress*. *Environ Microbiol*, 2003. **5**(10): p. 814-27.
49. Nohmi, T., *Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases*. *Annu Rev Microbiol*, 2006. **60**: p. 231-53.
50. Radman, M., *Enzymes of evolutionary change*. *Nature*, 1999. **401**(6756): p. 866-7, 869.
51. McKenzie, G.J., et al., *The SOS response regulates adaptive mutation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(12): p. 6646-51.
52. McKenzie, G.J., et al., *SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification*. *Mol Cell*, 2001. **7**(3): p. 571-9.
53. Layton, J.C. and P.L. Foster, *Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2003. **50**(2): p. 549-61.
54. Goodman, M.F., *Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes*. *Annu Rev Biochem*, 2002. **71**: p. 17-50.
55. Jarosz, D.F., et al., *Y-family DNA polymerases in Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, 2007. **15**(2): p. 70-7.
56. Friedberg, E.C., A.R. Lehmann, and R.P. Fuchs, *Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis?* *Mol Cell*, 2005. **18**(5): p. 499-505.
57. Fernandez De Henestrosa, A.R., et al., *Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2000. **35**(6): p. 1560-72.
58. Sanders, L.H., et al., *Role of Pseudomonas aeruginosa dinB-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(24): p. 8573-85.
59. Sutton, M.D. and G.C. Walker, *Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8342-9.
60. Abella, M., et al., *Widespread distribution of a lexA-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum*. *Mol Microbiol*, 2004. **54**(1): p. 212-22.
61. Erill, I., et al., *Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(1): p. 66-77.
62. Bichara, M., J. Wagner, and I.B. Lambert, *Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria*. *Mutat Res*, 2006. **598**(1-2): p. 144-63.
63. Moxon, R., C. Bayliss, and D. Hood, *Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation*. *Annu Rev Genet*, 2006. **40**: p. 307-33.
64. van Belkum, A., et al., *Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. **62**(2): p. 275-93.
65. Field, D., et al., *Contingency loci, mutator alleles, and their interactions. Synergistic strategies for microbial evolution and adaptation in pathogenesis*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **870**: p. 378-82.
66. Moxon, E.R., et al., *Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria*. *Curr Biol*, 1994. **4**(1): p. 24-33.
67. Metzgar, D. and C. Wills, *Evidence for the adaptive evolution of mutation rates*. *Cell*, 2000. **101**(6): p. 581-4.
68. Campa, M., M. Bendinelli, and H. Friedman, *Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen*. Plenum Press, New York, N. Y., 1993.
69. Williams, P.A. and M.J. Worsey, *Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids*. *J Bacteriol*, 1976. **125**(3): p. 818-28.
70. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. *Nature*, 2000. **406**(6799): p. 959-64.

71. Lee, D.G., et al., *Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial*. Genome Biol, 2006. 7(10): p. R90.
72. Schmidt, K.D., B. Tummeler, and U. Romling, *Comparative genome mapping of Pseudomonas aeruginosa PAO with P. aeruginosa C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats*. J Bacteriol, 1996. 178(1): p. 85-93.
73. Tummeler, B., in *Pseudomonas*, eds Ramos JL, Levesque RC (Springer, Heidelberg), Vol 4, pp 35-68. 2006.
74. Cramer, N., et al., *Microevolution of the major common Pseudomonas aeruginosa clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs*. Environ Microbiol, 2011. 13(7): p. 1690-704.
75. Romling, U., K.D. Schmidt, and B. Tummeler, *Large chromosomal inversions occur in Pseudomonas aeruginosa clone C strains isolated from cystic fibrosis patients*. FEMS Microbiol Lett, 1997. 150(1): p. 149-56.
76. Smith, E.E., et al., *Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2005. 187(6): p. 2138-47.
77. Spencer, D.H., et al., *Whole-genome sequence variation among multiple isolates of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2003. 185(4): p. 1316-25.
78. Arora, S.K., et al., *Sequence polymorphism in the glycosylation island and flagellins of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2004. 186(7): p. 2115-22.
79. He, J., et al., *The broad host range pathogen Pseudomonas aeruginosa strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(8): p. 2530-5.
80. Klockgether, J., et al., *Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of Pseudomonas aeruginosa C*. J Bacteriol, 2004. 186(2): p. 518-34.
81. Larbig, K.D., et al., *Gene Islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a Pseudomonas aeruginosa clone*. J Bacteriol, 2002. 184(23): p. 6665-80.
82. Wolfgang, M.C., et al., *Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(14): p. 8484-9.
83. Reva, O.N. and B. Tummeler, *Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage patterns*. BMC Bioinformatics, 2004. 5: p. 90.
84. Reva, O.N. and B. Tummeler, *Differentiation of regions with atypical oligonucleotide composition in bacterial genomes*. BMC Bioinformatics, 2005. 6: p. 251.
85. Ernst, R.K., et al., *Genome mosaicism is conserved but not unique in Pseudomonas aeruginosa isolates from the airways of young children with cystic fibrosis*. Environ Microbiol, 2003. 5(12): p. 1341-9.
86. Klockgether, J., et al., *Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa PAO1 laboratory strains*. J Bacteriol, 2010. 192(4): p. 1113-21.
87. Kresse, A.U., et al., *Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of Pseudomonas aeruginosa chronically colonizing cystic fibrosis lungs*. Mol Microbiol, 2003. 47(1): p. 145-58.
88. Smith, E.E., et al., *Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(22): p. 8487-92.
89. Spencer, R.C., *Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996. 15(4): p. 281-5.
90. Driscoll, J.A., S.L. Brody, and M.H. Kollef, *The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs, 2007. 67(3): p. 351-68.
91. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Lung infections associated with cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(2): p. 194-222.
92. Bye, M.R., J.M. Ewig, and I.M. Quittell, *Cystic fibrosis*. Lung, 1994. 172(5): p. 251-70.

93. Kerem, B.S., et al., *DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis*. *Am J Hum Genet*, 1989. **44**(6): p. 827-34.
94. Knowlton, R.G., et al., *A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7*. *Nature*, 1985. **318**(6044): p. 380-2.
95. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. *Science*, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
96. Rommens, J.M., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. *Science*, 1989. **245**(4922): p. 1059-65.
97. Collins, F.S., *Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications*. *Science*, 1992. **256**(5058): p. 774-9.
98. Oller de Ramirez, A.M., et al., *[Molecular diagnosis of cystic fibrosis in 93 Argentinean patients and detection of heterozygotes in affected families. Impact on health services and therapeutic advances]*. *Arch Argent Pediatr*, 2008. **106**(4): p. 310-9.
99. Govan, J.R. and V. Deretic, *Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, 1996. **60**(3): p. 539-74.
100. Harrison, F., *Microbial ecology of the cystic fibrosis lung*. *Microbiology*, 2007. **153**(Pt 4): p. 917-23.
101. Harris, J.K., et al., *Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(51): p. 20529-33.
102. Klepac-Ceraj, V., et al., *Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 2010. **12**(5): p. 1293-303.
103. Marshall, B.C., et al., *Cystic fibrosis foundation: achieving the mission*. *Respir Care*, 2009. **54**(6): p. 788-95; discussion 795.
104. Burns, J.L., et al., *Longitudinal assessment of Pseudomonas aeruginosa in young children with cystic fibrosis*. *J Infect Dis*, 2001. **183**(3): p. 444-52.
105. Johansen, H.K. and N. Hoiby, *Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis in Denmark*. *Thorax*, 1992. **47**(2): p. 109-11.
106. Canton, R. and R. del Campo, *Cystic fibrosis: deciphering the complexity*. *Clin Microbiol Infect*, 2010. **16**(7): p. 793-7.
107. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. *Semin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 3-9.
108. Elizur, A., C.L. Cannon, and T.W. Ferkol, *Airway inflammation in cystic fibrosis*. *Chest*, 2008. **133**(2): p. 489-95.
109. Armstrong, D.S., et al., *Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis*. *BMJ*, 1995. **310**(6994): p. 1571-2.
110. Armstrong, D.S., et al., *Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening*. *Pediatr Pulmonol*, 2005. **40**(6): p. 500-10.
111. Hoiby, N., B. Frederiksen, and T. Pressler, *Eradication of early Pseudomonas aeruginosa infection*. *J Cyst Fibros*, 2005. **4 Suppl 2**: p. 49-54.
112. Döring, G., *The role of neutrophil elastase in chronic inflammation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **150**(6 Pt 2): p. S114-7.
113. Hassett, D.J., et al., *Pseudomonas aeruginosa hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways*. *Trends Microbiol*, 2009. **17**(3): p. 130-8.
114. Worlitzsch, D., et al., *Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(3): p. 317-25.
115. Alvarez-Ortega, C. and C.S. Harwood, *Responses of Pseudomonas aeruginosa to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration*. *Mol Microbiol*, 2007. **65**(1): p. 153-65.

116. Yoon, S.S., et al., *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell*, 2002. **3**(4): p. 593-603.
117. Doring, G., *Serine proteinase inhibitor therapy in alpha(1)-antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis*. *Pediatr Pulmonol*, 1999. **28**(5): p. 363-75.
118. Ratjen, F., et al., *Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha*. *Thorax*, 2002. **57**(11): p. 930-4.
119. Gilligan, P.H., et al., *Isolation medium for the recovery of Pseudomonas cepacia from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis*. *J Clin Microbiol*, 1985. **22**(1): p. 5-8.
120. Tunney, M.M., et al., *Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. **177**(9): p. 995-1001.
121. Romling, U., et al., *Epidemiology of chronic Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis*. *J Infect Dis*, 1994. **170**(6): p. 1616-21.
122. Jensen, E.T., et al., *Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment*. *J Hosp Infect*, 1997. **36**(2): p. 117-22.
123. Frederiksen, B., C. Koch, and N. Hoiby, *Antibiotic treatment of initial colonization with Pseudomonas aeruginosa postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis*. *Pediatr Pulmonol*, 1997. **23**(5): p. 330-5.
124. Munck, A., et al., *Genotypic characterization of Pseudomonas aeruginosa strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization*. *Pediatr Pulmonol*, 2001. **32**(4): p. 288-92.
125. Taccetti, G., et al., *Early eradication therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients*. *Eur Respir J*, 2005. **26**(3): p. 458-61.
126. Costerton, J.W., et al., *Bacterial biofilms in nature and disease*. *Annu Rev Microbiol*, 1987. **41**: p. 435-64.
127. Moskowitz, S.M., et al., *Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(5): p. 1915-22.
128. Ryder, C., M. Byrd, and D.J. Wozniak, *Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. *Curr Opin Microbiol*, 2007. **10**(6): p. 644-8.
129. Steinberger, R.E. and P.A. Holden, *Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms*. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(9): p. 5404-10.
130. Whitchurch, C.B., et al., *Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation*. *Science*, 2002. **295**(5559): p. 1487.
131. Fronzes, R., H. Remaut, and G. Waksman, *Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria*. *EMBO J*, 2008. **27**(17): p. 2271-80.
132. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. *Science*, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
133. Gilbert, P. and A.J. McBain, *Biofilms: their impact on health and their recalcitrance toward biocides*. *Am J Infect Control*, 2001. **29**(4): p. 252-5.
134. Potera, C., *Forging a link between biofilms and disease*. *Science*, 1999. **283**(5409): p. 1837, 1839.
135. Mena, A., et al., *Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(24): p. 7910-7.
136. Yang, L., et al., *Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(18): p. 7481-6.
137. Evans, D.J., et al., *The rfb locus from Pseudomonas aeruginosa strain PA103 promotes the expression of O antigen by both LPS-rough and LPS-smooth isolates from cystic fibrosis patients*. *Mol Microbiol*, 1994. **13**(3): p. 427-34.
138. Hancock, R.E., et al., *Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains*. *Infect Immun*, 1983. **42**(1): p. 170-7.

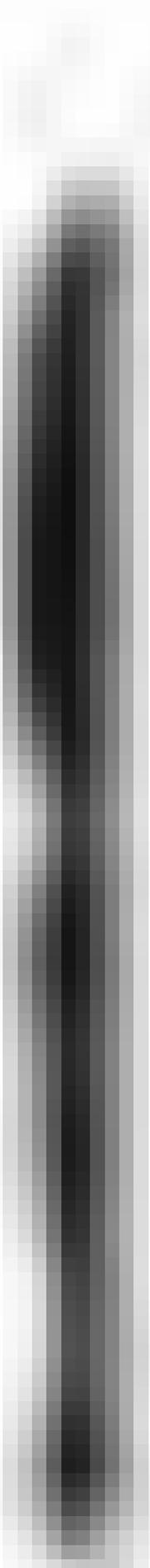
139. Lam, M.Y., et al., *Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(5): p. 962-7.
140. Rocchetta, H.L., L.L. Burrows, and J.S. Lam, *Genetics of O-antigen biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(3): p. 523-53.
141. D'Argenio, D.A., et al., *Growth phenotypes of Pseudomonas aeruginosa lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients*. Mol Microbiol, 2007. **64**(2): p. 512-33.
142. Hoffman, L.R., et al., *Pseudomonas aeruginosa lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression*. J Cyst Fibros, 2009. **8**(1): p. 66-70.
143. Barth, A.L. and T.L. Pitt, *Auxotrophic variants of Pseudomonas aeruginosa are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(1): p. 37-40.
144. Martin, D.W., et al., *Mechanism of conversion to mucoidy in Pseudomonas aeruginosa infecting cystic fibrosis patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8377-81.
145. Haussler, S., et al., *Highly adherent small-colony variants of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection*. J Med Microbiol, 2003. **52**(Pt 4): p. 295-301.
146. Mahenthiralingam, E. and D.P. Speert, *Nonopsonic phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa by macrophages and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum*. Infect Immun, 1995. **63**(11): p. 4519-23.
147. Hogardt, M. and J. Heesemann, *Adaptation of Pseudomonas aeruginosa during persistence in the cystic fibrosis lung*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(8): p. 557-62.
148. Henry, R.L., C.M. Mellis, and L. Petrovic, *Mucoid Pseudomonas aeruginosa is a marker of poor survival in cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 1992. **12**(3): p. 158-61.
149. Pedersen, S.S., et al., *Role of alginate in infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. Thorax, 1992. **47**(1): p. 6-13.
150. Grobe, S., J. Wingender, and H.G. Truper, *Characterization of mucoid Pseudomonas aeruginosa strains isolated from technical water systems*. J Appl Bacteriol, 1995. **79**(1): p. 94-102.
151. May, T.B., et al., *Alginate synthesis by Pseudomonas aeruginosa: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients*. Clin Microbiol Rev, 1991. **4**(2): p. 191-206.
152. Farrell, P.M., et al., *Association between mucoid Pseudomonas infection and bronchiectasis in children with cystic fibrosis*. Radiology, 2009. **252**(2): p. 534-43.
153. Hoiby, N., *Prevalence of mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa in bacteriological specimens from patients with cystic fibrosis and patients with other diseases*. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl, 1975. **83**(6): p. 549-52.
154. Lam, J., et al., *Production of mucoid microcolonies by Pseudomonas aeruginosa within infected lungs in cystic fibrosis*. Infect Immun, 1980. **28**(2): p. 546-56.
155. Ohman, D.E. and A.M. Chakrabarty, *Utilization of human respiratory secretions by mucoid Pseudomonas aeruginosa of cystic fibrosis origin*. Infect Immun, 1982. **37**(2): p. 662-9.
156. Hassett, D.J., *Anaerobic production of alginate by Pseudomonas aeruginosa: alginate restricts diffusion of oxygen*. J Bacteriol, 1996. **178**(24): p. 7322-5.
157. Mathee, K., et al., *Mucoid conversion of Pseudomonas aeruginosa by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung*. Microbiology, 1999. **145** ( Pt 6): p. 1349-57.
158. Terry, J.M., S.E. Pina, and S.J. Mattingly, *Environmental conditions which influence mucoid conversion Pseudomonas aeruginosa PAOI*. Infect Immun, 1991. **59**(2): p. 471-7.
159. Garrett, E.S., D. Perlegas, and D.J. Wozniak, *Negative control of flagellum synthesis in Pseudomonas aeruginosa is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU)*. J Bacteriol, 1999. **181**(23): p. 7401-4.
160. Wu, W., et al., *MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2004. **186**(22): p. 7575-85.



161. Li, Z., et al., *Longitudinal development of mucoid Pseudomonas aeruginosa infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis*. JAMA, 2005. **293**(5): p. 581-8.
162. Williams, P. and M. Camara, *Quorum sensing and environmental adaptation in Pseudomonas aeruginosa: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(2): p. 182-91.
163. Poole, K., et al., *Multiple antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: evidence for involvement of an efflux operon*. J Bacteriol, 1993. **175**(22): p. 7363-72.
164. Poole, K. and R. Srikumar, *Multidrug efflux in Pseudomonas aeruginosa: components, mechanisms and clinical significance*. Curr Top Med Chem, 2001. **1**(1): p. 59-71.
165. Vogne, C., et al., *Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(5): p. 1676-80.
166. Ciofu, O., et al., *Occurrence of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(6): p. 2276-82.
167. Ferroni, A., et al., *Effect of mutator P. aeruginosa on antibiotic resistance acquisition and respiratory function in cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2009. **44**(8): p. 820-5.
168. Hogardt, M., et al., *Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates*. Int J Med Microbiol, 2006. **296**(4-5): p. 313-20.
169. Waine, D.J., et al., *Association between hypermutator phenotype, clinical variables, mucoid phenotype, and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(10): p. 3491-3.
170. Kenna, D.T., et al., *Hypermutability in environmental Pseudomonas aeruginosa and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 6): p. 1852-9.
171. Montanari, S., et al., *Biological cost of hypermutation in Pseudomonas aeruginosa strains from patients with cystic fibrosis*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 5): p. 1445-54.
172. Henrichfreise, B., et al., *Resistance mechanisms of multiresistant Pseudomonas aeruginosa strains from Germany and correlation with hypermutation*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(11): p. 4062-70.
173. Macia, M.D., et al., *Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa strains causing chronic lung infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3382-6.
174. Plasencia, V., et al., *Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of in vitro and in vivo resistance development to single or combined antipseudomonal agents*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(7): p. 2574-81.
175. Gutierrez, O., et al., *Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in Pseudomonas aeruginosa isolates from intensive care unit patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(9): p. 3573-5.
176. Martinez-Solano, L., et al., *Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(12): p. 1526-33.
177. Roman, F., et al., *Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by Haemophilus influenzae in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(4): p. 1450-9.
178. Martin, C., et al., *Genetic diversity of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(6): p. 1461-6.
179. Nguyen, D. and P.K. Singh, *Evolving stealth: genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa during cystic fibrosis infections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8305-6.

180. Gibson, R.L., J.L. Burns, and B.W. Ramsey, *Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **168**(8): p. 918-51.
181. Oliver, A., et al., *Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(11): p. 4226-33.
182. Moyano, A.J., et al., *MutS deficiency and activity of the error-prone DNA polymerase IV are crucial for determining mucA as the main target for mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa**. *Mol Microbiol*, 2007. **64**(2): p. 547-59.
183. Lujan, A.M., et al., *Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* mutS strain*. *Microbiology*, 2007. **153**(Pt 1): p. 225-37.
184. Smania, A.M., et al., *Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa**. *Microbiology*, 2004. **150**(Pt 5): p. 1327-38.
185. Garibyan, L., et al., *Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome*. *DNA Repair (Amst)*, 2003. **2**(5): p. 593-608.
186. Obmolova, G., et al., *Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 703-10.
187. Pezza, R.J., et al., *Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-MutS interaction at the Walker A motif*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(21): p. 4700-8.
188. Ban, C. and W. Yang, *Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis*. *Cell*, 1998. **95**(4): p. 541-52.
189. Boucher, J.C., et al., *Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection*. *Infect Immun*, 1997. **65**(9): p. 3838-46.
190. Ciofu, O., et al., *Investigation of the *algT* operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants*. *Microbiology*, 2008. **154**(Pt 1): p. 103-13.
191. Levy, D.D. and T.A. Cebula, *Fidelity of replication of repetitive DNA in mutS and repair proficient *Escherichia coli**. *Mutat Res*, 2001. **474**(1-2): p. 1-14.
192. Schaaper, R.M. and R.L. Dunn, *Spectra of spontaneous mutations in *Escherichia coli* strains defective in mismatch correction: the nature of in vivo DNA replication errors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(17): p. 6220-4.
193. 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.
194. Govan, J.R. and J.A. Fyfe, *Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: resistance of the mucoid from to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro*. *J Antimicrob Chemother*, 1978. **4**(3): p. 233-40.
195. Hoffman, L.R., et al., *Nutrient availability as a mechanism for selection of antibiotic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF airway*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(1): p. e1000712.
196. Ciofu, O., et al., *Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants*. *Microbiology*, 2010. **156**(Pt 4): p. 1108-19.
197. Yang, L., et al., *In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(8): p. 2767-76.
198. Erdeniz, N., et al., *Mutations affecting a putative MutLalpha endonuclease motif impact multiple mismatch repair functions*. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(10): p. 1463-70.

199. Guarne, A., et al., *Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair*. EMBO J, 2004. **23**(21): p. 4134-45.
200. Wu, T.H. and M.G. Marinus, *Deletion mutation analysis of the mutS gene in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5948-52.
201. 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.
202. Brown, E.W., et al., *Phylogenetic evidence for horizontal transfer of mutS alleles among naturally occurring Escherichia coli strains*. J Bacteriol, 2001. **183**(5): p. 1631-44.
203. Denamur, E., et al., *Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes*. Cell, 2000. **103**(5): p. 711-21.
204. Drummond, A.J., et al., *Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7*. Mol Biol Evol, 2012. **29**(8): p. 1969-73.
205. Marvig, R.L., et al., *Genome analysis of a transmissible lineage of pseudomonas aeruginosa reveals pathoadaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators*. PLoS Genet, 2013. **9**(9): p. e1003741.
206. Turrientes, M.C., et al., *Normal mutation rate variants arise in a Mutator (Mut S) Escherichia coli population*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e72963.
207. Winsor, G.L., et al., *Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D596-600.
208. Damkiaer, S., et al., *Evolutionary remodeling of global regulatory networks during long-term bacterial adaptation to human hosts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(19): p. 7766-71.
209. Potvin, E., F. Sanschagrin, and R.C. Levesque, *Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(1): p. 38-55.
210. Moyano, A.J. and A.M. Smania, *Simple sequence repeats and mucoid conversion: biased mucA mutagenesis in mismatch repair-deficient Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8203.
211. Moyano, A.J., et al., *Simple Sequence Repeats Together with Mismatch Repair Deficiency Can Bias Mutagenic Pathways in Pseudomonas aeruginosa during Chronic Lung Infection*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80514.
212. Woods, R., et al., *Tests of parallel molecular evolution in a long-term experiment with Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9107-12.
213. Tenaillon, O., et al., *The molecular diversity of adaptive convergence*. Science, 2012. **335**(6067): p. 457-61.
214. Kohler, T., et al., *Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 1997. **23**(2): p. 345-54.
215. Vettoretti, L., et al., *Efflux unbalance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(5): p. 1987-97.
216. Erickson, D.L., et al., *Pseudomonas aeruginosa relA contributes to virulence in Drosophila melanogaster*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5638-45.
217. Chung, J.C., et al., *Genomic variation among contemporary Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically infected cystic fibrosis patients*. J Bacteriol, 2012. **194**(18): p. 4857-66.
218. De Vos, D., et al., *Study of pyoverdine type and production by Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis patients: prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine-negative mutations*. Arch Microbiol, 2001. **175**(5): p. 384-8.
219. Martin, L.W., et al., *Pseudomonas siderophores in the sputum of patients with cystic fibrosis*. Biometals, 2011. **24**(6): p. 1059-67.



220. Davies, J.A., et al., *The GacS sensor kinase controls phenotypic reversion of small colony variants isolated from biofilms of Pseudomonas aeruginosa PA14*. FEMS Microbiol Ecol, 2007. **59**(1): p. 32-46.
221. Goodman, A.L., et al., *A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in Pseudomonas aeruginosa*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 745-54.
222. Lapouge, K., et al., *Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour*. Mol Microbiol, 2008. **67**(2): p. 241-53.
223. Zolfaghar, I., et al., *Mutation of retS, encoding a putative hybrid two-component regulatory protein in Pseudomonas aeruginosa, attenuates multiple virulence mechanisms*. Microbes Infect, 2005. **7**(13): p. 1305-16.
224. Choy, W.K., et al., *MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse Pseudomonas species*. J Bacteriol, 2004. **186**(21): p. 7221-8.
225. Mahenthiralingam, E., M.E. Campbell, and D.P. Speert, *Nonmotility and phagocytic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis*. Infect Immun, 1994. **62**(2): p. 596-605.
226. Meissner, A., et al., *Pseudomonas aeruginosa cupA-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate*. Environ Microbiol, 2007. **9**(10): p. 2475-85.
227. Ritchings, B.W., et al., *Cloning and phenotypic characterization of fleS and fleR, new response regulators of Pseudomonas aeruginosa which regulate motility and adhesion to mucin*. Infect Immun, 1995. **63**(12): p. 4868-76.
228. Ruer, S., et al., *The 'P-usher', a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion*. EMBO J, 2008. **27**(20): p. 2669-80.
229. Ruer, S., et al., *Assembly of fimbrial structures in Pseudomonas aeruginosa: functionality and specificity of chaperone-usher machineries*. J Bacteriol, 2007. **189**(9): p. 3547-55.
230. Starkey, M., et al., *Pseudomonas aeruginosa rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung*. J Bacteriol, 2009. **191**(11): p. 3492-503.
231. Wong, A., N. Rodrigue, and R. Kassen, *Genomics of adaptation during experimental evolution of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet, 2012. **8**(9): p. e1002928.
232. Hoboth, C., et al., *Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable Pseudomonas aeruginosa during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis*. J Infect Dis, 2009. **200**(1): p. 118-30.
233. Barth, A.L. and T.L. Pitt, *The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol, 1996. **45**(2): p. 110-9.
234. Palmer, K.L., et al., *Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of Pseudomonas aeruginosa physiology*. J Bacteriol, 2005. **187**(15): p. 5267-77.
235. Galabert, C., et al., *Relationships between the lipid content and the rheological properties of airway secretions in cystic fibrosis*. Clin Chim Acta, 1987. **164**(2): p. 139-49.
236. Rose, M.C. and J.A. Voynow, *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 245-78.
237. Hogardt, M., et al., *Stage-specific adaptation of hypermutable Pseudomonas aeruginosa isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis*. J Infect Dis, 2007. **195**(1): p. 70-80.
238. de Visser, J.A., *The fate of microbial mutators*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 5): p. 1247-52.
239. Tenaillon, O., et al., *Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria*. Genetics, 1999. **152**(2): p. 485-93.

240. Shigenobu, S., et al., *Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS*. *Nature*, 2000. **407**(6800): p. 81-6.
241. Bantinaki, E., et al., *Adaptive divergence in experimental populations of Pseudomonas fluorescens. III. Mutational origins of wrinkly spreader diversity*. *Genetics*, 2007. **176**(1): p. 441-53.
242. Elena, S.F. and R.E. Lenski, *Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(6): p. 457-69.
243. Kolter, R., *Growth in studying the cessation of growth*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(3): p. 697-9.
244. Zinser, E.R. and R. Kolter, *Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(18): p. 5800-7.
245. Mowat, E., et al., *Pseudomonas aeruginosa population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **183**(12): p. 1674-9.
246. Wilder, C.N., G. Allada, and M. Schuster, *Instantaneous within-patient diversity of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections*. *Infect Immun*, 2009. **77**(12): p. 5631-9.
247. Workentine, M.L., et al., *Phenotypic heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa populations in a cystic fibrosis patient*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e60225.
248. Stewart, P.S. and M.J. Franklin, *Physiological heterogeneity in biofilms*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(3): p. 199-210.
249. Xu, K.D., et al., *Spatial physiological heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa biofilm is determined by oxygen availability*. *Appl Environ Microbiol*, 1998. **64**(10): p. 4035-9.
250. Rainey, P.B. and M. Travisano, *Adaptive radiation in a heterogeneous environment*. *Nature*, 1998. **394**(6688): p. 69-72.
251. Lujan, A.M., et al., *Evolution and adaptation in Pseudomonas aeruginosa biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27842.
252. Kassen, R., *Toward a general theory of adaptive radiation: insights from microbial experimental evolution*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. **1168**: 3-22. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04574.x.
253. Schluter, D., *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford Univ Press., 2000.
254. Lee, S.M., et al., *Adaptation in a mouse colony monoassociated with Escherichia coli K-12 for more than 1,000 days*. *Appl Environ Microbiol*, 2010. **76**(14): p. 4655-63.
255. Kotewicz, M.L., et al., *Genomic variability among enteric pathogens: the case of the mutS-rpoS intergenic region*. *Trends Microbiol*, 2003. **11**(1): p. 2-6.
256. Fijalkowska, I.J., R.L. Dunn, and R.M. Schaaper, *Mutants of Escherichia coli with increased fidelity of DNA replication*. *Genetics*, 1993. **134**(4): p. 1023-30.
257. Guelfo, J.R., et al., *A MATE-family efflux pump rescues the Escherichia coli 8-oxoguanine-repair-deficient mutator phenotype and protects against H(2)O(2) killing*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(5): p. e1000931.
258. Wielgoss, S., et al., *Mutation rate dynamics in a bacterial population reflect tension between adaptation and genetic load*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(1): p. 222-7.
259. Hazra, T.K., et al., *Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001. **68**: p. 193-205.
260. Lu, A.L., et al., *Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions*. *Cell Biochem Biophys*, 2001. **35**(2): p. 141-70.
261. Morero, N.R. and C.E. Argarana, *Pseudomonas aeruginosa deficient in 8-oxodeoxyguanine repair system shows a high frequency of resistance to ciprofloxacin*. *FEMS Microbiol Lett*, 2009. **290**(2): p. 217-26.
262. Qiu, Z. and M.F. Goodman, *The Escherichia coli polB locus is identical to dinA, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a polB mutant*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(13): p. 8611-7.

263. Bonner, C.A., et al., *Purification and characterization of an inducible Escherichia coli DNA polymerase capable of insertion and bypass at abasic lesions in DNA*. J Biol Chem, 1988. **263**(35): p. 18946-52.
264. Masker, W., P. Hanawalt, and H. Shizuya, *Role of DNA polymerase II in repair replication in Escherichia coli*. Nat New Biol, 1973. **244**(138): p. 242-3.
265. Escarceller, M., et al., *Involvement of Escherichia coli DNA polymerase II in response to oxidative damage and adaptive mutation*. J Bacteriol, 1994. **176**(20): p. 6221-8.
266. Tessman, I. and M.A. Kennedy, *DNA polymerase II of Escherichia coli in the bypass of abasic sites in vivo*. Genetics, 1994. **136**(2): p. 439-48.
267. Storz, G. and L.A. Tartaglia, *OxyR: a regulator of antioxidant genes*. J Nutr, 1992. **122**(3 Suppl): p. 627-30.
268. Sancar, G.B., et al., *Sequences of the Escherichia coli photolyase gene and protein*. J Biol Chem, 1984. **259**(9): p. 6033-8.
269. Kang, P.J. and E.A. Craig, *Identification and characterization of a new Escherichia coli gene that is a dosage-dependent suppressor of a dnaK deletion mutation*. J Bacteriol, 1990. **172**(4): p. 2055-64.
270. Cheng, C. and S. Shuman, *Characterization of an ATP-dependent DNA ligase encoded by Haemophilus influenzae*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(7): p. 1369-74.
271. Carter, J.R., et al., *Molecular cloning, sequencing, and overexpression of the structural gene encoding the delta subunit of Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme*. J Bacteriol, 1992. **174**(21): p. 7013-25.
272. McHenry, C.S., *DNA polymerase III holoenzyme of Escherichia coli*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 519-50.
273. Song, M.S., et al., *The delta and delta' subunits of the DNA polymerase III holoenzyme are essential for initiation complex formation and processive elongation*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 35165-75.
274. Amundsen, S.K., et al., *recD: the gene for an essential third subunit of exonuclease V*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(15): p. 5558-62.
275. Telander-Muskavitch, K.M.L., S. (1981) , in *The Enzymes*, P.D.A. ed. Boyer, New York), 3rd Ed., Vol. 14, pp. 233-250., Editor. 1981.
276. Hassan, H.M. and I. Fridovich, *Physiological function of superoxide dismutase in glucose-limited chemostat cultures of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1977. **130**(2): p. 805-11.
277. Messner, K.R. and J.A. Imlay, *The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1999. **274**(15): p. 10119-28.
278. Sobel, M.L., G.A. McKay, and K. Poole, *Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(10): p. 3202-7.
279. Westbrook-Wadman, S., et al., *Characterization of a Pseudomonas aeruginosa efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2975-83.
280. Romling, U. and B. Tummner, *Achieving 100% typeability of Pseudomonas aeruginosa by pulsed-field gel electrophoresis*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(1): p. 464-5.
281. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
282. Morales, G., et al., *Structure of Pseudomonas aeruginosa populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping*. J Bacteriol, 2004. **186**(13): p. 4228-37.
283. Wiehlmann, L., et al., *Population structure of Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8101-6.

284. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
285. Choi, K.H. and H.P. Schweizer, *An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants*. *BMC Microbiol*, 2005. **5**: p. 30.
286. 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.
287. Bochner, B.R., *New technologies to assess genotype-phenotype relationships*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(4): p. 309-14.
288. Bochner, B.R., *Global phenotypic characterization of bacteria*. *FEMS Microbiol Rev*, 2009. **33**(1): p. 191-205.
289. Cooper, V.S. and R.E. Lenski, *The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 736-9.
290. Zerbino, D.R. and E. Birney, *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs*. *Genome Res*, 2008. **18**(5): p. 821-9.
291. Krawitz, P., et al., *Microindel detection in short-read sequence data*. *Bioinformatics*, 2010. **26**(6): p. 722-9.
292. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
293. DePristo, M.A., et al., *A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data*. *Nat Genet*, 2011. **43**(5): p. 491-8.
294. Prim, R.C., *Shortest connection networks and some generalizations*. *Bell Syst. Tech. J.*, 1957(36): p. 1389-1401.
295. Balzarini M.G., D.R.J.A. *InfoGen versión 2013.FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. URL <http://www.info-gen.com.ar>.
296. Drummond, A.J., et al., *Relaxed phylogenetics and dating with confidence*. *PLoS Biol*, 2006. **4**(5): p. e88.
297. Hasegawa, M., H. Kishino, and T. Yano, *Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA*. *J Mol Evol*, 1985. **22**(2): p. 160-74.
298. Yang, Z. and J.P. Bielawski, *Statistical methods for detecting molecular adaptation*. *Trends Ecol Evol*, 2000. **15**(12): p. 496-503.
299. Grocock, R.J. and P.M. Sharp, *Synonymous codon usage in *Pseudomonas aeruginosa* PA01*. *Gene*, 2002. **289**(1-2): p. 131-9.