



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – Universidad Nacional  
de Rosario

Tesis para optar al título de Doctorado en Ciencias Biológicas:

**Análisis funcional del complejo MutSy de  
*Arabidopsis thaliana***

Presentada por:

*Rodrigo L. Gomez.*

Rosario, Argentina.

2012.

# **Análisis funcional del complejo MutSy de *Arabidopsis thaliana***

Rodrigo L. Gomez

Licenciado en Biotecnología,  
Universidad Nacional de Rosario.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI) dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre diciembre de 2007 y el marzo de 2012, bajo la dirección de la Dra. Claudia P. Spampinato.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

#### PUBLICACIONES:

- Gomez R.L., Galles C. y Spampinato C.P. (2011). High-level production of MSH2 from *Arabidopsis thaliana*: a DNA mismatch repair system key subunit. *Mol Biotechnol* **47**, 120-129.
- Galles, C., Gomez, R. L. y Spampinato, C. P. (2011). PMS1 from *Arabidopsis thaliana*: optimization of protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep* **38**, 1063–1070.
- Spampinato, C. P., Gomez, R. L., Galles, C., y Lario, L. D. (2009). From bacteria to plants: A compendium of mismatch repair assays. *Mutation Research: Reviews in Mutation Research* **682**, 110–128.
- Gomez, R.L. y Spampinato, C.P. (2012). “Functional effect of *Arabidopsis thaliana* MutS<sub>y</sub> in yeast”. Enviado.

#### REUNIONES CIENTÍFICAS:

- **XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB).** Pinamar, 3 6 de diciembre de 2005. Galles, C., Gómez, R., Inga, A. y Spampinato, C.P. “Cloning and expression of MutS and MutL complexes from *Arabidopsis thaliana*”.
- **XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB).** Rosario, 12 15 de noviembre de 2006. Gómez, R., Galles, C., Ciribilli, Y., Inga, A. y Spampinato, C.P. “Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* MutS and MutL complexes in yeast”.
- **XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB).** Mar del Plata, 17-20 de noviembre de 2007. Gómez, R. y Spampinato, C.P. “Cloning, expression and purification of a key *A. thaliana* DNA mismatch repair protein”.
- **XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB).** Puerto Madryn, 30 de noviembre - 3 de diciembre de 2010. Gómez, R.L. y Spampinato, C.P. “A yeast system to study the role of *Arabidopsis thaliana* MutS heterodímero”.

## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar agradezco al CEFOTI, donde pude desarrollar mi trabajo, y muy especialmente a la Dra. Claudia Spampinato, por su dirección, apoyo y plena confianza en mí en todo momento.

A mis tutores, Elena Orellano y Hugo Permingeat, que durante estos años siguieron mi trabajo e hicieron aportes de gran valor. A Hebe Bottai, por su excelente predisposición y su gran ayuda en los análisis estadísticos de la presente tesis.

A todas las hermosas personas que tuve el gusto de conocer durante mi estadía en el CEFOTI. A Marian, Eze, Cuca, Damián, La flaca, Clari, Gaby, Juli B. y Lauxmann, que soportaron mis alegrías y mis pesares desde un principio convirtiéndose en verdaderos amigos. En especial, a Lore, una verdadera amiga que me brindó un invaluable apoyo en momentos de necesidad. A todos los integrantes del lab 1, que me acogieron como uno más de ellos, especialmente a Juli Q., Juli E., Romi, Luciana, Maby y al pequeño Lucio. A mis queridos amigos de planta alta: Dieguito, Mauri, Coco, Lau, Vale T., Vale P. y Cele, por los innumerables momentos compartidos. Y a todos aquellos que formaron parte de los cafecitos, asados en el Mitre y esos maravillosos almuerzos (incluido Voldemort).

A Celi, cuya excelente compañía alegró todos estos años en el laboratorio. Quién llegó a conocerme con la asombrosa profundidad que sólo los más excelentes amigos logran. A vos amiga, compañera y hermana, nunca encontraré palabras para agradecer tu presencia en mi vida.

A mi gran amigo Cris, que me soportó y apoyó absolutamente en todo y a quien adoro con todo mi ser.

A mi bella amiga Sabri, a quien amo desde jardín de infantes, por su presencia permanente durante toda mi vida.

A mis amigos del poli Leo, Eleo, Luli, Sole, Ceci y Emi que comenzaron siendo compañeros de secundaria y hoy los cuento entre mis mejores amigos.

A mis amigos de la facu, en primer lugar a la primera persona que conocí en esas aulas y que me acompañó durante la carrera y mucho más, Pao. Y a mis grandes y mágicas amigas Mara y Sil, con quienes compartí y sigo compartiendo momentos hermosos.

A aquellas personas increíbles que la vida puso en mi camino: Vange, Leti, Juli, los viudos, Lore, “La Fer” y a todos aquellos amigos que no llegaré a nombrar en este reducido espacio con el que dispongo para darles las gracias por su participación en mi vida.

A mi familia, mis tíos y primos. A mis abuelos, que el destino alejó anteriormente a la conclusión de este trabajo pero que me acompañaron incondicionalmente en gran parte del mismo. A mi papá que siempre confió en mí, me alentó y me apoyo en todas mi decisiones.

A mi cómplice y mi todo, mi hermana Corina, quien es la persona más importante de mi vida y ocupa la porción central de mi corazón.

Y finalmente, a una de las personas más maravillosas que habitó este planeta, quien por los caprichos del destino hoy no está físicamente presente, pero permanece más viva que nunca dentro de mi maravillosa hermana y de mí: Gracias Ma, sin vos éste y muchos otros logros de mi vida no existirían...



*A mi mamá y a mi hermana...*

**ÍNDICE:**

<b>Índice:</b>	I
<b>Abreviaturas y Anglicismos:</b>	VIII
<b>1. Introducción:</b>	1
1.1 Replicación del ADN y mantenimiento de la integridad génica:	1
1.2 Mecanismos de reparación del ADN:	3
1.2.1. Reversión directa de las lesiones:	4
1.2.2. Sistema de reparación por eliminación de nucleótidos:	4
1.2.3. Sistema de reparación por eliminación de bases:	5
1.2.4. Reparación de escisiones doble hebra:	5
1.2.5 Sistema de reparación de bases incorrectamente apareadas:	6
1.3 Mecanismo molecular del sistema MMR:	7
1.3.1 Características del MMR en plantas superiores:	9
1.3.2. MutS y sus homólogos eucariotas:	10
1.3.2.1 La subunidad MSH7:	13
1.4. Estrés oxidativo y daño al ADN en <i>A. thaliana</i> :	16
1.4.1. Especies reactivas del oxígeno:	17
1.4.2. Oxidación del ADN. Guanina y 8-oxo-guanina:	20
1.4.3. Reparación del daño oxidativo al ADN:	21
1.5. Estado actual del conocimiento del sistema MMR en plantas:	24
<b>2. Objetivos:</b>	25
2.1. Objetivo general:	25
2.2. Objetivos particulares:	25
<b>3. Materiales y Métodos:</b>	26
3. 1. Medios de cultivo:	26
3.1.1. Medios para crecimiento de bacterias:	26
3.1.2. Medios de cultivo para crecimiento de levaduras:	26
3.1.3. Medios de cultivo para crecimiento de plantas <i>in vitro</i> :	27
3.2. Cepas y Plásmidos:	27
3.2.1. Cepas de <i>E. coli</i> :	27
3.2.1.1. Cepa de clonado y mantenimiento de los plásmidos:	27
3.2.1.2. Cepa de expresión:	28

3.2.2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> :	28
3.2.3. Plásmidos:	28
3.3. Soluciones generales utilizadas:	29
3.4. Extracción del ADN plasmídico bacteriano:	30
3.5. Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción:	30
3.6. Electroforesis del ADN en geles de agarosa y visualización:	31
3.6.1. Electroforesis de ADN:	31
3.6.2. Visualización del ADN en geles de agarosa:	31
3.7. Precipitación del ADN:	31
3.8. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos:	31
3.9. Transformación genética de células bacterianas:	32
3.9.1. Preparación de bacterias electrocompetentes para la transformación:	32
3.9.2. Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico por electroporación:	32
3.10. Electroforesis de proteínas:	33
3.10.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE):	33
3.10.2. Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturalizantes:	33
3.10.3. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata:	33
3.11. Cuantificación de proteínas:	34
3.12. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (análisis por Western blot):	34
3.13. Expresión y purificación de la proteína recombinante AtMSH2 en <i>E. coli</i> :	35
3.13.1. Expresión de AtMSH2 recombinante:	35
3.13.2. Purificación de AtMSH2 expresada en <i>E. coli</i> JM109(DE3) pRIL:	35
3.13.3. Digestión de AtMSH2 recombinante con enteroquinasa:	37
3.14. Material vegetal:	37
3.15. Crecimiento de las plantas en invernadero:	37
3.16. Crecimiento de plantas <i>in vitro</i> :	37
3.17. Generación de callos de <i>A. thaliana</i> :	38
3.18. Obtención de protoplastos de <i>A. thaliana</i> :	38
3.19. Inmunolocalización de AtMSH2 en protoplastos de <i>A. thaliana</i> :	39
3.20. Extracción de núcleos de <i>A. thaliana</i> :	40
3. 21. Extracción de núcleos de coliflor ( <i>Brassica oleracea</i> ):	41
3.22. Extracción de ADN genómico de tejido vegetal:	41

3.23. Selección de plantas mutantes en MSH2 por inserción de ADN-T:	42
3.24. Medidas del porcentaje de liberación de electrolitos:	43
3.25. Determinación de la concentración de clorofilas a y b:	43
3.26. Determinación de la concentración de flavonoides:	44
3.27. Determinación de las tasas de germinación:	44
3.28. Medida de la longitud de las raíces:	44
3.29. Tratamientos de estrés:	45
3.29.1. Tratamientos con MV:	45
3.29.1.1. Tratamientos de plántulas sumergidas en soluciones con MV:	45
3.29.1.2. Tratamientos en placas de MS-0 suplementadas con MV:	45
3.29.2. Tratamientos con NaCl:	46
3.30. Extracción de ARN de plantas y retrotranscripción:	46
3.30.1. Obtención de ADNc:	46
3.30.2. PCR en tiempo real:	47
3.31. Inmunodetección de 8-oxoG en el ADN: Ensayo de dot blot:	48
3.32. Transformación genética de <i>S. cerevisiae</i> :	48
3.32.1. Preparación de células de <i>S. cerevisiae</i> electrocompetentes:	48
3.32.2. Electroporación de <i>S. cerevisiae</i> :	49
3.33. Disrupción génica de MSH2 en levaduras de la cepa YLKL313:	49
3.34. Expresión de proteínas recombinantes en levaduras:	51
3.34.1. Expresión en cepas T334, YLKL313 e YRG313:	51
3.34.2. Expresión en cepas E134 y DAG60:	52
3.35. Extracción proteica de levaduras:	52
3.35.1. Extracción desnaturalizante:	52
3.35.2. Extracción no desnaturalizante:	52
3.36. Inmunoprecipitación:	53
3.37. Espectroscopía de masas:	53
3.38. Medidas de tasas de mutaciones: Ensayos de fluctuación:	54
3.39. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA):	55
3.39.1. Anillado de oligonucleótidos:	55
3.39.2. Fosforilación de oligonucleótidos:	55
3.39.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles:	56
3.40. Secuenciación de <i>CANI</i> :	56
3.40.1. Extracción de ADN genómico:	56

3.40.2. Amplificación de <i>CANI</i> mediante PCR:	57
3.40.3. Secuenciación de las muestras de amplificación y análisis de mutaciones:	58
3.41. Ensayos estadísticos:	59

## **Resultados y Discusión:**

<b>4. Purificación a homogeneidad y estudios inmunológicos de la proteína AtMSH2:</b>	60
4.1. Introducción:	60
4.2. Obtención de AtMSH2 de forma recombinante:	60
4.2.1. Purificación de AtMSH2 a homogeneidad:	61
4.2.2. Digestión de AtMSH2 recombinante con enteroquinasa:	62
4.3. Análisis de la abundancia y localización de la proteína AtMSH2 en tejidos vegetales. Cuantificación de los niveles de transcripción del gen MSH2:	63
4.4. Inmunodetección de AtMSH2 en extractos proteicos de núcleos de coliflor:	65
4.5. Discusión.	67
4.5.1 Purificación de AtMSH2 a homogeneidad:	67
4.5.2. Análisis de la abundancia y localización de la proteína AtMSH2 en tejidos vegetales. Cuantificación de los niveles de transcripción del gen MSH2:	68
4.5.3. Inmunodetección de AtMSH2 en núcleos de coliflor:	69
<b>5. Estudio de la funcionalidad del sistema MMR durante el daño oxidativo generado por estrés abiótico:</b>	71
5.1. Introducción:	71
5.2. Tratamientos para producción de estrés oxidativo en <i>A. thaliana</i> :	71
5.2.1. Tratamientos con metilviológeno:	72
5.2.2. Tratamientos con NaCl:	72
5.3. Evaluación del daño oxidativo en las plantas tratadas:	73
5.3.1. Observación visual de clorosis en las hojas:	73
5.3.2. Medidas de liberación de electrolitos:	73
5.3.3. Medida de la longitud de las raíces:	73
5.4. Evaluación de cambios transcripcionales en los genes del MMR de plantas de <i>A. thaliana</i> sometidas a estrés oxidativo:	74
5.4.1. Tratamiento con MV:	74

5.4.2. Tratamiento con NaCl:	76
5.5. Evaluación de parámetros fisiológicos y acumulación de bases oxidadas en el ADN en plantas salvajes y mutantes en el MMR sometidas a estrés oxidativo:	77
5.5.1. Selección de plantas de <i>A. thaliana</i> mutantes en MSH2:	78
5.5.2. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas crecidas en condiciones control:	80
5.5.3. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas sometidas a condiciones de estrés:	81
5.5.4. Evaluación del crecimiento radicular de plantas salvajes y mutantes <i>msh2</i> :	82
5.5.5. Comparación de tasas de germinación de plantas salvajes y mutantes <i>msh2</i> :	84
5.5.6. Estudios de acumulación de 8-oxoG en el ADN de plantas sometidas a distintos tratamientos de estrés: DOT BLOT:	85
5.5.6.1. Comparación de acumulación de 8-oxoG en ADN de plantas salvajes y mutantes en MSH2 en condiciones de crecimiento normal:	87
5.5.6.2. Comparación de los niveles de 8-oxoG en plantas sometidas a estrés abiótico	87
5.5.6.2.1. Niveles de 8-oxoG en plantas tratadas con MV:	88
5.5.6.2.2. Niveles de 8-oxoG en plantas tratadas con NaCl:	89
5.6. Discusión:	91
5.6.1. Evaluación de cambios transcripcionales en los genes del MMR de plantas de <i>A. thaliana</i> sometidas a estrés oxidativo y salino:	91
5.6.2. Evaluación de parámetros fisiológicos y acumulación de bases oxidadas en el ADN en plantas salvajes y mutantes en el MMR sometidas a estrés oxidativo y salino	93
<b>6. Análisis funcional de las proteínas atMSH2 y atMSH7 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>:</b>	96
6.1. Introducción:	96
6.2. Plásmidos utilizados en los ensayos con <i>S. cerevisiae</i> :	97
6.3. Expresión de AtMSH2 en cepas T334 e YLKL31:	99
6.4. Disrupción génica de yMSH2 en <i>S. cerevisiae</i> YJKL313. Generación de la cepa YRG313:	100
6.5. Expresión de AtMSH2 en levaduras E134 y DAG60:	102

6.6. Medidas de tasas de mutaciones en levaduras:	
Ensayos de fluctuación:	103
6.6.1. Ensayos de reversión en YLKL313 e YRG313:	105
6.6.2. Determinación de las tasas de mutaciones en cepas E134 y DAG60:	106
6.6.2.1. Efecto de AtMSH2 y AtMSH7 sobre tasas de mutaciones en cepas E134:	108
6.6.2.2. Efecto de AtMSH2 y AtMSH7 sobre las tasas de mutaciones en cepas DAG60	111
6.7. Confirmación de la formación del complejo funcional AtMutSy expresado de forma heteróloga:	112
6.7.1. Electroforesis no desnaturizante seguida de electrotransferencia e inmunodetección:	112
6.7.2. Inmunoprecipitación del complejo AtMSH2-AtMSH7 expresado en <i>S. cerevisiae</i> seguido del análisis mediante espectroscopía de masa de tipo MALDI-TOF-TOF:	113
6.7.3. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA):	114
6.8. Estimación del espectro de mutaciones en el locus <i>CAN1</i> producido por la expresión heteróloga de AtMSH2-AtMSH7:	116
6.8.1. Modificación del espectro de mutaciones de la cepa E134 por la expresión de AtMutSy:	118
6.8.1.1. Análisis de las diferencias de sustituciones de bases al sobreexpresar AtMutSy:	121
6.8.2. Análisis de las mutaciones a nivel proteico:	124
6.9. Discusión:	128
6.9.1. Ensayos en las cepas T334, YLKL313 e YRG313:	128
6.9.2. Ensayos en las cepas E134 y DAG60:	129
6.9.2.1. Ensayos de cambio de movilidad electroforética:	131
6.9.2.2. Ensayos de Fluctuación: Medidas de las tasas de mutaciones:	132
6.9.2.3. Estimación de especificidad de unión del dímero AtMutSy:	134
6.9.3. Conclusiones generales:	139
6.a. Apéndice:	141
6.a.1. Muestras conteniendo el vector vacío (Grupo YEP, control):	141
6.a.2. Muestras que expresan AtMSH2-AtMSH7 (grupo MM):	143

<b>7. Conclusiones:</b>	146
<b>8. Resumen:</b>	148
<b>9. Referencias:</b>	151



**ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS:**

**Abreviaturas:**

**8-oxoG:** 8-oxo-Guanina.

**AP:** sitioapurínico/apirimidínico.

**At:** *Arabidopsis thaliana*.

**BER:** sistema de reparación por eliminación de bases (del inglés: Base Excision Repair).

**CTAB:** bromuro de cetil trimetil amonio.

**DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol.

**DO:** densidad óptica.

**EROs:** Especies Reactivas del Oxígeno.

**HEPES:** Acido 4-(2-Hidroxietil)-1-Pireracínil-Etanosulfónico.

**IDL:** inserción o eliminación de nucleótidos (del inglés: insertion/deletion loop).

**MLH:** homólogo de MutL.

**MMR:** Sistema de reparación de bases incorrectamente apareadas (del inglés, *Mismatch Repair System*)**MSH:** homólogo de MutS.

**MV:** Metilviológeno.

**NER:** sistema de reparación por eliminación de nucleótidos (del inglés: Nucleotide Excision Repair).

**NHEJ:** sistema de reparación por unión de extremos no homólogos (del inglés: non-homologous end joining).

**pb:** pares de bases.

**PCNA:** Antígeno nuclear de proliferación celular (del inglés, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*).

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

**PMS:** Mutante en la segregación post-meiótica (del inglés, *Post-Meiotic Segregation Mutant*).

**PMSF:** Fenilmetilsulfonil fluoruro.

**RFC:** Factor de replicación C (del inglés, *Replication Factor C*).

**RH:** recombinación homóloga.

**RPA:** Proteínas de replicación A (del inglés, *Replication Protein A*).

**RT:** Reacción de retrotranscripción del ARN.

**Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*.

**TAE:** Tris acetato EDTA.

**TBE:** Tris borato EDTA.

**TBS:** Buffer Tris salino.

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.

**Tris:** N-tris-(hidroximetil) aminometano.

**UV:** ultravioleta.

### **Anglicismos:**

**Buffer:** solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo pH).

**Dot Blot:** ensayo de inmunodetección sobre muestras de ADN adherido a membranas de nylon.

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.

**Western Blot:** la técnica que emplea la transferencia de proteínas separadas electroforéticamente a una membrana apropiada para un posterior revelado con anticuerpos específicos.

# *INTRODUCCIÓN*

## **1. INTRODUCCIÓN:**

### **1.1 Replicación del ADN y mantenimiento de la integridad génica:**

Todos los organismos vivos están finalmente definidos por sus genomas: grandes moléculas de ADN que se ordenan en uno o más cromosomas. Resulta, por lo tanto, de vital importancia el mantenimiento de la estabilidad genómica para evitar cambios en las secuencias de ADN (mutaciones) que puedan alterar la información genética e integridad estructural de los cromosomas, así como su transmisión a las células descendientes. Existen diversos mecanismos celulares responsables del mantenimiento de la estabilidad génica. Los sistemas proteicos responsables de tales actividades se encuentran ampliamente conservados entre los organismos, presentando en muchos casos redundancia funcional (Morita y col., 2010).

Se definen como mutaciones a los cambios permanentes y, por lo tanto, heredables en la estructura del ADN. Estos eventos son poco comunes y ocurren espontáneamente con frecuencias de  $10^{-9}$  –  $10^{-10}$  mutaciones por pares de bases por duplicación (Drake, 1991). Las fuentes de tales cambios abarcan una amplia gama de lesiones. Uno de los factores más relevantes que llevan a la incorporación de lesiones en el ADN es la propia replicación de esta macromolécula. En primer lugar, puede producirse la incorporación errónea de nucleótidos que genera pares de bases no complementarios en la hélice, que si no se corrigen, provocarán una mutación durante la siguiente ronda de replicación (Lai y Beatti, 1988). De forma similar, la generación de estructuras secundarias inusuales y el desplazamiento de las ADN polimerasas sobre hebras de ADN en regiones de secuencias repetitivas (microsatélites) pueden generar mutaciones por inserción o supresión de nucleótidos (Kunkel y Soni, 1988). Estas lesiones se denominan IDLs, por sus siglas en inglés (insertion-deletion loops), y en mamíferos se encuentran relacionadas con ciertos tipos específicos de cáncer (Bebenek y Kunkel, 2000). Al producirse este tipo de lesiones dentro de la secuencia codificante de un gen, se genera un corrimiento del marco de lectura que, por lo general, conlleva a la pérdida de función del producto génico expresado.

Otros fenómenos que pueden alterar la estructura del ADN si permanecen sin repararse surgen de la desaminación espontánea de bases y la pérdida de bases purínicas o pirimidínicas como resultado de la ruptura del enlace glicosídico entre la base y la desoxirribosa. Dichos procesos suelen ocurrir de forma espontánea y son comunes en mamíferos (Lindahl y Nyberg, 1972; Kuhnlein, 1985).

Paralelamente, el ADN se encuentra sometido al ataque de sustancias químicas como a distintas radiaciones con capacidades mutagénicas como las radiaciones ionizantes (rayos X o  $\gamma$ ) y la luz ultravioleta (Boorstein y col., 1990; Doetsch y col., 1995; Zhou y col., 2001). Las sustancias químicas mutagénicas pueden ser endógenas o exógenas. Las primeras pueden provenir del metabolismo celular normal o ser generadas durante ciertas condiciones de estrés, como por ejemplo las especies reactivas del oxígeno (EROs). Las sustancias mutagénicas exógenas abarcan un amplio grupo de especies químicas entre las cuales son destacables los agentes alquilantes y oxidantes que reaccionan con el ADN, así como, los agentes que producen entrecruzamientos covalentes de hebras y roturas de la doble hélice (McHugh y col., 2000; Dronkert y Kanaar, 2001).

Es importante notar que las mutaciones, también, pueden provenir de la incorporación directa de nucleótidos alterados químicamente o mediante la incorporación errónea de los nucleótidos opuestos a las bases dañadas en la hebra molde. También, existen ciertos compuestos hidrofóbicos, especialmente, compuestos policíclicos conjugados, que al ser modificados por enzimas hepáticas detoxificantes en animales, son transformados en derivados hidrosolubles que por su naturaleza anfipática tienen la capacidad de intercalarse entre las bases del ADN, y producir mutaciones por corrimiento del marco de lectura (Huff y Topal, 1987).

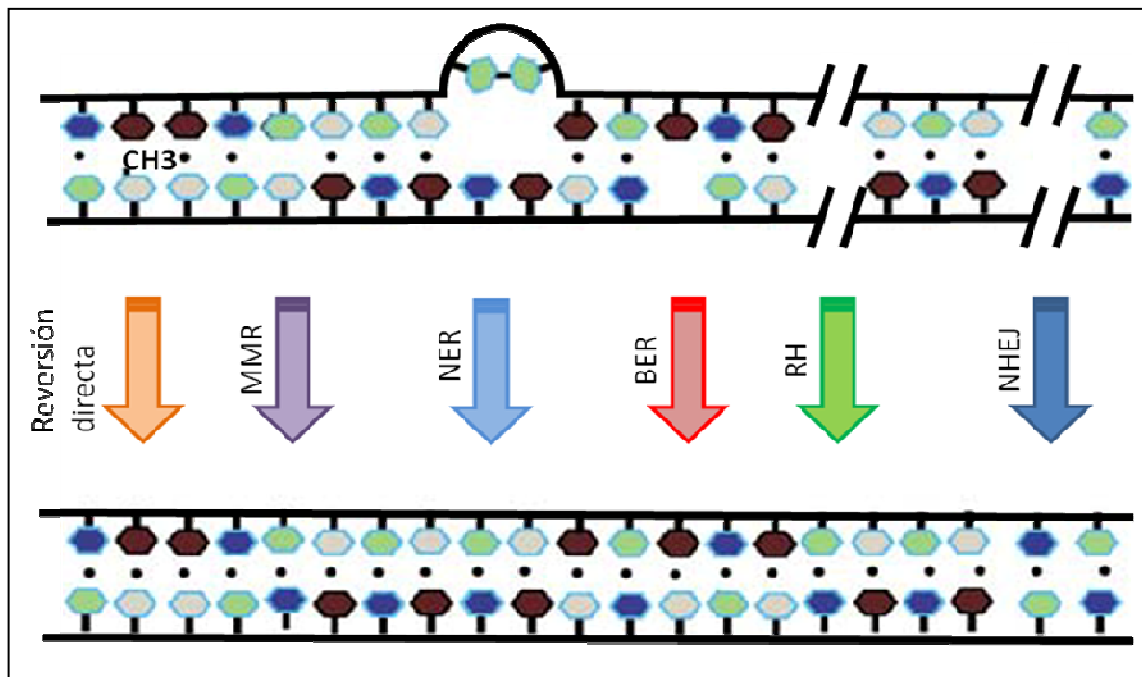
El mantenimiento de las tasa de mutaciones en los niveles comentados previamente es el resultado de la acción concertada de diversos mecanismos celulares. Entre ellos pueden mencionarse sistemas de detoxificación de sustancias nocivas y de reparación de lesiones que aseguran el mantenimiento de la integridad del ADN.

El primer factor que asegura la transmisión de la información genética de los progenitores a los descendientes, reside de forma intrínseca en la geometría del apareamiento de las bases en el ADN y en los sistemas proteicos encargados de la replicación del mismo. Las principales enzimas encargadas de la biosíntesis del ADN, denominadas ADN polimerasas, aseguran el apareamiento correcto de las bases en las hebras nacientes con respecto a las hebras moldes. Sin embargo, en determinados casos estas enzimas pueden cometer errores que conllevan al agregado de un nucleótido no complementario en la cadena naciente. Muchas de las ADN polimerasas replicativas poseen actividad exonucleasa correctora de prueba asociada con la capacidad de editar estos errores mediante hidrolizado y resintetizado del fragmento correspondiente. Finalmente, la selectividad de las ADN polimerasas por los nucleótidos sumada a la

actividad correctora de prueba confiere una tasa de errores del orden de  $10^{-7}$  inserciones incorrectas por par de bases por duplicación (Iyer y col., 2006). Adicionalmente, existen diversos mecanismos cuya función específica reside en la reparación o eliminación de lesiones en el ADN que puedan establecerse como mutaciones variando la información contenida en estas macromoléculas. Es importante notar, que existe una cierta redundancia funcional entre estos sistemas, confirmando de este modo la importancia de estos procesos.

## 1.2 Mecanismos de reparación del ADN:

Los sistemas de reparación del ADN, en su conjunto, son finalmente los responsables del mantenimiento de la información genética que posteriormente será transferida a las células descendientes.



**Figura 1.1. Mecanismos de reparación del ADN:**

Existen diversos mecanismos de reparación que lidian con los diversos tipos de daño al ADN. Estos incluyen: [1] la reversión directa del daño, [2] el sistema de corrección de bases incorrectamente apareadas (MMR), [3] el sistema de corrección por eliminación de nucleótidos (NER), [4] el sistema de corrección por eliminación de bases (BER), [5] la corrección por recombinación homóloga (RH) y [6] el sistema de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Adaptado de Hakem 2008.

En la figura 1.1 se ejemplifican los sistemas generales de reparación, los cuales se comentan brevemente a continuación, para finalmente focalizar la atención al sistema estudiado en la presente tesis, el sistema de reparación de bases incorrectamente apareadas en el ADN o sistema MMR por sus siglas en inglés, Mismatch Repair System.

### **1.2.1. Reversión directa de las lesiones:**

El primero de estos sistemas, lo constituye la reversión directa de lesiones particulares por sistemas enzimáticos simples (Sedgwick y col., 2007). Un ejemplo de la reversión directa del daño, presente en plantas y microorganismos, es el proceso denominado fotoreactivación. El mismo es responsable de la reparación de daños al ADN producidos por radiación ultravioleta (UV). La luz UV genera aductos del tipo de dímero de pirimidina por formación de anillos de ciclobutano y aductos del tipo pirimidina (6-4) pirimidinona, también llamados fotoproductos 6-4 (Paterson y col, 1974). En este proceso actúan enzimas denominadas fotoliasas que utilizan la energía proveniente de la luz visible para eliminar las lesiones en el ADN (Sinha y Häder, 2002).

Otro ejemplo de este tipo de reversión directa se encuentra en la O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) de mamíferos y sus análogas bacterianas (Hakem, 2008). Estas enzimas eliminan grupos metilos de guaninas modificadas transfiriéndolos a sus sitios activos y finalmente sufriendo un proceso de ubiquitinación y consecuente degradación vía proteosoma.

### **1.2.2. Sistema de reparación por eliminación de nucleótidos:**

Un mecanismo destacable, altamente conservado en todos los organismos, es el sistema de reparación por eliminación de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés) (Shuck y col., 2008). Este sistema de múltiples subunidades está encargado de la reparación de lesiones que generan grandes distorsiones en la estructura normal del ADN, como modificaciones de nucleótidos con grupos químicos voluminosos (de Laat y col., 1999). El sistema, también, actúa en la reparación de dímeros de pirimidina, solapándose a la fotoreactivación en plantas y microorganismos, pero constituyendo la principal vía de eliminación de estas lesiones en animales y otros organismos donde no existen enzimas con actividad fotoliasa (Friedberg y col., 1995).

Existen dos vías alternativas del NER, la primera de ellas se denomina NER de genoma global y corrige lesiones de todo el genoma. La segunda se denomina NER acoplado a la transcripción y actúa sobre genes que se encuentran en replicación activa (Hanawalt, 2002). En ambos casos, el sistema comienza con el reconocimiento de la lesión que provoca la distorsión local en el ADN. A continuación, se generan roturas simple hebra a varios nucleótidos de distancia hacia ambos lados de la lesión y se elimina el oligonucleótido conteniendo la misma. Finalmente, se resintetiza el ADN en



la mella generada y se liga. Las dos vías alternativas mencionadas anteriormente cumplen sus funciones mediante este mecanismo general difiriendo únicamente en los primeros componentes proteicos encargados del reconocimiento de las lesiones (Friedberg y col., 2006).

### **1.2.3. Sistema de reparación por eliminación de bases:**

El sistema de corrección por eliminación de bases, denominado BER por sus siglas en inglés, constituye otro de los mecanismos con los que cuentan los organismos vivos para mantener la integridad génica (Zharkov, 2008). El mismo funciona en la reparación de lesiones específicas sobre las bases del ADN. Entre tales lesiones pueden mencionarse las producidas por oxidación de las bases, modificaciones químicas y desaminación de bases. El proceso es iniciado por enzimas de reparación denominadas ADN N-glicosilasas que reconocen la base dañada e hidrolizan el enlace glicosídico entre ésta y la desoxirribosa (Barnes y col., 1993).

Como se comentará más adelante, este sistema reviste especial importancia en la reparación del daño oxidativo al ADN (David y col., 2007). Existen numerosas glicosilasas conservadas evolutivamente abocadas a la reparación de este tipo de lesiones (Slupphaug y col., 2003; Krokan y col., 1997).

### **1.2.4. Reparación de escisiones doble hebra:**

Existen diversos agentes que pueden provocar la rotura doble hebra de las moléculas de ADN, fundamentalmente la radiación ionizante y el daño oxidativo intenso (Britt, 1996). Adicionalmente, pueden contarse en las causas de este tipo de lesiones fenómenos como la generación de cromosomas dicéntricos y el movimiento de elementos transponibles (Puchta, 2005; Bleuyard y col., 2006)

Existen dos sistemas abocados a la reparación de roturas doble hebra de las cadenas de ADN. El primero lo constituye la recombinación homóloga (HR, de sus siglas en inglés). Este sistema utiliza las cromátides hermanas como una fuente de ADN molde para la reunión del ADN fragmentado. El proceso ocurre en múltiples pasos y requiere un alto número de proteínas (Thompson y Schild, 2002; Li y Heyer, 2008). En segundo lugar, se encuentra el sistema de reparación por unión de extremos no homólogos o NHEJ por sus siglas en inglés (Lees-Miller y Meek, 2003). Ambos sistemas se encuentran presentes en todos los organismos, variando únicamente en el grado de participación de cada uno. En mamíferos y plantas, por ejemplo, la reparación

de roturas doble hebra se realiza en un 10 % por recombinación homóloga, encargándose el sistema NHEJ del 90 % de las lesiones restantes. En contraste, en bacterias y levaduras casi la totalidad de la reparación de estas lesiones tiene lugar mediante recombinación homóloga (Hakem, 2008). En mamíferos y plantas, la recombinación homóloga opera en las fases S o G2 del ciclo celular, mientras que el sistema NHEJ tiene lugar, fundamentalmente, en las fases G0-G1 (Rothkamm y col. 2003; Ferreira y Cooper, 2004).

La diferencia entre estos dos sistemas radica en que el segundo de ellos, NHEJ, en contraste a la recombinación homóloga, no restituye exactamente la secuencia del ADN fragmentado, produciendo una molécula reparada en la cual faltan algunos pares de bases en el sitio de unión. Este resultado es intrínseco al proceso de reparación el cual comienza con el desenrollamiento del ADN en los extremos de ambos fragmentos de ADN a unir. A continuación, una corta región monocatenaria en un ADN aparea sus bases con una región homóloga en el otro ADN. Finalmente, se eliminan las regiones 5' no apareadas y se ligan los extremos libres. Como consecuencia, la rotura doble hebra queda reparada pero se han perdido varios pares de bases en el lugar de la escisión.

#### **1.2.5 Sistema de reparación de bases incorrectamente apareadas:**

Los errores biosintéticos que escapan al sistema de edición de las ADN polimerasas, son corregidos, fundamentalmente, por el sistema de reparación de bases incorrectamente apareadas, elevando la fidelidad de la replicación entre 50 a 1.000 veces (Iyer y col., 2006). Estos valores dan cuenta de la importancia de este sistema en el mantenimiento de la fidelidad génica. Los defectos en el sistema MMR conducen a un marcado aumento en las sustituciones de bases y en las mutaciones por corrimiento del marco de lectura (Chen y col., 2001). A su vez, permiten recombinación entre secuencias cuasi-homólogas y, en células de mamíferos, confieren resistencia a los efectos citotóxicos de una amplia variedad de agentes químicos que dañan al ADN, los cuales son utilizados como quimioterapéuticos en tratamientos oncológicos (Bignami y col., 2003; Fedier y Fink, 2004). En humanos, la deficiencia genética en este sistema está estrechamente relacionada con el cáncer de colon no polipósico hereditario así como con el desarrollo de ciertos tipos de tumores esporádicos (Jiricny y Marra, 2003; Lin y col., 2004; Muller y Fishel, 2002).

El sistema MMR se extiende más allá de la corrección de los errores post-replicativos y está involucrado en la reparación de ciertas lesiones en el ADN

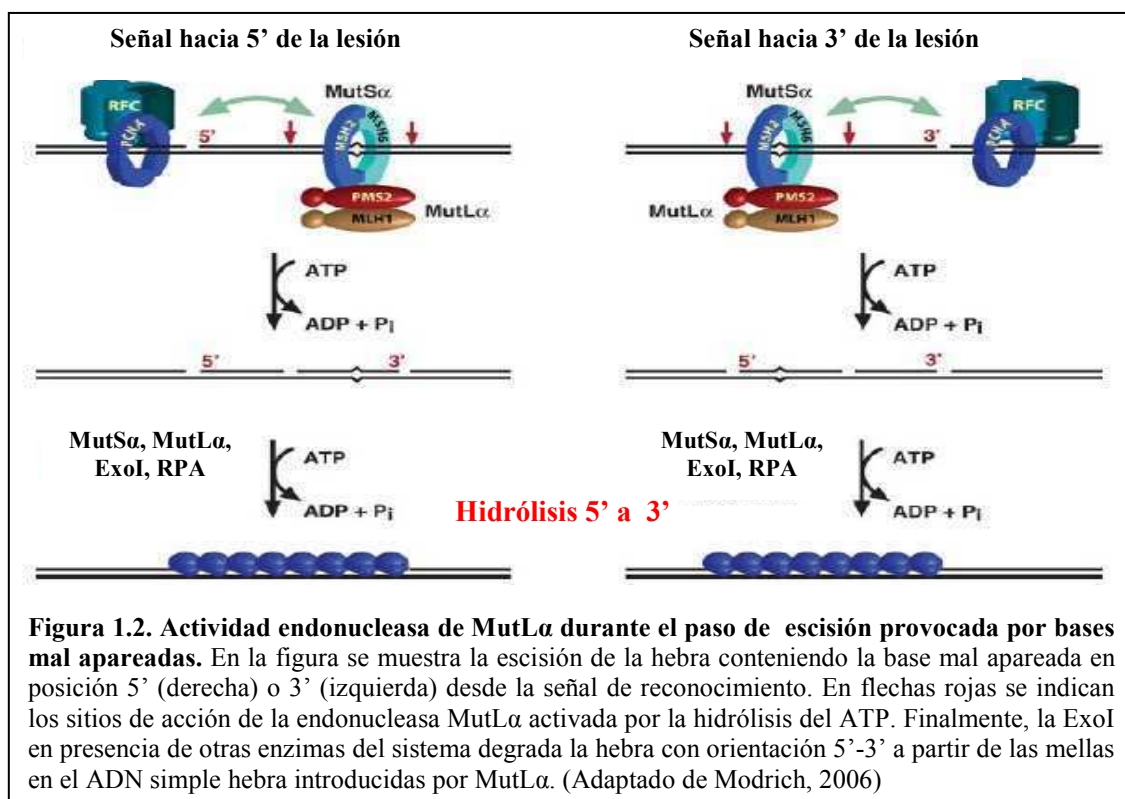
producidas por factores endógenos y exógenos [revisado recientemente en las referencias (Hsieh y Yamane, 2008; Iyer, y col., 2006; Jiricny, 2006; Kunkel y Erie, 2005; Li, 2008)]. Estas lesiones incluyen bases dañadas o modificadas, principalmente O<sup>6</sup>-metilguanina, 8-oxoguanina y fotoproductos inducidos por radiación ultravioleta, entre otras. Finalmente, el sistema MMR, también, contribuye al arresto del ciclo celular y la apoptosis de células humanas como respuesta a la acumulación de lesiones en el ADN (Liu y col., 2010; Yoshioka y col., 2006; Hewish y col., 2010).

### **1.3 Mecanismo molecular del sistema MMR:**

Este mecanismo de reparación se ha conservado evolutivamente, encontrándose en bacterias, levaduras, células humanas y plantas (Kolodner y Marsischky, 1999; Marti, y col., 2002; Schofield y Hsieh, 2003; Kunkel y Erie, 2005; Iyer, y col., 2006; Kimura y Sakaguchi, 2006; Modrich, 2006). El sistema en organismos eucariotas es similar al procariota en cuanto a la estrategia bioquímica utilizada, pero muy diferente en cuanto a la naturaleza y complejidad de las proteínas involucradas. Básicamente, este sistema reconoce el error, discrimina entre las hebras de ADN parental e hija, elimina la lesión sobre la hebra naciente y resintetiza el ADN.

En *Escherichia coli*, el proceso se inicia cuando homodímeros de MutS se unen a las bases incorrectamente apareadas (Su y col., 1988), seguidos por homodímeros de MutL. El complejo MutS-MutL-ADN activa la endonucleasa MutH que reconoce la hebra recién sintetizada, transitoriamente sin metilar y la escinde (Welsh y col., 1987). La escisión ocurre en la secuencia d(GATC) hemimetilada más cercana al par de bases incorrectamente apareadas, 3' o 5' del mismo. Este reconocimiento involucra una comunicación a lo largo de la hélice del ADN entre el error y la secuencia d(GATC) hemimetilada (Pluciennik y Modrich, 2007). Involucra la translocación de las proteínas por el ADN (Allen y col., 1997) y depende de la hidrólisis del ATP (Au y col., 1992; Spampinato y Modrich, 2000). El siguiente paso es estrictamente nucleolítico, se inicia en la escisión y continúa hacia las bases incorrectamente apareadas (Grilley y col., 1993). La helicasa II desenrolla la hebra y una de las varias exonucleasas específicas (3' → 5' o 5' → 3') la degradan (Burdett y col., 2001). La hebra molde queda protegida por la proteína de unión a simple hebra, SSB. Finalmente, la ADN polimerasa III resintetiza la secuencia correcta y la ADN ligasa acaba con el proceso de la reparación (Modrich y Lahue, 1996).

En organismos eucariotas, el proceso inicial de la reparación requiere de heterodímeros de homólogos de MutS (MSH) y heterodímeros de homólogos de MutL (MLH). Otros homólogos de MutL son llamados PMS, cuyo nombre refleja que los mutantes *pms* en levaduras exhiben altos niveles de segregación postmeiótica. Existen múltiples homólogos de MutS designados como MSH1 - MSH7 y varios homólogos de MutL conocidos como MLH1 - MLH3 y, PMS1 y PMS2. De todos los miembros de las familias descritas, sólo algunos son responsables de mantener la estabilidad del ADN nuclear durante la división mitótica. El proceso general del sistema MMR en eucariotas se esquematiza en la figura 1.2.



El heterodímero MSH2-MSH6, conocido como MutSα, reconoce los pares de bases incorrectamente apareados e inserciones o supresiones de 1 a 10 nucleótidos. Por su parte, el heterodímero MSH2-MSH3, conocido como MutSβ, reconoce inserciones o supresiones de 2 a 10 nucleótidos (Drummond y col., 1995; Genschel y col., 1998; Marsischky y col., 1996). El paso subsiguiente involucra la participación de MutLα, heterodímero de MLH1 y PMS2 en células humanas o MLH1 y PMS1 en levaduras y plantas (Li y Modrich, 1995; Prolla y col., 1994). La posterior discriminación entre las hebras parental e hija, se especula, estaría dada por los extremos 5' y 3' de los fragmentos de Okazaki o por la síntesis creciente 3' de la hebra adelantada dado que no

existe homólogo de MutH en las células eucariotas. Algunas observaciones físicas y genéticas han sugerido a PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) como el vínculo físico entre la replicación del ADN y este sistema de reparación (Chen y col., 1999; Clark y col., 2000; Spampinato y col., 2009). De esta manera los extremos de ADN en la horquilla funcionarían como la señal de discriminación de la hebra recién sintetizada durante la replicación del ADN (Masih y col., 2007; Umar y col., 1996). El proceso continúa con la participación de RPA (proteína de unión a simple hebra), RFC (complejo de la horquilla replicativa), exonucleasa I y ADN polimerasa  $\delta$  (Longley y col., 1997; Lin y col., 1998; Genschel y col., 2002; Dzantiev y col., 2004; Constantin y col., 2005). Recientemente, se ha indicado la existencia de uno o más mecanismos de reparación independientes de exonucleasa I (Kadyrov y col., 2009) que requieren la integridad funcional de la actividad endonucleasa latente de MutL $\alpha$  (Kadyrov y col., 2006; Kadyrov y col., 2007).

### 1.3.1 Características del MMR en plantas superiores:

La estabilidad genómica de las plantas está amenazada por la radiación UV-B producto de la constante exposición solar, por la generación de EROs, debido a su fuerte metabolismo oxidativo, y por su incapacidad para eludir genotoxinas ambientales. Adicionalmente, las plantas carecen de una reserva de línea germinal, las gametas se originan solo hacia la finalización del ciclo de vida, a partir de células somáticas que han atravesado un alto número de divisiones, con la consecuente posibilidad de mutagénesis espontánea o ambiental. Por todo esto, es notable la necesidad de sistemas altamente fieles, que aseguren la estabilidad génica tanto en células meristemáticas como en sus descendientes florales. Los genomas de *Arabidopsis thaliana* y otras plantas superiores revelaron ortólogos de la mayoría de las proteínas de mamíferos y levaduras involucradas en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Entre ellos pueden citarse los mecanismos de reparación por escisión, reparación de roturas en las hebras de ADN, la existencia de polimerasas de ADN de síntesis translesiones y proteínas de control del estado del ADN (Hays, 2002).

En las plantas, el estudio del sistema MMR es relativamente reciente. Se han identificado homólogos de MutS y MutL en *A. thaliana* (Ade y col., 1999; Culligan y Hays, 2000; Jean y col., 1999), trigo (Dong y col., 2002), maíz (Dong, y col., 2002; Horwath y col., 2002) y tomate (Tam y col., 2009), a través del estudio de homologías en las secuencias del ADN.

Existen tres ortólogos de MutS que junto a MSH2, forman los dímeros funcionales en el reconocimiento y reparación. Estos se denominan MSH6, MSH3 y MSH7 y dan origen a los complejos MutS $\alpha$ , MutS $\beta$  y MutS $\gamma$ . Una característica especial de las plantas es la presencia de MSH7, hasta ahora no identificado en otros organismos eucariotas (Ade, y col., 1999; Culligan y Hays, 2000; Dong, y col., 2002; Tam y col., 2009; Lloyd y col., 2007).

El conocimiento sobre el sistema MMR en plantas se ha extendido al análisis de *A. thaliana* mutantes en genes del MMR [revisado en (Spampinato y col., 2009)]. Las plantas mutantes muestran cambios en la longitud de secuencias repetitivas en el genoma, fenómeno conocido como inestabilidad en los microsatélites (Leonard y col., 2003; Alou y col., 2004; Depeiges y col., 2005; Hoffman y col., 2004) y un aumento en la frecuencia de recombinación entre secuencias divergentes (Li y col., 2006; Emmanuel y col., 2006; Dion y col., 2007; Lafleuriel y col., 2007; Li y col., 2009) confirmando que este sistema de reparación del ADN resulta esencial para mantener la integridad del genoma vegetal. Adicionalmente, ha sido evidenciada en *A. thaliana* la participación del complejo MutS $\alpha$  en la reparación de daños producidos por radiación ultravioleta B (Lario y col., 2011). Sin embargo, como se puede inferir, el conocimiento sobre el sistema MMR de plantas superiores está en sus comienzos. Resta aún determinar la contribución del sistema MMR en la corrección de distintos tipos de mutaciones puntuales y lesiones inducidas por factores exógenos en el ADN de plantas.

### **1.3.2. MutS y sus homólogos eucariotas:**

La mayoría de las eubacterias y todos los eucariotas examinados hasta el momento codifican homólogos de proteínas de reparación del ADN tipo MutS. En eubacterias existe sólo un tipo de MutS, mientras que en eucariotas se codifican al menos seis de proteínas homólogas a MutS (MSH), correspondiente a una familia génica conservada (ortólogos). Esto sugiere una evolución de las líneas individuales de esta familia génica mediante eventos de duplicación y especialización (Culligan y col., 2000). Análisis genéticos y bioquímicos han demostrado que la evolución de distintas familias génicas de MSHs eucariotas ha sido acompañada por la adquisición de nuevas funciones. Los homólogos MSH1 se encuentran especializados en la reparación mitocondrial en levaduras (Reenan y Kolodner, 1992) y reparación mitocondrial y plastídica en plantas (Xu y col., 2011). MSH2, MSH3, MSH6 y en plantas MSH7, se

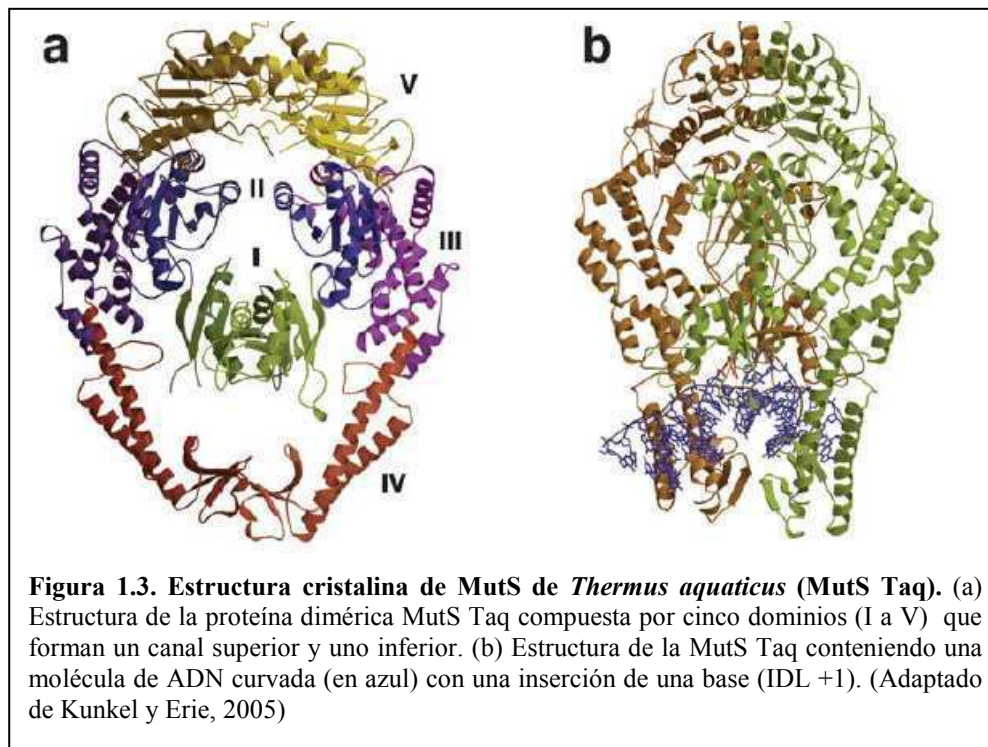
encuentran implicados en la reparación del ADN nuclear (Modrich y Lahue, 1996; Culligan y Hays, 2000). De forma paralela, MSH4 y MSH5 intervienen positivamente en el proceso de recombinación homóloga durante la meiosis (Ross-Macdonald y Roeder, 1994; Hollingsworth y col., 1995).

A diferencia de los homodímeros bacterianos MutS, las proteínas eucariotas responsables del reconocimiento de apareamientos incorrectos de bases funcionan como heterodímeros. Estos complejos formados por distintas combinaciones de MSHs, reconocen distintos tipos de lesiones pero, en ciertos casos, presentan cierta redundancia funcional (Kunkel y Erie, 2005; Iyer y col., 2006). A su vez, se observa una influencia del entorno de las bases mal apareadas en la eficiencia del reconocimiento y finalmente en la reparación (Hays y col., 2005). MutS y sus homólogos son miembros de la familia ATPasa de transportadores tipo ABC (Adenine nucleotide Binding Cassette) (Aravind y col., 1999). El primero de los heterodímeros, MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6), reconoce bases mal apareadas e IDLs pequeñas de 1 a 3 nucleótidos en una de las hebras (Drummond y col., 1995; Palombo y col., 1996; Genschel y col. 1998). En segundo lugar, MutS $\beta$  (MSH2-MSH3) reconoce IDLs de más de 3 nucleótidos pero no reconoce apareamientos incorrectos base-base (Genschel y col. 1998; Palombo y col., 1995). En *A. thaliana*, MSH7 forma un heterodímero funcional con MSH2, conocido como MutS $\gamma$ , que repara ciertos desapareamientos de bases específicos pero no reconoce inserciones de 1 o 3 nucleótidos de timina (Culligan y Hays, 2000; Wu y col., 2003).

La dilucidación de las estructuras de MutS procariontas y de células humanas permitió caracterizar y confirmar la función proteica. Las proteínas MutS de *Thermus aquaticus* y *E. coli* han sido cristalizadas en presencia y ausencia de un heteroduplex de ADN (Lamers y col., 2000; Obmolova y col., 2000). Adicionalmente se cuenta con la estructura cristalina del complejo MutS $\alpha$  de humanos (Warren y col., 2007). Estas estructuras revelan que cada subunidad contiene 5 dominios, los dominios I y IV unen ADN, y el dominio V contiene la interfase de dimerización junto con el sitio de unión a nucleótidos específico para ADP o ATP (figura 1.3). En las proteínas eucariotas homólogas se encuentran los 5 dominios mencionados sumados a una región amino terminal que contiene un motivo de interacción con PCNA (Kunkel y Erie, 2005).

En ausencia del ADN, MutS forma un dímero estable con los dominios II, III y V manteniendo la estructura. Sin embargo, los dominios I y IV son demasiado móviles para ser detectados mediante cristalografía (Obmolova y col., 2000). En presencia de

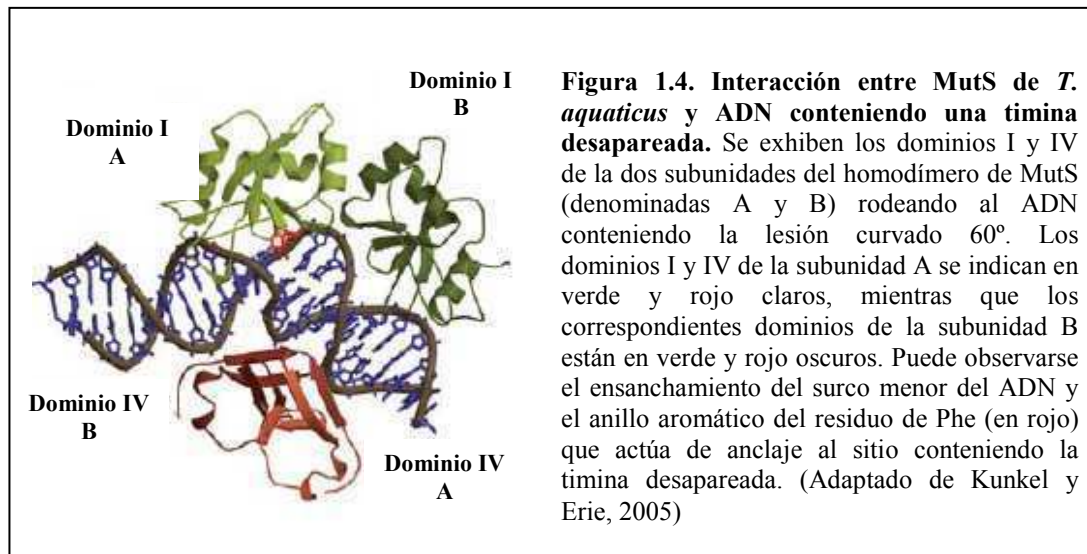
ADN con bases incorrectamente apareadas, se observa que el homodímero de MutS se une de forma asimétrica al heteroduplex de ADN.



Los dominios I y IV envuelven el ADN y forman interfases que crean un canal superior y uno inferior (figura 1.3a). El canal superior es lo suficientemente amplio y posee un potencial electrostático adecuado para permitir que el ADN se ubique. Este dominio recibe generalmente el nombre de abrazadera y podría funcionar durante la recombinación y en la búsqueda de la señal de reconocimiento de la hebra naciente (Yang, 2000). El canal inferior interacciona con el ADN conteniendo la lesión (figura 1.3.b). Aunque ambas subunidades proteicas contactan al ADN, la unión es asimétrica. Cada subunidad forma numerosos contactos distintos, donde la mayoría son inespecíficos de la secuencia del ADN. Solo dos residuos, pertenecientes a la misma subunidad hacen contacto específico con las bases desapareadas. Esta interacción involucra el motivo Phe-X-Glu en MutS bacteriana, donde X representa cualquier residuo aminoacídico (Schofield y col., 2001). El anillo aromático del residuo de Phe de una de las subunidades contacta a la base desapareada como se puede observar en la figura 1.4. El residuo de glutamato conservado interactúa con varias bases desapareadas formando puentes hidrógeno con el átomo de nitrógeno N3 de la timina desapareada o el N7 de la purina desapareada (Obmolova y col., 2000; Lamers y col., 2003; Natrajan y col., 2003). El motivo Phe-X-Glu está conservado en MSH6 y MSH7 pero no en MSH3



y MSH2 de organismos eucariotas. Este hecho implica que, al igual que MutS, MutS $\alpha$  y MutS $\gamma$  se unen al ADN de forma asimétrica y de manera diferente a MutS $\beta$  (Genschel y col., 1998; Culligan y col., 2000). Cabe recordar que MutS $\beta$  no reconoce bases mal apareadas sino IDLs con más de 3 bases desapareadas. Los polipéptidos MSH3 parecen conservar un motivo (Lys/Arg)-(Phe/Tyr)-(Lys/Arg) que podría ser el responsable de la especificidad en el reconocimiento de lesiones tipo IDL por parte de MutS $\beta$  (Culligan y col., 2000).

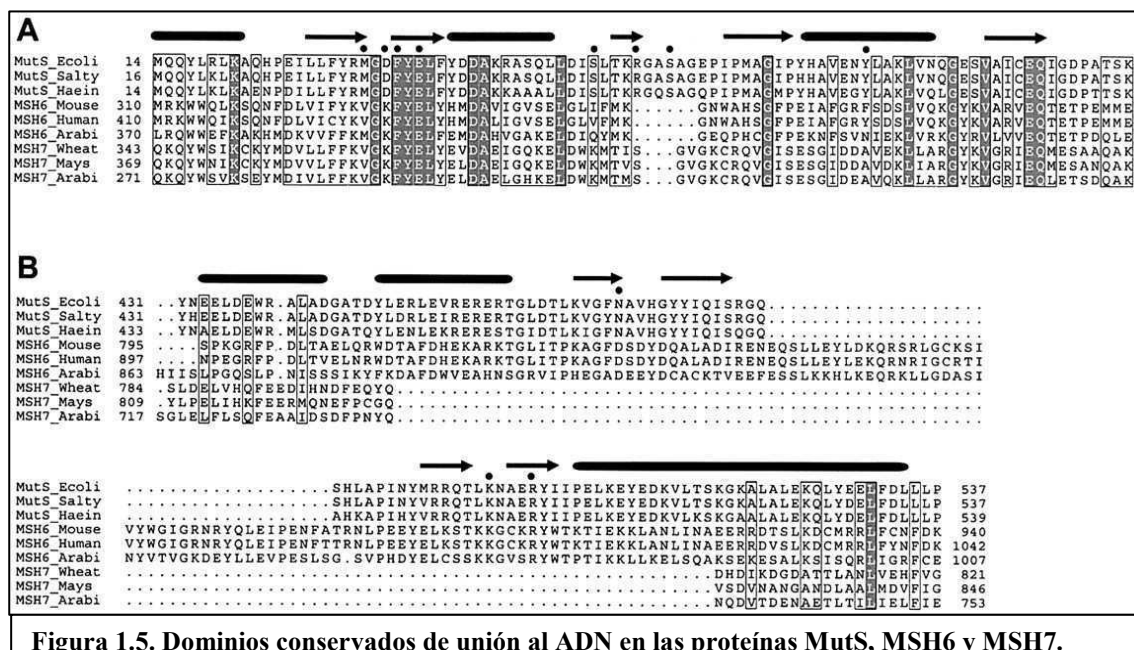


### 1.3.2.1 La subunidad MSH7:

Como se comentó previamente, MSH7 es una proteína exclusiva de plantas. La misma, aparentemente, surgió de manera temprana en la evolución por duplicación y divergencia de un gen similar a MSH6 de una planta primitiva, antes de la división entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (Culligan y col., 2000). La estructura primaria muestra el motivo conservado de unión a bases mal apareadas, Phe-Tyr-Glu y un patrón de residuos cargados y aromáticos en el dominio de unión a las bases incorrectamente apareadas en el amino terminal similar al de las proteínas MSH6 (Culligan y col., 2000). La figura 1.5a muestra un alineamiento del segmento comentado conservado en MutS procarionotas y MSH6 y MSH7 eucariotas.

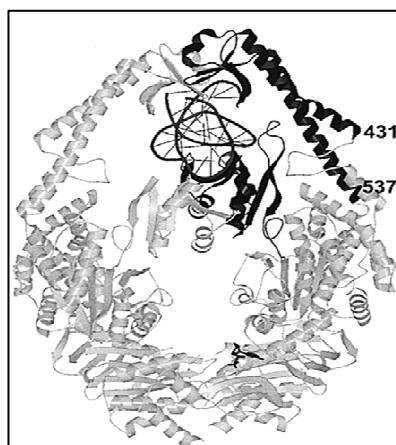
Como se comentó previamente, las estructuras cristalinas obtenidas evidencian que en la misma subunidad que contacta directamente con la lesión se forma una estructura de abrazadera que envuelve el ADN sin hacer contacto directo con su esqueleto (figuras 1.5b y 1.6). Este dominio podría ayudar al reconocimiento de la lesión facilitando el curvado del ADN. En estructuras cristalográficas de MutS

procariota unida a distintos sustratos se ha observado una curvatura de 60 °, como se ejemplifica en la figura 1.4, la cual se propone inherente al reconocimiento de las bases mal apareadas. Este hecho ha sido confirmado recientemente en Cristóvão y col. (2012).



**Figura 1.5. Dominios conservados de unión al ADN en las proteínas MutS, MSH6 y MSH7.**

Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las regiones conteniendo el motivo de interacción con las bases mal apareadas (A) y dominios abrazadera (B), derivados del alineamiento realizado con las secuencias completas. Las líneas gruesas rellenas y las flechas superiores indican estructuras  $\alpha$ -hélices y cadenas  $\beta$ , respectivamente. Los puntos negros indican los residuos que contactan con al ADN mediante formación de enlaces de puente de hidrógeno. Ecoli: *E. coli*; Salty: *Salmonella typhimurium*; Haein: *Haemophilus influenzae*; Mouse: *Mus musculus*; Human: *Homo sapiens*; Arabi: *A. thaliana*; Wheat: *Triticum aestivum*; Mays: *Zea mays*. (Adaptado de Wu y col., 2003).



**Figura 1.6. Dominio de interacción al ADN de MutS.**

Estructura cristalina del dímero MutS de *E. coli* con sustrato de ADN conteniendo una base incorrectamente apareada. En el monómero que contacta con el ADN de forma directa, los dominios de interacción con la lesión y de abrazadera están indicados en negro, el ADN en gris oscuro y el resto de la proteína en gris claro. Los números se refieren al inicio (431) y final (537) del dominio abrazadera alineado en la figura 1.5b.

El dominio de abrazadera de ADN contiene aproximadamente 100 residuos aminoacídicos en la MutS bacteriana y aproximadamente 110 en la MSH6 de plantas (figura 1.5b). Sorprendentemente este dominio no se encuentra en MSH7. La carencia del mismo se asoció a una reducción en la capacidad para curvar el ADN y, consecuentemente, en la afinidad por lesiones en general, pero con un incremento en el

reconocimiento de lesiones específicas (Wu y col., 2003). Estas diferencias sugieren que el rol de MSH7 en la estabilidad genómica de las plantas podría diferir de la corrección de errores provenientes de la replicación del ADN, como son los reconocidos por MutS $\alpha$  y MutS $\beta$  o actuar en la reparación de lesiones en entornos específicos. Finalmente, también, se propone que podría participar en la regulación de la recombinación meiótica, antagonizando la recombinación de secuencias cuasi-homólogas y ayudando al mantenimiento de barreras interespecies (Dong, y col., 2002; Lloyd y col., 2007; Tam y col., 2011). Existen dos hipótesis compatibles con los datos disponibles hasta el presente. La primera propone que MSH6 y MSH7 participarían tanto en la corrección post-replicativa como en la antagonización de la recombinación meiótica entre secuencias no homólogas. La diferencia residiría en el conjunto de lesiones que reconoce cada una y/o las secuencias circundantes del entorno.

Alternativamente, la segunda hipótesis plantea que la falta de la abrazadera en MSH7 reflejaría una cierta evolución hacia una dedicación en la fidelidad de la recombinación meiótica. La baja afinidad de MutS $\gamma$  por el ADN lineal perfectamente apareado podría minimizar la interferencia con la recombinación homóloga entre fragmentos de ADN de alta homología. En este caso, solo MSH2-MSH3 y MSH2-MSH6 mediarían la reparación post-replicativa (Culligan y Hays, 2000; Wu y col., 2003)

Adicionalmente, en *A. thaliana*, al igual que MSH6, MSH7 contiene dominios de interacción en los extremo amino terminales, previamente identificados en muchas proteínas involucradas en el metabolismo del ADN, incluyendo el ortólogo humano MSH6 (Nicolaidis y col., 1996). Estos dominios han demostrado ser sitios putativos para la interacción con PCNA y RPA (Otterlei y col., 1999). Varios estudios en levaduras y células humanas han señalado a PCNA como el factor involucrado tanto en los pasos de pre y post escisión del MMR (Johnson y col., 1996; Umar y col., 1996; Chen y col., 1999). Por lo tanto, MSH6 y MSH7 podrían interactuar en cierto grado con la maquinaria de replicación del ADN.

A pesar de la evidencia filogenética que indica que MSH7 deriva de MSH6 en fases tempranas de la evolución, los heterodímeros MutS $\alpha$  y MutS $\gamma$  de *A. thaliana* obtenidos por traducción *in vitro* difieren con respecto a la especificidad por las bases incorrectamente apareadas o desapareadas que reconocen (Wu y col., 2003). En especial, MutS $\gamma$  ha mostrado unirse con baja afinidad a ADN con una base extra desapareada (+T), mientras que dicha lesión es fuertemente reconocida por MutS $\alpha$ .

Adicionalmente, MutS $\gamma$  reconoce algunos pares de base mal apareados de manera preferencial. En primer lugar, reconoce lesiones del tipo G/T con afinidad semejante a MutS $\alpha$  y lesiones del tipo G/A y C/A mejor que MutS $\alpha$  (Culligan y Hays, 2000; Wu y col., 2003).

Con respecto a apareamientos incorrectos del tipo G/T, resulta importante notar su origen. En las plantas las citosinas están frecuentemente metiladas en secuencias CpG, CpNpG y CpNpN (Gruenbaum y col., 1981; Richards, 1997; Tompa y col., 2002). La desaminación espontánea de 5-metilcitosina en estos sitios origina timina, dando lugar a apareamientos incorrectos del tipo G/T. Cabe destacarse que las plantas presentan mayores tasas de metilación de citosinas que otros eucariotas, requiriendo probablemente sistemas de reparación más eficientes (Lee y col., 2010; Ossowski y col., 2010). De igual modo, las plantas están constantemente sometidas a radiación ultravioleta y a radicales provenientes del metabolismo oxidativo (especies reactivas del oxígeno). En trabajos realizados en *E. coli*, se ha observado que el sistema MMR funciona durante la replicación en la reparación de errores provenientes de fotoproductos en el ADN resultantes de la incidencia de radiación ultravioleta (Liu y col., 2000). A su vez, ha sido reportado que la óptima reparación asociada a la transcripción de bases oxidadas (por ejemplo, 8-oxoguanina) requiere proteínas MSH y MLH en levaduras y células humanas (Leadon y Avrutskaya, 1997, 1998; Le Page y col., 2000).

Por lo antedicho, puede sugerirse que otra de las funciones propuestas para MSH7 podría ser la de facilitar la reparación acoplada a la transcripción. Sin embargo, estas funciones restan ser demostradas.

#### **1.4. Estrés oxidativo y daño al ADN en *A. thaliana*:**

Las plantas, dada su naturaleza sésil y su dependencia lumínica para llevar a cabo la fotosíntesis, se encuentran sometidas habitualmente a condiciones ambientales que resultan diferentes a las óptimas. Entre ellas pueden citarse la deficiencia de nutrientes, alta salinidad de los suelos, el exceso de radiación lumínica, la baja disponibilidad de agua, temperaturas subóptimas y el ataque de patógenos e insectos, entre otros. En ciertos casos, estas condiciones no favorables alcanzan magnitudes tales que generan situaciones de estrés, en las cuales se compromete el normal desarrollo y crecimiento de las plantas, así como la capacidad de las mismas para generar progenie (Buchanan y col., 2000).

La exposición de las plantas a situaciones de estrés provoca una amplia gama de respuestas, denominadas mecanismos de resistencia. Mediante los mismos las plantas intentan sobrevivir al estrés y en cierta medida prepararse para nuevas exposiciones a los mismos. La supervivencia depende tanto de la severidad de la situación de estrés así como de la especie, genotipo y estadio de desarrollo de la planta. En ciertas ocasiones, las plantas son afectadas por condiciones de estrés subletales que desencadenan el proceso denominado aclimatación. Este proceso comprende la inducción de cambios fisiológicos y genéticos en la planta que mejoran su capacidad de supervivencia ante una nueva situación de estrés del mismo tipo, o incluso en ciertos casos, de otros tipos de estrés (Greene, 2002).

El estrés puede ser biótico, generado por organismos vivos, o abiótico, como consecuencia de variaciones en las condiciones óptimas del ambiente (Apel y Hirt, 2004). Las fuentes más comunes de estrés abiótico son la escasa disponibilidad de agua, la radiación ultravioleta, las temperaturas extremas, la deficiencia de nutrientes y el exceso de radiación lumínica. A estos factores naturales debemos sumarles aquellos antropogénicos como la polución del aire y la contaminación del agua de riego y de los suelos sembrados. La mayoría de estos factores externos provocan perturbaciones en el equilibrio metabólico de las células, resultando finalmente en un incremento de las EROs. Estas especies, que son generadas durante el metabolismo normal de las células, pueden aumentar sus niveles en respuesta a diferentes tipos de estrés (Van Breusegem y col., 2001). El desbalance entre la producción de EROs y los mecanismos encargados de la defensa contra las mismas desencadena un tipo de estrés denominado estrés oxidativo (Mittler, 2002). Cuando las EROs están incompletamente reducidas pueden ser extremadamente reactivas y oxidar importantes moléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

#### **1.4.1. Especies reactivas del oxígeno:**

En su estado basal, el oxígeno molecular, denominado oxígeno triplete, presenta dos electrones ocupando orbitales separados con espín paralelos. Para poder oxidar una molécula o átomo no radicalario, el oxígeno triplete debe reaccionar con otro compuesto que le provea un par de electrones con espín paralelo que se ajusten a sus orbitales libres. Sin embargo, los pares de electrones tienen típicamente espín opuesto, y por lo tanto, imponen una restricción a la reacción del O<sub>2</sub> en estado triplete con la mayoría de las moléculas orgánicas. Sin embargo, el O<sub>2</sub> puede convertirse en una forma mucho más

reactiva tanto por transferencia de energía como reacciones de transferencia de electrones. El primer fenómeno da lugar a la formación de oxígeno singlete, altamente reactivo, mientras que el segundo resulta en la reducción a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Klotz, 2002).

En plantas, las EROs se producen continuamente como subproductos de varias vías metabólicas localizadas en diferentes compartimentos subcelulares (Foyer y Harbinson, 1994). Los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas producen continuamente EROs como subproductos de reacciones metabólicas que se generan en los mismos. En los cloroplastos, los subproductos generados por la fotosíntesis incluyen el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). La primera de estas especies se produce cuando pigmentos excitados por absorción de luz transfieren energía al  $\text{O}_2$  (Niyogi, 1999). Su relajación puede ocurrir por disipación térmica, emisión de luz, o reacción química. Debido a que el  $^1\text{O}_2$  presenta sus electrones de valencia apareados, es capaz de reaccionar mucho más rápidamente con las biomoléculas que el  $\text{O}_2$  en estado fundamental. Adicionalmente, el anión superóxido puede formarse a partir de la transferencia de un electrón desde la cadena de transporte electrónico tilacoidal hacia una molécula de oxígeno. De forma paralela, las especies más frecuentemente generadas como productos secundarios en peroxisomas son el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Asada, 2006; del Rio y col., 2006). En la oscuridad, la mayoría de las EROs son generadas en la mitocondria, que produce principalmente anión superóxido por la sobre-reducción de la cadena de transporte electrónico (Maxwell y col., 1999).

Bajo condiciones fisiológicas normales estas moléculas son eliminadas por diferentes componentes de defensa antioxidantes que usualmente están confinados a compartimentos particulares (Alscher y col., 1997). Un gran número de factores ambientales adversos pueden perturbar el equilibrio entre la generación y la eliminación de EROs. Como resultado de estas perturbaciones los niveles de EROs intracelulares pueden aumentar rápidamente (Malan y col., 1990; Elstner, 1991; Prasad y col., 1994; Tsugane y col., 1999). A su vez, las plantas pueden aumentar la producción de EROs mediante la activación de ciertas oxidasas y peroxidasas en respuesta a ciertos cambios en el ambiente (Doke, 1985; Allan y Fluhr, 1997; Bolwell y col., 1998; Bolwell y col., 2002). Estas posibles fuentes enzimáticas de EROs incluyen la oxidasa de NADPH localizada en membrana plasmática (Desikan y col., 1998b; Keller y col., 1998; Torres y col., 1998), las peroxidasas de pared celular y las amino-oxidasas (Bolwell y

Wojtaszek, 1997). El rápido aumento en la concentración intracelular de EROs se denomina “explosión oxidativa” (Apostol y col., 1989) y ocurre normalmente como respuesta al ataque por patógenos, a través de la activación del sistema NADPH oxidasa de membrana plasmática (Apel y Hirt, 2004).

Adicionalmente a la generación endógena de EROs, estas especies pueden producirse por exposición a poluentes, como ser ozono (Mehlhorn y col., 1990), luz ultravioleta (Landry y col., 1995) y bajas dosis de radiación ionizante (Ward, 1988).

El tiempo de vida media, la reactividad y la difusibilidad de las EROs influyen enormemente su potencial para producir daño celular. Mientras que el peróxido de hidrógeno es relativamente estable, alcanzando concentraciones en el rango de los micromoles dentro de las células (Cheeseman, 2006), las demás EROs tienen tiempos de vida media muy cortos. El anión superóxido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por superóxido dismutasas, siendo esta molécula una especie relativamente inerte que puede difundir hacia otros sitios dentro de la célula. El radical hidroxilo es la especie más reactiva del oxígeno y puede oxidar cualquier molécula mediante reacciones limitadas por la velocidad de difusión. Se ha determinado que la distancia media de difusión del radical hidroxilo antes de que reaccione con algún componente celular es de solo 3 nm, aproximadamente el diámetro promedio de una proteína (Hutchinson, 1957). Una parte importante de la toxicidad de estas EROs se debe a la denominada reacción de Fenton. Mediante esta reacción pueden generarse derivados del oxígeno más tóxicos a partir de peróxido de hidrógeno, entre ellos el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) o el radical ferrilo ( $\text{FeO}^{+2}$ ) (Goldstein y col., 1993). Se ha demostrado que esta reacción ocurre *in vivo* y es la principal causa de la toxicidad del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Como se ha mencionado anteriormente, el radical hidroxilo no difunde más allá de 5 a 10 radios moleculares de su sitio de formación antes de reaccionar. Sin embargo, la capacidad de los iones Fe de establecer complejos con proteínas y ADN conduce a la formación de  $\text{OH}^\cdot$  directamente sobre estos polímeros (Haber y Weiss, 1934 ; Keyer y col., 1995).

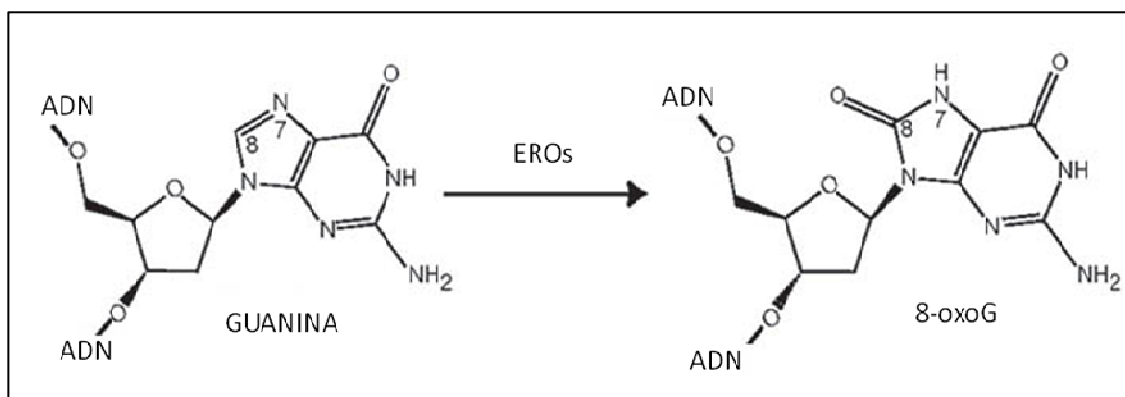
La naturaleza de las EROs las hace potencialmente tóxicas. Para evitar el daño, las plantas cuentan con una batería de sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los sistemas no enzimáticos encontramos compuestos antioxidantes como las vitaminas C y E, el glutatión y los  $\beta$ -carotenos (Alscher y Hess, 1993). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascobato peroxidasa (APX) y glutatión peroxidasa (GPX) componen el principal sistema enzimático de defensa vegetal (Britt,

1996). Todos estos factores funcionan de forma concertada para evitar el daño oxidativo de los componentes celulares.

#### 1.4.2. Oxidación del ADN. Guanina y 8-oxo-guanina:

El ataque oxidativo del ADN genera tanto alteraciones en las bases como en los residuos de azúcares que pueden llegar a provocar fragmentación y rotura de hebras. El ataque oxidativo de las bases del ADN, generalmente, se produce por adición de grupos oxidrilos a los dobles enlaces, mientras el daño a los residuos de azúcares resulta principalmente de la remoción de hidrógeno de la desoxirribosa (Dizdaroglu, 1993).

La guanina es una de las bases más susceptibles al ataque por reactivos oxidantes, siendo el mayor producto de oxidación la 8-oxoG (Neeley y Essigmann, 2006; Burrows y Muller, 1998), resultante de la oxidación del carbono C8 formando el aducto hidroxilado (Kasai y Nishimura, 1984; Kasai y col., 1984; Dizdaroglu, 1985), como se muestra en la figura 1.7.



**Figura 1.7. Formación de 8-oxoG.**

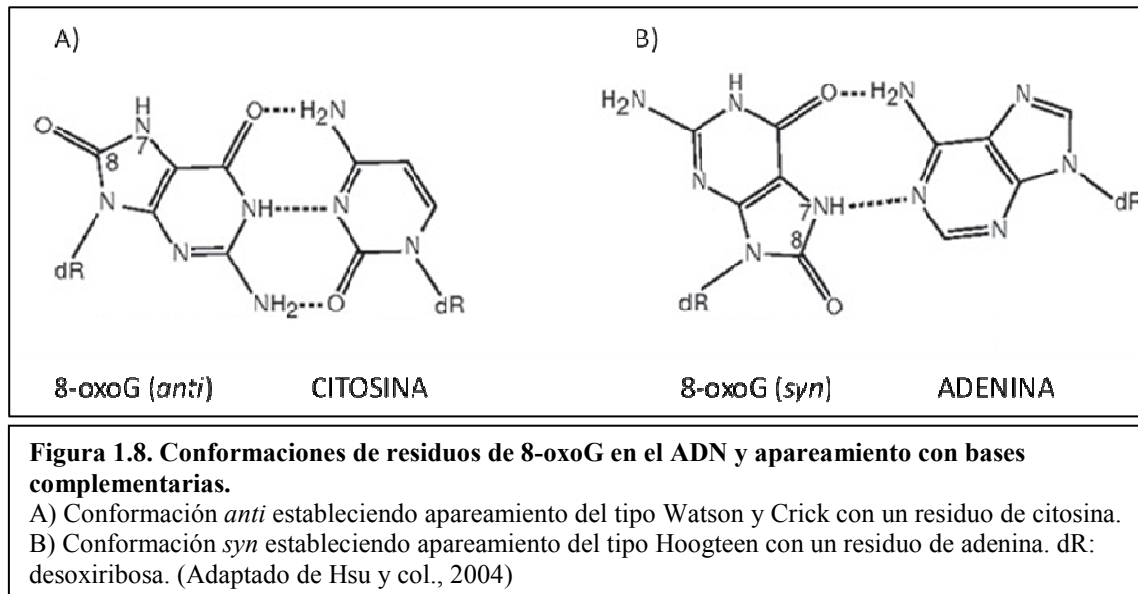
Oxidación de un residuo de guanina en el ADN mediante EROs. (Adaptado de Hsu y col., 2004)

Este tipo de lesión oxidativa es una de las más comunes y más estudiada, utilizándose ampliamente como un marcador del daño oxidativo al ADN, tanto en células eucariotas como procariontas (Kamiya, 2003; Klaunig y Kamendulis, 2004).

Las propiedades fisicoquímicas de la 8-oxoG que afectan la transcripción y replicación han sido estudiadas ampliamente. En el ADN, los residuos de guanina se encuentra normalmente presente en su forma ceto con conformación *anti*, permitiendo el apareamiento con citosina. Cuando se forman, *in situ*, las bases apareadas de 8-oxoG mantienen esta conformación, sin embargo, cuando el ADN se convierte en simple hebra durante la transcripción o la traducción, la 8-oxoG puede adoptar la conformación *syn*, energéticamente más favorable, que afecta la capacidad del apareamiento normal.



Esta alteración conformacional es la responsable de la capacidad de apareamiento incorrecto con adenina. Mientras que las bases de guanina tienen una fuerte preferencia por el apareamiento con citosina, la 8-oxoG puede aparearse tanto con citosina, en el modo Watson-Crick (figura 1.8A), y con adenina en el modo Hoogsteen (figura 1.8B)



Ha sido demostrado que esta lesión produce mutaciones por transversiones GC a TA tanto *in vitro* como *in vivo* (Cheng y col., 1992; Wood y col., 1992; Kamiya y col., 1995). Alternativamente, puede introducirse un nucleótido de 8-oxoG frente a una adenina durante la replicación generando sustitución de timina por guanina (Cheng y col., 1992). Se ha observado que la transversión GC a TA conforma la segunda mutación somática más común en los cánceres humanos y es especialmente prevalente en el espectro mutacional de gen supresor de tumores p53 (Krokan y col., 2000). Adicionalmente, se ha reportado que en células de mamíferos mientras el par 8-oxoG:C es reparado eficientemente, el par 8-oxoG:A se repara en menor extensión (Le Page y col., 1998; Dherin y col., 1999).

#### 1.4.3. Reparación del daño oxidativo al ADN:

Entre los diversos mecanismos con los que cuentan las células para evitar y reparar la oxidación al ADN, el principal lo constituye el sistema de reparación por escisión de bases, denominado BER por sus siglas en inglés (Barnes y Lindahl, 2004; Dizdaroglu, 2005; Friedberg y col., 2006). Este proceso se inicia por enzimas de reparación denominadas ADN N-glicosilasas que hidrolizan el enlace glicosídico entre la base dañada y la desoxirribosa. De esta forma, al liberarse la base dañada se genera

un sitio apurínico/apirimidínico (AP) que será procesado mediante diferentes componentes proteicos del BER para regenerar finalmente el ADN sin lesiones.

Las ADN glicosilasas se clasifican en dos grandes grupos. El primer grupo está constituido por las ADN glicosilasas monofuncionales, que sólo catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico. El segundo grupo está formado por las ADN glicosilasas/liasas, que producen la liberación de la base oxidada y adicionalmente producen una escisión simple hebra en el esqueleto del ADN en el sitio abásico (Friedberg y col., 2006). Se han identificado una amplia variedad de ADN glicosilasas tanto en procariontes como eucariotes (Barnes y Lindahl, 2004; Dizdaroglu, 2005; Friedberg y col., 2006) perteneciendo la mayoría al segundo grupo, ADN glicosilasas/liasas bifuncionales. En general, las lesiones en el ADN por bases oxidadas son reconocidas por enzimas específicas para pirimidinas o para purinas. Sin embargo, las especificidades de estas enzimas por los sustratos muchas veces se superponen.

En *Arabidopsis* el sistema BER se encuentra fuertemente conservado tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas, lo que sugiere una fuerte conservación del sistema de reparación de daño oxidativo durante la evolución de plantas (Roldan-Arjona y Ariza, 2009).

Adicionalmente al BER, existen en plantas otros mecanismos de reparación del daño al ADN provocado por EROs. Entre ellos pueden citarse el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), el sistema MMR y los sistemas de reparación de roturas simple y doble hebra que incluyen los procesos de recombinación homóloga y NHEJ (Slupphaug y col., 2003).

Otro de los fenómenos de gran importancia en el mantenimiento de la estabilidad génica ante el daño oxidativo es la síntesis mediada por ADN polimerasas translesiones específicas (Friedberg y col., 1995). En particular, es destacable la presencia en plantas de una ADN polimerasa de la familia X, denominada ADN polimerasa  $\lambda$  (Amoroso y col., 2011). Esta enzima no actúa normalmente en la polimerización del ADN en las fases replicativas. Su eficiencia sobre sustratos de ADN que no contienen lesiones es baja, sin embargo, es altamente eficiente en la replicación sobre la base oxidada 8-oxoG. Ha sido observado que esta enzima es fundamental en la reparación de este tipo de lesiones actuando de forma conjunta con el BER durante las fases S y G2 del ciclo celular (Markkanen y col., 2012). En este período, la fosforilación de la ADN polimerasa  $\lambda$  estabiliza y promueve la actividad de la enzima. Se postula que el mecanismo de eliminación de lesiones del tipo 8-oxoG:A en el que está involucrado

esta enzima, consta de dos etapas. En una primera etapa la glicosilasa MYH (homólogo de MutY bacteriano) reconoce y elimina la adenina enfrentada a la base oxidada. A continuación, la ADN polimerasa  $\lambda$  incorpora un nucleótido de citocina frente a la 8-oxoG. La segunda etapa es llevada a cabo exclusivamente por el BER, eliminándose la base oxidada por la acción de la glicosilasa OGG1 (Amoroso y col., 2011). Adicionalmente, otras polimerasas translesiones podrían actuar sobre el daño oxidativo. Un ejemplo lo constituye la ADN polimerasa  $\eta$ , la cual puede polimerizar correctamente sobre las lesiones oxidativas del tipo timina-glicol (Johnson y col., 2002; Anderson y col., 2008).

En cuanto al sistema MMR, existe una amplia variedad de trabajos que indican una importante relación del sistema con la prevención de inestabilidades genéticas relacionadas a la oxidación de bases. Se propone que el MMR constituiría una alternativa al sistema BER en la reparación de daño oxidativo (Colussi y col., 2002; Ni y col., 1999; Gu y col., 2002; Mazurek y col., 2002). En estudios sobre ADN de células de humanos y ratones deficientes en el sistema MMR tratadas con agentes oxidantes o con bajas dosis de luz ionizante se observó una marcada acumulación de bases oxidadas (DeWeese y col., 1998; Colusi y col., 2002; Russo y col., 2004). Adicionalmente, en *S. cerevisiae* el sistema MMR parece compensar la aparente ausencia de una MYH funcional y remueve A incorporada erróneamente frente a 8-oxoG (Ni y col., 1999; Boiteux y col., 2002). Sin embargo, los apareamientos formados con purinas oxidadas, 8-oxoG y 8-oxoA, son ineficientemente reconocidos por el MMR de mamíferos (Mazurek y col., 2002) y no son reparados por el MMR de extractos celulares de humanos (Larson y col., 2003).

Existe evidencia que indica que la incorporación de 8-oxoGMP a partir de dNTPs oxidados provee una fuente de 8-oxoG en el ADN sobre el que puede actuar el MMR (Colussi y col., 2002 y Russo y col., 2004). La incorporación de 8-oxoGMP en el ADN está normalmente minimizada por una familia de hidrolasas que disminuyen las concentraciones intracelulares de 8-oxoGTP (Sakumi y col., 1993; Cai y col., 2003; Ishibashi y col., 2003). La principal hidrolasa perteneciente a esta familia en humanos se denomina MTH1 y es homóloga a MutT de *E. coli* (Sakumi y col., 1993). En células de ratones con pérdida total de la función MTH se observó la acumulación selectiva de corrimientos de marcos de lectura de una base en secuencias repetitivas, consistentes con una posible relación entre 8-oxoGTP y 8-oxoG incorporada en el ADN con la generación de lesiones del tipo de corrimiento del marco de lectura (Egashira y col.,

2002). Apoyando esta idea, se observó que la sobreexpresión de MTH1 en células humanas y de ratón deficientes en el MMR atenuó significativamente su fenotipo mutador y la inestabilidad de microsatélites (Russo y col, 2004). Adicionalmente, se observó que la proteína MutS $\alpha$  de humanos, en contraste al bajo reconocimiento de lesiones simples 8-oxoG:C y 8-oxoG:A, puede reconocer de forma muy eficiente 8-oxoG desapareados (Macpherson y col., 2005).

### **1.5. Estado actual del conocimiento del sistema MMR en plantas:**

En plantas, la relación entre el MMR y la reparación del daño oxidativo al ADN resta por ser determinada en detalle. Uno de los objetivos de la presente tesis es sumar datos que permitan esclarecer algunos puntos de interacción entre estos fenómenos.

Además, la caracterización bioquímica y funcional de los complejos multiproteicos del MMR en plantas es aún muy limitada, habiéndose sólo estudiado la afinidad de AtMutS $\alpha$  y AtMutS $\gamma$  traducidas *in vitro* por algunos errores en el ADN (Culligan y Hays, 2000; Wu, y col., 2003), debido, probablemente, a la baja abundancia de las proteínas *in vivo*. En estudios previos ha sido reportado que los niveles de expresión de *AtMSHs* son virtualmente indetectables en tejidos de *Arabidopsis*, pero se detectó en muestras provenientes de cultivos en suspensión (Adé y col., 1999). Ante este escenario, el segundo objetivo del presente trabajo de tesis es extender el conocimiento sobre el MMR en la especie vegetal *A. thaliana*, enfocándose particularmente en la proteína AtMSH7 y al complejo único que forma junto con AtMSH2.

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1. Objetivo general:

Contribuir al incremento del conocimiento sobre el mecanismo de reparación de bases incorrectamente apareadas en el ADN de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y evaluar la posible relación de este sistema con la reparación de bases oxidadas en el ADN.

### 2.2. Objetivos particulares:

- Purificar a homogeneidad AtMSH2 expresada en un huésped bacteriano para futuros ensayos en sistemas *in vitro*.
- Realizar diversos inmunoensayos que permitan esclarecer la abundancia y localización tisular de MSH2 en plantas.
- Estudiar cambios transcripcionales de los genes del MMR en plantas sometidas a distintas condiciones que generan estrés oxidativo.
- Comparar las respuestas diferenciales y el daño oxidativo al ADN, de plantas silvestres o mutantes en el sistema MMR, en condiciones de crecimiento normal o bajo situaciones de estrés.
- Expresar ambas subunidades del complejo dimérico AtMutS $\gamma$  en levaduras y evidenciar la formación del complejo funcional.
- Estudiar el efecto de AtMSH2 y AtMSH7 sobre las tasas de mutaciones de levaduras conteniendo el MMR funcional o inactivado, al expresar ambas subunidades de forma independiente o conjunta.

# *MATERIALES Y MÉTODOS*

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS:

#### 3. 1. Medios de cultivo:

##### 3.1.1. Medios para crecimiento de bacterias:

###### **Medio Luria-Bertani o LB**

(Sambrook y Russell, 2001)

0,5% p/v extracto de levaduras

1% p/v tripteína

0,5% p/v NaCl

###### **Medio LB-AGAR**

Medio LB adicionado con

1,5% p/v agar-agar

###### **SOC** (Sambrook y Russell, 2001)

2% p/v tripteína

0,5% p/v extracto de levaduras

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

20 mM glucosa

##### 3.1.2. Medios de cultivo para crecimiento de levaduras:

###### **YPDA** (Ausubel y col., 1992)

1% p/v extracto de levaduras

2% p/v peptona

2% p/v glucosa

40 mg/l adenina

###### **YPDA-Agar** (Ausubel y col., 1992)

Medio YPDA adicionado con 1,5% p/v agar-agar

###### **Medio SCD completo:**

1.7 g/l Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco)

5 g/l Sulfato de amonio

20 g/l glucosa

Bases y aminoácidos: 20 mg/l adenina, 30 mg/l tirosina, 30 mg/l isoleucina; 30mg/l lisina; 50 mg/l fenilalanina; 100 mg/l ácido glutámico; 150 mg/l valina; 400

mg/l serina; 20 mg/l prolina; 30 mg/l glutamina; 100 mg/l asparagina; 40 mg/l glicina, 20 mg/l uracilo; 20 mg/l histidina, 30 mg/l lisina, 60 mg/l leucina.

En caso de utilizarse en forma de medio de cultivo sólido se adicionó con 1,5 % p/v de agar-agar

**Medios de selección:**

**SCDL:** SCD sin agregado de leucina

**SCDLH:** SCD sin agregado de leucina e histidina.

**SCDLK:** SCD sin agregado de leucina y lisina.

**SCDL-CANA:** SCD sin agregado de leucina conteniendo 60 mg/l Canavanina.

**Medios de inducción:**

**SCGL:** similar a SCDL pero con galactosa 2 % p/v en lugar de glucosa.

**SCDGL:** SCDL suplementado con galactosa 2 % p/v.

**YPGA:** similar a YPDA pero con galactosa 2 % p/v en lugar de glucosa.

**3.1.3. Medios de cultivo para crecimiento de plantas *in vitro*:**

Se utilizó el medio de cultivo líquido de Murashigue-Skoog (Murashigue y Skoog, 1962) sin agregado de sacarosa, denominado MS-0. El medio sólido corresponde a MS-0 conteniendo agar-agar 0,7 % p/v.

Los medios para tratamientos, con distintos agregados, se realizaron adicionando los reactivos según se indica al medio basal MS-0 durante la preparación del mismo. En el caso particular del metilviológeno, el agregado del mismo a los medios se realizó en el paso posterior al autoclavado a partir de soluciones madres esterilizadas por filtración con Minisart® High Flow PES Syringe Filters 0,2µm (Sartorius).

**3.2. Cepas y Plásmidos:**

**3.2.1. Cepas de *E. coli*:**

**3.2.1.1. Cepa de clonado y mantenimiento de los plásmidos:**

- DH5α (Invitrogen): F<sup>-</sup>, Φ80dlacZΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>k</sub><sup>+</sup>*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)U169



### 3.2.1.2. Cepa de expresión:

- JM109(DE3) pRIL (Gómez, 2007): *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1, supE44, Δ(lac-proAB)*, [ $F'$ , *traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15*] [ $λ$ DE3] [ $pRIL, cm^r$ ]

### 3.2.2. Cepas de *S. cerevisiae*:

• **T334**: *MATα ura3-52 leu2-3,112 Δtrp1::hisG reg1-501 gall pep4-3 prb1-112*

• **YLKL313**: *MATα ura3-52 leu2-3,112 Δtrp1::hisG reg1-501 gall pep4-3 prb1-112 lys2::InsE-A4*

• **YRG313** (este trabajo): derivada de YLKL313  $Δmsh2::TRP1$ .

• **E134** (Clark y col. 1999): *Mata, ade5-1, his7-2, leu2-3,112, trp1-289, ura3-52 lys2::InsE-A<sub>14</sub>*.

• **DAG60** (Clark y col. 1999): Derivada de E134. Presenta una mutación *msh2::kanMX* que fue generada reemplazando una porción mayoritaria de la región codificante de MSH2 por kanMX.

### 3.2.3. Plásmidos:

**pET32b::AtMSH2**: (Gómez y col, 2011): Derivado del vector comercial pET-32 b (+) (Novagen) que posee las siguientes características: *Amp<sup>r</sup>*, 5899 pb, *ori fl, lacI<sup>q</sup>*, SMC, *ori ColE1*. Contiene la secuencia de *MSH2* de *A. thaliana* clonada entre los sitios de restricción NcoI y BamHI del sitio de múltiple clonado del vector bajo el control del promotor y de las señales de inicio de la traducción del bacteriófago T7.

**YE<sub>p</sub>181SPGAL (YE<sub>p</sub>181)**: (Clark y col, 1999) *Amp<sup>r</sup>*. Vector dual que contiene un origen de replicación para *E. coli* y un origen para replicación en *S. cerevisiae* (*ori* 2 μ). Utiliza *LEU2* como marcador de selección revirtiendo auxotrofia de leucina en levaduras. Posee los promotores de levadura divergentes *GAL1* y *GAL10* inducibles por galactosa con sitios de múltiple clonado a ambos lados.

**YE<sub>p</sub>::M2**: (Gómez, 2007) *Amp<sup>r</sup>*. Derivado de YE<sub>p</sub>181SPGAL conteniendo la secuencia codificante de *AtMSH2* clonada en el sitio de múltiple clonado bajo el promotor *GAL10* inducible por galactosa.

**YEp::M7:** (Gómez, 2007) *Amp<sup>r</sup>*. Derivado de YEp181SPGAL conteniendo la secuencia codificante de AtMSH7 clonada en el sitio de múltiple clonado bajo el promotor *GALI* inducible por galactosa.

**YEp::M2-M7:** (Gómez, 2007) *Amp<sup>r</sup>*. Derivado de YEp181 SP GAL conteniendo simultáneamente la secuencia codificante de AtMSH2 clonada en el sitio de múltiple clonado bajo el promotor *GAL10* y la secuencia codificante de AtMSH7 clonada en el sitio de múltiple clonado bajo el promotor *GALI*.

**YEp112 SP GAL:** (Clark y col., 1999) *Amp<sup>r</sup>*. Vector dual que contiene un origen de replicación para *E. coli* y un origen ori 2  $\mu$  para replicación en *S. cerevisiae*. Contiene el gen *TRP1* como marcador de selección revirtiendo auxotrofia de triptófano en levaduras.

### 3.3. Soluciones generales utilizadas:

**TAE 1X: Buffer de corrida electroforética de ADN**

40 mM Tris-Acetato pH 8,0

1 mM EDTA

**TBE 1X: Buffer de corrida electroforética de ADN**

89 mM Tris base

89 mM Ácido Bórico

2 mM EDTA

**Buffer SDS-PAGE 4x**

1,2% p/v Tris-base

5,74% p/v Glicina

0,4% p/v SDS

**Buffer de siembra de ADN en geles de agarosa 6x**

30% v/v Glicerol

0,25% p/v Xilencianol

0,25% p/v Azul de Bromofenol

**Buffer de siembra para proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes 5x**

60 mM Tris-HCl pH 6,8

25% v/v Glicerol

2% p/v SDS

0,5% v/v 2-mercaptoetanol

0,1% p/v Azul de Bromofenol

**Buffer PBS**

10 mM Fosfato de sodio pH 7,2  
130 mM NaCl

**Solución TBS**

10 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
pH 7,5

**Buffer de transferencia para Western blot**

1,93 g/l Tris-base  
9 g/l Glicina  
pH 8,1- 8,4

**Solución de Ponceau**

0,5% p/v Ponceau S  
1% v/v Ácido Acético Glacial

**Buffer de bloqueo (buffer leche)**

TBS conteniendo 5% p/v leche en polvo descremada

**Buffer sustrato**

100 mM Tris-HCl pH 9,5  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Solución NBT**

50 mg/ml Cloruro de p-nitro azul de tetrazolio en dimetilformamida 70%

**Solución BCIP**

50 mg/ml Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo en dimetilformamida 100%

**3.4. Extracción del ADN plasmídico bacteriano:**

En todos los casos la extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo a partir de un cultivo líquido de la colonia correspondiente en 5 ml medio LB suplementado con los antibióticos necesarios. Los cultivos se crecieron a saturación incubado durante toda una noche a 37 °C en agitación constante de 200 rpm. El ADN plasmídico se extrajo utilizando el sistema comercial “QIAprep Spin Miniprep kit” (QIAGEN Inc.), según las instrucciones del fabricante. La elusión del ADN retenido en las columnas se realizó con Tris-HCl 1 mM, pH 8,0.

**3.5. Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción:**

Los plásmidos se digirieron con enzimas de restricción según las instrucciones del proveedor de las mismas (Promega o New England Biolabs). Se incubó 1 U de la enzima de restricción correspondiente/μg de ADN por cada de sitios de corte en un volumen de 10 o 15 μl durante 1 hora a 37°C.

### **3.6. Electroforesis del ADN en geles de agarosa y visualización:**

#### **3.6.1. Electroforesis de ADN:**

Las corridas electroforéticas de ADN se realizaron en geles de agarosa (Biodynamics) 1% p/v preparados en buffer TAE 1X. Las muestras de ADN se diluyeron 1:6 con buffer de siembra 6X previo a la siembra. Se utilizaron como marcadores de tamaño molecular ADN  $\lambda$  digerido con EcoR I/Hind III (Promega), ADN  $\lambda$  digerido con Hind III (Promega) o marcador de 400 pb (PB-L Productos Bio-Lógicos). Las corridas electroforéticas de ADN se llevaron a cabo en TAE 1X a una intensidad de corriente constante de 40-100 mA.

#### **3.6.2. Visualización del ADN en geles de agarosa:**

Una vez concluida la electroforesis del ADN, los geles se incubaron durante 20 minutos en buffer TAE 1X conteniendo 0,5  $\mu$ g/ml bromuro de etidio. Concluido este período, los geles se lavaron con agua destilada y se procedió a la observación del ADN utilizando un transiluminador UV ( $\lambda = 302$  nm). Las imágenes digitalizadas de los geles de agarosa se muestran en la presente tesis como imágenes negativas. Las mismas se adquirieron utilizando el digitalizador de imágenes-cuarto oscuro EpiChemi3 de UVP, y la densitometría se realizó usando el software Labworks.

### **3.7. Precipitación del ADN:**

Se adicionaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (almacenado a -20 °C) a las soluciones conteniendo el ADN a precipitar, y, luego de mezclar vigorosamente y centrifugar brevemente, se incubó la muestra de 2 a 16 horas a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a máxima velocidad y 4 °C. Una vez descartado el sobrenadante, el precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% v/v, se centrifugó 20 minutos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado de ADN, se secó completamente y se resuspendió en un volumen adecuado de agua destilada estéril o TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).

### **3.8. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos:**

La concentración y calidad de la preparación de ácidos nucleicos en solución se determinó espectrofotométricamente (Sambrook y Russell, 2001). Para cuantificar la cantidad de ADN se realizaron diluciones apropiadas de las muestras y se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm. Se considera que 1 unidad de absorbancia a 260 nm

corresponde a 50 µg/ml de ADN doble hebra. Una relación de  $Abs_{260}/Abs_{280}$  comprendida entre 1,7 y 2,1 indica una pureza apropiada de la preparación respecto a contaminantes proteicos.

La cuantificación del ADN de la muestra, también, se estimó rutinariamente en geles de agarosa. Esto se realizó comparando la intensidad de las bandas de ADN de la muestra con las intensidades de las bandas del marcador ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima Hind III o conjuntamente con las enzimas Hind III y EcoR I de concentraciones perfectamente conocidas.

### **3.9. Transformación genética de células bacterianas:**

#### **3.9.1. Preparación de bacterias electrocompetentes para la transformación:**

Una colonia de la cepa bacteriana correspondiente se creció en 5 ml de LB a 37 °C con agitación durante toda la noche. Posteriormente, se realizó una dilución 1/100 del cultivo saturado en 500 ml de LB suplementado con antibióticos en los casos que corresponda y se creció a 37°C hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,5-0,8. El cultivo se incubó a 0°C durante 30 minutos y las células se centrifugaron a 4000  $\times$  g durante 15 minutos a 4 °C. El sedimento conteniendo las células se lavó 2 veces con 500 ml de agua a 4 °C y una vez con 10 ml de glicerol 10% v/v frío. Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% v/v frío y se fraccionó en alícuotas de 40 µl en tubos Eppendorf, las cuales se conservaron a -70°C hasta su utilización.

#### **3.9.2. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico por electroporación:**

La transformación de las distintas cepas de *E. coli* se realizó mediante la técnica de electroporación. Para ello, 40 µl de una suspensión de células competentes y 1-3 µl de plásmido se incubaron en un tubo Eppendorf durante 1 minuto en hielo. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación. Se utilizó el electroporador Gene Pulser de Bio-Rad y las condiciones de electroporación fueron 25 µF, 2,5 kV y 200 Ω. Luego de la descarga, se agregó 1 ml de medio SOC a la cubeta. La suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó durante 1 hora a 37 °C sin agitación. Luego de ese período, 100 µl de este cultivo celular se sembraron en cajas de Petri con medio LB-agar conteniendo los antibióticos adecuados según el caso.

### **3.10. Electroforesis de proteínas:**

#### **3.10.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE):**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se llevaron a cabo utilizando la celda mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) y el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Las concentraciones finales de acrilamida fueron 8% p/v para el gel de separación, a menos que se indique lo contrario, y 5% p/v para el gel de concentración. Las muestras diluidas 1:5 en buffer de siembra 5X se incubaron a 100 °C durante 5 minutos y, luego, se sembraron en el gel. De forma paralela, se sembraron 5 µl de marcadores de masa molecular (PageRuler™ Unstained Protein Leader, Fermentas o SDS-PAGE Standards high range, BioRad). Los geles se analizaron por tinción con azul de Coomassie, o por tinción con nitrato de plata en los casos que se requirió mayor sensibilidad. Alternativamente, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa para el análisis por Western blot.

#### **3.10.2. Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturalizantes:**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes se llevaron a cabo utilizando la celda mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) y el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970) de igual forma que se describe en la sección anterior, pero excluyendo el SDS y el 2-mercaptoetanol de todas las soluciones utilizadas. Adicionalmente, en la preparación de los geles de poliacrilamida se agregó glicerol en una concentración final de 10 % v/v. Los geles se analizaron por tinción con azul de Coomassie, o por tinción con nitrato de plata en los casos que se requirió mayor sensibilidad. Alternativamente, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa para el análisis por Western blot.

#### **3.10.3. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata:**

Los geles se incubaron inicialmente durante 16 horas en una solución de fijación (50 % (v/v) metanol y 10 % (v/v) ácido acético). Se lavaron 3 veces con agua destilada y se incubaron durante 15 minutos en 1 ml de AgNO<sub>3</sub> 40 % (p/v) recientemente preparada y 49 ml de 1,43 % (v/v) de NH<sub>4</sub>OH suplementado con 60 µl de solución 12 N de NaOH. A continuación, se realizaron dos lavados con agua destilada de 2 minutos cada uno. Finalmente, se reveló con 50 ml de solución conteniendo 0,05 % (p/v) ácido cítrico y 0,015 % (v/v) formaldehído hasta aparición de señal. La reacción se finalizó mediante el agregado de una solución de ácido acético 1 % (v/v).

### **3.11. Cuantificación de proteínas:**

Las concentraciones de proteínas se determinaron por el método colorimétrico de Sedmak y Grossberg (Sedmak y Grossberg 1977). Se utilizó una solución 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Se realizaron curvas de calibración con BSA entre 1 y 10 µg en un volumen final de 100 µl.

Paralelamente, se realizaron diluciones de alícuotas de la solución de proteína a cuantificar llevando a un volumen final de 100 µl con agua. Se les adicionó 1 ml de una dilución 1/5 de reactivo de Bradford (Bio-Rad) a cada tubo conteniendo las muestras. Se los agitó e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se midió absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UNICAM, HEλ10S (Perkin Elmer). Se graficaron los datos de absorbancia a 595 nm versus cantidad del patrón de BSA y a partir de ellos se determinó la cantidad de proteínas totales en cada muestra incógnita.

### **3.12. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (análisis por Western blot):**

La electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa Amersham Hybond™ ECL™ (GE health Care) se llevó a cabo utilizando la celda Mini Trans-Blot™ (Bio-Rad) durante 2 horas a 50 V en el buffer de transferencia. La correcta transferencia se examinó mediante tinción reversible con la solución de Ponceau. La membrana se bloqueó con buffer leche durante 1 hora y se lavó con TBS tres veces durante 10 minutos cada vez. Posteriormente, se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente y luego se lavó 3 veces con TBS durante 10 minutos. Se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Bio-Rad) y se repitieron los lavados con TBS. Finalmente, la membrana se reveló incubándola con 20 µl de NBT 50 mg/ml y 10 µl de BCIP 50 mg/ml en 10 ml de buffer sustrato. La reacción se desarrolló en oscuridad hasta aparición de bandas color púrpura y se detuvo por lavados sucesivos con agua destilada. Alternativamente, se empleó el sistema de revelado por quimioluminiscencia Lumi-Phos™ WB (Thermo Scientific), según indicaciones del proveedor.

### **3.13. Expresión y purificación de la proteína recombinante AtMSH2 en *E. coli*:**

#### **3.13.1. Expresión de AtMSH2 recombinante:**

Se utilizó la cepa de *E. coli* JM109(DE3) pRIL, que permite la expresión de las secuencias clonadas bajo el control del promotor de la T7 ARN polimerasa. A su vez, presenta el lisógeno  $\lambda$ DE3 y, por lo tanto, se designan con el sufijo (DE3). Esta cepas bacteriana lisogénica contienen una copia del gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por lactosa o IPTG.

Con el vector pET32b::AtMSH2 se transformaron células de *E. coli* electrocompetentes JM109(DE3) pRIL mediante electroporación y se seleccionaron en medio sólido LB suplementado con los antibióticos ampicilina (100  $\mu$ g/ml), cloranfenicol (20 $\mu$ g/ml) y ácido nalidíxico (15 $\mu$ g/ml). El primero de los antibióticos selecciona las células transformantes mientras los dos siguientes sirven para seleccionar el plásmido pRIL y la cepa, respectivamente. Luego de una incubación durante 16 hs a 37 °C, se inoculó una colonia en 5 ml de medio LB conteniendo los antibióticos de selección citados previamente. Este cultivo se incubó durante 16 hs a 37 °C con agitación de 200 rpm y se utilizó para inocular 200 ml de LB suplementado con antibióticos, en cantidad suficiente para generar una DO<sub>600</sub> inicial de aproximadamente 0,05. Se creció a 30 °C con agitación de 200 rpm hasta DO<sub>600</sub> dentro del rango 0,8 a 1. En este momento, se tomaron alícuotas y se guardaron como control no inducido. El cultivo se suplementó con IPTG obteniendo una concentración final de 0,1 mM. Se incubó a continuación, a 15 °C durante 16 hs para permitir la expresión de AtMSH2. Finalmente, los cultivos inducidos se centrifugaron a 5000  $\times$  g durante 20 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se guardaron inmediatamente a -70°C hasta su utilización.

Las medidas de densidad óptica a 600 nm se llevaron a cabo en un equipo UNICAM, HELIOS (Perkin Elmer).

#### **3.13.2. Purificación de AtMSH2 expresada en *E. coli* JM109(DE3) pRIL:**

Los sedimentos bacterianos obtenidos como se detalla en la sección anterior se resuspendieron en Solución A (20 mM Tris-HCl, 30 mM imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.4). Se utilizaron 15 ml de solución A por gramo de peso fresco de bacterias. La ruptura celular se llevó a cabo en un sonicador (MSE), para lo cual la muestra se sometió a 7 ciclos de 10 segundos de pulso y 15 segundos de descanso en baño de agua-hielo entre cada pulso. Los residuos celulares se removieron por centrifugación a 4 °C



durante 20 minutos a 4500  $\times$  g, recuperándose la fracción soluble. Se midió la cantidad de proteína total obtenida en este sobrenadante como se indica en la sección 3.11.

La purificación se realizó utilizando una columna His-trap<sup>TM</sup> (GE, Health Care) debido a que la secuencia codificante de MSH2 se expresó fusionada a una secuencia continua de 6 histidinas (6xHis o hexa-Histidina), la cual es afín al níquel complejado a la resina de la columna. El sobrenadante obtenido del lisado bacteriano y las soluciones utilizadas para la purificación se filtraron con un filtro de 0,2  $\mu$ m Minisart<sup>TM</sup> (Sartorius). Las soluciones se suministraron a la columna utilizando una bomba peristáltica a un flujo de aproximadamente 1 ml/minuto. La columna fue previamente equilibrada con 10 ml de solución A. Se sembró todo el sobrenadante recuperado, se lavó con 15 ml de solución A y se eluyó con 5 ml solución B (20 mM Tris-HCl, 500 mM imidazole, 0.5 M NaCl, pH 7.4). Se recogieron alícuotas de 1 ml excepto durante la elución, donde las alícuotas fueron de 0,5 ml. Todas las alícuotas se mantuvieron en hielo durante todo el proceso.

Finalmente, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para identificar las fracciones que contenían las proteínas de interés. Estas fracciones se juntaron y se sembraron en una columna de exclusión molecular (Hi-Trap Desalting<sup>TM</sup>, GE Health Care) previamente equilibrada con solución TG (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5% v/v glicerol). Se llevó a cabo la elución con la solución TG tomando alícuotas de 0,5 ml, las cuales se analizaron para determinar la presencia de proteínas. Las alícuotas obtenidas conteniendo proteínas se juntaron y se adicionó NaCl para lograr una concentración final de 200 mM. Luego, se sembraron en una columna de intercambio aniónico (Hi-Trap<sup>TM</sup> Q FF, GE Health Care) previamente equilibrada con solución TG conteniendo 200 mM de NaCl. Se realizó un paso de lavado con 10 ml de solución TG conteniendo 200 mM de NaCl y la proteína se eluyó con 10 ml de solución TG conteniendo 250 mM NaCl. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se ensayo la presencia de proteínas de interés mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las fracciones conteniendo la proteína AtMSH2, se mezclaron y el pool se ajustó a concentraciones finales de 500 mM NaCl y 30 mM imidazol para la siembra en una segunda columna His-Trap equilibrada con solución A. Se lavó con 5 ml de solución A y finalmente se eluyó con solución B recogiendo fracciones de aproximadamente 0,25 ml, las cuales fueron finalmente analizadas por SDS-PAGE. Las fracciones conteniendo la proteína de interés se juntaron y se sembraron en una columna Hi-trap desalting (GE Health Care), equilibrada previamente

con solución TG. A continuación se eluyó con solución TG y se recogieron las fracciones conteniendo AtMSH2. Estas fracciones desaladas conteniendo la proteína pura en solución TG se conservó a -70 °C hasta su utilización.

### **3.13.3. Digestión de AtMSH2 recombinante con enteroquinasa:**

La proteína de interés purificada como se detalla en la sección anterior se digirió con la proteasa enteroquinasa para remover el extremo amino terminal codificado por el vector. A las alícuotas purificadas y desaladas se les añadió 50 mM NaCl y 2 mM CaCl<sub>2</sub>. La reacción se llevó a cabo a 23 °C durante 16 horas utilizando 1,5 ng de enteroquinasa recombinante (New England Biolabs) cada 50 µg de la proteína AtMSH2 en un volumen final de 50 µl. Las digestiones fueron analizadas finalmente mediante SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie o transferidos a membranas de nitrocelulosa para su análisis por Western blot.

### **3.14. Material vegetal:**

Se utilizó la línea salvaje de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 y la línea mutante en MSH2 derivada de *A. thaliana* Columbia-0, denominada SALK\_002708, obtenida a partir del banco de semillas del instituto Salk (Alonso y col., 2003).

### **3.15. Crecimiento de las plantas en invernadero:**

Las plantas se crecieron en tierra en invernadero bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz (150 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 horas de oscuridad. La temperatura de crecimiento se mantuvo entre 20 - 23 °C y la humedad relativa entre 70 – 90 %. El riego se realizó cada 2 o 3 días con agua corriente.

### **3.16. Crecimiento de plantas *in vitro*:**

Las semillas de las distintas líneas se esterilizaron previo a la siembra *in vitro* en 1 ml de solución de esterilización (0,1 % v/v Triton X-100, 50 % v/v etanol) durante 3 minutos con agitación constante seguido de dos lavados con etanol 96 ° y finalmente se dejaron secar sobre placas de Petri conteniendo papel de filtro estéril dentro del flujo laminar.

Las semillas esterilizadas se sembraron luego en placas de Petri conteniendo medio sólido MS-0 o MS suplementado según se indique. Se incubaron en oscuridad durante 72 horas a 4-8 °C y posteriormente se transfirieron a cámara de cultivo con un

fotoperíodo de 16 horas de luz ( $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 horas de oscuridad. La temperatura de crecimiento se mantuvo entre 20 - 23 °C y la humedad relativa entre 70 – 80 %.

### **3.17. Generación de callos de *A. thaliana*:**

Los callos se obtuvieron en base al método descrito por Mathur y Konz (Mathur y Konz, 1998) con algunas modificaciones. Las semillas de *A. thaliana*, esterilizadas como se comentó previamente, se sembraron en placas conteniendo medio MS suplementado con 3 % p/v sacarosa, 0,5 mg/l kinetina y 2,5 mg/l ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2 % p/v agar-agar. Las placas se incubaron en oscuridad a 8 °C durante 72 hs. A continuación, se transfirieron a cámara de cultivo en condiciones normales de crecimiento hasta la germinación de las semillas. Posteriormente, las placas se cubrieron de la luz y se mantuvieron en oscuridad en cámara de cultivo a 23 °C para permitir la generación de los callos. Luego de un 1 mes de iniciado el crecimiento se observaron callos de aproximadamente 5 mm de diámetro generados a partir de cada semilla originalmente sembrada. Los mismos se fraccionaron en 4 y se transfirieron a nuevas placas con el medio mencionado anteriormente. Este procedimiento se repitió aproximadamente 1 vez por mes hasta la utilización de los mismos manteniéndose siempre la condición de oscuridad y esterilidad.

### **3.18. Obtención de protoplastos de *A. thaliana*:**

Se preparó la solución de digestión previa a la toma de muestras de la siguiente manera. Una solución de 1,5 % p/v celulasa R-10, 0,4 % p/v macerozima R-10, 0,4 M manitol, 20 mM KCl, 20 mM MES pH 5,7 se calentó a 55 °C durante 10 minutos, se templó a temperatura ambiente y, a continuación, se agregó 10 mM  $\text{CaCl}_2$  y 5 mM de 2-mercaptoetanol. Finalmente, se filtró con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Se utilizaron hojas de plantas crecidas durante 3 semanas en invernadero, tomándose la 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> hoja de cada planta. La región central de cada hoja se cortó con bisturí en trozos de 0,5 a 1 mm de ancho eliminándose los extremos anterior y posterior de la hoja. Se emplearon 10 ml de solución de digestión cada 10 a 20 hojas tratadas. El material fue cuidadosamente introducido en la solución de digestión. Se aplicó vacío durante 30 minutos y luego se incubó en oscuridad, sin agitación, durante 3 a 4 horas.

Finalizada la incubación, se agitó suavemente la solución conteniendo los fragmentos de hojas para producir la liberación de los protoplastos. Se agregó 5 ml de solución W5 (2 mM MES pH 5,7, 154 mM NaCl, 125 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM KCl) cada 10

ml de solución de digestión utilizada inicialmente. Se filtró la suspensión a través de un filtro de nylon de 80  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y la suspensión filtrada se centrifugó 2 minutos a 50 x g. Se removió el sobrenadante y se lavó el sedimento conteniendo los protoplastos con 1 ml de solución de lavado a 4 °C (0,5 M manitol, 4 mM MES pH 5,7, 20 mM KCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Se centrifugó nuevamente a 50 x g durante 1 minuto a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, obteniéndose los protoplastos en el sedimento resultante. Estos se resuspendieron en 200 a 500  $\mu\text{l}$  de solución de lavado para cuantificar mediante microscopía óptica en cámara de Thoma. En todos los casos, se obtuvieron extractos conteniendo entre  $10^5$  -  $10^6$  protoplastos/ml. Los mismos se mantuvieron en hielo hasta su utilización.

### **3.19. Inmunolocalización de AtMSH2 en protoplastos de *A. thaliana*:**

Suspensiones de protoplastos obtenidas como se detalló anteriormente se centrifugaron a baja velocidad y se eliminó el sobrenadante. El sedimento, correspondiente a los protoplastos se utilizó para los pasos siguientes.

- Fijación: Se incubaron los protoplastos durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución de fijación (HEPES 10 mM pH 7, sorbitol 0,4 M, paraformaldehído 4% p/v). A continuación, se realizó un lavado de 5 minutos con 0,1 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en PBS y tres lavados con PBS 1X.

- Adhesión: 50 a 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión fijada se colocaron sobre portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina (Sigma) y se incubaron durante 2 a 3 horas a 4 °C.

- Permeabilización: los protoplastos fijados y adheridos se trataron a continuación con una solución de 0,1 % v/v Triton en PBS durante 10 minutos, seguido de tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X.

- Bloqueo: las muestras anteriores se incubaron con una solución de BSA al 2 % en PBS durante 1 hora a 4 °C y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X.

- Incubación con anticuerpo primario: se ensayaron diversas diluciones de anticuerpos primarios anti-MSH2 purificados en PBS con las cuales se incubó durante 16 hs a 4 °C o 2 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X.

- Incubación con anticuerpo secundario: se utilizaron anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados al fluoróforo Cy3 (Invitrogen), el cual se excita con luz a 550 nm y emite a 570 nm. Previo lavado con PBS, los protoplastos se incubaron durante

1 hora a 4 °C con una dilución 1/800 de la solución stock de anticuerpos en PBS 1X, según indicaciones del proveedor.

- Tinción con DAPI y montaje: Finalmente se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS y un último lavado con PBS conteniendo 0,5 µg/ml de DAPI, el cual tiñe ADN y al excitarse a 350 nm fluoresce evidenciando los núcleos de las células en azul ( $\lambda_{em} = 470$  nm). Se eliminó la solución excedente y se montó utilizando 5 a 10 µl de solución de montado (50 % glicerol en PBS conteniendo p-fenilendiamina 0,1 % p/v para evitar la extinción de la fluorescencia) y posterior cobertura con cubreobjetos.

Finalmente, se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo de inmersión 40x y aceite mineral. Se realizaron observaciones con luz visible y con luz ultravioleta con los filtros de excitación y emisión adecuados para los fluoróforos DAPI y Cy3, alternativamente.

### **3.20. Extracción de núcleos de *A. thaliana*:**

Se procesaron con mortero y pilón, 1 a 2 g de tejido vegetal congelado con N<sub>2</sub> líquido hasta obtención de polvo fino. Se transfirió el material a solución de extracción E (400 mM sacarosa, 20 mM Tris-HCl pH 7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% v/v Triton X-100, 0,2 mM PMSF, 20 mM 2-ME) en una relación de 5 ml de solución por gramos de tejido utilizado. Se homogenizó y se dejó reposar durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, se filtro a través de cuatro capas de miracloth y se centrifugó a 380 x g durante 6 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó a 300 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento, conteniendo los núcleos, se lavó con 1 ml de solución L (400 mM Sacarosa, 20 mM Tris-HCl pH 7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,10% Triton X-100, 0,2 mM PMSF, 20 mM 2-ME) y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 2200 x g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de solución L suavemente. Finalmente, se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 1800 x g y se eliminó el sobrenadante. En el sedimento resultante se obtienen los núcleos.

Para confirmar el éxito de la extracción y la integridad de los núcleos obtenidos, una alícuota de los mismos resuspendidos en solución L se observó en microscopio de fluorescencia previa tinción con DAPI 1 mg/l.

Para realizar extractos proteicos de núcleos, el sedimento obtenido anteriormente se resuspendió en 200 µl de solución de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 110 mM KCl, 0,1 mM PMSF, 5 mM 2-ME) y se incubó durante 15

minutos en hielo. A continuación, se agregó solución de siembra SDS-PAGE 5x y se incubó a 100 °C durante 5 minutos. Finalmente, se centrifugó a 20000  $x$  g a 4 °C y el sobrenadante se separó y guardó a -20 °C hasta su utilización.

### **3. 21. Extracción de núcleos de coliflor (*Brassica oleracea*):**

El procedimiento general se basó en la utilización de inflorescencias de coliflor como una fuente abundante de proteínas de una especie estrechamente relacionada con *A. thaliana*, esencialmente como se describe en Browler y col. (2004). Las inflorescencias de coliflor se procesaron en licuadora doméstica junto a la solución de extracción (0,4 M sacarosa; 25 mM HEPES-KOH, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM 2-mercaptoetanol y 0,2 mM PMSF) en una relación de 4 ml de solución por gramo de tejido. Luego, el extracto se filtró a través de cuatro capas de Miracloth y se centrifugó a 3000  $x$  g durante 20 minutos a 4 °C eliminándose el sobrenadante. El sedimento obtenido conteniendo los núcleos se resuspendió cuidadosamente en la solución de homogenización (0,25 M sacarosa, 10 mM HEPES-KOH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM 2-mercaptoetanol; 0,15 % v/v Triton X-100 y 0,2 mM PMSF) en una relación de 1 ml de solución por gramo de tejido inicialmente procesado. A continuación se centrifugó a 2200  $x$  g durante 20 minutos a 4 °C eliminándose el sobrenadante. Este procedimiento de lavado con solución de homogenización y centrifugación se repitió tres veces en total. Finalmente, el sedimento nuclear se resuspendió en solución de siembra para SDS-PAGE 1X y se hirvió durante 5 minutos. Finalmente, se centrifugó y se separó el sobrenadante conteniendo el extracto proteico nuclear, que se almacenó a -20 °C hasta su utilización

### **3.22. Extracción de ADN genómico de tejido vegetal:**

Para la extracción de ADN genómico, se recolectaron 50 a 100 mg del material vegetal en tubos eppendorf estériles y se congelaron con nitrógeno líquido. El tejido se disgregó en nitrógeno líquido con un pilón pequeño y se extrajo con 400  $\mu$ l de solución de extracción CTAB (1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8; 100 mM Tris pH 8; 2 % (p/v) bromuro de cetil trimetil amonio). Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 60 °C y posteriormente se realizó una extracción con 400  $\mu$ l de cloroformo. Se homogeneizó por inversión y se centrifugó a 20.000  $x$  g durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 1  $\mu$ l de RNAsa A 0,5 mg/ml (Promega). Se incubó a temperatura ambiente 1 h y posteriormente se repitió la

extracción con cloroformo. Se separó la fase acuosa conteniendo el ADN y se agregó 400 µl de isopropanol. Se incubó durante una noche a -20 °C y se centrifugó a 20.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN resultante se lavó con 1 ml de etanol 70 % (v/v) y se centrifugó durante 7 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante completamente y se secó el sedimento en centrivap durante 1 a 2 horas hasta evaporación completa del líquido. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de agua o TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM). La concentración y calidad del ADN obtenido se determinó por medidas de absorbancia a 260 y 280 nm (Sambrook y Russell, 2001).

### **3.23. Selección de plantas mutantes en *MSH2* por inserción de ADN-T:**

Las semillas mutantes de la línea SALK\_002708 se crecieron en tierra en invernadero y se seleccionaron aquellas plantas homocigotas para el alelo mutante *msh2* por inserción del ADN-T. Para ello, se extrajo ADN de hojas de las plantas en estudio como se comenta en la sección 3.23. A continuación, las muestras de ADN obtenidas se utilizaron para la realización de ensayos de PCR con distintas combinaciones de los tres oligonucleótidos que se detallan a continuación:

**LB-Salk:** 5' - ATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAG - 3'

**LP-AtMSH2:** 5' - GCAAAGACGGAGTGAAGTTC - 3'

**RP-AtMSH2:** 5' - GCCTTTCAATATCGATGCGG - 3'

Cada muestra de ADN se analizó con el par LB-Salk / LP-At-MSH2 y paralelamente con el par LP-At-MSH2 / RP-At-MSH2. La primera combinación permite la amplificación del locus mutante conteniendo la inserción de ADN-T, mientras el segundo par amplifica el locus salvaje *MSH2*.

Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en 25 µl de mezcla conteniendo solución de amplificación para GoTaq™ 1X, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada oligonucleótido correspondiente y 0,025 U de GoTaq™ ADN polimerasa. El protocolo de temperaturas y ciclos utilizados constó de una primera etapa de desnaturalización inicial a 96 °C durante 6 minutos. A continuación, se realizaron 35 ciclos con una etapa de desnaturalización a 96 °C de 30 segundos, una etapa de hibridación de 30 segundos a 56 °C y una etapa de elongación de 1 minuto y 15 segundos a 72 °C. Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de elongación final de 10

minutos a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % p/v.

### 3.24. Medidas del porcentaje de liberación de electrolitos:

Para cada condición, se tomaron hojas, plántulas completas o rosetas, según se indique. Las mismas se lavaron extensivamente con agua destilada y se incubaron por separado en el mismo volumen de agua destilada y con agitación suave durante 3 horas en oscuridad a 23 °C, o según se indique. Se midió conductividad a cada muestra luego de la incubación de 3 horas, o según se indique. Finalmente, las muestras se autoclavaron para liberar la totalidad de electrolitos y se midió la conductividad final de cada muestra. Con estos datos, se calculó el porcentaje de liberación de electrolitos (% LE) utilizando la ecuación:

$$\text{Ecuación 3.1)} \quad \% \text{ LE} = \frac{C(t)}{C(f)} \times 100$$

Donde  $C(t)$  es la conductividad luego del tiempo del ensayo y  $C(f)$  es la conductividad total, luego de autoclavarse las muestras.

### 3.25. Determinación de la concentración de clorofilas a y b:

La cuantificación de clorofilas se llevó a cabo macerando 50 mg de muestra con 1 mL de etanol 96% (v/v) e incubando durante 24 horas en oscuridad a temperatura ambiente para permitir la completa extracción de los pigmentos. A continuación, la solución se centrifugó a 1.000  $x g$  durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se diluyó al 10 % (v/v) en el mismo solvente. Finalmente, las concentraciones de clorofilas (Chl) del sobrenadante diluido se determinaron midiendo las absorbancias a 649 y 665 nm aplicando las siguientes fórmulas (Wintermans y De Mots, 1965).

$$\text{Ecuación 3.2)} \quad [\text{Chl a}] (\mu\text{g/mL}) = 12,19 \times \text{Abs}_{665 \text{ nm}} - 3,45 \times \text{Abs}_{649 \text{ nm}}$$

$$\text{Ecuación 3.3)} \quad [\text{Chl b}] (\mu\text{g/mL}) = 21,99 \times \text{Abs}_{649 \text{ nm}} - 3,45 \times \text{Abs}_{665 \text{ nm}}$$



### **3.26. Determinación de la concentración de flavonoides:**

La cuantificación de flavonoides se realizó mediante la maceración de 50 mg de muestra con N<sub>2</sub> líquido seguida de una primera extracción con 0,60 ml de metanol ácido (1% (v/v) HCl en metanol) y posterior incubación durante 8 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizó una segunda extracción con 1,2 ml de cloroformo y 0,6 ml de agua destilada. La solución resultante se centrifugó durante 2 minutos a 3.000  $\times$  g a temperatura ambiente descartándose la fase orgánica. Sobre la fase acuosa, se realizó un espectro de absorbancia comprendido entre 280 nm y 600 nm y se midió el pico de absorbancia a 312 nm (Casati y Walbot, 2003). La absorbancia obtenida se relativizó al peso fresco del material original utilizado.

### **3.27. Determinación de las tasas de germinación:**

Se sembraron 25 a 50 semillas por placa de Petri conteniendo medios sólidos MS-0 o MS suplementados con agentes que producen estrés. Las placas de Petri se incubaron a 4 °C durante 72 horas en oscuridad y se transfirieron a cámara de cultivo. A los 10 días de crecimiento se contabilizaron las semillas que germinaron. Como criterio de germinación se verificó la presencia de radícula y cotiledones. Las determinaciones se realizaron entre 4 a 6 veces para cada condición y cada línea ensayada, utilizándose distintas placas para cada línea. Las tasas de germinación se calcularon como semillas germinadas sobre semillas totales sembradas y se compararon estadísticamente mediante la prueba Z.

### **3.28. Medida de la longitud de las raíces:**

Para la realización de estas determinaciones se sembraron 7 semillas de cada línea (salvaje y SALK\_002708) en placas de Petri conteniendo medio sólido MS-0 o medio suplementado con agentes de estrés. Las placas de Petri conteniendo el medio de cultivo se dividieron en dos áreas iguales trazando una línea recta que contiene el centro de las mismas. Adicionalmente, se trazó un segmento perpendicular a la línea trazada anteriormente a 2 cm del centro de la placa. Las semillas se dispusieron sobre esta última línea de forma equidistantes entre sí. A continuación, las placas se incubaron en oscuridad durante 72 horas a 4°C en posición vertical. Finalmente, se transfirieron a cámara de cultivo ubicándose en posición vertical, formando un ángulo de aproximadamente 65 ° con la horizontal. Las placas se fotografiaron al tiempo indicado y las fotografías obtenidas se analizaron con el programa informático ImageJ (NCBI)

para medir exactamente la longitud de las raíces. Los valores obtenidos se compararon mediante ensayos de ANOVA con un nivel de significación fijado en 5 % ( $\alpha = 0,05$ ), verificándose el cumplimiento de las condiciones para la aplicación del mismo.

### **3.29. Tratamientos de estrés:**

#### **3.29.1. Tratamientos con MV:**

##### **3.29.1.1. Tratamientos de plántulas sumergidas en soluciones con MV:**

En este caso, el tratamiento se realizó transfiriendo plántulas crecidas en medio MS-0 a recipientes conteniendo soluciones de 0,01 % v/v de Triton X-100 suplementadas con MV en las concentraciones indicadas o en ausencia del mismo, a modo de control. Este tipo de tratamiento permite el seguimiento del grado de daño mediante medidas directas de conductividad y posterior cálculo de porcentajes de liberación de electrolitos. Como se mencionó anteriormente, al producirse EROs dentro de las células dañan diversos componentes celulares, entre los que se encuentran las membranas plasmáticas. Este daño en las membranas se evidencia por medidas de conductividad de las soluciones donde están sumergidas las plantas, previas al tratamiento y luego del mismo. La variable en estudio en estos ensayos es el porcentaje de liberación de electrolitos, calculado según la ecuación 3.1. Un aumento en esta variable indica un mayor daño en las membranas e indirectamente un mayor grado de estrés oxidativo de las células.

##### **3.29.1.2. Tratamientos en placas de MS-0 suplementadas con MV:**

Este tipo de tratamientos tuvo como objetivo generar un sistema que permita el crecimiento durante períodos de tiempos mayores a los utilizados previamente, bajo condiciones que impongan un daño oxidativo constante. Se utilizaron placas de Petri conteniendo medio sólido MS-0 suplementado con MV en concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ . Los ensayos se realizaron con plantas crecidas en medio MS-0 que luego fueron transferidas a MS suplementado con MV y, adicionalmente, con plantas directamente germinadas y crecidas en MS suplementado con MV, según se indique.

Las medidas de porcentajes de liberación de electrolitos se realizaron sobre plántulas enteras como se comenta en la sección 3.24.

### **3.29.2. Tratamientos con NaCl:**

Para generar estrés salino, e indirectamente estrés oxidativo, las plantas se cultivaron en los medios sólidos en presencia de concentraciones de NaCl superiores a las óptimas. Se llevaron a cabo dos tipos de tratamientos, el primero se realizó creciendo plantas en medio sólido MS-0 suplementado con distintas concentraciones de NaCl (0, 20 mM, 50 mM, 150 mM). Alternativamente, se trataron plantas germinadas y crecidas durante 1 o 2 semanas en placas de Petri conteniendo MS-0, transfiriéndolas a nuevas placas de Petri con MS-0 suplementado con NaCl en las concentraciones citadas previamente.

En todos los casos el daño oxidativo se evaluó mediante la observación directa de clorosis y mediante ensayos de liberación de electrolitos (como se comenta en 3.24). Adicionalmente, se utilizaron otros ensayos como indicadores del daño oxidativo, entre ellos medidas de longitud de raíces (3.28) y cuantificación de clorofilas totales (3.25).

### **3.30. Extracción de ARN de plantas y retrotranscripción:**

#### **3.30.1. Obtención de ADNc:**

Las extracciones de ARN de las muestras de plantas tratadas con MV se llevaron a cabo utilizando TRIzol (Invitrogen, Life Technologies) según las indicaciones del proveedor. Posteriormente, se analizó la integridad del ARN en geles de agarosa 1,2 % p/v y se midió la concentración de ARN utilizando el sistema QUBIT™ (Invitrogen, Life Technologies), según especificaciones del fabricante. Previo a la retrotranscripción se realizó un tratamiento con ADNasa I (Promega) para eliminar restos de ADN genómico contaminante. El tratamiento consistió en la incubación de 2 mg de ARN total con 2 U de la enzima RQ1 DNaseI (Promega) durante 1 h a 37° C, en un buffer de reacción 1x (suministrado por el fabricante de la enzima) en un volumen final de 10 µl. La enzima se inactivó con el agregado de 1 µl de solución Stop provista por el fabricante. La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando la enzima SuperScript II (Invitrogen) y oligo-dT<sub>15</sub>, como cebador. La reacción de síntesis de la primera hebra de ADNc se desarrolló en un volumen final de 20 µl, incubando a 70°C durante 5 min 2 µg de ARN total tratado con ADNasa I (11 µl) con 1 µg de oligo-dT<sub>15</sub> en un volumen final de 12 µl. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se enfrió rápidamente en hielo y se centrifugó brevemente. Luego se añadieron los siguientes componentes al tubo de reacción: buffer 1x (suministrado por el fabricante de la enzima); dNTPs a una concentración final de 0,1 mM, y agua libre de ARNasas hasta completar un volumen

de 19  $\mu$ l. Se incubó a 42°C durante 5 min y finalmente se adicionaron 200 U de la transcriptasa reversa Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). La reacción se llevó a cabo incubando la mezcla a 42°C durante 1 h y luego la transcriptasa reversa se inactivó incubando los tubos durante 15 min a 70°C. Posteriormente, las muestras se almacenaron en freezer a -20 °C hasta su utilización. El ADNc obtenido se diluyó al medio previo al análisis mediante PCR en tiempo real.

### 3.30.2. PCR en tiempo real:

Los ensayos de PCR en tiempo real para estudiar la expresión de los genes MSH2, MSH6, MLH1 y PMS1 se realizaron utilizando los pares de cebadores que se detallan en la tabla 3.1. Para estos experimentos, 1  $\mu$ l de una dilución 1/2 del ADNc generado se empleó como molde en reacciones de PCR empleando el equipo Mx 3000P QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA), con 332,5 nM de cada cebador, 20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM KCl, 0,5x SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,23 mM dNTPs y 0,58 U ADN polimerasa Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Las condiciones de PCR fueron: 2 min a 94 °C, seguidos por 50 ciclos, 10 s de desnaturalización a 96 °C, 15 s de apareamiento a 57 °C y 20 s de extensión a 72 °C, con un paso final de extensión a 72°C de 1 min. Luego de cada reacción de PCR, los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2 % (p/v), estudiándose también sus curvas de *melting*, con el fin de corroborar la identidad de los productos de PCR generados.

**Tabla 3.1.** Se indican los cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real para cada gen ensayado y el tamaño molecular del producto amplificado.

GEN	Cebador directo	Cebador reverso	Producto PCR (pb)
<i>MLH1</i>	GCAATACAGCTTAGCGATCC	GTGCACGCTGAAATACTCCT	177
<i>PMS1</i>	CTCCTGGAACACAAGCTGAT	TTTAGGACCGGTTGACTGAG	200
<i>MSH2</i>	TGGTAACACTTGTTGGTGTGG	TTCTCTTCCCACTCTCCTCA	242
<i>MSH6</i>	ACTACCTGCGACAAGCATTC	TACAGCGTTCCTGAATAGCC	244
<i>TUB2</i>	GAGCCTTACAACGCTACTCTGTC TGTC	ACACCAGACATAGTAGCAGAAATC AAG	167

Los datos obtenidos se analizaron mediante el método “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ” descrito por Livak y Schmittgen (2001), utilizando el gen de tubulina *TUB2* (AT5G62690) como referencia, el cual no varía por estrés oxidativo en plantas de *A. thaliana*.

### **3.31. Inmunodetección de 8-oxoG en el ADN: Ensayo de dot blot.**

El protocolo general para medir bases oxidadas del tipo 8-oxoG se adaptó del descrito por Stapleton y Walbot (1994). Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (NNS-MOG-020P-EX, Cosmo Bio Co.). Se realizaron experimentos de dot blot, para los cuales se sembraron en una membrana de nylon Hybond (GE Healthcare), por sextuplicado, 1,5  $\mu$ g de ADN de cada muestra de los distintos genotipos con cada tratamiento. La membrana fue luego bloqueada con buffer leche por al menos 1 h a 4°C con agitación continua. Se lavó la membrana con buffer TBS y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario (1:1000 en buffer TBS), también a 4°C y con agitación. El anticuerpo no unido se lavó con buffer TBS, y el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina, se incubó con la membrana durante al menos 1 h a 20°C, agitando continuamente. Finalmente, se lavó la membrana y se procedió al revelado con 10 ml de una solución conteniendo 30  $\mu$ l de NBT 30 mg/ml y 30  $\mu$ l de BCIP 15 mg/ml en buffer sustrato, dejando que la reacción transcurra en oscuridad hasta observar aparición de color. La reacción se cortó por lavados con agua destilada. Las imágenes de las membranas se adquirieron utilizando el digitalizador de imágenes-cuarto oscuro EpiChemi3 de UVP, y la densitometría se realizó usando el software Labworks.

### **3.32. Transformación genética de *S. cerevisiae*:**

La transformación en levaduras se llevó a cabo mediante electroporación, según un protocolo adaptado de Suga y Hatakeyama (2003).

#### **3.32.1. Preparación de células de *S. cerevisiae* electrocompetentes:**

Una colonia se inocula en 5 ml de medio YPDA se incubó a 30 °C con agitación constante (200 rpm) durante una noche. A continuación, se midió la  $DO_{600}$  del cultivo saturado y se tomó una cantidad suficiente para inocular 100 ml de YPDA con una  $DO_{600}$  inicial de 0,1, aproximadamente. Este nuevo cultivo se creció a 30 °C hasta una  $DO_{600}$  aproximada de 0,25. Luego, el cultivo se incubó en hielo durante 15 minutos y a continuación se centrifugó 5 minutos a 1600 x g. Se lavó tres veces con agua a 4 °C.

Finalmente, se resuspendió el precipitado en solución Freezing (Sorbitol 0,6 M; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; HEPES 10 mM pH 7,5) fría, en una relación 1/50 del volumen del cultivo original. La suspensión celular resultante se dividió en alícuotas de 100 µl cada una que se mantuvieron a -70°C hasta su utilización.

### **3.32.2. Electroporación de *S. cerevisiae*:**

Las alícuotas de células electrocompetentes se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 1 minuto a 3.000 x g. El sobrenadante se eliminó completamente y el precipitado se lavó con 100 µl de Sorbitol 1 M a 4 °C. A continuación, el sedimento celular se resuspendió en 40 µl de Sorbitol 1 M y se agregó entre 1 a 10 µl de la solución de ADN plasmídico.

La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación. Se utilizó el electroporador Gene Pulser de Bio-Rad y las condiciones de electroporación fueron 25 µF, 1,5 kV y 200 Ω. Luego de la descarga, se agregó 1 ml de medio YPDA a la cubeta. La suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó durante 1 hora a 30 °C sin agitación. Luego de ese período, se centrifugó a 2000 x g durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de medio selectivo adecuado, previo a la siembra en placas de Petri conteniendo el medio selectivo.

### **3.33. Disrupción génica de *MSH2* en levaduras de la cepa YLKL313:**

Se diseñaron cebadores de ADN de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud con las siguientes características: los 50 nucleótidos 3' de cada uno de estos cebadores son complementarios a cada uno de los extremos de la secuencia codificante *MSH2* de *S. cerevisiae* mientras que los 20 nucleótidos restantes son complementarios a los extremos del gen *TRP1* de levadura y se diseñaron con la finalidad de amplificar este fragmento mediante PCR. Las secuencias nucleotídicas de los cebadores son las siguientes:

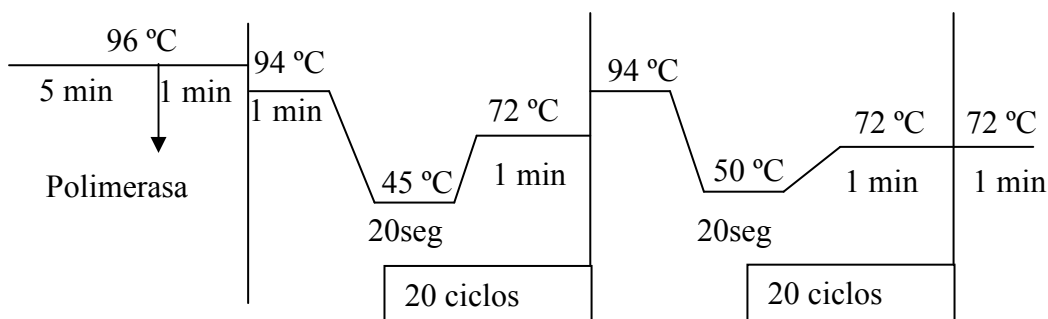
TFW: (directo)

5'GACACTCTACTCCAATATCAACTGTAAAAAATCTCTTTATCTGCTGA  
CCT TCTTCAAGAATTAATTCGGTTCG 3'

TRV: (reverso)

5'GCACGCAATAGCTCTTGTATTTTATGCTGGGAAGCTTCTTCAGTAATT  
TT CGATCCGATGATAAGCTGTC 3'

En *itálica* se distinguen las secuencias de 20 nucleótidos que sirven como cebadores para amplificar *TRP1*. El resto de las secuencias TFW y TRV tienen nucleótidos homólogos a las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen de *MSH2* de *S. cerevisiae*, respectivamente. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando ADN polimerasa termoestable Vent<sup>TM</sup> (New England Biolabs) con 1 ng/μl de ADN molde YEp112SPGAL, 5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 μM de cada primer (directo y reverso), 0,2 mM de dNTPs y 4 mU/μl de ADN polimerasa Vent, la cual se agregó a los 5 minutos de la etapa de desnaturalización inicial. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp<sup>R</sup> PCR System 2400 (Perkin Elmer) utilizando el protocolo de temperaturas que se detalla a continuación:



El producto de amplificación obtenido se corrió en una electroforesis en gel de agarosa 1,2 % (p/v). El gel se tiñó con bromuro de etidio y se extrajo el fragmento conteniendo la banda de interés. A continuación, el fragmento de agarosa conteniendo el ADN amplificado se procesó, según especificaciones del fabricante, utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit<sup>®</sup> (Qiagen). El ADN se eluyó finalmente con agua estéril. Se utilizaron 10 μl del producto de amplificación purificado para transformar células electrocompetentes de la cepa YLKL313. Las colonias transformantes obtenidas se seleccionaron en placas sin triptófano (SCDW: SCD-agar sin agregado de triptófano). Luego de varios días, se repicaron las colonias de las placas originales en medio fresco SCDW y se crecieron durante 3 a 5 días a 30°C.

Para corroborar la disrupción se generaron también 3 cebadores adicionales de 20 nucleótidos cada uno denominados MTWA, MRB y TRC.

MTWA: 5'-ATCAGAACTCCAGCACTCC-3'

MRB 5'-ATGTTCCCTGGAGATGCGC-3'

TRC: 5'-CTCCGCTTACATCAACACC-3'

El primer cebador hibrida en el ADN genómico de *S. cerevisiae* corriente arriba del gen *MSH2*. MRB hibrida dentro del gen *MSH2* y TRC hibrida dentro del gen *TRP1*. Ambos tienen dirección contraria al primer oligonucleótido mencionado (MTWA). De esta forma, al realizar PCR con el par MTWA-MRB se amplifica un producto de aproximadamente 650 pb sólo si el locus *MSH2* salvaje no ha sido reemplazado por *TRP1*. De forma similar, si se realiza la PCR con el par MTWA-TRC se genera un producto de amplificación de 981 pb sólo si se produjo el reemplazo del gen *MSH2* por *TRP1* en el ADN genómico de la levadura. Estos cebadores se utilizaron para realizar PCR de colonia sobre las distintas transformantes obtenidas. Se tomó con un tipo de micropipeta una porción de una colonia y se resuspendió en 10 µl de NaOH 0,02 N. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 10 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se utilizó 1 µl de sobrenadante como molde de la reacción de PCR. La reacción de PCR se llevó a cabo usando ADN polimerasa termoestable Vent<sup>TM</sup> (New England Biolabs), 3 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 µM de cada primer (directo y reverso, según corresponda), 0,2 mM de dNTPs y 4 mU/µl de ADN polimerasa Vent, la cual se agregó a los 5 minutos de la etapa de desnaturalización inicial. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp<sup>R</sup> PCR System 2400 (Perkin Elmer) mediante el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 96°C durante 6 minutos, 40 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, una etapa de hibridación de 20 segundos a 62 °C y una etapa de elongación de 1 minuto a 72 °C. Finalmente, se agregó una etapa de elongación final de 7 minutos a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v) como se detalló anteriormente.

### **3.34. Expresión de proteínas recombinantes en levaduras:**

#### **3.34.1. Expresión en cepas T334, YLKL313 e YRG313:**

Se transformaron células electrocompetentes de las distintas cepas con los plásmidos de interés y las colonias transformantes se seleccionaron en medio sólido SCDL. Una colonia de interés se inoculó luego en 5 a 10 ml de medio mínimo SCDL y se creció a saturación a 30 °C con agitación (200 rpm). Este cultivo se diluyó en medio SCDGL para obtener una DO<sub>600</sub> inicial de aproximadamente 0,01 y se creció durante 16



horas a 30 °C con agitación (200 rpm). Finalmente, los cultivos se centrifugaron a 2.000  $x$  g durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó y el sedimento celular se procesó o se guardó a -70 °C hasta su utilización.

### **3.34.2. Expresión en cepas E134 y DAG60:**

Una colonia de la cepa de interés se inoculó en medio SCDL. Se cultivó a 30 °C durante 20 horas con agitación de 200 rpm. Un ml del cultivo crecido se centrifugó a 2.000  $x$  g durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 ml de agua estéril y, finalmente, se resuspendió en 1 ml de SCGL. Se midió  $DO_{600}$ . Se tomó la cantidad suficiente de la alícuota lavada para obtener una  $DO_{600}$  inicial de aproximadamente 0,2 al inocular 20 a 100 ml de medio de inducción SCGL. Se creció durante 20 horas y el cultivo inducido resultante se centrifugó durante 5 minutos a 2000  $x$  g. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se procesó en el momento o se guardó a -70°C hasta su utilización.

### **3.35. Extracción proteica de levaduras:**

#### **3.35.1. Extracción desnaturizante:**

Los sedimentos celulares inducidos se resuspendieron en solución CRK (5% SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM PMSF) utilizando 100  $\mu$ l de solución por cada  $2,5 \times 10^7$  células, aproximadamente. Cada 7 minutos se agregó 1mM de PMSF para evitar la degradación proteica. A continuación se agregaron esferas de vidrio (0,5 mm de diámetro; Sigma), cubriendo aproximadamente 1/3 del volumen original. Se realizaron 6 pulsos de vortex a máxima potencia de 1 minuto cada uno con 1 minuto de incubación en hielo entre ellos. Se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos a 4 °C y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos. A los sedimentos se les agregaron 50  $\mu$ l de buffer CRK y se hirvieron durante 3 minutos. Se realizaron 2 pulsos de vortex adicionales, se centrifugaron y estos sobrenadantes se mezclaron con los anteriores. Las muestras se mantuvieron a -70 °C hasta su utilización.

#### **3.35.2. Extracción no desnaturizante:**

Los sedimentos celulares se resuspendieron en solución de extracción no desnaturizante (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 10 mM 2-mercaptoetanol; 1 mM PMSF) conservando la relación de 100  $\mu$ l de buffer cada 2,5  $x$

$10^7$  células, aproximadamente. Se agregaron esferas de vidrio y se realizaron 6 pulsos de vortex vigoroso de 1 minuto incubando un tiempo similar en hielo entre cada pulso. Se separaron las esferas de vidrio de los extractos celulares y se centrifugaron a  $10.000 \times g$  durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Los sobrenadantes se separaron y se determinó la concentración de proteínas totales. En todos los casos se obtuvieron valores mayores a  $20 \text{ mg/ml}$ . Estos extractos se conservaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.36. Inmunoprecipitación:**

Los ensayos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo utilizando proteína A - agarosa (Invitrogen), anticuerpos anti-AtMSH2 generados en conejos (Gomez y col., 2011) y extractos proteicos totales no desnaturizantes de los cultivos de levaduras inducidos conteniendo los plásmidos de interés según corresponda. Los mismos se obtuvieron como se indica en la sección anterior.

En primer lugar,  $300$  a  $500 \mu\text{l}$  de los extractos proteicos de interés se incubaron con agitación suave, a  $4^\circ\text{C}$  durante 3 horas con  $150 \mu\text{l}$  de la solución de anticuerpos purificados anti-MSH2. A continuación, se agregaron  $25 \mu\text{l}$  de la suspensión de proteína A - agarosa, previamente equilibrada en la solución de extracción proteica no desnaturizante, y se incubó nuevamente durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$  con agitación suave. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a  $1.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  y se eliminó el sobrenadante. El sedimento conteniendo la proteína A - agarosa se lavó con  $200 \mu\text{l}$  de solución IP ( $100 \text{ mM}$  Tris-HCl pH 7,6;  $150 \text{ mM}$  NaCl;  $1 \%$  v/v Triton X-100;  $1 \text{ mM}$  EDTA) durante 30 segundos, se centrifugó a  $1000 \times g$  y se eliminó el sobrenadante. Este paso de lavado se llevó a cabo 3 veces en total. Finalmente, al sedimento lavado se le agregó solución de siembra para SDS-PAGE 1X y se hirvió durante 5 minutos, manteniéndose a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Previo a la siembra en geles de poliacrilamida, las muestras se centrifugaron a  $20.000 \times g$  utilizándose finalmente el sobrenadante obtenido.

### **3.37. Espectroscopía de masas:**

Se analizaron por espectroscopía de masas MALDI-TOF-TOF muestras provenientes de extractos proteicos inmunoprecipitados de levaduras como se indicó anteriormente. Las muestras se obtuvieron a partir de geles de SDS-PAGE de los extractos proteicos provenientes de las inmunoprecipitaciones. Los mismos se corrieron y tiñieron con azul de Coomassie de manera habitual, pero utilizando soluciones filtradas

y condiciones de limpieza estrictas para evitar contaminaciones. A continuación, se seccionó con la ayuda de bisturí estéril la fracción del gel conteniendo las bandas de interés obteniéndose fragmentos de aproximadamente 5 mm de ancho y 1 mm de alto. Los mismos se introdujeron en tubo eppendorf perfectamente rotulados y limpios y se enviaron al servicio del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectroscopía de Masa MALDI TOF (Cequibiem, Departamento de Química Biológica, Fac. Ciencias exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires) para su procesamiento y análisis. Los datos de las masas obtenidas se analizaron utilizando el programa MASCOT (Perkins y col., 1999).

### **3.38. Medidas de tasas de mutaciones: Ensayos de fluctuación:**

Se seleccionaron colonias transformadas con cada plásmido (YE<sub>p</sub> vacío, YE<sub>p</sub>::M2, YE<sub>p</sub>::M7 y YE<sub>p</sub>::M2-M7) en placas conteniendo medio sólido completo sin leucina, SCDL. A continuación, una colonia transformante de cada tipo se inoculó en 5 ml de medio SCDL líquido y se creció a saturación a 30 °C. Se tomó 1 ml de cada cultivo, se centrifugó a 1.000 x g y se eliminó el sobrenadante. El sedimento celular se lavó con agua estéril, para eliminar restos de glucosa que pudiera inhibir la expresión por galactosa, y se diluyó lo suficiente para obtener una densidad celular promedio de 1.000 células / ml en medio inductor SCGL. Para las cepas T334, YLKL313 e YRG313, se utilizó SCDGL en este último paso.

Estas diluciones se dividieron luego en alícuotas de 100 µl en microplacas de 96 pocillos, conformándose de esta manera, 96 cultivos paralelos independientes de cada tipo. Las placas se cerraron, se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron hasta saturación a 30 °C sin agitación. Entre 12 a 24 cultivos de 100 µl de cada tipo de transformantes se utilizaron para determinar el número total de células mediante medidas de DO<sub>600</sub>. Adicionalmente, 24 a 48 cultivos paralelos de 100 µl para cada tipo de transformantes se sembraron en placas de Petri con los medios selectivos correspondientes: sin lisina para estudiar el locus *lys2::InsE-A<sub>14</sub>* (SCDLK), sin histidina para estudiar el locus *his7-2* (SCDLH) y con canavanina para analizar el locus *CAN1* (SCDL-CANA). En los casos que resultaron necesarios los cultivos se diluyeron en agua estéril, previo a la siembra de 100 µl de dilución y los valores se corrigieron según el factor de dilución como se indica en Foster (2006). Se sembraron 6 a 9 cultivos de 100 µl por placa situando lentamente la suspensión sobre el medio sólido formando gotas circulares de aproximadamente 1 a 2 cm de diámetro. Las placas sembradas se

dejaron secar en esterilidad hasta la absorción completa del líquido depositado y luego se incubaron a 30 °C durante 2 a 5 días hasta aparición de colonias mutantes. Estos valores se analizaron utilizando la plataforma informática FALCOR (Fluctuation Analysis Calculator, <http://www.keshavsingh.org/protocols/FALCOR.html#interface>) según el método de la mediana modificado (Schmidt y col., 2006) o el método MSS (Sarkar y col., 1992; Ma y col., 1992).

### **3.39. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA):**

#### **3.39.1. Anillado de oligonucleótidos:**

Para los ensayos de cambios de movilidad electroforética se utilizaron dos oligonucleótidos de 61 residuos nucleotídicos denominados BtG y TopT. Estos son totalmente complementarios excepto por la base central de cada una de ellos donde se genera un par incorrecto de tipo G/T. Las secuencias de los mismos se observan a continuación, la base que genera el apareamiento incorrecto está marcada en rojo en cada primer.

<b>TopT</b>	5' -TCGCCAGAATCGCCGAATTGCTAGCAAGCTTCGAGTCTAGAAATTCGGCGAATCCCGTCA- 3'
<b>BtG</b>	5' -TGACGGGATTTCGCCGAATTTCTAGACTCGAGAGCTTGCTAGCAATTCGGCGATTCTGGCGA- 3'

En primer lugar, se llevó a cabo la hibridación de los cebadores mezclando cantidades equimolares de cada uno de los oligonucleótidos disueltos en agua estéril de forma de obtener una concentración final de ADN doble hebra de 100 µM. Esta mezcla se hibridó en un termociclador Gene Amp<sup>R</sup> PCR System 2400 (Perkin Elmer) con el protocolo de temperaturas que se indica: 2 minutos a 94 °C, 2 minutos a 72 °C, 2 minutos a 55 °C y 10 minutos a 15 °C. Finalmente, el ADN doble hebra generado se mantuvo en hielo o se guardó a -20 °C para utilización posterior

#### **3.39.2. Fosforilación de oligonucleótidos:**

Las reacciones de fosforilación de los oligonucleótidos se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl, conteniendo una solución de fosforilación comercial suplementada con 20 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 mCi/µmol, 10 µCi/µl, New England Nuclear), 250 ng del oligonucleótido doble hebra, anillado como se detalla en la sección anterior, y 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Fermentas). Se incubó 60 min a 37 °C. Luego, la solución se diluye con agua destilada hasta 100 µl y el oligonucleótido marcado se purificó en

una columna de Sephadex G25 (Penefsky, 1977). La columna se preparó, en primer lugar, resuspendiendo el Sephadex G-25 en agua destilada a razón de 5 ml de agua por gramo del material seco. La mezcla se dejó hidratar por 1 hora y luego se armó una columna utilizando una jeringa de 3 ml a la cual se le colocó 2 pequeños discos de papel 3MM (Whatman) para la contención del Sephadex. La matriz se secó por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min, y luego se sembró la mezcla radioactiva. Una nueva centrifugación permitió colectar el oligonucleótido purificado en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

### **3.39.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles:**

La interacción de los extractos proteicos de levaduras con la sonda correspondiente se analizó mediante la técnica de retardo de la movilidad electroforética de Lane (1992). Aproximadamente, 1 ng de fragmento de ADN marcado se incubó con aproximadamente 120 µg de los diferentes extractos proteicos en un volumen final de 20 µl de una solución buffer de unión 1x (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 12 % v/v glicerol; 1 mM DTT) y 0,1 µg de ADN λ digerido con la enzima BstEII (Promega). En caso de requerirse, se agregaron por lo menos 100 ng de la misma sonda sin la marca radiactiva, denominado competidor. Luego de 1 hora a 4 °C, se agregó solución de siembra (0,25 % p/v azul de bromofenol, 0,25 % p/v xilencianol, y 30 % v/v glicerol) en una proporción 20:1 de muestra:solución y se sembró en geles de poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 no desnaturalizantes de concentración final 5 % (p/v). Para la preparación de los geles y como solución de corrida se utilizó TBE 0,5x. La corrida electroforética se llevó a cabo a 4°C y 100V. Los geles se secaron a 80°C durante 60 min en un secador de geles con bomba de vacío (SGD 2000, SAVANT), para luego ser incubados al menos durante 24 h en un cartucho específico con placas radiográficas (GE Healthcare), previo al revelado de las mismas.

### **3.40. Secuenciación de *CAN1*:**

#### **3.40.1. Extracción de ADN genómico:**

Se realizó un ensayo de fluctuación para *CAN1* como se detalló anteriormente, utilizando la cepa E134 transformada con los plásmidos YEp181 vacío y YEp::M2-M7. A partir de este ensayo, se repicaron 24 colonias Can<sup>r</sup> de cada grupo en nuevas placas conteniendo medio SCDL-CANA. Los grupos se denominaron a continuación YEp (vector vacío) y MM (YEp::M2-M7). Cada colonia repicada se inoculó en 1,5 ml de

medio SCDL y los cultivos se crecieron a saturación durante 2 días a 30 °C. Los cultivos crecidos se centrifugaron a 3000  $\times$  g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario. Los sedimentos celulares resultantes se resuspendieron en 50  $\mu$ l de solución STES (200 mM Tris-HCl pH 7,6; 500 mM NaCl; 0,1 % p/v SDS; 10 mM EDTA). Se agregó un volumen aproximado de 50  $\mu$ l de esferas de vidrio (0,5 mm de diámetro; Sigma) a cada muestra y se mezcló mediante un pulso de vortex corto. A continuación, se adicionó a cada tubo 20  $\mu$ l de TE pH 7,6 (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) y 60  $\mu$ l de una mezcla de fenol/cloroformo 1:1, equilibrado previamente en 100 mM Tris-HCl pH 7,6. Se realizaron dos pulsos de vortex a máxima velocidad de 1 minuto cada uno, con un intervalo de similar duración entre ellos. Se centrifugó a 21.000  $\times$  g durante 10 minutos y se transfirió la fase acuosa superior a nuevos tubos. Se realizó un lavado adicional del sobrenadante obtenido de cada muestra mediante el agregado de 140  $\mu$ l de TE pH 7,6 y 100  $\mu$ l de cloroformo. Se homogenizó mediante vortex corto y se centrifugó a 21.000  $\times$  g durante 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a nuevos tubos y se precipitó el ADN mediante el agregado de un volumen de isopropanol 100 % e incubación a -20 °C durante 16 horas. Luego de la misma, las muestras se centrifugaron a 21.000  $\times$  g durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante de las mismas. Se realizó un lavado con etanol 70 % v/v a 4 °C y se repitió el paso anterior de centrifugación y eliminación de sobrenadantes. Finalmente, los sedimentos de ADN se secaron completamente y se resuspendieron en 40  $\mu$ l de agua estéril.

### **3.40.2. Amplificación de *CANI* mediante PCR:**

Las muestras de ADN obtenidas en el paso anterior se utilizaron a continuación como moldes para amplificar por PCR el locus *CANI* en dos fragmentos denominados A y B. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los mismos se detallan en la tabla 3.2. Para la amplificación del primer fragmento se utilizaron los cebadores denominados A-FW y A-REV, directo y reverso respectivamente. El segundo fragmento se amplificó con los cebadores B-FW y B-REV, directo y reverso, respectivamente.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	FRAGMENTO SECUENCIADO
A-FW	GTTCTTCAGACTTCTTAACTCCTG	A
A-REV	CACCAGTAGATGTCTCCATG	A
A-OP2	GTGCGGCCAATGGTTACATG	A
B-FW	CATATTCTGTCACGCAGTCC	B
B-REV	CTTATGAGGGTGAGAATGCG	B
B-OP3	GCTATTGAGAACTCTGGTAC	B

**Tabla 3.2. Cebadores utilizados para amplificar y secuenciar CAN1.** En la tercera columna se indica el fragmento sobre el que se realizó la secuenciación con el oligonucleótido correspondiente.

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando 1 µl de ADN genómico como molde en cada tubo de reacción en un volumen total de 50 µl conteniendo solución de amplificación para ADN polimerasa GoTaq™ 1X (Promega), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada oligonucleótido (directo y reverso, según corresponda), 0,025 U de GoTaq™ ADN polimerasa (Promega) y 0,004 U de Pfu ADN polimerasa (Promega). El protocolo de amplificación constó de una etapa inicial de desnaturalización de 7 minutos a 94 °C. A continuación, se realizaron 5 ciclos en los cuales la temperatura de hibridación se fue disminuyendo de 2 °C por cada ciclo, comenzando en 60 °C. Estos primeros ciclos constan de una etapa de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, una etapa de hibridación de 30 segundos y una etapa de amplificación a 72 °C durante 135 segundos. A continuación, se realizaron 30 ciclos con una etapa de desnaturalización de un minuto a 94 °C, una etapa de hibridación de 30 segundos a 50 °C y una etapa de elongación de 2 minutos y 15 segundos a 72 °C. Finalmente, se llevó a cabo una etapa de elongación de 10 minutos a 72 °C. Los productos obtenidos se mantuvieron a -20 °C hasta su utilización.

Estas reacciones con cada muestra de ADN genómico se repitieron al menos 4 veces para obtener cantidades suficientes para la posterior secuenciación. Las amplificaciones obtenidas para cada muestra con cada par de oligonucleótidos se mezclaron y precipitaron con etanol y finalmente se resuspendieron en una cantidad de agua suficiente para obtener concentraciones de aproximadamente 100 ng/µl.

### 3.40.3. Secuenciación de las muestras de amplificación y análisis de mutaciones:

Los fragmentos A y B generados, para cada muestra de ADN original, se secuenciaron con los cebadores correspondientes indicados en la tabla 3.2 por el servicio de secuenciación MacroGen Corea. Las muestras y los cebadores

correspondientes se enviaron al servicio cumpliendo con las especificaciones indicadas por el mismo.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la utilización del programa informático MegAling<sup>TM</sup> (Lasergene). Adicionalmente, en muchos de los casos, fue necesaria la inspección detallada de los cromatogramas enviados por el servicio de secuenciación.

Con los datos obtenidos se generaron las distintas tablas de contingencias que se analizaron estadísticamente mediante la prueba exacta de Fisher.

### **3.41. Ensayos estadísticos:**

Todos los ensayos estadísticos realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo mediante la utilización del software Statgraphics<sup>TM</sup> (StatPoint Technologies). En todos los casos se corroboró el cumplimiento de todos los supuestos requeridos por los ensayos aplicados. Los mismos se efectuaron utilizando un nivel de significación del 5 %, a menos que se indique lo contrario.



*RESULTADOS*

*Y*

*DISCUSIÓN*

## **4. Purificación a homogeneidad y estudios inmunológicos de la proteína AtMSH2.**

#### **4. PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD Y ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS DE LA PROTEÍNA ATMSH2:**

##### **4.1. Introducción:**

El sistema MMR comienza con el reconocimiento de apareamientos incorrectos o bases desapareadas mediante complejos proteicos diméricos. Este primer paso, en eucariotas, es llevado a cabo por heterodímeros denominados MutS $\alpha$ , MutS $\beta$  y, en el caso particular de plantas, MutS $\gamma$ . Los mismos están formados por una subunidad común denominada MSH2 y una segunda subunidad correspondiente a MSH6, MSH3 o MSH7, respectivamente. Estos últimos componentes, son finalmente los responsables de la especificidad de reconocimiento de lesiones de los distintos complejos (Acharya y col., 1996; Marsischky y col., 1996; Culligan y Hays, 2000; Iyer y col., 2006). Ante este escenario, resulta evidente el rol fundamental de la subunidad MSH2 en la funcionalidad del MMR. La pérdida de esta función lleva indefectiblemente a la anulación total del sistema. Este hecho es notable en distintos organismos estudiados, desde bacterias a humanos y se evidencia en un marcado aumento de las tasas de mutaciones, principalmente inestabilidad de secuencias repetitivas (Sia y col., 1997; Drotschmann y col., 1999; Adé y col., 2001; Leonard y col., 2003). Adicionalmente, en humanos, la deficiencia en este gen se encuentra directamente relacionada a la generación de distintos tipos de cáncer (Vasen y col., 2001; Ollila y col., 2008).

Debido a los datos expuestos, resulta de especial interés la caracterización de esta subunidad y su evaluación en sistemas biológicos a modo de reportero de la actividad del sistema MMR. En el presente capítulo se abordará principalmente el estudio de la subunidad MSH2 en la planta modelo *A. thaliana* como parte de uno de los objetivos generales planteados al inicio del presente trabajo, el cual consiste en la caracterización bioquímica y funcional del complejo AtMutS $\gamma$ .

##### **4.2. Obtención de AtMSH2 de forma recombinante:**

En el laboratorio se contaba con la secuencia codificante de AtMSH2 clonada en un vector de expresión de *Escherichia coli* de la serie pET32-b (Gomez, 2007). Este plásmido permite la expresión en forma recombinante en *E. coli* de AtMSH2. La proteína expresada contiene un péptido fusión amino terminal que incluye una secuencia de hexa-histidina, permitiendo la purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel, y 109 aminoácidos correspondientes a la proteína tiorredoxina, que

aumenta la solubilidad del producto proteico generado. El péptido fusión puede eliminarse mediante tratamiento con la proteasa enteroquinasa, liberándose el polipéptido correspondiente a AtMSH2 con sólo un aminoácido adicional en el extremo amino terminal. En el trabajo de tesina citado anteriormente se sobreexpresó la proteína recombinante en la cepa de *E. coli* JM109(DE3) pRIL. En principio la proteína recombinante se purificó parcialmente y se eliminó la fusión amino terminal con enteroquinasa. La proteína obtenida se utilizó para la generación de anticuerpos policlonales en conejos y la posterior purificación de los mismos.

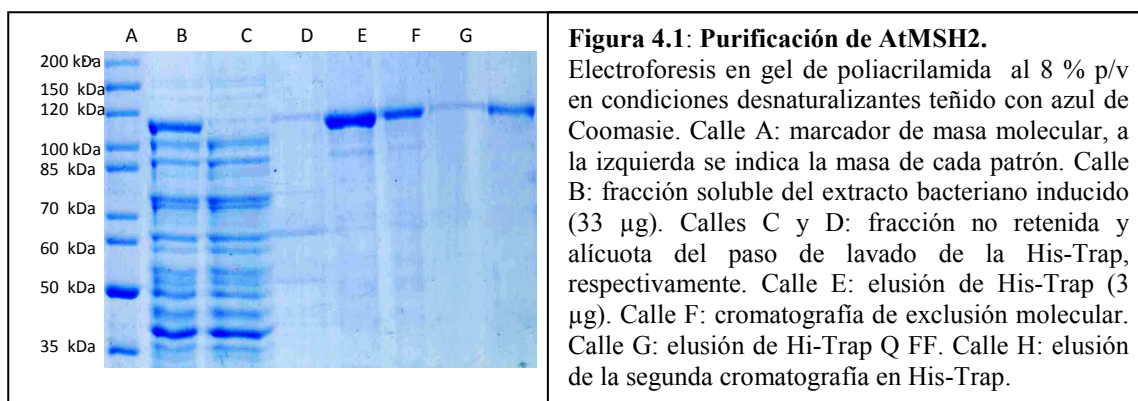
#### **4.2.1. Purificación de AtMSH2 a homogeneidad:**

En el presente trabajo se optimizó la purificación de la proteína AtMSH2 recombinante, a partir del plásmido pET32b::AtMSH2 en la cepa de *E. coli* JM109(DE3) pRIL. En la sección Materiales y Métodos se describen los procedimientos utilizados en la purificación. La misma constó de cuatro etapas. En primer lugar, se llevó a cabo una cromatografía de afinidad a níquel. Este paso aprovecha la presencia de una secuencia de hexa-histidinas en la fusión aminoterminal de la proteína recombinante obtenida de la expresión en bacterias. Las alícuotas conteniendo la proteína de interés eluidas de la columna citada previamente se juntaron y se sometieron a continuación a cromatografía de exclusión molecular con una resina de Sephadex G-50 (Sigma). Este procedimiento se llevó a cabo para ajustar las condiciones de salinidad y pH de la solución, necesarias para el siguiente paso. El producto de interés obtenido se sometió luego a cromatografía de intercambio aniónico en una columna comercial Hi-Trap Q FF (GE HealthCare). De esta forma, se obtuvo la proteína de interés en alta pureza pero en baja concentración. Ante tal resultado, se utilizó un paso de concentración final mediante una nueva cromatografía de afinidad a níquel similar a la inicial. En este caso, el producto eluido de la columna presenta la proteína pura y concentrada.

Como resultado de este procedimiento de purificación se obtienen 14 mg de proteína de fusión AtMSH2 por litro de cultivo bacteriano con una pureza de 99% (estimada por densitometría). En la tabla 4.1 se resumen los pasos de purificación, y en la figura 4.1 se observan alícuotas de varias fracciones analizadas por SDS-PAGE.

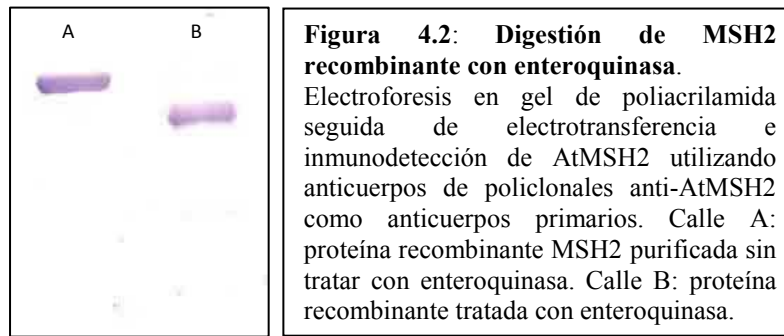
Tabla 4.1. Purificación de AtMSH2.

Paso	Volumen total (ml)	Concentración proteica (mg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento	Purificación
Extracto crudo	20,00	0,90	18,00	100,00	1,00
His Trap	4,00	0,60	2,40	90,95	6,82
Hi Q FF	9,00	0,14	1,22	51,64	7,65
His Trap (concentración)	1,50	0,55	0,83	35,42	7,73



#### 4.2.2. Digestión de AtMSH2 recombinante con enteroquinasa:

El fragmento de fusión N-terminal codificado por el vector se eliminó de la proteína expresada mediante el tratamiento con la proteasa enteroquinasa. Esta enzima reconoce un sitio específico delante del inicio de la secuencia aminoacídica correspondiente a AtMSH2 dejando solo un aminoácido amino terminal no correspondiente a la proteína madura. Se ensayaron diversas condiciones de tratamiento considerando diversas relaciones de proteína recombinante : enteroquinasa, temperatura y tiempos de digestión. Finalmente, se establecieron las condiciones óptimas para la escisión como se detalla en Materiales y Métodos. En la figura 4.2 se observa un ensayo de electroforesis en poliacrilamida seguida de electrotransferencia e inmunodetección de AtMSH2, evidenciándose la obtención de un producto totalmente digerido. Esta proteína podría resultar útil para realizar ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes que permita elucidar en mayor detalle el sistema MMR en Arabidopsis. Sin embargo, no se cuenta aún con las otras subunidades expresadas y purificadas al mismo nivel como para llevarlos a cabo.



### 4.3. Análisis de la abundancia y localización de la proteína AtMSH2 en tejidos vegetales. Cuantificación de los niveles de transcripción del gen *MSH2*:

Con el objetivo de evidenciar la proteína MSH2 en tejidos vegetales y realizar una evaluación de los niveles de la misma en distintos tejidos o en condiciones de crecimiento particulares se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-MSH2 en diversos experimentos.

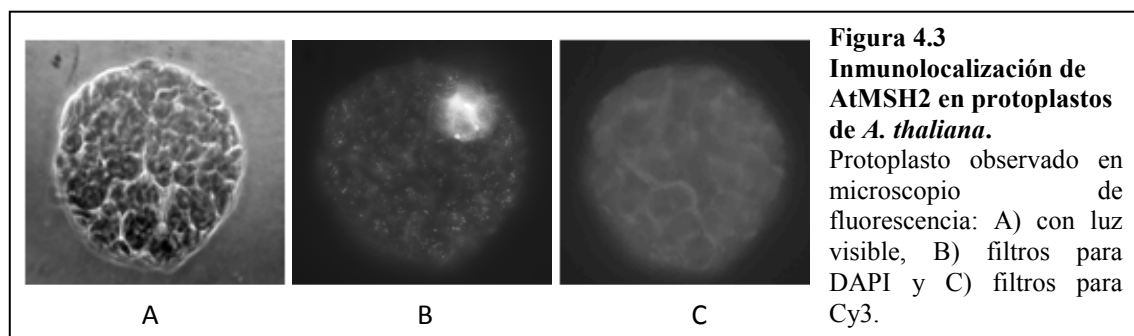
En primer lugar, se realizaron diversos ensayos de inmunodetección de AtMSH2 utilizando extractos proteicos de plántulas de *Arabidopsis* enteras de menos de dos semanas de crecimiento, así como hojas, flores y silicuas de plantas adultas, de alrededor de cuatro a cinco semanas de crecimiento. En ninguno de los casos se evidenció la proteína de interés. Ante este resultado no satisfactorio se decidió realizar extracción de núcleos y analizar los extractos proteicos nucleares con el fin de concentrar las proteínas del sistema MMR, las cuales tienen una muy baja abundancia en las células. A su vez, se utilizó un sistema de revelado por quimioluminiscencia para los ensayos de inmunodetección, el cual es mucho más sensible que el revelado colorimétrico utilizando inicialmente. Sin embargo, tampoco se obtuvieron en estos casos resultados positivos.

Paralelamente, se intentó establecer la localización subcelular de AtMSH2 mediante inmunolocalización en protoplastos de hojas de *A. thaliana* de tres semanas de crecimiento. Para la realización de estas experiencias se utilizaron los anticuerpos anti-MSH2 generados en conejos y anticuerpos secundarios marcados con el fluoróforo Cy3. Este compuesto pertenece al grupo de los fluoróforos de cianina que al excitarse con luz de longitud de onda de aproximadamente 550 nm emite fluorescencia, con un pico de emisión a los 570 nm, visible bajo microscopio de fluorescencia.

En primer lugar, se generaron protoplastos de buena calidad a partir de tejido foliar de plantas, de tres a cuatro semanas de edad, crecidas en tierra en invernadero

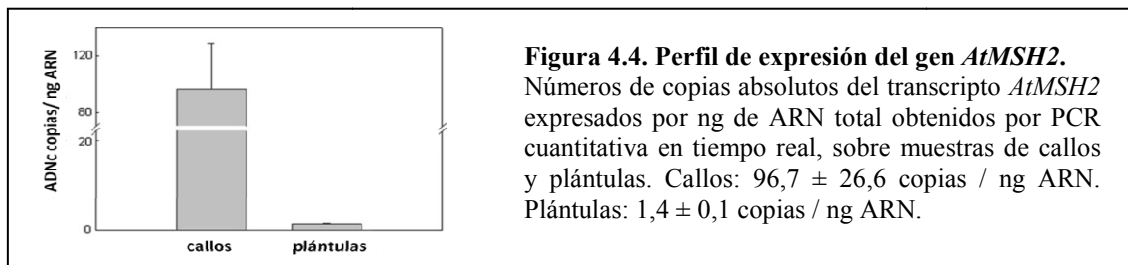
(protocolo adaptado de Sheen, 2002). A continuación, se optimizaron las condiciones de fijación de los protoplastos, adhesión a portaobjetos, permeabilización, bloqueo e incubaciones con anticuerpos primarios y secundarios como se detalla en Materiales y Métodos. Adicionalmente, los preparados se tiñeron con el fluoróforo 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Este compuesto al excitarse con luz de una longitud de onda cercana al pico de absorción, 358 nm, emite luz en la región azul, con un pico de emisión a 461 nm. El DAPI tiene la capacidad de asociarse fuertemente al ADN doble hebra en regiones ricas en AT a través del surco menor. Esta asociación produce un aumento de la fluorescencia de alrededor de 20 veces, por lo que resulta de gran utilidad en microscopía de fluorescencia para evidenciar zonas de alta concentración de ADN, especialmente núcleos.

En todos los ensayos realizados se obtuvieron imágenes favorables de los núcleos teñidos con DAPI, pero no se observaron regiones de fluorescencia roja del Cy3 consistentes con la localización de la proteína de interés. En la figura 4.3 puede observarse, a modo de ejemplo, la imagen de un protoplasto obtenida con un microscopio de fluorescencia en luz visible (4.3-A) y con filtros de excitación y emisión para el fluoróforo DAPI (4.3-B) y para Cy3 (4.3-C). En la sección superior derecha de la figura 4.3-B puede apreciarse claramente la fluorescencia correspondiente al núcleo, evidenciado por la tinción con DAPI. Sin embargo, no se obtuvieron resultados apreciables al utilizar los filtros para observar fluorescencia del fluoróforo Cy3, la cual revelaría indirectamente la localización de AtMSH2 dentro de la organela.



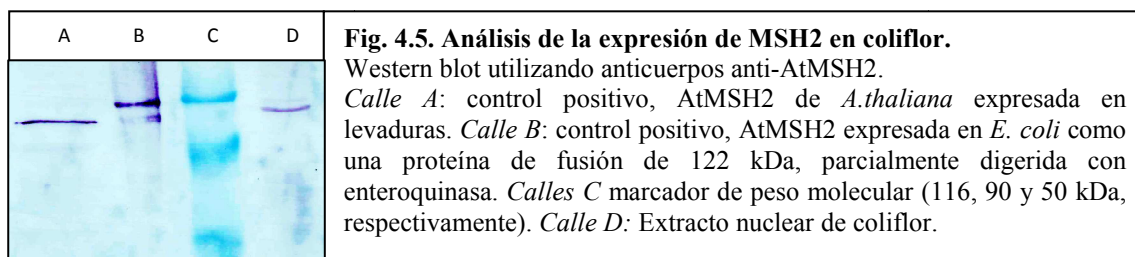
Pese a los numerosos esfuerzos realizados no se logró evidenciar la proteína en ninguno de estos inmunoensayos, lo cual podría deberse a su baja abundancia. Existen datos de experiencias de microarreglos registradas en la página TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), que indican baja expresión de los transcritos correspondientes a las proteínas del sistema.

Ante tales observaciones se evaluaron los niveles de transcripción de *MSH2* mediante análisis por PCR en tiempo real en callos y plántulas salvajes de *A. thaliana*. (Gómez y col., 2011). Se cuantificó el número de copia inicial del transcripto de AtMSH2 en dichas muestras utilizando una curva estándar generada con el plásmido pET32b-MSH2 como molde. Basados en la masa molecular del plásmido, la cantidad de molde utilizado en cada reacción se mantuvo en el rango de  $2,49 \times 10^{-10}$  y  $2,49 \times 10^{-5}$  pmol (correspondientes a  $126 - 1,26 \times 10^7$  copias respectivamente). Como se observa en la figura 4.4, la expresión de MSH2 en callos superó más de 70 veces la expresión del transcripto en plántulas, alcanzando los valores de 96,7 y 1,4 copias por ng de ARN, respectivamente.



#### 4.4. Inmunodetección de AtMSH2 en extractos proteicos de núcleos de coliflor:

Se llevó a cabo la extracción proteica de núcleos de inflorescencias de coliflor que luego se sometieron a ensayos de inmunodetección utilizando los anticuerpos policlonales anti-AtMSH2.



Distintas fracciones de los extractos proteicos nucleares se sometieron a electroforesis desnaturizante, seguida de electrotransferencia e inmunodetección. Mediante estos ensayos pudo confirmarse la presencia de un banda inmunoreactiva de aproximadamente 110 kDa, como se observa en la figura 4.5 (calle D). Cabe destacarse que, al realizar este tipo de ensayos con extractos proteicos totales de inflorescencia de coliflor, no se logró evidenciar una banda inmunoreactiva correspondiente a MSH2 (resultados no mostrados). Estos ensayos indican la existencia de una proteína MSH2



putativa en coliflor, que se evidencia sólo en extractos nucleares, de masa molecular semejante a las MSH2 eucariotas conocidas, en el intervalo de 105 a 110 kDa.

## 4.5. Discusión.

### 4.5.1 Purificación de AtMSH2 a homogeneidad:

Se llevó a cabo la purificación a homogeneidad electroforética de la subunidad AtMSH2 expresada de forma recombinante en *E. coli* a partir del vector pET32b::AtMSH2. Esta construcción permite la expresión de la proteína de interés fusionada a un péptido amino terminal codificado por el vector. El péptido resulta útil para la purificación y estabilización de la proteína y contiene un sitio de reconocimiento para su eliminación mediante tratamiento proteolítico. Mediante la metodología aplicada, consistente en cromatografías de afinidad a iones de níquel quelados y cromatografía de intercambio aniónico, se obtuvo un rendimiento de 14 mg de proteína recombinante por litro de cultivo bacteriano, con una pureza del 99 %. Esta proteína de fusión purificada, a continuación, se trató con la proteasa enteroquinasa para liberar el fragmento correspondiente a AtMSH2, con un único aminoácido adicional en el extremo amino terminal. De esta forma, se optimizó un proceso metodológico que permite la obtención de grandes cantidades de la proteína AtMSH2 pura, conteniendo sólo un aminoácido adicional hacia su extremo amino terminal. La misma podría resultar importante para la realización de estudios *in vitro* con esta subunidad y otros componentes del MMR expresados de formas similares.

Sin embargo, debe destacarse que el sistema bacteriano utilizado presenta grandes impedimentos metodológicos para la expresión de este tipo de proteínas. En primer lugar, estos impedimentos se deben al gran tamaño de los péptidos que deben biosintetizarse. La maquinaria de biosíntesis proteica de *E. coli* no está preparada para la síntesis de forma eficiente de proteínas de más de 90 kDa, siendo todos los componentes de los heterodímeros de MutS de plantas mayores que ese valor límite. Adicionalmente, los mecanismos de plegamiento bacterianos podrían no ser adecuados para las grandes proteínas de *A. thaliana*, generándose productos proteicos no solubles que se acumulan como cuerpos de inclusión en la célula huésped (Baneyx, 1999)

Este conjunto de factores alentó los ensayos realizados a continuación en el organismo *S. cerevisiae*, que permite la expresión de proteínas eucariotas con mejor eficiencia que los sistemas bacterianos, manteniendo las ventajas prácticas del trabajo con microorganismos.

#### **4.5.2. Análisis de la abundancia y localización de la proteína AtMSH2 en tejidos vegetales. Cuantificación de los niveles de transcripción del gen *MSH2*:**

Se llevaron a cabo distintos inmunoensayos con anticuerpos policlonales anti-MSH2 (Gomez y col., 2011), con el objetivo de evidenciar la proteína AtMSH2 en tejidos vegetales y establecer posibles diferencias en sus niveles asociados a variaciones atribuibles a estados de desarrollo o condiciones de crecimiento particulares. En ninguno de los casos analizados se logró evidenciar la presencia de la proteína de interés a pesar de utilizar metodologías de detección de alta sensibilidad.

Paralelamente, se intentó establecer la localización subcelular de la proteína a modo de confirmar su presencia en núcleo y evidenciar posibles translocaciones entre esta organela y citoplasma, las cuales podrían resultar en algún tipo de regulación de la actividad del MMR. Este tipo de regulación por translocación subcelular ha sido reportada en trabajos previos realizados sobre células humanas y levaduras, proponiéndose como un importante mecanismo de regulación de la funcionalidad del MMR (Christmann y Kaina, 2000; Christmann y col., 2002; Brieger y col., 2005; Hayes y col., 2009; Grassman y col., 2011). Estos ensayos se llevaron a cabo mediante inmunolocalización en protoplastos de hojas de *A. thaliana* de 14 días de crecimiento. En los mismos fue posible evidenciar perfectamente los núcleos celulares pero resultó imposible la detección de imágenes consistentes con la presencia de AtMSH2.

Esta serie de resultados en su conjunto indujeron a suponer una muy baja presencia de la proteína en los tejidos analizados. Este hecho se constató indirectamente mediante análisis de ARN mensajero en distintos tejidos, así como con datos obtenidos de la literatura existente. En estudios previos realizados en *A. thaliana* y maíz mediante Northern Blot, se reportó una muy baja abundancia de los transcritos del sistema MMR (Ade y col., 1999; Horwath y col., 2002).

Bajo la hipótesis de una presencia extremadamente baja de la proteína de interés, AtMSH2, se llevaron a cabo estudios sobre los niveles de expresión del transcritos de ARN mensajero correspondiente. Se cuantificó la abundancia absoluta del transcritos AtMSH2 mediante PCR cuantitativa en tiempo real sobre dos tipos de muestras. La primera de ellas corresponde a plántulas de dos semanas crecidas en condiciones normales en invernadero. En este caso, se observó una abundancia muy baja del transcritos cuantificado en relación al total de ARN presente, obteniéndose 1,4 copias de transcritos por ng de ARN total. Adicionalmente, se cuantificó por el mismo método el número de copias de transcritos de AtMSH2 en callos de *A. thaliana* mantenidos *in*

*vitro*. En estas muestras el número de copia promedio por ng de ARN total para el transcripto de interés fue de 96,6 copias, resultando aproximadamente 70 veces superior al hallado en plántulas. Estos datos indicarían que la transcripción del gen *AtMSH2* es fuertemente requerida para asegurar la estabilidad genómica en callos, donde tiene lugar una alta división celular, observándose en algunos casos eventos de endoreplicación (Larkins y col. 2001; Fras y col., 2007) y variación somaclonal (Polanco y Ruiz, 2002; Fras y Maluszynska, 2005). Adicionalmente, los niveles de ARN mensajero de *MSH2* son claramente menores en plántulas donde la replicación del ADN prácticamente ha cesado. Estos datos se compararon con valores de intensidad de señal obtenidos de experimentos de microarreglos de ARN agrupados en la base de datos Geninvestigator (Zimmermann y col., 2004), corroborándose mayores niveles de transcriptos en callos que en plántulas. Por lo tanto, los resultados experimentales obtenidos por PCR en tiempo real y los datos obtenidos de Geninvestigator evidencian un marcado aumento en la expresión del gen *AtMSH2* en tejidos de rápida división celular. Esta conclusión es consistente con informes previos que indican un mayor nivel de actividad MSH2 en células en división activa de *A. thaliana* (Ade y col., 1999), *Zea mays* (Horwath y col., 2002) y *Solanum lycopersicum* (Tam y col., 2009), comparadas con células de tejido maduro.

Finalmente, estos resultados resultan consistentes con la hipótesis que propone una muy baja expresión del gen y abundancia a nivel proteico, con la consiguiente imposibilidad de evidenciarse con los métodos utilizados en el presente trabajo.

#### **4.5.3. Inmunodetección de *AtMSH2* en núcleos de coliflor:**

Ante los resultados poco satisfactorios obtenidos utilizando *A. thaliana*, se decidió utilizar los anticuerpos para intentar detectar proteínas homólogas a MSH2 en coliflor (*Brassica oleracea*). Esta especie proporciona una gran fuente de proteínas de tejido meristemático y está relacionada filogenéticamente con *A. thaliana*. De esta manera, se evidenció una MSH2 putativa en extractos nucleares de inflorescencia de coliflor, con una masa molecular semejante a las MSH2 eucariotas. La misma no logró detectarse en extractos totales de inflorescencias, denotando la baja abundancia de la proteína en las células. En muestras conteniendo la totalidad de las proteínas celulares la proteína de interés se encontraría sub-representada y no permitiría su detección mediante los métodos utilizados. Sin embargo, al concentrar las proteínas nucleares, aumenta su abundancia relativa y permitió su detección.

Este resultado abre nuevas perspectivas para la utilización de los anticuerpos generados contra la subunidad AtMSH2 en otras especies vegetales en busca de homólogos de AtMSH2. De esta forma, podrá evidenciarse cierto grado de conservación del sistema MMR a nivel proteico aún en especies que no poseen su genoma completamente secuenciado.

**5. Estudio de la funcionalidad del sistema MMR durante el daño oxidativo generado por estrés abiótico**

## **5. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL SISTEMA MMR DURANTE EL DAÑO OXIDATIVO GENERADO POR ESTRÉS ABIÓTICO:**

### **5.1. Introducción:**

El sistema MMR se encuentra involucrado principalmente en la reparación de lesiones provenientes de la replicación del ADN, tanto en organismos eucariotas como procariotas. Sin embargo, existen evidencias que indican su participación, al menos en forma parcial, en la reparación de bases oxidadas en el ADN, entre los que se encuentra la reparación de 8-oxoG (Slupphaug y col., 2003). Esta lesión, producto del ataque oxidativo a nucleótidos conteniendo la base guanina, es una de las principales lesiones oxidativas en el ADN y la principal responsable de las transversiones del tipo GC → AT (Kamiya, 2003). En *E. coli* y mamíferos se ha informado que el sistema MMR actúa en la reparación de lesiones oxidativas, principalmente 8-oxoG, de forma alternativa al BER (DeWeese y col., 1998; Minowa y col., 2000; Colussi y col., 2002; Wyrkowski y Volkert, 2003). Adicionalmente, en levaduras, el sistema MMR reemplaza la actividad de la glicosilasa MYH, ausente en este organismo, mediante el reconocimiento y reparación de las lesiones del tipo 8-oxoG:A (Ni y col., 1999; Earley y Crouse, 1998).

Sin embargo, no se han descrito este tipo de interacciones entre el MMR y la reparación de daño oxidativo en plantas. Por lo tanto, uno de los objetivos planteados en la presente tesis fue avanzar en el conocimiento de la posible relación entre el sistema MMR con la reparación de bases oxidadas en el ADN de plantas. Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron diversos estudios en *A. thaliana* salvajes y mutantes en el MMR, en condiciones normales de crecimiento y condiciones que generen de forma directa o indirecta estrés oxidativo, con el consecuente aumento del daño al ADN.

### **5.2. Tratamientos para producción de estrés oxidativo en *A. thaliana*:**

En el presente trabajo se evaluó el estrés oxidativo generado por tratamiento con el herbicida metilviológeno y el estrés salino producido por crecimiento de plantas en sustratos con distintas concentraciones de NaCl. Este último, produce de forma secundaria un aumento en las especies reactivas del oxígeno y concomitantemente, estrés oxidativo (Bartels y Sunkar 2005).

### 5.2.1. Tratamientos con metilviológeno:

El metilviológeno (MV) o paraquat, es un herbicida del grupo de los denominados “redox cíclicos”. Este compuesto, en presencia de irradiación lumínica moderada, puede aceptar electrones de la cadena de transporte tilacoidal de cloroplastos, principalmente del fotosistema I (Nelson y Ben Shem, 2004). Una vez reducido, puede ceder un electrón al O<sub>2</sub> para formar radical superóxido y regenerar la molécula de MV. El superóxido a continuación, sufre una dismutación generando peróxido de hidrógeno, que finalmente, en presencia de catión Fe<sup>+2</sup> genera el radical hidroxilo, altamente tóxico. Este último compuesto es el principal causante de lesiones en plantas tratadas con el herbicida (Babbs y col., 1989). La alta velocidad y eficiencia de la transferencia de electrones del fotosistema I al MV hacen que su toxicidad sea mucho más elevada en la luz que en la oscuridad. Paralelamente, el MV puede ser tóxico para tejidos no fotosintéticos, ya que puede ser reducido por diversas deshidrogenasas que presentan actividad diaforasa y aceptar en menor medida electrones de la cadena de transporte mitocondrial.

### 5.2.2. Tratamientos con NaCl:

El estrés salino puede afectar diversos procesos fisiológicos, desde la germinación de semillas hasta el desarrollo de las plantas (Attia y col., 2008). La fotosíntesis, uno de los mecanismos metabólicos claves en las plantas, se ve afectado por el estrés salino. En este tipo de estrés, el ácido abscísico produce como respuesta una disminución de la turgencia de las células de la guarda y limita el CO<sub>2</sub> disponible para la fotosíntesis (Leung y col., 1994). Más aún, durante estas situaciones la reducción del volumen estromático de los cloroplastos y la generación de EROs juegan también un importante papel en la inhibición de la fotosíntesis (Prince y Hendry, 1991). Las EROs pueden generarse en los cloroplastos mediante la transferencia directa de la energía de excitación de las clorofilas para producir oxígeno singlete, o mediante la reducción del oxígeno molecular en el fotosistema I (Foyer y col., 1994; Allen, 1995).

Debido a estas observaciones se utilizaron tratamientos que generan estrés salino con el objetivo de incrementar indirectamente los niveles de EROs intracelulares y evaluar la respuesta del sistema MMR frente al ataque de los mismos al ADN. Se establecieron distintos tratamientos con NaCl para generar este tipo de estrés, como se comenta en las secciones correspondientes.



### **5.3. Evaluación del daño oxidativo en las plantas tratadas:**

#### **5.3.1. Observación visual de clorosis en las hojas:**

En tratamientos intensos las plantas pueden desarrollar clorosis visible en sus hojas indicando un amplio grado de daño por el estrés impuesto. Estas lesiones se hacen evidentes luego de un tiempo (horas a días) de aplicadas las condiciones de estrés y su extensión es dependiente de la intensidad y duración de las mismas.

Este tipo de observaciones permitió en un principio optimizar las condiciones a utilizar con la finalidad planteada previamente. A continuación, los tratamientos se ajustaron siguiendo parámetros más específicos e informativos, principalmente, mediante el ensayo de liberación de electrolitos comentado a continuación.

#### **5.3.2. Medidas de liberación de electrolitos:**

Estos ensayos permiten de manera indirecta evaluar el daño producido por el estrés oxidativo sobre las membranas plasmáticas (Zhao y col., 2007). Plántulas y hojas sometidas a las condiciones de estrés indicadas se incubaron en agua destilada, previo lavado extensivo, durante 2 a 4 horas y se midió la conductividad eléctrica de las soluciones finalizado el tiempo correspondiente. Finalmente, las muestras se autoclavaron y se midió nuevamente la conductividad de las soluciones, valor que corresponde al 100 % de los electrolitos presentes en las muestras biológicas. El porcentaje de liberación de electrolitos para cada muestra se calculó como el cociente de la conductividad al tiempo indicado sobre la conductividad total multiplicado por 100. Estos datos se graficaron y compararon estadísticamente mediante pruebas de ANOVA para establecer diferencias entre los grupos tratados y control. Paralelamente, este método se utilizó para estimar el grado de daño en cada situación de estrés.

#### **5.3.3. Medida de la longitud de las raíces:**

Se efectuaron determinaciones de longitud de raíces de plantas crecidas *in vitro* sometidas a estrés, con el objetivo de evidenciar el efecto de los tratamientos realizados sobre el crecimiento de las mismas. Adicionalmente, se utilizaron para comparar posibles diferencias en la respuesta al tratamiento de *A. thaliana* salvajes y mutantes con pérdida de función en *MSH2*. Las comparaciones se realizaron utilizando ensayos de ANOVA o prueba t-Student, según fuese necesario.

#### 5.4. Evaluación de cambios transcripcionales en los genes del MMR de plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés oxidativo:

Se evaluaron cambios en los niveles de transcripción de algunos de los genes más importantes del sistema MMR en plantas sometidas a estrés mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello, se utilizaron cuatro pares de cebadores de ADN que permiten la cuantificación de los transcritos de *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* y *MLH1*. Cabe recordar que los productos proteicos de los dos primeros genes considerados forman el heterodímero MutS $\alpha$ , mientras los dos siguientes forman el complejo heterodimérico MutL $\alpha$ . Ambos complejos son los principales participantes del sistema MMR en plantas. El transcrito de interés *MSH7* no pudo ser determinado por inconvenientes técnicos durante los ensayos, como se comenta en la sección de discusión. Cada determinación, se llevó a cabo utilizando como mínimo triplicados biológicos para cada condición, expresándose finalmente como el promedio para cada gen  $\pm$  el error estándar.

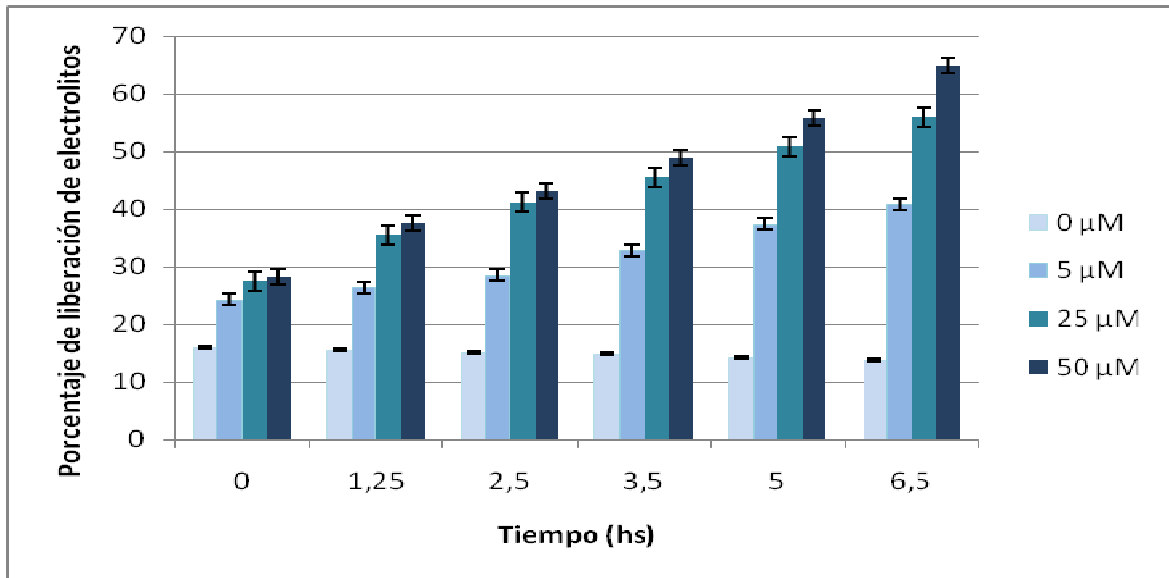
##### 5.4.1. Tratamiento con MV:

En primer lugar, se optimizó el tratamiento con el compuesto redox metilviológico para determinar las condiciones a utilizar en los experimentos de PCR cuantitativa. En la figura 5.1 puede observarse un ensayo llevado a cabo con plántulas de *A. thaliana* ecotipo Col-0, crecidas en medio MS-0 durante 2 semanas y, a continuación, sometidas a tratamiento con MV en distintas concentraciones. En este ensayo se utilizaron 6 plántulas para cada concentración de MV a ensayar: 0  $\mu$ M (control sin tratamiento), 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, en una solución 0,01 % v/v de Tritón X-100. Las plántulas se mantuvieron sumergidas en 1 ml de la solución correspondiente y se midió la conductividad de las mismas a diversos tiempos dentro del rango de 6,5 hs.

En la figura 5.1, se evidencia el aumento en la liberación de electrolitos, siendo éste directamente proporcional al tiempo de tratamiento y a la concentración de MV utilizada. A partir de este primer ensayo se decidió utilizar soluciones de MV 5  $\mu$ M en un tratamiento con luz normal durante 5 horas, de forma de no producir daño excesivo en los tejidos tratados.

Se analizó la expresión de los principales genes del sistema MMR bajo tratamiento con MV. Para ello, se utilizó un tratamiento corto de forma de observar cambios medianamente rápidos en la expresión de los citados genes como respuesta al estrés oxidativo. Plántulas crecidas en condiciones normales durante 2 semanas en

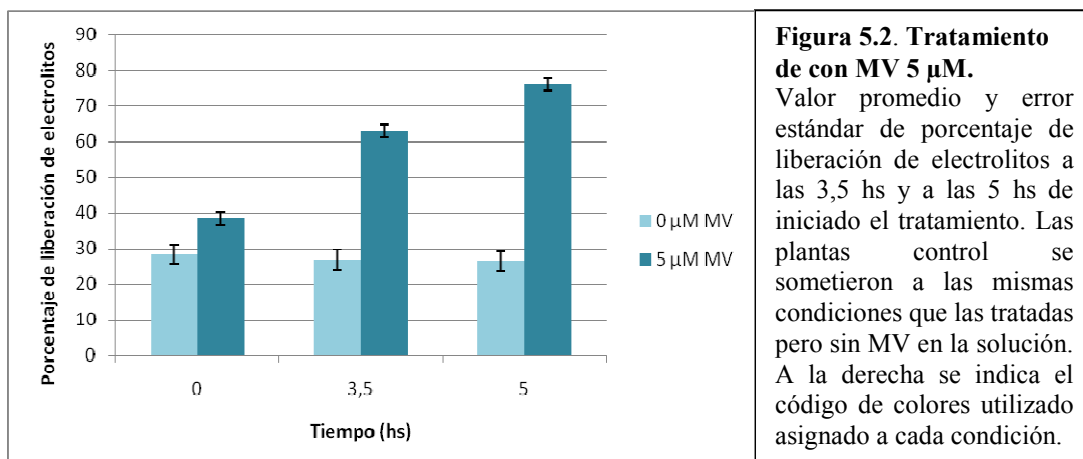
placas de MS-0, se lavaron extensivamente con agua destilada y se transfirieron a soluciones de Tritón X-100 al 0,01 % v/v en ausencia (control) o presencia de 5  $\mu\text{M}$  de MV. Las muestras se incubaron en luz durante 5 hs a 23 °C. El daño oxidativo se determinó a 3 y 5 hs de iniciado el tratamiento sobre algunas muestras tomadas al azar mediante ensayos de liberación de electrolitos.



**Figura 5.1. Porcentaje de liberación de electrolitos en función del tiempo de plantas salvajes tratadas con distintas concentraciones de MV.**

En el gráfico se observan los promedio y error estándar de liberación de electrolitos a los distintos tiempos, para los tratamientos con metilviológeno en las concentraciones indicadas por el código de colores a la derecha.

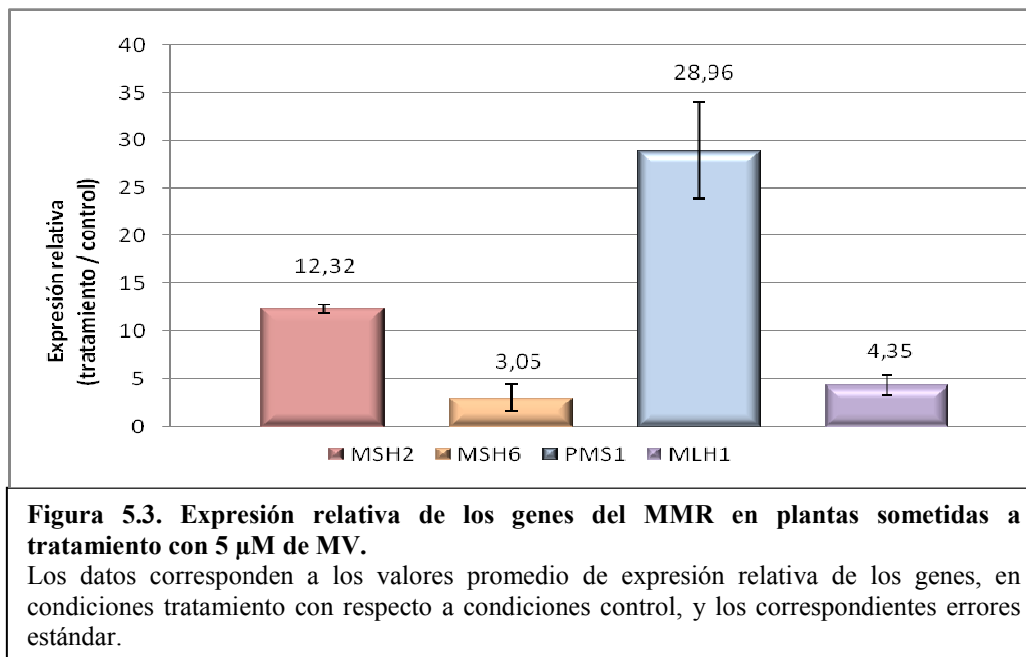
En la figura 5.2 puede observarse fácilmente que las muestras control presentan una variación casi nula, consistente con la ausencia de daño a las membranas. Sin embargo, es evidente el aumento de la liberación de electrolitos en las muestras conteniendo metilviológeno 5  $\mu\text{M}$ , el cual resulta proporcional a la extensión temporal del tratamiento, como fue determinado en experimentos previos.



**Figura 5.2. Tratamiento de con MV 5  $\mu\text{M}$ .**

Valor promedio y error estándar de porcentaje de liberación de electrolitos a las 3,5 hs y a las 5 hs de iniciado el tratamiento. Las plantas control se sometieron a las mismas condiciones que las tratadas pero sin MV en la solución. A la derecha se indica el código de colores utilizado asignado a cada condición.

Muestras obtenidas en paralelo a las utilizadas para la verificación del daño se utilizaron para la posterior extracción de ARN, seguida de retrotranscripción y ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real. Los datos de expresión obtenidos de estos ensayos se muestran en la figura 5.3. Puede observarse que todos los genes del MMR ensayados aumentan su expresión al recibir el tratamiento oxidativo detallado previamente. En el caso de *MSH2* se observa un aumento de  $12,32 \pm 0,49$  veces, sin embargo, el gen *MSH6* sufre un incremento en su expresión de sólo  $3,05 \pm 1,35$  veces. Paralelamente, se evidencia un incremento marcado de *PMS1* de  $28,96 \pm 5,05$  veces, mientras que *MLH1* revela un incremento de  $4,35 \pm 1,07$  veces al recibir tratamiento oxidativo.

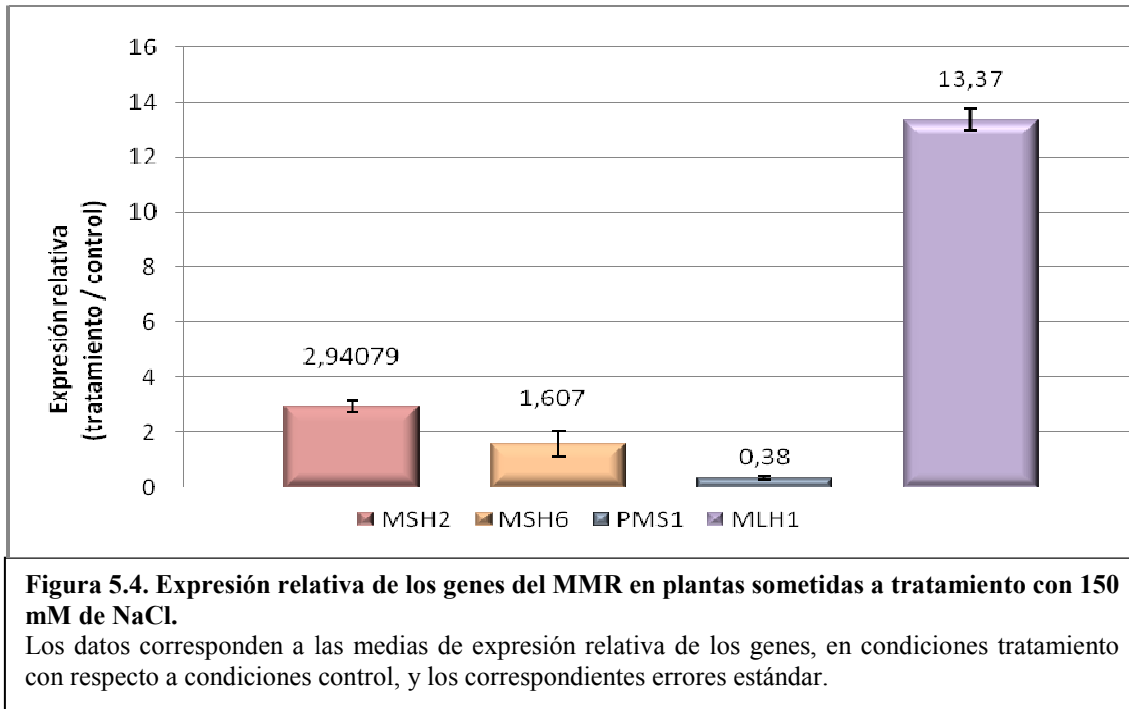


#### 5.4.2. Tratamiento con NaCl:

Se evaluaron cambios transcripcionales en los principales genes del MMR en condiciones que producen estrés salino. Para ello se crecieron durante 10 días plantas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo MS-0. A continuación, se transfirieron a placas conteniendo MS-0 suplementado con 150 mM NaCl y se dejaron crecer en cámara de cultivo durante tres días adicionales. Finalizado este período se tomaron muestras a las que se les extrajo ARN para su posterior retrotranscripción y análisis mediante PCR en tiempo real. Previamente, se ensayaron distintos tiempos de incubación en medio de alto contenido salino y se observó que a partir del 4º día de tratamiento las plantas presentaban lesiones cloróticas, que se hacían extensivas durante los días siguientes generando finalmente la muerte de las plantas hacia el sexto día. Debido a estas observaciones se decidió tomar las muestras para la evaluación de

cambios transcripcionales dos días antes de la aparición de las citadas lesiones. Con ello se intentó evaluar el estado transcripcional de los genes del MMR en una situación de estrés que aún permita la vida de las células.

En la figura 5.4 se detallan los resultados de expresión relativa de los genes del MMR obtenidos con estas muestras, utilizando el gen *TUB2* como control. Previamente se confirmó que este gen no altera sus tasas de transcripción debido a los tratamientos utilizados (resultados no mostrados).



Los genes *MSH2* y *MSH6* presentaron aumentos moderados de su expresión relativa ( $2,49 \pm 0,19$  y  $1,61 \pm 0,44$ , respectivamente). Sin embargo, los genes *PMS1* y *MLH1* presentaron comportamientos llamativos, con valores de expresión relativa de  $0,38 \pm 0,076$  y  $13,37 \pm 0,39$ , respectivamente.

### 5.5. Evaluación de parámetros fisiológicos y acumulación de bases oxidadas en el ADN en plantas salvajes y mutantes en el MMR sometidas a estrés oxidativo:

Se realizaron distintos estudios y comparaciones entre plantas salvajes de *A. thaliana* y sus derivadas deficientes en el MMR, debido a la eliminación de la funcionalidad de *MSH2*. Previamente, se ha reportado que no existen diferencias notables en el desarrollo y crecimiento en plantas mutantes homocigotas en *MSH2* de la línea SALK\_002708, en la primera generación, comparadas a plantas salvajes (Hoffman y col, 2004). Sin embargo, no se evaluaron, hasta el presente trabajo, diferencias

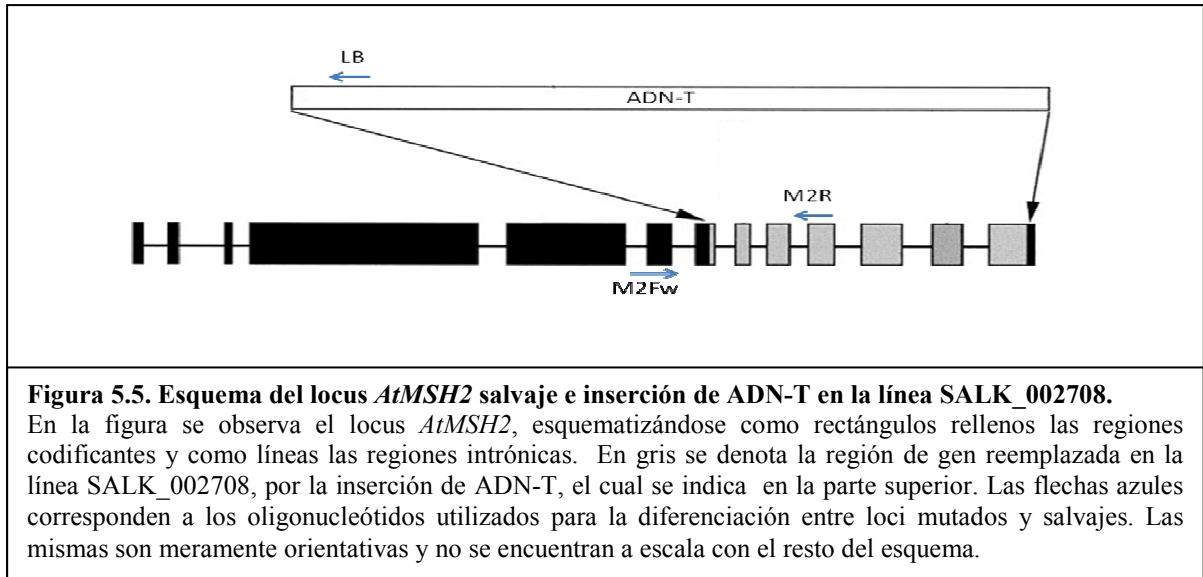
fenotípicas luego de que las diferentes plantas reciban tratamientos que impongan situaciones de estrés. Debido a ello, se realizaron las siguientes determinaciones: contenido de los pigmentos fotosintéticos, crecimiento radicular y tasas de germinación y supervivencia, de plantas salvajes y mutantes sometidas a condiciones de estrés oxidativo y salino. Adicionalmente, se comparó la acumulación de 8-oxoG en el ADN en ambos tipos de plantas sometidas a condiciones de estrés versus plantas en condiciones control.

Cabe destacarse que las condiciones de estrés impuestas para estos ensayos fueron marcadamente más leves que las utilizadas anteriormente para observar cambios transcripcionales. Para el desarrollo de estos ensayos se optimizaron las condiciones de estrés que permitiesen la viabilidad de las distintas plantas durante todo el período de interés para el análisis.

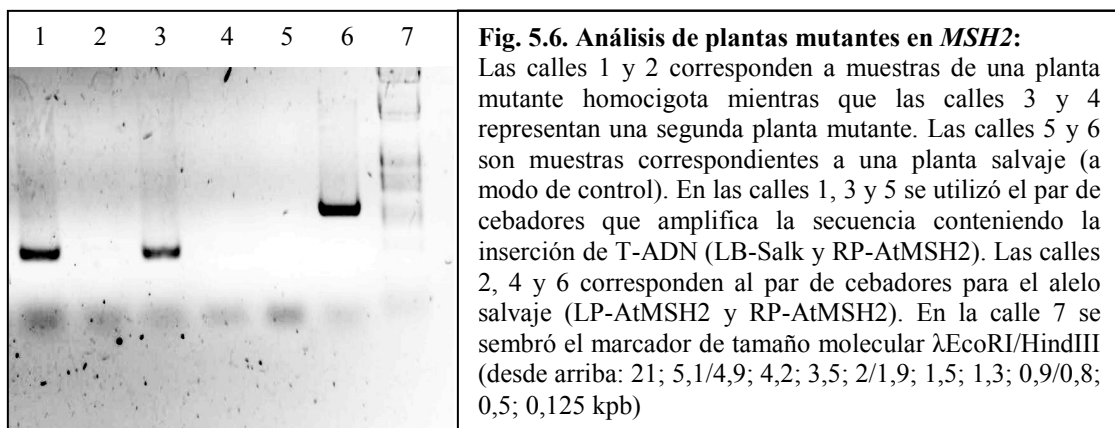
#### **5.5.1. Selección de plantas de *A. thaliana* mutantes en *MSH2*:**

A partir de semillas del banco de mutantes por inserción de ADN-T del instituto Salk se obtuvieron semillas de la línea SALK\_002708 derivada de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 (Alonso y col., 2003). Esta línea, presenta una inserción de T-ADN en el exón 7 del gen, que no solo interrumpe la secuencia codificante sino que causa la eliminación de dos secuencias altamente conservadas en todas las MSH2 esenciales para su función. Como resultado, esta línea presenta nulidad total de la función de MSH2 generando una inactivación total del sistema MMR, siendo este producto proteico clave para el mismo.

La selección de plantas homocigotas se llevó a cabo sobre 10 a 20 plantas crecidas a partir de las semillas citadas previamente. Para ello, se extrajo ADN de hojas de las distintas plantas y se realizaron PCR sobre estas muestras con cebadores que permiten diferenciar el alelo salvaje y el alelo conteniendo la inserción de ADN-T. En la figura 5.5 se esquematiza el locus de *MSH2* y el sitio de sustitución por la inserción del ADN-T. El primer cebador, M2Fw, aparea sobre una región dentro del locus *MSH2* mientras que el segundo, denominado M2Rv, lo hace en una región más interna con orientación contraria al anterior, en la zona que es reemplazada por el ADN-T en la mutante insercional. De este modo, se genera un producto de amplificación de aproximadamente 1.000 pb al utilizarse como molde ADN conteniendo el alelo salvaje, sin obtenerse producto al utilizar como molde ADN conteniendo la inserción de ADN-T.



Alternativamente, se utilizó un tercer oligonucleótido que aparece dentro de la secuencia de ADN-T con orientación inversa al primero, denominado LB. De esta forma, al amplificar con estos cebadores sobre ADN molde conteniendo la mencionada inserción se obtiene un producto de amplificación de aproximadamente 500 pb, el cual no se evidencia al realizar la amplificación sobre muestras de ADN salvaje. En consecuencia, para plantas homocigotas salvajes sólo se obtiene producto de PCR con el primer par de cebadores, mientras que para plantas homocigotas mutantes se obtiene el producto sólo con el segundo par. Adicionalmente, plantas heterocigotas mutantes evidenciarán productos de amplificación con ambos pares de cebadores correspondiendo a cada uno de los locus, salvaje y mutante. En la figura 5.6 puede observarse esta diferencia al realizar electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por PCR.



Se escogieron plantas mutantes homocigotas y se almacenaron las semillas obtenidas a partir de ellas, correspondientes a la primera generación, para utilizarlas en los diversos experimentos. Las mismas, se confirmaron mediante retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real para verificar la ausencia del transcripto de *MSH2* (resultados no mostrados).

Las plantas homocigotas mutantes en sistemas de reparación del ADN acumulan potencialmente una gran cantidad de mutaciones al mantenerse durante numerosas generaciones. Más aún, ha sido previamente informado, que plantas mutantes en *MSH2* no generan semillas viables luego de la quinta generación (Hoffman y col., 2004). Debido a esto, las plantas homocigotas mutantes utilizadas en el presente trabajo corresponden únicamente a la primera generación, obtenidas como se comentó anteriormente, a partir de las semillas provistas por el banco de mutantes.

### 5.5.2. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas crecidas en condiciones control:

Con el objetivo de determinar diferencias fisiológicas básicas entre las plantas salvajes y mutantes en *MSH2*, se determinaron en primer lugar, los contenidos de clorofilas (a y b) en referencia al peso fresco, en condiciones control. Las muestras se obtuvieron de plántulas crecidas *in vitro* en cámara de cultivo durante 10 días con medio MS-0. Se determinaron los contenidos de clorofilas a y b informados en la tabla 5.1.

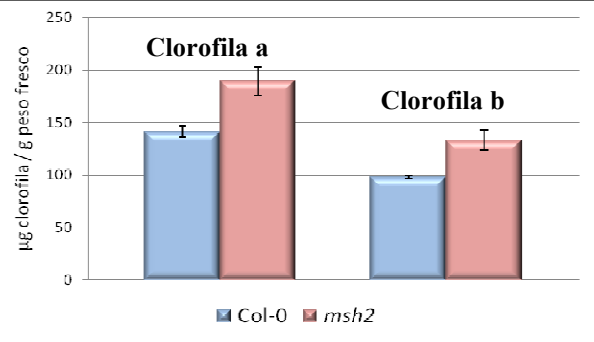
Se observaron diferencias significativas en el contenido total de clorofilas a y b entre plantas salvajes y mutantes ( $p < 0,05$ , prueba de t-Student). Sin embargo, la relación clorofila a sobre clorofila b permanece constante entre ambos grupos ( $p = 0,78$ ). Las plantas mutantes *msh2* poseen un mayor contenido de ambos tipos de clorofilas, como puede observarse esquemáticamente en la figura 5.7.

<b>Tabla 5.1. Concentración de clorofilas a y b en muestras de plantas salvajes y mutantes en <i>msh2</i>.</b>		
	<b>Plantas salvajes</b>	<b>Mutantes <i>msh2</i></b>
<b>Clorofila a (<math>\mu\text{g} / \text{g}</math> peso fresco)</b>	<b>141,27 <math>\pm</math> 5,26</b>	<b>189,61 <math>\pm</math> 13,46</b>
<b>Clorofila b (<math>\mu\text{g} / \text{g}</math> peso fresco)</b>	<b>98,11 <math>\pm</math> 1,34</b>	<b>132,94 <math>\pm</math> 9,37</b>
<b>Clorofila a / clorofila b</b>	<b>1,44 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>1,42 <math>\pm</math> 0,02</b>



**Figura 5.7. Contenido de clorofilas a y b en plantas salvajes y mutantes *msh2* crecidas en condiciones normales.**

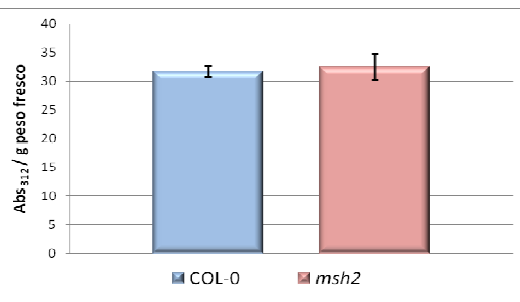
Los valores promedio se expresan como  $\mu\text{g}$  de clorofilas por g de peso fresco de tejido vegetal. Las barras indican el error estándar para cada determinación. Debajo se indica el código de colores utilizado asignado a cada genotipo.



Adicionalmente, se determinaron y compararon los contenidos de flavonoides por gramo de peso fresco, entre muestras similares a las utilizadas para determinar clorofilas. Los mismos se expresan como unidades de absorbancia a 312 nm por gramo de tejido fresco. En este caso, los datos no evidenciaron diferencias significativas al analizar mediante la prueba de t-Student ( $p = 0,756$ ). En la figura 5.8 se esquematizan los resultados obtenidos, observándose claramente la similitud entre los grupos analizados.

**Figura 5.8. Contenido de flavonoides en plantas crecidas en condiciones normales en invernadero durante 10 días.**

Contenido de flavonoides en plantas salvajes (Col-0) y mutantes (*msh2*). Los valores se grafican como absorbancia a 312 nm por gramo de peso fresco en la muestra.



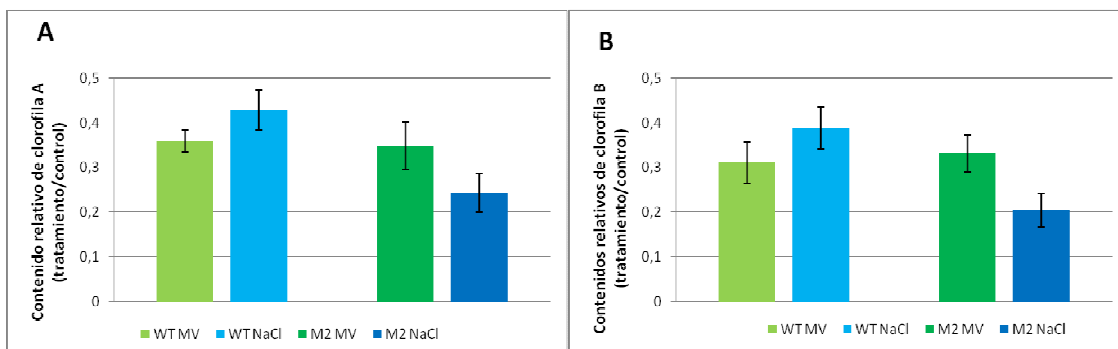
### 5.5.3. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas sometidas a condiciones de estrés:

Las plantas salvajes y mutantes *msh2* se sometieron a condiciones de crecimiento distintas de las óptimas para promover la generación de estrés oxidativo leve, directa o indirectamente. Los tratamientos utilizados constaron del crecimiento de las plantas *in vitro* en medio MS sólido suplementado con  $0,1 \mu\text{M}$  de metilviológeno o  $50 \text{ mM}$  de NaCl, respectivamente. Las placas se mantuvieron durante 10 días en cámara de cultivo con iluminación y temperatura normal, previamente a la toma de muestras. Estos tratamientos se realizaron de forma paralela al crecimiento de las plantas en condiciones control (medio MS-0). De esta forma, los resultados se expresaron en función de los valores observados en las condiciones control, con el objetivo de denotar cambios significativos en los contenidos de clorofilas a y b, debido a los tratamientos aplicados.

Los resultados se encuentran tabulados en la tabla 5.2 y se esquematizan en los gráficos de la figura 5.9.

	CLOROFILA a		CLOROFILA b	
	MV 0,1 $\mu$ M	NaCl 50 mM	MV 0,1 $\mu$ M	NaCl 50 mM
	Salvajes	0,359 $\pm$ 0,024	0,428 $\pm$ 0,045	0,311 $\pm$ 0,044
Mutantes	0,348 $\pm$ 0,054	0,243 $\pm$ 0,043	0,332 $\pm$ 0,041	0,205 $\pm$ 0,038

Los contenidos de clorofilas a y b disminuyen marcadamente por los tratamientos con MV y NaCl. Más aún, es notable una disminución similar en plantas salvajes y mutantes *msh2* bajo tratamiento con MV en ambos tipos de clorofilas. Sin embargo, bajo tratamiento con NaCl las plantas mutantes muestran un comportamiento diferencial respecto de las salvajes. En este caso, la disminución en el contenido de cada tipo de clorofila es aproximadamente el doble en las mutantes *msh2* (ANOVA,  $p < 0,05$ ) Sin embargo, no se evidencian cambios significativos en las relaciones de clorofila a / clorofila b en ninguna de las condiciones (ANOVA,  $p=0,5792$ ).



**Figura 5.9. Contenidos relativos de clorofilas a y b de plantas sometidas a estrés.**

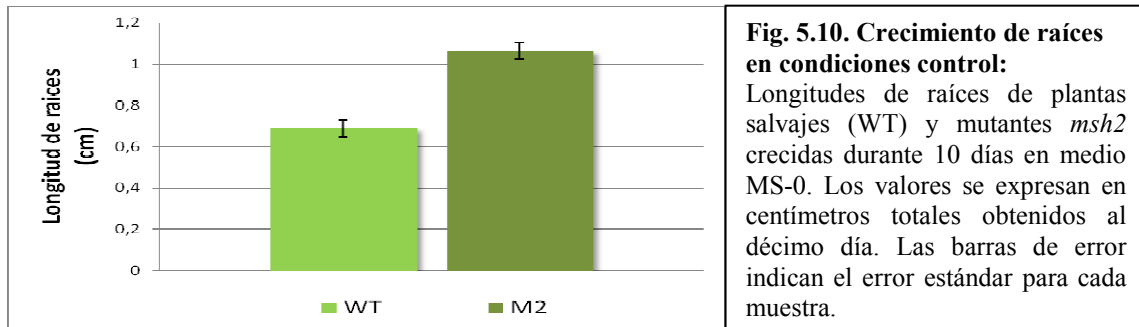
Se grafican los valores medios de clorofilas relativos al control de los grupos tratados con metilviológeno 0,1  $\mu$ M (MV) y NaCl 50 mM (NaCl), sobre plantas salvajes (WT) y mutantes en MSH2 (M2), según se indique en la leyenda inferior. A: contenidos relativos de clorofila a. B: contenidos relativos de clorofila b: las barras de error indican el error estándar para cada muestra.

#### 5.5.4. Evaluación del crecimiento radicular de plantas salvajes y mutantes *msh2*:

Se evaluó el crecimiento de las raíces de plantas salvajes y mutantes en *MSH2* bajo condiciones de crecimiento normal y en condiciones de estrés, con la finalidad de evidenciar posibles diferencias entre los distintos grupos. Para ello, se determinaron las longitudes de raíces de plantas crecidas *in vitro* en placas de Petri conteniendo medio sólido MS-0 o MS suplementado con MV 0,1  $\mu$ M o NaCl 50 mM. Las placas se

mantuvieron en un ángulo de 70 ° con el plano horizontal durante todo el crecimiento y se midieron las longitudes de las raíces a distintos días desde la germinación como se detalla en materiales y métodos.

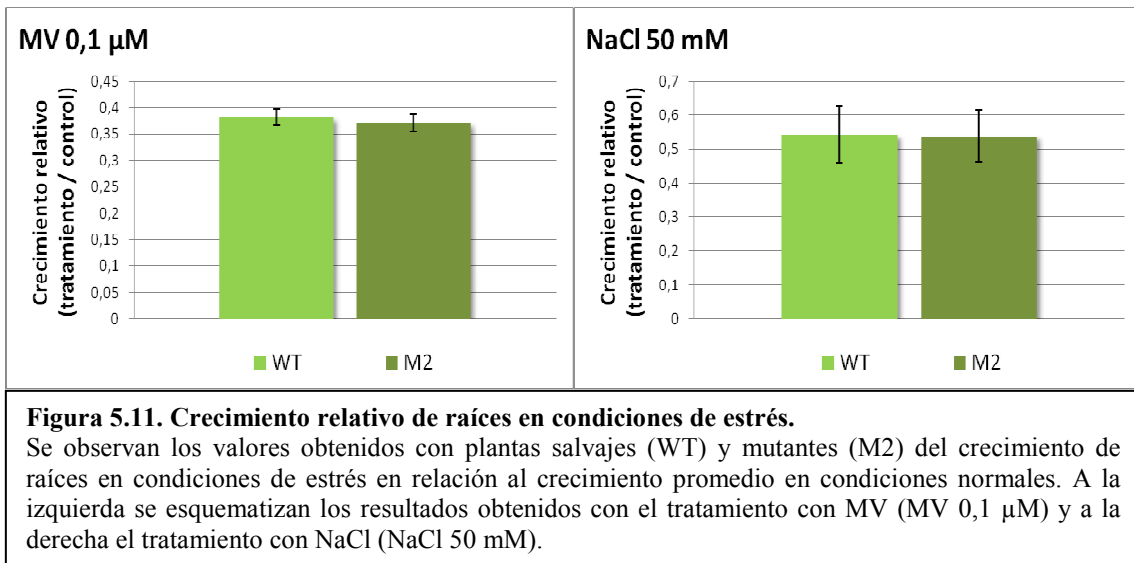
En primer lugar, se establecieron posibles diferencias entre los genotipos salvaje y mutante en condiciones de crecimiento normales, o control. Para ello, los datos de longitudes de raíces para ambos tipos de plantas crecidas durante 10 días en placas conteniendo MS-0 sólido se agruparon y compararon estadísticamente, evidenciando diferencias significativas entre los mismos. Como puede observarse en la figura 5.10, el crecimiento de las raíces de plantas mutantes es significativamente mayor que el correspondiente a las plantas salvajes. La longitud total promedio de las raíces de plántulas de 10 días de crecimiento es  $0,689 \pm 0,042$  cm para plantas salvajes, mientras el valor obtenido para plantas mutantes es  $1,066 \pm 0,0119$ .



Paralelamente, se determinó la longitud de las raíces de plantas crecidas en medio MS suplementado con MV 0,1  $\mu$ M o NaCl 50 mM. Estos resultados se agruparon y se compararon estadísticamente con la finalidad de detectar diferencias significativas entre los genotipos y/o debidas a los tratamientos. En la figura 5.11 se esquematizan los resultados obtenidos para ambos tratamientos, oxidativo y salino, respectivamente. En ambos casos, los valores se relativizaron al crecimiento de los grupos salvaje y mutante en condiciones control.

En los dos tratamientos realizados puede observarse una disminución significativa del crecimiento de las raíces con respecto al normal como resultados de las situaciones de estrés impuestas. Adicionalmente, es evidente que el tratamiento con MV produce un mayor grado de inhibición del crecimiento que el tratamiento salino. En el primer caso, el crecimiento de raíces alcanza entre el 36 al 39 % del crecimiento en condiciones control, esto se traduce en una inhibición superior al 60 % del crecimiento de las raíces. Alternativamente, el crecimiento en condiciones de estrés salino se encuentra alrededor del 52 % de la longitud de las raíces en condiciones control, significando una inhibición

menor al 50 %. Una consideración importante reside en el hecho de que la disminución del crecimiento de raíces de plantas salvajes y mutantes, en cada tratamiento, es similar.



#### 5.5.5. Comparación de tasas de germinación de plantas salvajes y mutantes *msh2*:

Se determinaron las tasas de germinación de muestras de ambos genotipos sometidas a condiciones de estrés. Para la evaluación se utilizaron placas con MS-0 y placas con MS suplementado con MV 0,1  $\mu$ M o con NaCl 50 mM, crecidas en condiciones normales en cámara de cultivo. Al cabo de 10 días, se contabilizaron las semillas germinadas utilizando como criterio la observación de radícula y cotiledones emergentes. Las tasas de germinación se calcularon como semillas germinadas sobre semillas totales sembradas y se compararon estadísticamente mediante la prueba Z.

En las condiciones control de crecimiento en medio MS-0, las tasas de germinación de plantas salvajes y mutantes no difieren significativamente ( $p = 0,3239$ ). En ambos casos, los porcentajes de germinación se encuentran en valores superiores al 94 %. Adicionalmente, tampoco se observaron diferencias entre plantas salvajes y mutantes al germinar las semillas en medio MS suplementado con MV 0,1  $\mu$ M ( $p = 0,2260$ ) o NaCl 50 mM ( $p = 0,2436$ ). En conclusión, las plantas silvestres y mutantes en *MSH2* no presentan diferencias en cuanto a germinación tanto en condiciones de crecimiento normal como en condiciones de estrés.

### **5.5.6. Estudios de acumulación de 8-oxoG en el ADN de plantas sometidas a distintos tratamientos de estrés: DOT BLOT**

Se llevó a cabo, el estudio comparativo de los niveles de acumulación de la base oxidada 8-oxoG en plantas salvajes y mutantes en *MSH2* sometidas a condiciones de estrés.

En el presente trabajo la detección se realizó sobre ADN inmovilizado en una membrana utilizando un sistema basado en la inmunodetección de 8-oxoG con un anticuerpo monoclonal altamente específico. El procedimiento, denominado dot-blot, consta de varias etapas: extracción de ADN e inmovilización en membrana, inmunodetección con anticuerpos específicos y finalmente, cuantificación de la señal mediante densitometría de los discos resultantes sobre la membrana.

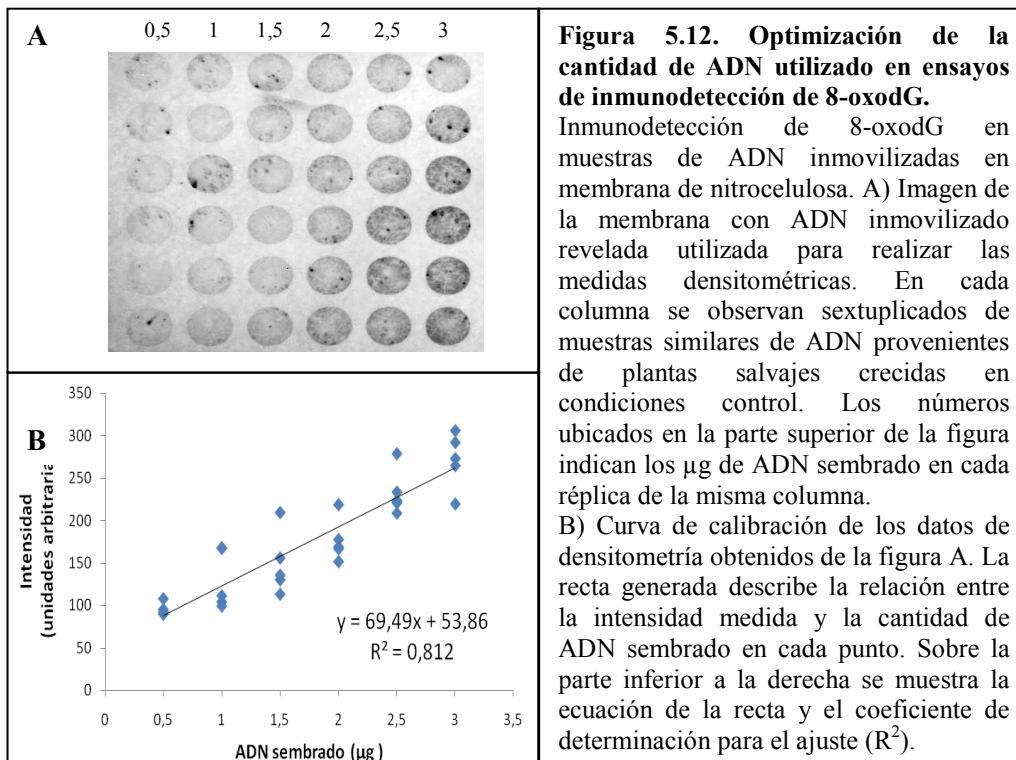
Para la primera etapa del procedimiento, se llevó a cabo la extracción de ADN mediante el método de CTAB, como se detalla en Materiales y Métodos. El ADN obtenido se sometió a medidas de absorbancia a 260 nm y 280 nm. Con estos datos se calculó la concentración de ADN en cada muestra y se estimó la calidad del mismo mediante la relación absorbancia 260/280, utilizándose en todos los casos muestras con tasas iguales o mayores a 1,8. Adicionalmente, se realizó electroforesis en geles de agarosa de 1 µg de ADN de cada muestra, previo a cada ensayo. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se fotografiaron y a continuación se cuantificaron las bandas de ADN por densitometría, relacionando todas las señales con una señal seleccionada como patrón. El objetivo de este procedimiento fue normalizar las concentraciones de las muestras de ADN a utilizar.

La inmovilización se llevó a cabo sobre membranas de nylon optimizada para el uso con ADN (Amersham Hybond N<sup>+</sup>) utilizando un sistema diseñado en el laboratorio. Este sistema cuenta de un contenedor superior con 96 pocillos idénticos de 7 mm de diámetro el cual se ubica sobre la membrana previamente equilibrada en la solución de inmovilización. Luego, el contenedor con la membrana ubicada en la región inferior se ajusta sobre varias capas de papel Whatmann y papel absorbente común. Finalmente, este conjunto se ubica sobre un soporte y se ajusta. De esta forma, se generan pocillos sobre la membrana, que permiten sembrar muestras de volúmenes mayores a 300 µl en cada uno de ellos. Las soluciones conteniendo el ADN se siembran en los pocillos y van transfiriéndose hacia el papel absorbente inferior por capilaridad. Una vez que toda la solución del pocillo drenó completamente, el ADN permanece concentrado sobre la membrana en un disco de 7 mm de diámetro. Cada pocillo se lava con solución de

transferencia y finalmente la membrana se remueve del dispositivo y se entrecruza el ADN a la membrana mediante un tratamiento a 80 °C durante 2 hs. A continuación la membrana con el ADN inmovilizado se bloquea, se trata con anticuerpo primario anti-8-oxodG, seguido del anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina y finalmente se revela por el método colorimétrico utilizando NBT/BCIP.

Las membranas se secan y se fotografian para su posterior análisis mediante densitometría de las señales obtenidas. Estas señales se refieren a la cantidad de ADN sembrada y a correcciones derivadas de los geles de agarosa realizados en paralelo, como se comentó previamente. Los datos no corresponden a cantidades absolutas ya que no se utilizaron curvas de calibración con cantidades conocidas de 8-oxodG. Sin embargo, los valores son suficientes para permitir comparaciones entre muestras provenientes de distintas condiciones evaluadas en un mismo ensayo.

En ensayos iniciales se determinó la cantidad de ADN a inmovilizar en la membrana, así como las condiciones generales del método. Se ensayaron concentraciones crecientes de muestras de ADN de hojas de plantas silvestres crecidas en condiciones control durante 3 semanas. A saber, se sembraron sextuplicados de cada concentración, desde 0,5 µg hasta 3 µg, en incrementos de 0,5 µg cada vez. En la figura 5.12 puede observarse la membrana correspondiente a este ensayo revelada y la curva de calibración generada a partir de ella.

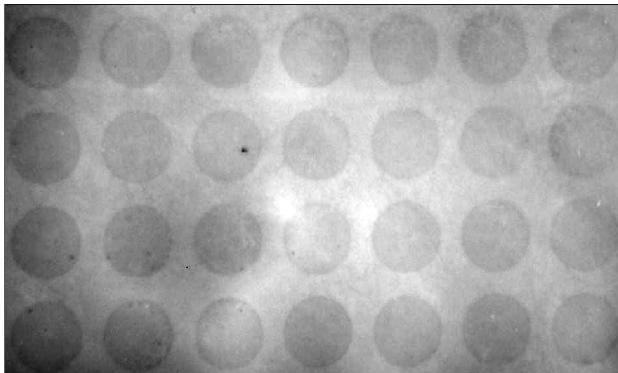


Se determinó la concentración óptima para el ensayo en 1,5 µg de ADN total por cada réplica inmovilizada en membranas. Esta fue la cantidad utilizada a continuación en todos los ensayos de dot-blot realizados.

#### 5.5.6.1. Comparación de acumulación de 8-oxoG en ADN de plantas salvajes y mutantes en *MSH2* en condiciones de crecimiento normal:

En primer lugar, se llevó a cabo la comparación entre los niveles de oxidación del ADN de hojas de plantas crecidas normalmente en invernadero durante 3 semanas, sin ningún tipo de estrés.

Se analizaron 7 muestras de ADN de cada tipo de plantas (salvajes o mutantes en *MSH2*), realizándose duplicados técnicos para cada muestra. Se realizaron dos ensayos paralelos, en membranas independientes, utilizando las mismas muestras en condiciones similares. En la figura 5.13 se observa una de las membranas reveladas. Las medidas de densitometría, con sus correspondientes correcciones de intensidad de fondo y de siembra, se agruparon y se compararon mediante ANOVA para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los grupos. Se determinó que no existen diferencias entre los niveles de acumulación de 8-oxoG en el ADN de plantas mutantes en *MSH2* y salvajes ( $p = 0,788$ ).



**Fig. 5.13. Acumulación de 8-oxodG en plantas salvajes y mutantes *msh2* en condiciones control.**

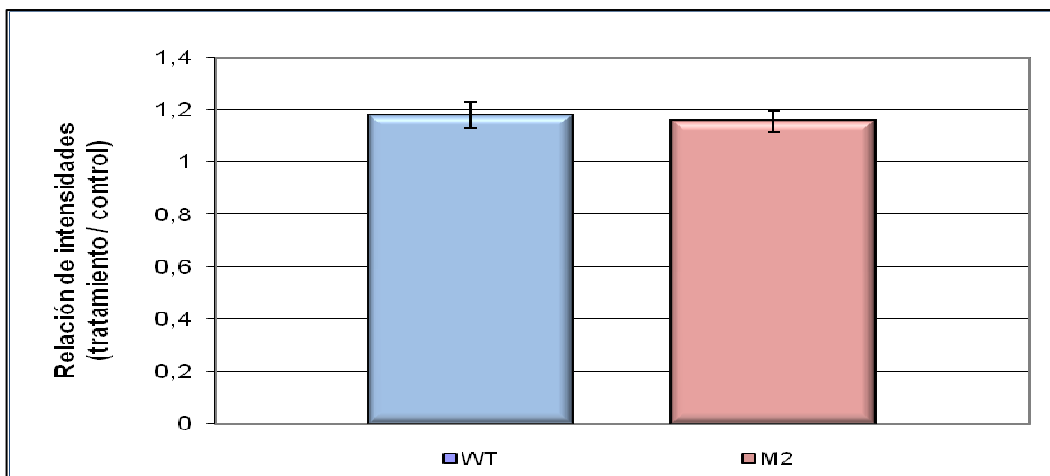
Inmunodetección de 8-oxodG en muestras de 1,5 µg de ADN inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa. La primera fila corresponde a muestras independientes provenientes de plantas salvajes mientras la segunda fila corresponde a ADN de plantas mutantes. La tercera y cuarta fila son replicas técnicas de las dos anteriores.

#### 5.5.6.2. Comparación de los niveles de 8-oxoG en plantas sometidas a estrés abiótico:

Se llevaron a cabo diversos análisis mediante dot-blot similares a los descritos en la sección anterior con plantas que recibieron distintos tipo de estrés abiótico de forma de generar finalmente estrés oxidativo.

### 5.5.6.2.1. Niveles de 8-oxoG en plantas tratadas con MV:

Se realizaron tratamientos con MV como los comentados en las secciones anteriores. Las plantas de ambos genotipos se crecieron *in vitro*, en medio MS-0 (control) y en medio MS suplementado con MV 0,1  $\mu\text{M}$  (tratamiento), durante 15 días en cámara de cultivo en condiciones normales. Terminado este período, se extrajo ADN de las mismas para determinar la acumulación de 8-oxodG. Se utilizaron sextuplicados biológicos ensayados en diversas membranas y duplicados técnicos para cada muestra. En todos los casos se utilizaron las fracciones aéreas completas de las plántulas, eliminándose las raíces. Los datos densitométricos provenientes de muestras tratadas se relativizaron al promedio de los obtenidos en condiciones control, para cada genotipo en particular y se compararon estadísticamente. Como puede observarse en la figura 5.14, en ambos tipos de plantas, salvajes y mutantes, aumenta la acumulación de bases oxidadas en las condiciones de tratamiento en relación a condiciones control (plantas salvajes:  $1,179 \pm 0,054$  y plantas mutantes *msh2*:  $1,155 \pm 0,041$ ). Sin embargo, al comparar estas tasas no se observan diferencias significativas (ANOVA,  $p = 0,7249$ ).



**Fig. 5.14: Acumulación de 8-oxoG en el ADN de plantas crecidas en medio de cultivo suplementado con MV 0,1  $\mu\text{M}$ .**

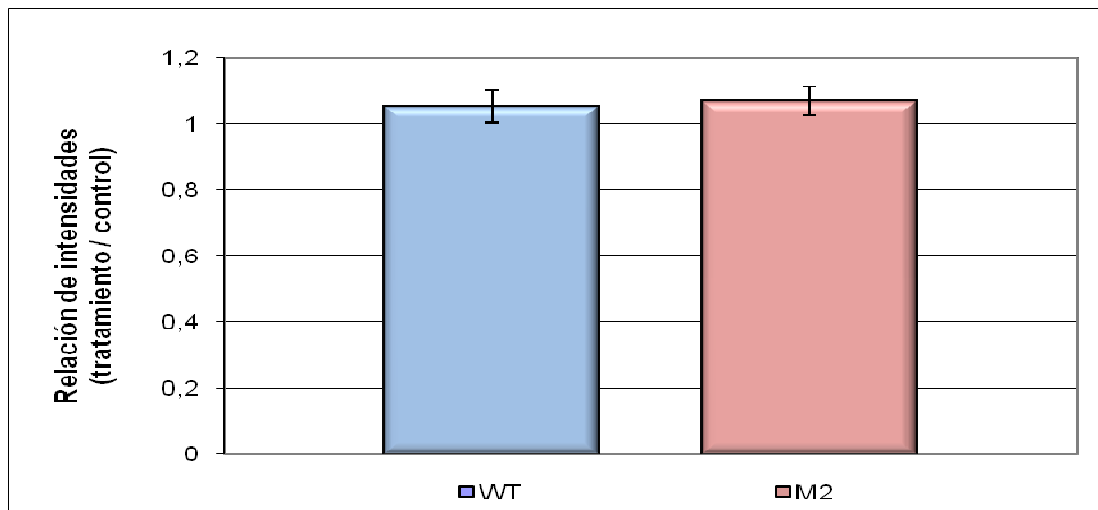
Ensayos de dot-blot con ADN de plantas salvajes (WT) y mutantes en MSH2 (M2). Se grafican los valores promedios de los cocientes de intensidad de las muestras tratadas sobre las muestras utilizadas como control y el correspondiente error estándar.

En conclusión, el tratamiento con MV 0,1  $\mu\text{M}$  produce un incremento de aproximadamente 20 % en la acumulación de 8-oxoG en el ADN similar en ambos genotipos ensayados.



### 5.5.6.2.2. Niveles de 8-oxoG en plantas tratadas con NaCl:

Se evaluó la acumulación de 8-oxoG en ADN de plantas crecidas en medio de cultivo MS suplementadas con NaCl 50 mM en relación a las muestras crecidas en MS-0 utilizadas como control. Las mismas se cultivaron *in vitro* durante 15 días en condiciones de crecimiento normal en cámara de cultivo. Finalizado este período, se extrajo ADN de al menos 6 muestras por cada condición y genotipo y se utilizó el mismo para realizar ensayos de dot-blot con anticuerpos anti-8-oxoG en duplicados técnicos. En todos los casos se utilizaron las fracciones aéreas completa de las plántulas, eliminándose las raíces. La intensidad relativa de muestras crecidas en presencia de NaCl 50 mM para cada genotipo de interés se relativizaron al promedio de la intensidad en las condiciones control correspondientes. De esta manera, se obtuvieron los conjuntos de intensidades relativas utilizados para la comparación estadística mediante ANOVA. Los promedios de estos datos son para las plantas salvajes  $1,051 \pm 0,049$  y para plantas mutantes *msh2*  $1,068 \pm 0,044$ . Los mismos se observan en la figura 5.15.



**Fig. 5.15: Acumulación de 8-oxoG en ADN de plantas crecidas en medio de cultivo suplementado con NaCl 50 mM.**

Ensayos de dot-blot con ADN de plantas salvajes (WT) y mutantes en MSH2 (M2). Se grafican los valores promedios de los cocientes de intensidad de las muestras tratadas sobre las muestras utilizadas como control y el correspondiente error estándar.

Es notable observar que los valores son aproximadamente iguales a la unidad, traduciéndose en una acumulación de lesiones similar en condiciones de tratamiento y control. Adicionalmente, al comparar los datos obtenidos para cada línea se evidencia la falta de diferencia significativa de los mismos (ANOVA,  $p = 0,8079$ ). Con estos resultados puede concluirse que el crecimiento en medio conteniendo NaCl 50 mM no

produce un aumento en la acumulación de lesiones oxidativas en el ADN del tipo 8-oxodG, en ninguno de los genotipos ensayados.

## 5.6. Discusión:

### 5.6.1. Evaluación de cambios transcripcionales en los genes del MMR de plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés oxidativo y salino:

Se evaluó parcialmente la funcionalidad del MMR de *A. thaliana* en la reparación del daño oxidativo al ADN. Para ello se llevaron a cabo dos tratamientos que producen el aumento de las concentraciones intracelulares de EROs. El primero de ellos, se basó en la imposición de estrés oxidativo por el tratamiento con el herbicida redox MV. Como segundo tratamiento, se sometieron las plantas a estrés salino con NaCl, el cual produce indirectamente un incremento de las niveles de EROs. Los resultados se compararon y relativizaron a los obtenidos con muestras sometidas a condiciones similares pero sin el agregado de los compuestos que producen estrés, considerados como condiciones control.

En primer lugar, se evaluaron cambios transcripcionales en los cuatro genes principales involucrados en el MMR, a saber, *MHS2*, *MSH6*, *MLH1* y *PMS1*. Los dos primeros forman el heterodímero MutSa y los otros el complejo MutLa. El gen *MSH7*, de particular interés en esta tesis no pudo ser cuantificado debido a inconvenientes experimentales en su determinación. En trabajos previos en el CEFOBI con cebadores diseñados especialmente para la determinación de estos transcritos se obtuvieron resultados muy dispares, observándose en general ausencia de transcripto en distintas muestras. Estos datos previos y determinaciones realizadas en este trabajo con resultados negativos (resultados no incluidos), indujeron a la eliminación de la determinación de este gen en el presente estudio. En trabajos posteriores, realizados por la Lic. Luciana Lario en el CEFOBI, se logró establecer el patrón de expresión de *AtMSH7*, observándose expresión en flores, silículas jóvenes y ápices radiculares, pero no en tejido foliar (comunicación personal). Cabe recordarse que en el presente trabajo de tesis, se utilizaron las fracciones aéreas de plántulas jóvenes, que consisten mayormente de tejido foliar. Este hecho, es consistente con la ausencia de resultados satisfactorios al ensayar el gen mencionado previamente.

Los genes ensayados mostraron distintos grados de expresión en las condiciones impuestas. En la mayoría de los mismos, se observaron aumentos transcripcionales. Sólo *MLH1* mostró represión de aproximadamente 2,6 veces en condiciones de estrés salino, sin embargo, este mismo gen reportó un aumento marcado de su expresión en condiciones de estrés oxidativo por tratamiento con MV. Este tipo de comportamiento

aparentemente ambiguo entre los tratamientos también se extiende a los otros genes ensayados. En primer lugar, *MSH2*, evidencia un aumento de la transcripción de aproximadamente 4 veces en condiciones de estrés oxidativo respecto al estrés salino. De modo contrario, el aumento de la expresión en el gen *PMS1* es alrededor de 3 veces en estrés salino con respecto al valor obtenido en estrés oxidativo. Finalmente, el gen *MSH6* aumenta moderadamente su expresión en ambas condiciones de tratamientos, presentando un valor de aproximadamente el doble en estrés oxidativo con respecto al obtenido en estrés salino.

Estos valores en su conjunto, no permiten la proposición de una hipótesis explicativa global sobre la expresión de los genes en las condiciones ensayadas. Sin embargo, permiten concluir la existencia de respuestas transcripcionales distintas en ambas condiciones consistentes, en primer lugar, con las diferencias entre los tratamientos impuestos. Si bien, en ambas situaciones de estrés se produce un aumento de las especies reactivas del oxígeno, existen diferencias en cuanto a las respuestas generales a las condiciones particulares de cada tratamiento. El tratamiento con MV genera de forma directa el aumento de las EROs, principalmente a nivel cloroplástico. Sin embargo, el tratamiento con NaCl produce una serie de respuestas fisiológicas de mayor complejidad relacionadas principalmente con el desbalance osmótico e iónico en los tejidos. La generación de las EROs constituye una de varias respuestas secundarias aparejadas a estas condiciones.

En segundo lugar, deben considerarse las diferencias temporales de los tratamientos impuestos. En el tratamiento con MV, el tiempo total del mismo es de aproximadamente 5 horas, mientras que el tratamiento salino es llevado a cabo en un lapso de tiempo que abarca 48 horas. Por lo tanto, las respuestas transcripcionales no son consideradas en igualdad de condiciones temporales, por lo que no es esperable un comportamiento similar entre las mismas.

Esta serie de consideraciones, en cuanto a la naturaleza y los tiempos de los tratamientos impuestos, permiten justificar, al menos en parte, las diferencias en las respuestas transcripcionales observadas.

Finalmente, los datos obtenidos de los tratamientos con MV, se corresponderían con un aumento en las tasas de transcripción. Este hecho, podría relacionarse a la posible funcionalidad del MMR en el reconocimiento y reparación de lesiones oxidativas. Sin embargo, con los ensayos realizados no puede establecerse totalmente

una relación directa entre el aumento de la expresión de los genes del MMR y la reparación de bases oxidadas por parte de este sistema.

### **5.6.2. Evaluación de parámetros fisiológicos y acumulación de bases oxidadas en el ADN en plantas salvajes y mutantes en el MMR sometidas a estrés oxidativo y salino:**

Se evaluaron potenciales diferencias de plantas salvajes y deficientes en el MMR sobre ciertos parámetros fisiológicos y la acumulación de la base oxidada 8-oxoG. Esta, constituye una de las principales lesiones oxidativas en todos los organismos y es frecuentemente utilizada como marcador de este tipo de daños (Bruskov y col., 2002).

En primer lugar, se seleccionó una línea mutante en el MMR (SALK\_002708) por inserción de ADN-T en el gen *MSH2*. Esta inserción anula completamente la funcionalidad del producto homónimo, con la consecuente abolición completa del sistema MMR, debido al rol central de *MSH2* en la vía.

Se realizaron determinaciones de los pigmentos fotosintéticos clorofilas a y b en plantas salvajes y mutantes crecidas en distintas condiciones. Se evaluaron inicialmente los contenidos de estos pigmentos en plantas crecidas en condiciones control en invernadero para establecer algún tipo de diferencias atribuibles al genotipo. De esta forma, pudo determinarse que las plantas de la línea SALK\_002708 acumulan aproximadamente un 30 % más de ambos tipos de clorofilas que la línea salvaje. Esta diferencia podría corresponderse con algún efecto secundario producto de la inactivación del sistema MMR, sin embargo, la causa no está clara.

Al analizar los valores del contenido de clorofilas crecidas en presencia de MV 0,1  $\mu$ M y NaCl 50 mM, se evidencian valores menores al 50 % del contenido de estos compuestos con respecto a las plantas control. Cabe destacarse, que los valores de clorofilas a y b disminuyen de forma similar para cada genotipo y tratamiento, indicando una disminución general del contenido total de estos pigmentos, debido a las condiciones de crecimiento impuestas. Estos resultados indican en primer lugar, la eficacia de los tratamientos efectuados en la generación de estrés. Adicionalmente, es importante notar la existencia de diferencias entre los tratamientos y los genotipos. Al focalizar la atención en los valores obtenidos para plantas salvajes, se observa una disminución ligeramente mayor de ambos tipos de clorofilas en el grupo tratado con MV en relación al tratamiento salino (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, al comparar los valores obtenidos de plantas mutantes en *MSH2* se observa el resultado inverso. En este

caso, la mayor disminución en las clorofilas la genera el tratamiento salino, mostrando el tratamiento con MV, valores similares a los obtenidos con plantas salvajes. De esta forma, puede concluirse que existe un comportamiento diferencial de las plantas mutantes frente al tratamiento salino, produciendo mayor disminución del contenido de clorofila total.

Adicionalmente, se utilizó el crecimiento radicular como uno de los parámetros fisiológicos a comparar. En primer lugar, se observa una diferencia significativa en el crecimiento promedio de las plantas salvajes y mutantes en *MSH2*. Las últimas, presentan longitudes 30 % mayores que las obtenidas de plantas salvajes. Este hecho podría indicar cierta interacción entre el MMR y el ciclo celular, resultando en afecciones fisiológicas en el crecimiento. En mamíferos el MMR está involucrado en la regulación del ciclo celular, principalmente en la transición de las fases S a G2 (Hawn y col., 1995; O'Brien y Brown, 2006). El sistema actuaría en el punto de control de transición que retrasa la progresión de la mitosis en células que no hubieran completado satisfactoriamente la duplicación del material genético. En plantas, existen evidencias que indican cierto grado de interrelación entre el sistema MMR y su interacción con el ciclo celular (Lario y col., 2011). Por lo tanto, las plantas mutantes *msh2*, podrían evitar el retraso impuesto por el punto de control de la transición y progresar con mayor velocidad que las salvajes. Esta hipótesis, sin embargo, es meramente orientativa requiriéndose un conjunto de estudios adicionales para el sustento de la misma.

Paralelamente, se evaluó el crecimiento radicular en presencia de MV 0,1  $\mu$ M y NaCl 50 mM. En ambos tratamientos se observaron disminuciones significativas de los valores promedio, similares para ambos genotipos en cada condición. En el tratamiento con MV se obtuvo un grado de inhibición de aproximadamente 60 % mientras que el tratamiento salino produjo una disminución un tanto menor, con valores que se aproximan al 50 %. De esta manera, se puede concluir que los tratamientos impuestos generan condiciones de estrés, afectando el crecimiento normal de las plantas, con diferencias debidas a la identidad de los mismos. Sin embargo, no se observa una respuesta diferencial debida al tipo de planta, salvaje o mutante *msh2*. Esto implica que bajo estas condiciones de tratamiento la presencia del producto MSH2 no genera cambios apreciables en la respuesta a los mismos.

Al ensayar la capacidad de germinación de semillas provenientes de ambas líneas de plantas, en condiciones control y con los tratamientos previamente citados, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos. Esto sugiere que la

germinación no se ve afectada por los tratamientos de estrés tanto en plantas salvajes como mutantes en *MSH2*.

Finalmente, se evaluó la acumulación de la base oxidada 8-oxoG para evidenciar la posible implicación del MMR en la reparación de las mismas. En primer lugar, se compararon los niveles de acumulación de ambas líneas, salvaje y SALK\_002708, en condiciones control, sin observarse diferencias. Luego, se compararon de igual manera, los valores obtenidos en las condiciones de tratamiento. En este caso, tampoco se observaron diferencias atribuibles al genotipo. El tratamiento con MV 0,1  $\mu$ M mostró en ambos tipos de plantas un incremento del 20 % en la acumulación de bases oxidadas, sin embargo, no se observó incremento significativo en plantas crecidas en NaCl 50 mM. Esto sugiere que la generación de EROs debido a este tipo de estrés resulta menos agresiva al ADN que el tratamiento con MV, en el cual se generan de forma directa estos factores de injuria. Este hecho, es consistente con las diferencias en las respuestas fisiológicas de las plantas en los distintos tratamientos comentadas anteriormente.

En conclusión, el conjunto de datos obtenidos no permiten establecer relaciones entre el MMR y la reparación de 8-oxoG, al menos en las condiciones ensayadas. Cabe recordarse, que existen otros mecanismos abocados a la reparación de lesiones oxidativas en el ADN. Ante este escenario, la funcionalidad del MMR podría resultar enmascarada por estos sistemas en los ensayos realizados. Sin embargo, no puede descartarse un rol indirecto en la reparación ante este tipo de injurias o algún tipo de relación sinérgica entre los distintos tipos de mecanismos de reparación.

***6. Análisis funcional de las proteínas  
AtMSH2 y AtMSH7 en  
Saccharomyces cerevisiae***



## 6. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS ATMSH2 Y ATMSH7 EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*:

### 6.1. Introducción:

*S. cerevisiae* es uno de los organismos unicelulares más versátiles y utilizados en los campos de la investigación tanto genética y bioquímica como en biología celular y molecular. En este sentido, este microorganismo presenta diversas ventajas que lo han convertido en uno de los modelos eucariotas preferidos en distintas áreas de investigación (Karathia y col., 2011). Entre las características más destacables se encuentran su carácter eucariota, rápido ciclo de vida, alternancia entre formas de vida haploide y diploide, facilidades técnicas de manejo en el laboratorio y bajo costo económico. Adicionalmente, su genoma se encuentra completamente secuenciado y se disponen de innumerables técnicas genéticas y moleculares desarrolladas para las distintas áreas de la investigación. Entre las mismas, se encuentra un gran desarrollo en el área del clonado molecular y la expresión de proteínas recombinantes (Strausberg y Strausberg, 2001; Liu y col., 2012). Debido a ello, esta levadura ha sido utilizada exitosamente no solo en la producción de moléculas de interés biotecnológico, sino que se ha consolidado como un marco biológico *in vivo* para el estudio de distintas proteínas eucariotas.

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la función del heterodímero AtMutSy, utilizando como huésped para su estudio el organismo eucariota unicelular *S. cerevisiae*. La elección de este organismo como huésped para la expresión de estas proteínas de *A. thaliana* en forma recombinante se basó, en primer lugar, en la imposibilidad de obtener un sistema de expresión heterólogo en *E. coli* que permitiese la síntesis conjunta de AtMSH2 y AtMSH7. Previamente se describió, en este trabajo de tesis, la expresión de la subunidad AtMSH2 en *E. coli* y su purificación. A su vez, como se comentó anteriormente, en el laboratorio se cuenta con anticuerpos policlonales para dicha proteína. Sin embargo, no se logró hasta la realización de este trabajo de tesis, la expresión y purificación de AtMSH7 en cantidades suficientes para caracterizaciones funcionales y estructurales. Si bien existen anticuerpos de la subunidad previamente citada los mismos no son lo suficientemente efectivos para los diversos estudios inmunoquímicos planteados.

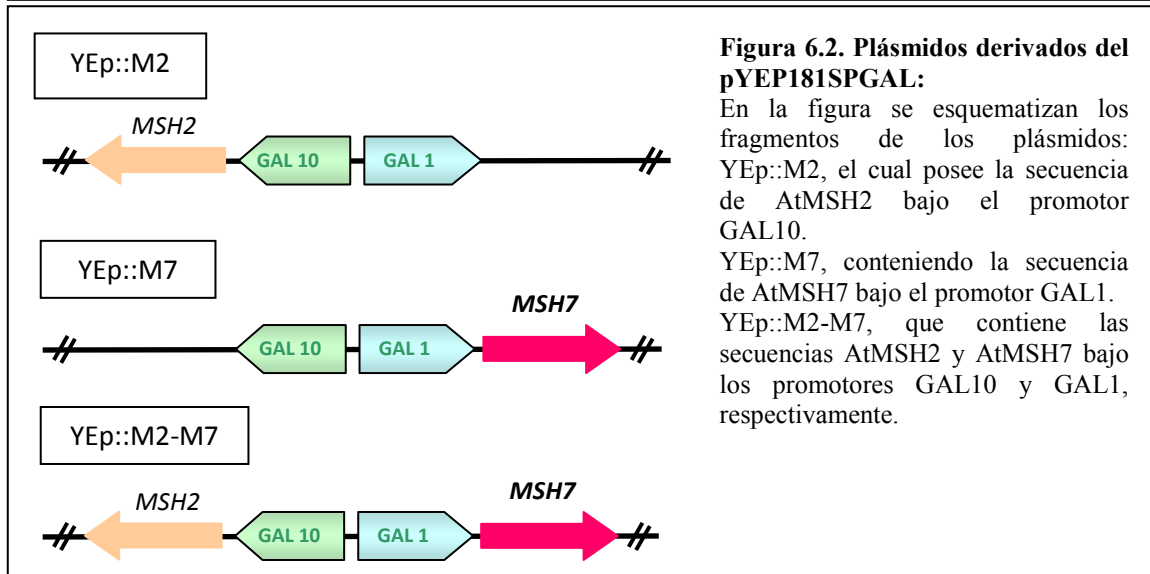
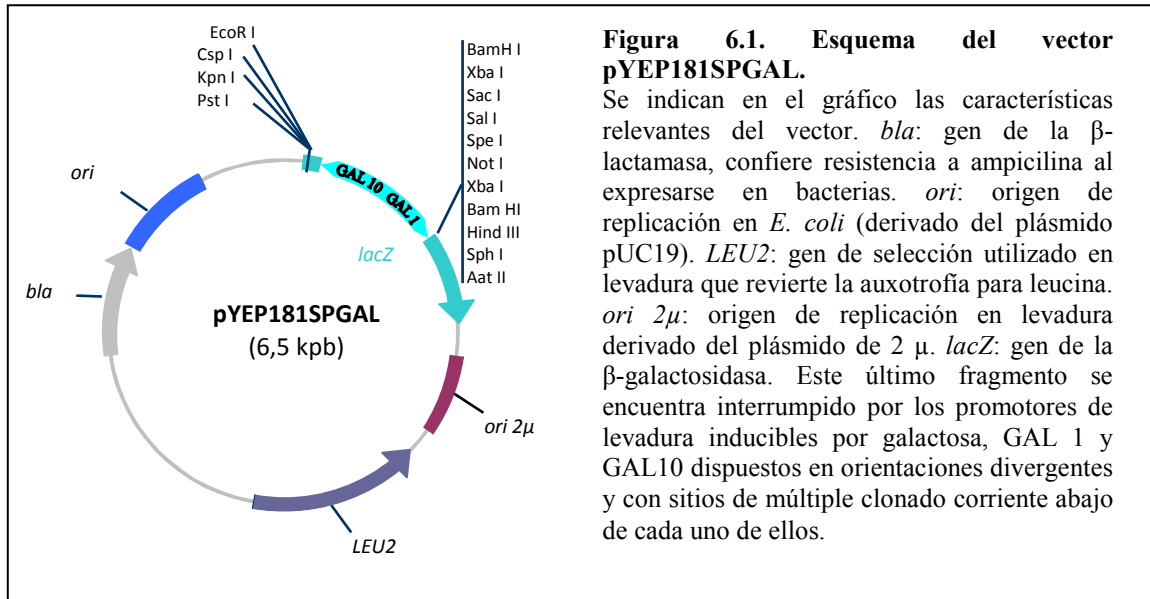
Debido a tales inconvenientes, se optó por utilizar un sistema de expresión en células eucariotas, el cual permite la biosíntesis de proteínas de alto peso molecular. Más aún, el sistema permite la expresión simultánea y en relación estequiométrica de las subunidades que forman el heterodímero (MSH2 y MSH7), a partir de un único plásmido de alto número de copia. Adicionalmente, este sistema podría realizar algunas modificaciones postraduccionales similares, pero no idénticas, a las de plantas (Romanos y col., 1992; Byrne y col., 2005). Debe remarcarse, sin embargo, que el sistema no ofrece las mismas facilidades que los análogos bacterianos en cuanto a la cantidad de proteína heteróloga obtenida. Por lo tanto, la forma más adecuada de evidenciar la expresión de proteínas heterólogas en estos sistemas es mediante inmunodetección.

Otra ventaja del sistema de levaduras empleado es la existencia de marcadores moleculares útiles para realizar medidas de tasas de mutaciones sobre sustratos típicos del MMR. En primer lugar, debe mencionarse los marcadores útiles en medidas de mutaciones por corrimiento del marco de lectura provenientes de desplazamientos de las ADN polimerasas durante la replicación del ADN en secuencias repetitivas. Este tipo de lesiones es uno de los principales sustratos del sistema MMR. Alternativamente, posee un marcador general que evidencia cualquier tipo de mutaciones, útil para estimar la integridad del genoma. En trabajos previos, estos sistemas se utilizaron para evaluar tasas de mutaciones en levaduras deficientes o con el MMR funcional, permitiendo esclarecer diferentes puntos del mecanismo general (Shcherbakova y Kunkel, 1999; Drotschmann y col., 2000). A su vez, se ha empleado este sistema para evaluar los efectos de la expresión de proteínas del MMR pertenecientes a otros organismos, como humanos (Clark y col., 1999).

## **6.2. Plásmidos utilizados en los ensayos con *S. cerevisiae*:**

Se utilizaron plásmidos contruidos a partir del vector de expresión dual de *S. cerevisiae* pYEP181SPGAL. Este vector permite el clonado de dos secuencias codificantes bajo el control de los promotores inducibles por galactosa: GAL1 y GAL10, respectivamente (figura 6.1). Estos promotores se encuentran en orientaciones divergentes y presentan sitios de múltiple clonado corriente abajo de cada uno de ellos. El vector también, consta de un marcador de selección para levadura, *LEU2*, el cual elimina la auxotrofia para leucina, siendo esta una característica de todas las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo. La selección de transformantes se realiza, por lo

tanto, en placas con medio de cultivo sin el agregado de leucina y la expresión de las proteínas clonadas se induce utilizando galactosa.



En un trabajo previo (Gomez, 2007, tesina de licenciatura), se construyeron 3 plásmidos conteniendo las secuencias codificantes para AtMSH2 y AtMSH7. El primero denominado pYEP::M2 posee la secuencia codificante *MSH2* clonada debajo del promotor GAL10. El segundo contiene la secuencia *MSH7* clonada en el sitio de múltiple clonado corriente abajo del promotor GAL1 y se denominó pYEP::M7. El tercero se denomina pYEP::M2-M7 y posee ambas secuencias clonadas bajo los promotores GAL10 y GAL1, respectivamente (figura 6.2). Este último plásmido permite la coexpresión de las dos subunidades de MutSy en relación estequiométrica

1:1. De esta forma, se generó un sistema de tres plásmidos totalmente equivalentes que permiten la expresión de las subunidades de MutS $\gamma$  por separado o de forma conjunta.

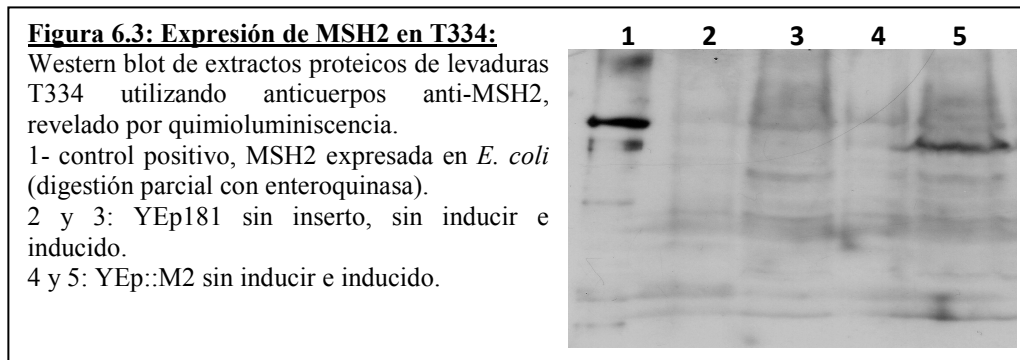
### 6.3. Expresión de AtMSH2 en cepas T334 e YLKL313:

Como primer objetivo, se evaluó la expresión de la subunidad AtMSH2 en cepas de levaduras denominadas T334 e YLKL313. Estas cepas presentan características genotípicas que confieren mayor estabilidad a las proteínas heterólogas expresadas en ellas. A su vez, facilitan la expresión eliminando la represión catabólica por glucosa, común en los sistemas de inducción por galactosa. Brevemente, los sistemas de inducción por galactosa utilizan los promotores denominados GAL, involucrados originalmente en la inducción de la vía metabólica específica para la degradación de galactosa. Esta vía se activa en levaduras sólo cuando se cumplen simultáneamente dos condiciones. En primer lugar, el medio debe contener galactosa y, en segundo lugar, no debe haber glucosa disponible. Este último punto se conoce como represión catabólica por glucosa y presenta una regulación del tipo “encendido-apagado”. Esto significa que, aún disponiendo de altas concentraciones de galactosa, la presencia de muy bajas concentraciones de glucosa logra inhibir la vía evitando la degradación de la galactosa y su posterior utilización como fuente de carbono y energía (Platt y Reece, 1998). Las cepas T334 e YLKL313 poseen una mutación que inactiva la represión catabólica por glucosa (*reg1-501*), permitiendo la expresión de secuencias bajo los promotores tipo GAL aún en presencia de glucosa. Sumado a esta ventaja, las cepas poseen otra mutación sobre uno de los genes necesarios para la degradación de galactosa (*gal1*), de esta forma, las levaduras no pueden consumir este azúcar, manteniéndose su concentración constante durante la inducción. Adicionalmente, estas cepas poseen mutaciones que inactivan dos de las mayores proteasas citosólicas de la levadura (*pep4-3 prb1-1122*) aumentando la estabilidad de las proteínas heterólogas expresadas (Byrne y col., 2005).

Finalmente, cabe destacarse que a diferencia de T334, la cepa YLKL313 contiene el locus *Lys2::InsE-A<sub>4</sub>*, el cual se comentará en detalle más adelante.

Los plásmidos YEp::M2, YEp::M7 y YEp::M2-M7 se electroporaron en ambas cepas. La selección de las células transformantes se realizó en placas de medio mínimo sin leucina, SCDL. A continuación, se realizó la inducción y la extracción proteica desnaturizante como se describe en materiales y métodos. Estos extractos se analizaron luego por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes, seguido

de electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-MSH2 policlonal purificado previamente.



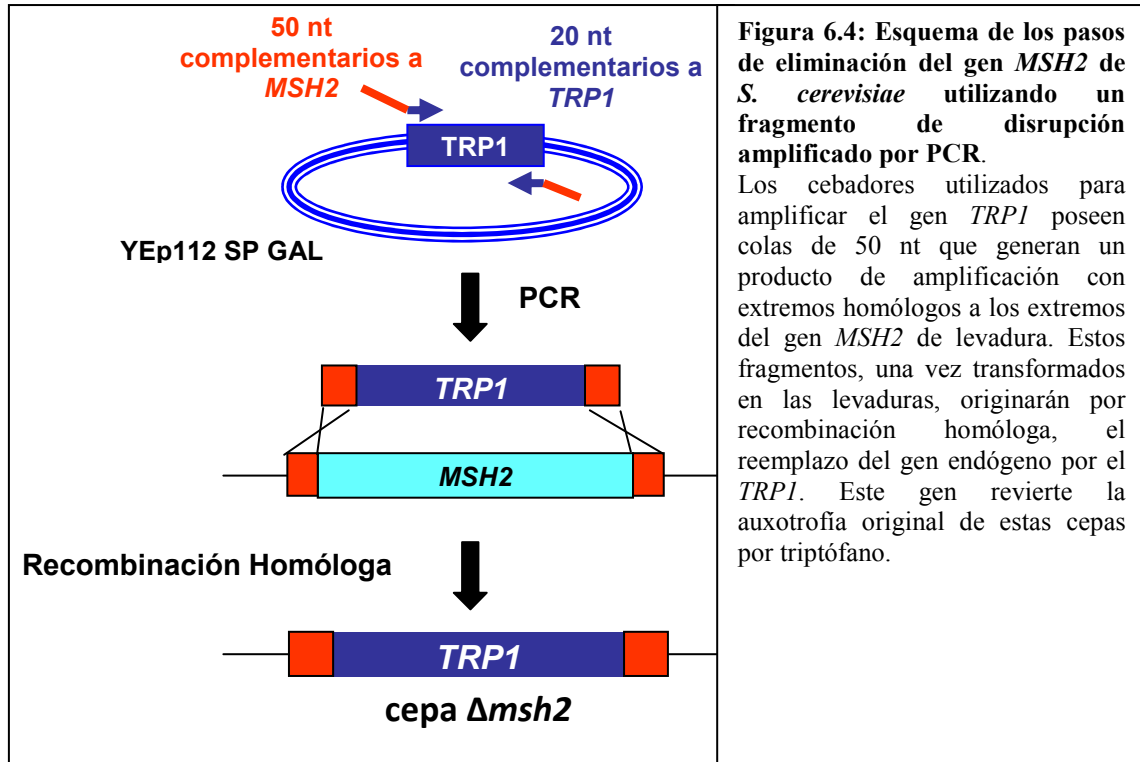
En la figura 6.3 puede observarse una banda inmunoreactiva en la calle conteniendo el extracto proteico de levaduras T334 transformadas con YEp::M2 (calle 5) y la ausencia de la misma en las muestras de extractos de levaduras transformadas con vector vacío (sin inducir e inducido, calles 2 y 3, respectivamente) y con el vector YEp::M2 sin inducir (calle 4). En la calle 1 puede observarse una muestra de AtMSH2 expresada en *E. coli* y purificada. Esta muestra se trató parcialmente con enteroquinasa para eliminar el péptido de fusión codificado por el vector de clonado. Por lo tanto, se observan dos bandas inmunoreactivas principales, la superior corresponde a la proteína sin digerir, mientras que la banda inmediatamente inferior corresponde a la proteína digerida, del peso molecular correcto. Las demás bandas inmunoreactivas que se observan en la figura corresponden a productos inespecíficos y se deben principalmente a la alta sensibilidad que logra el revelado por quimioluminiscencia.

De forma similar, se corroboró la expresión de AtMSH2 de forma recombinante en ambas cepas (T334 e YLKL313) utilizando levaduras transformadas tanto con YEp::M2 como con YEp::M2-M7. En todas estas condiciones se observó una banda inmunoreactiva correspondiente a AtMSH2.

#### 6.4. Disrupción génica de *yMSH2* en *S. cerevisiae* YJKL313. Generación de la cepa YRG313:

En el presente trabajo se originó una nueva cepa de *S. cerevisiae* denominada YRG313, carente del gen endógeno que codifica para yMsh2, mediante disrupción génica. El método de disrupción génica involucra el reemplazo de una secuencia de ADN original en la cepa a modificar, por otra secuencia que, en general, contiene un marcador de selección de las células positivas para la disrupción. Este proceso se lleva a

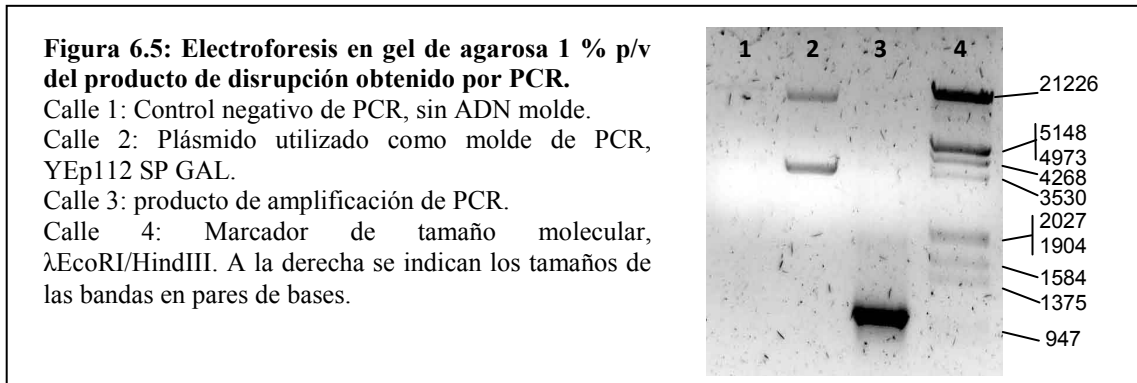
cabo por recombinación homóloga utilizando la maquinaria enzimática propia de la levadura. Para ello, se generaron oligonucleótidos de ADN de aproximadamente 70 residuos de longitud con características especiales. Los 50 nucleótidos situados en los extremos 3' de cada uno de estos cebadores son complementarios a cada uno de los extremos de la secuencia codificante para *MSH2* de *S. cerevisiae* mientras que los 20 nucleótidos restantes son complementarios a los extremos del gen *TRP1* de levadura y se diseñaron con la finalidad de amplificar este fragmento mediante PCR.



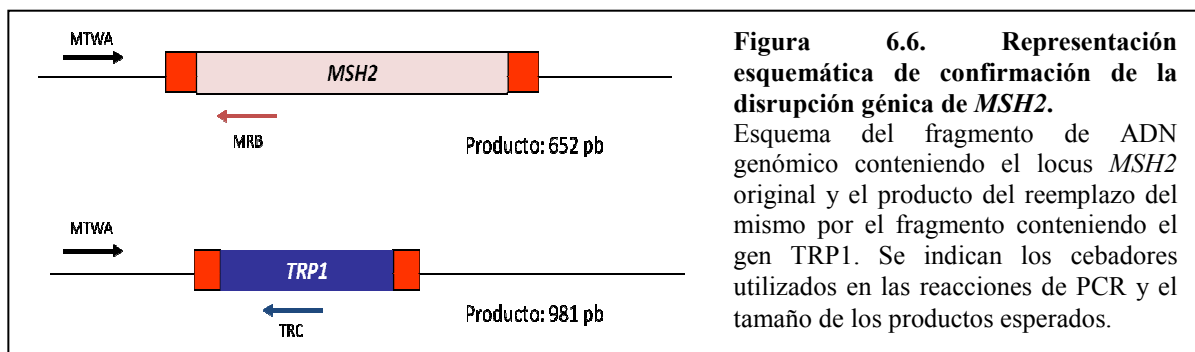
**Figura 6.4:** Esquema de los pasos de eliminación del gen *MSH2* de *S. cerevisiae* utilizando un fragmento de interrupción amplificado por PCR.

Los cebadores utilizados para amplificar el gen *TRP1* poseen colas de 50 nt que generan un producto de amplificación con extremos homólogos a los extremos del gen *MSH2* de levadura. Estos fragmentos, una vez transformados en las levaduras, originarán por recombinación homóloga, el reemplazo del gen endógeno por el *TRP1*. Este gen revierte la auxotrofia original de estas cepas por triptófano.

Con los cebadores confeccionados se amplificó por PCR el gen *TRP1* a partir del plásmido YEp112 SP GAL, como se detalla en la sección materiales y métodos. El fragmento resultante consiste en la secuencia codificante de la proteína Trp1 contenida entre dos fragmentos de 50 nucleótidos a cada lado, homólogos a los extremos 5' y 3' del gen *MSH2* de levadura (figura 6.4). El producto de amplificación, de aproximadamente 1000 pb, se electroporó en levaduras YLKL313. Para ello se requirió ajustar las condiciones de electroporación para obtener una muy buena eficiencia de transformación. Luego de examinar distintos protocolos se utilizó el protocolo descrito en materiales y métodos, adaptado de Suga y Hatakeyama (2003). En la figura 6.5 se observa el producto de PCR obtenido sometido a electroforesis en gel de agarosa.



Las colonias transformantes obtenidas se seleccionaron en placas sin triptófano. Para corroborar la disrupción se generaron también 3 cebadores adicionales de 20 nucleótidos cada uno denominados MTWA, MRB y TRC (figura 6.6). Estos cebadores se utilizaron para realizar PCR de colonia sobre las distintas transformantes obtenidas. De esta forma, se encontraron colonias conteniendo la disrupción, se eligió y se aisló una de estas colonias positivas, denominándose a partir de este momento YRG313.

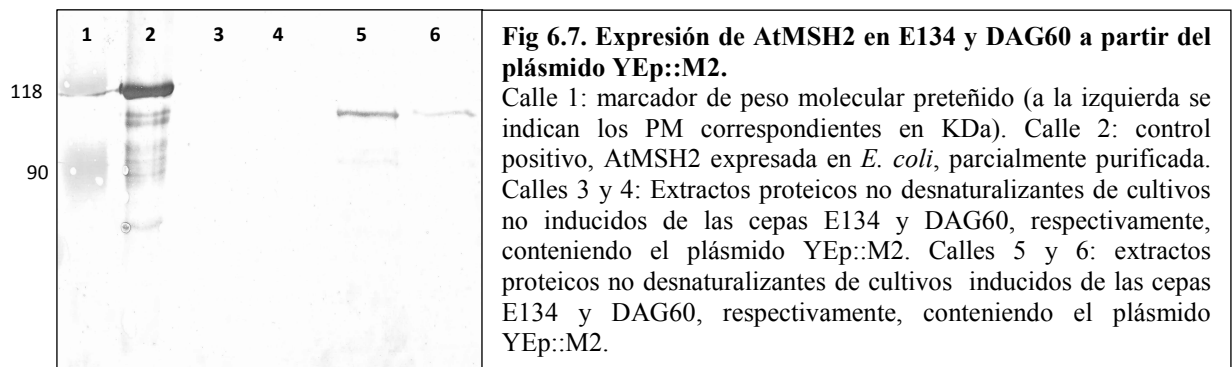


Esta cepa se electroporó con los plásmidos citados previamente y la inducción de la subunidad AtMSH2 se corroboró mediante ensayos de electroforesis e inmunodetección con anticuerpos específicos.

### 6.5. Expresión de AtMSH2 en levaduras E134 y DAG60:

La inducción de AtMSH2 en las cepas E134 y DAG60 se realizó a partir de los plásmidos citados previamente YEp::M2 e YEp::M2-M7. Estas cepas comparten el mismo genotipo (*Mata ade5-1 his7-2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52*) difiriendo únicamente en la presencia (cepa E134) o ausencia (cepa DAG60) del gen endógeno *MSH2*. Por este motivo, la cepa DAG60 es deficiente en el MMR, exhibiendo un fenotipo mutador, como se comentará posteriormente.

Los plásmidos se transformaron en levaduras competentes de las cepas citadas mediante electroporación y se seleccionaron en placas con medio SCDL sólido. Las colonias transformantes obtenidas se utilizaron para ensayos de expresión. Se llevó a cabo la extracción proteica de los cultivos inducidos tanto en condiciones desnaturizantes como no desnaturizantes. Con los extractos obtenidos se realizaron ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida seguido de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra AtMSH2. En todos los casos, se observaron bandas inmunoreactivas del peso molecular correcto para las muestras de cultivos inducidos conteniendo los plásmidos YEp::M2 y YEp::M2-M7. Estas bandas no se evidencian en extractos de cultivos sin inducir conteniendo dichos plásmidos ni en cultivos inducidos de células transformadas con el vector vacío. En la figura 6.7 se muestra uno de estos ensayos realizados en el cual puede observarse la inducción de AtMSH2 en las cepas E134 y DAG60, transformadas con el plásmido YEp::M2. Resultados similares se obtuvieron con estas cepas transformadas con el vector YEp::M2-M7.



### 6.6. Medidas de tasas de mutaciones en levaduras: Ensayos de fluctuación:

Uno de los objetivos planteados al inicio de esta tesis fue la evaluación del grado de conservación del sistema MMR entre *S. cerevisiae* y *A. thaliana*. Para ello, se propuso evaluar el efecto de la expresión de AtMSH2 y AtMSH7, de forma individual o conjunta, en las tasas de mutaciones de cepas de *S. cerevisiae*, deficientes en *MSH2* o con el gen funcional. Para ello, se realizó la determinación de tasas de mutaciones de los marcadores *lys2::InsE-A<sub>4</sub>*, *lys2::InsE-A<sub>14</sub>*, *his7-2* y *CAN1*.

La determinación de tasas de mutaciones se llevó a cabo mediante ensayos de fluctuación. Estos ensayos comienzan con la inoculación de un pequeño número de células en un gran número de cultivos paralelos en medios no selectivos para la



mutación a evaluar. Los mismos, se crecen hasta saturación, y cada uno se siembra en placas conteniendo medios selectivos que sólo permitan el crecimiento de colonias mutantes. Adicionalmente, se determina el número de células totales de cada cultivo. Las placas se incuban hasta aparición de colonias mutantes y se contabiliza el número de las mismas para cada cultivo paralelo. Existen diversos métodos para calcular las tasas de mutaciones haciendo uso de los datos de ensayos de fluctuación basados en la distribución de probabilidad de Luria y Delbrück (Luria y Delbrück, 1943). Es importante notar, que la generación de mutaciones espontáneas en condiciones no selectivas es un proceso estocástico, sólo guiado por factores aleatorios. De esta forma, el número de mutaciones que ocurre en una célula es un valor discreto, y por lo tanto, la probabilidad asociada a este evento se describe mediante una distribución de Poisson. Sin embargo, el número de células mutantes por cultivo variará enormemente en cuanto las mutaciones se hayan producido al comienzo del crecimiento del cultivo o en estadios posteriores. En el primer caso, el cultivo presentará un alto número de células mutantes mientras en el segundo caso, el número de colonias mutantes contadas será menor. La distribución del número de mutantes en los cultivos paralelos se utiliza para calcular las tasas de mutaciones mediante algoritmos matemáticos basados en la distribución probabilística desarrollada por Luria y Delbrück (1943). En el presente trabajo se utilizaron alternativamente dos de ellos. En primer lugar el “método de la mediana”, desarrollado por Lea-Coulson (Lea y Coulson, 1949) y en segundo lugar el “algoritmo MSS”, denominado de esta forma en honor a sus creadores, Ma-Sandri-Sarkar (Ma y col. 1992, Sarkar y col., 1992). Este último es el mejor método para calcular tasas de mutaciones (Foster, 2006), sin embargo, se basa en la suposición inicial de que todos los cultivos tienen el mismo número de células totales. Este hecho, muchas veces no se alcanza en la práctica, impidiendo la utilización del citado algoritmo. En tales casos, el método de la mediana, siendo más robusto y no requiriendo necesariamente igualdad de células totales entre los cultivos, resulta de mayor utilidad. En el presente trabajo, se utilizó la plataforma informática FALCOR (Fluctuation Analysis Calculator, <http://www.keshavsingh.org/protocols/FALCOR.html#interface>) que permite el cálculo de las tasas de mutaciones por cualquiera de los métodos matemáticos señalados anteriormente (Hall y col., 2009)

### 6.6.1. Ensayos de reversión en YLKL313 e YRG313:

Como se comentó previamente, las cepas T334, YLKL313 y su derivada YRG313, poseen características de interés para la expresión de proteínas heterólogas. Sin embargo, poseen una diferencia destacable, la cepa YLKL313 contiene un gen mutante *lys2::InsE-A<sub>4</sub>* que la convierte en auxótrofa para lisina, el mismo también se encuentra en YRG313, la cual es genótipicamente equivalente a la cepa anterior pero deficiente en el MMR. Este locus, *lys2::InsE-A<sub>4</sub>*, posee una inserción denominada *InsE* dentro de la secuencia *lys2*. Dentro de esta secuencia *InsE* existe un grupo de 4 adeninas en tándem que se presenta como un sitio de alta probabilidad para inserciones o supresiones de nucleótidos. Este tipo de errores se originan durante la replicación del ADN debido al desplazamiento de la ADN polimerasa, con el consecuente corrimiento del marco de lectura. Al producirse una eliminación de un nucleótido o inserción de 2 nucleótidos dentro del fragmento *InsE-A<sub>4</sub>*, se reestablece el marco de lectura y puede expresarse *Lys2* de forma funcional, revirtiendo la auxotrofia para lisina (Tran y col., 1995). Esta característica hace que el locus descrito pueda utilizarse como marcador en ensayos de medidas de mutaciones del tipo de corrimiento del marco de lectura. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que debido a la pequeña longitud de la repetición de nucleótido de adenina, este marcador resulta muy poco sensible.

Se realizaron ensayos de fluctuación con el objetivo de estimar tasas de reversión del marcador *lys2::InsE-A<sub>4</sub>* al inducir las proteínas MSH2 y MSH7 de *A. thaliana*. En primer lugar, se ensayó la cepa YLKL313 transformada con el vector vacío (YEp181) o con los plásmidos YEp::M2 y YEp::M2-M7. En este caso, las tasas de mutaciones calculadas fueron extremadamente bajas, en el orden de  $10^{-10}$  mutaciones por generación para todas las condiciones ensayadas. Paralelamente, se llevaron a cabo ensayos de fluctuación con la cepa generada en el presente trabajo, YRG313, que carece del gen funcional endógeno de *MSH2* (Tabla 6.1). En este caso, se ensayaron levaduras transformadas con el vector vacío y con el plásmido YEp::M2, únicamente. El objetivo fue determinar la posible complementación de la proteína AtMSH2 en levaduras mutantes en el gen endógeno. Las tasas de mutaciones resultantes no mostraron diferencias significativas entre levaduras conteniendo el vector vacío o expresando AtMSH2 a partir del plásmido transformado. Los valores obtenidos resultaron mayores que los obtenidos con YLKL313, en el orden de  $10^{-9}$  mutaciones/generación celular. Este hecho es cotejable con la falta del producto funcional MSH2, produciendo una

abolición del sistema MMR en esta cepa. Los cálculos se realizaron mediante el método de la mediana de Lea-Coulson.

**Tabla 6.1. Tasas de mutaciones para cepas YLKL313 e YRG313**

CEPA	PLÁSMIDO	Mutaciones /generación ( $\times 10^{-10}$ )	IC ( $\times 10^{-10}$ )
YLKL313	YEp181	5,63	1,66 ; 9,68
YLKL313	YEp::M2	2,79	0; 5,63
YLKL313	YEp::M2-M7	2,79	0; 5,63
YRG313	YEp181	26,70	17,93; 35,88
YRG313	YEp::M2	29,90	20,59; 39,67

IC: intervalo de confianza del 95 %.

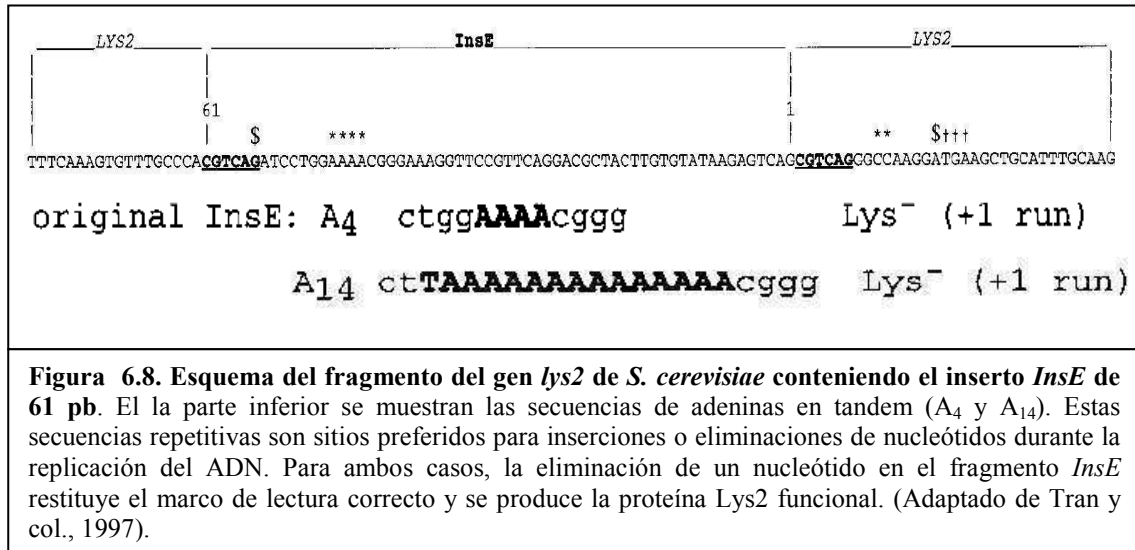
Estas tasas de mutaciones extremadamente bajas hacen a este sistema poco sensible para medir mutaciones e impone gran cantidad de impedimentos prácticos. Debido a esto, se decidió elegir nuevas cepas con nuevos marcadores genéticos de mayor sensibilidad que permitiesen la determinación de tasas de mutaciones confiables y comparables para distintas condiciones. Sin embargo, con los resultados obtenidos puede inferirse que *AtMSH2* no complementa la cepa YRG313 en las condiciones ensayadas.

#### 6.6.2. Determinación de las tasas de mutaciones en cepas E134 y DAG60:

Las cepas de levaduras E134 y DAG60 son genotípicamente similares con la diferencia de que DAG60 es deficiente en el sistema MMR. De esta manera, estas cepas posibilitan la realización de estudios sobre mutaciones en entornos genéticos idénticos con el sistema MMR funcional o no funcional, respectivamente.

Ambas cepas poseen 3 marcadores útiles para la estimación y comparación de las tasas de mutaciones. El primero de ellos se denomina *lys2::InsE-A<sub>14</sub>* y al igual que el reportero *lys2::InsE-A<sub>4</sub>* comentado anteriormente, posee una inserción dentro del alelo *lys2* que produce un corrimiento del marco de lectura generando un codón de terminación de la traducción prematuro (Figura 6.8). De esta forma, no puede sintetizarse el producto funcional, por lo que las cepas son auxótrofas para lisina y no pueden crecer en medios de cultivo sin agregado del aminoácido mencionado. Sin embargo, en este caso la inserción posee 14 nucleótidos de adenina en tándem en la región *InsE* que lo hacen altamente mutagénico y, por lo tanto, altamente sensible. Este

marcador, revierte por la eliminación de un nucleótido o la inserción de dos nucleótidos en la secuencia de 14 adenosinas consecutivas (Tran y col., 1997).

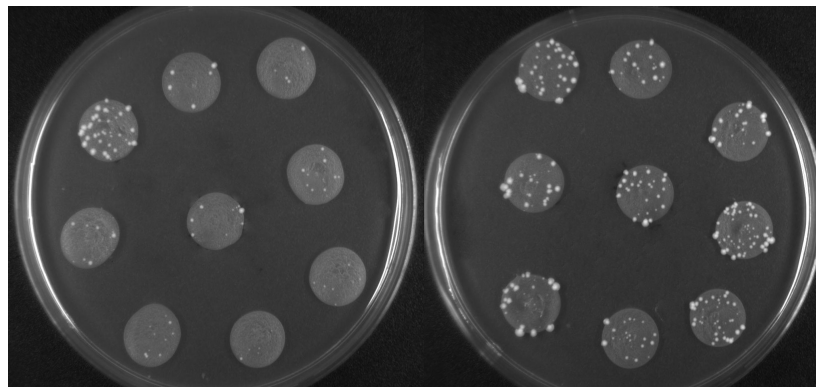


Otro de los reporteros de estas cepas es el locus *his7-2*, el cual se produjo originalmente debido a la pérdida de un nucleótido de adenina en una zona de 8 adeninas en tándem presentes en el locus salvaje *HIS7*. El alelo mutante *his7-2* revierte espontáneamente vía inserción de un nucleótido o eliminación de dos nucleótidos en una zona de 43 pares de bases que incluyen las 7 adeninas en tándem, revirtiendo la auxotrofia para histidina (Shcherbakova y Kunkel, 1999). Las revertantes, por lo tanto, se seleccionan en placas con medio sintético que no contiene histidina.

A diferencia de estos dos marcadores mencionados, que se utilizan para cuantificar tasas de reversión, el tercer reportero permite evaluar mutaciones espontáneas directas. El sistema se basa en la adquisición de resistencia al análogo de arginina denominado canavanina. Este compuesto resulta tóxico al ser transportado dentro de la levadura por el transportador selectivo de arginina, codificado por el gen *CAN1*. Debido a ello, cualquier mutación con pérdida de función de este gen (*can1*) generará el fenotipo denominado Can<sup>r</sup> y serán capaces de crecer en medios suplementados con dicho compuesto. El ensayo utilizando este marcador permite evaluar cualquier tipo de mutación directa sobre este gen, que produzca la inactivación funcional del mismo. La selección de mutantes se realiza en placas conteniendo medio sintético sin arginina suplementado con canavanina.

En todos los casos se sembraron 9 o 6 cultivos de 100 o 200 µl, respectivamente, en cada placa de Petri conteniendo el medio selectivo, según el marcador. Los cultivos líquidos se sembraron cuidadosamente como gotas de 1 cm de diámetro

aproximadamente. De esta forma, se pueden evaluar entre 6 a 9 cultivos paralelos en la misma placa, disminuyendo en gran medida el número de placas utilizadas. Luego de 4 o 5 días de crecimiento se evidencian las colonias mutantes sobre el crecimiento basal de cada pequeño cultivo. Estas colonias provienen de células que han adquirido la mutación durante el crecimiento previo al plaqueo. A modo de ejemplo, en la figura 6.9, se muestran 2 placas utilizadas en un ensayo de fluctuación. En este caso, ambas placas contienen medio sintético suplementado con canavanina. A la derecha, se muestra una placa sembrada con 9 cultivos paralelos de la cepa E134 conteniendo el plásmido YEp181 vacío. A la izquierda, se observan 9 cultivos líquidos similares correspondientes a la cepa E134 transformada con el vector YEp::M2-M7. Puede observarse a simple vista que los cultivos provenientes de la cepa que expresa MSH2 y MSH7 de *A. thaliana* presentan mayor número de colonias resistentes a canavanina en cada cultivo individual en comparación con la cepa con el vector vacío. Más adelante se comentará en detalle este resultado.



**Fig.6.9.** Ejemplo de un ensayo de fluctuación en placas suplementadas con canavanina utilizando la cepa E134 transformada con YEp181 (izquierda) o YEp::M2-M7 (derecha).

#### 6.6.2.1. Efecto de AtMSH2 y AtMSH7 sobre tasas de mutaciones en cepas E134:

En primer lugar, se evaluó el efecto de la expresión de las subunidades AtMSH2 y AtMSH7, expresadas individual o conjuntamente, sobre las tasas de mutaciones en la cepa E134. Para ello se realizaron ensayos de fluctuación para los tres marcadores comentados previamente. La descripción metodológica completa se encuentra en la sección correspondiente de materiales y métodos. El número de revertantes por cultivos paralelos independientes obtenidos por este método y el número de células totales se utilizaron finalmente para obtener las tasas de mutaciones expresadas como mutaciones

por generación celular. Estas tasas se compararon luego para determinar diferencias significativas al expresar las distintas subunidades en las levaduras.

En la tabla 6.2 se detallan los valores obtenidos para el marcador *lys2::InsE-A<sub>14</sub>* al expresar las distintas subunidades de AtMutS $\gamma$  de forma independiente o conjunta. Las comparaciones se realizaron utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, con un nivel de confianza establecido en 95 %. De esta forma, se determinó que al expresar las subunidades AtMSH2 y AtMSH7, por separado o de forma conjunta, no se observan cambios en las tasas de mutaciones respecto a levaduras que no expresan ninguna de las proteínas heterólogas. Esto significa que la expresión de estas proteínas no afecta la reparación de los errores del tipo inserción o eliminación de nucleótidos en secuencias repetitivas de adeninas contiguas.

**Tabla 6.2. Tasas de mutaciones en cepa E134 para el marcador molecular *lys2::InsE-A<sub>14</sub>*.**

<b>Plásmido transformado</b>	<b>M (x 10<sup>-7</sup> mutaciones / generación)</b>	<b>IC 95 % (x 10<sup>-7</sup> mutaciones / generación)</b>
YE <sub>p</sub>	0,329	(0,0849 ; 0,6796)
YE <sub>p</sub> :: M2	0,4094	(0,1157 ; 0,8237)
YE <sub>p</sub> :: M7	0,5714	( 0,1895; 1,092)
YE <sub>p</sub> :: M2 - M7	0,5136	(0,1529 ; 1,017)

M: tasa de mutaciones por generación celular. IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %.

Los resultados para el marcador *his7-2* se detallan en la tabla 6.3. Al evaluarse mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis, pudo determinarse que las tasas de mutaciones para este marcador tampoco son estadísticamente diferentes indicando que la expresión de las proteínas de Arabidopsis no afecta la tasa de reversión de *his7-2*.

**Tabla 6.3. Tasas de mutaciones en cepa E134 para el marcador molecular *his7-2*.**

<b>Plásmido transformado</b>	<b>M (x 10<sup>-9</sup> mutaciones / generación)</b>	<b>IC 95 % (x 10<sup>-9</sup> mutaciones / generación)</b>
YE <sub>p</sub>	3,2594	(1,2706 ; 9,94)
YE <sub>p</sub> :: M2	3,5917	(2,1241 ; 13,5558)
YE <sub>p</sub> :: M7	3,03	(2,3101 ; 12,9642)
YE <sub>p</sub> :: M2 - M7	3,8842	(0,5758 ; 12,97)

M: tasa de mutaciones por generación celular. IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %.

Cabe destacarse, que estos dos loci se denominan marcadores de reversión debido a que permiten observar sólo mutantes generadas por la reversión de un locus mutante, no funcional, producida por la inserción o eliminación de nucleótidos en una zona rica en adeninas consecutivas. Adicionalmente, es importante advertir la diferencia en la sensibilidad de ambos marcadores. El marcador *lys2::InsE-A<sub>14</sub>* es altamente sensible siendo sus tasas de mutaciones alrededor de 2 órdenes de magnitud mayores que para *his7-2*. Este hecho condice con la diferencia en extensión de la zona de alta probabilidad de desplazamiento de las polimerasas, constituido por el sitio de adeninas consecutivas. El primero de los locus contiene 14 adeninas, mientras el segundo contiene la mitad. Este hecho, lejos de correlacionarse de forma lineal con los valores, está en íntima concordancia con las tendencias halladas.

A diferencia de los reporteros de reversión previamente comentados, el locus *CANI* constituye un marcador de mutaciones directo. Permite cuantificar cualquier tipo de mutación que produzca la pérdida de funcionalidad del producto génico. Como resultado de esta característica, este marcador presenta un espectro de funcional mayor.

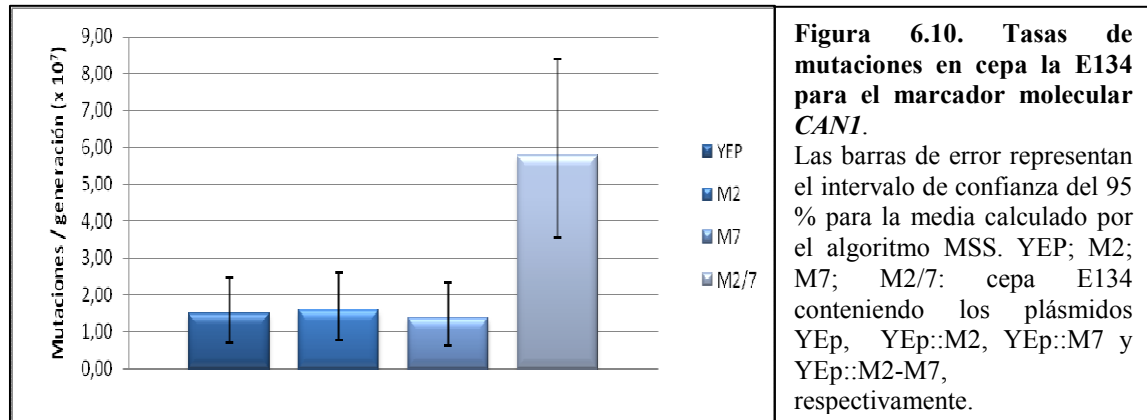
La tabla 6.4 muestra los valores de tasas de mutaciones obtenidas para el marcador *CANI*. Los mismos datos se representan en un grafico de barras en la figura 6.10.

**Tabla 6.4. Tasas de mutaciones en cepa E134 para el marcador molecular *CANI*.**

Plásmido transformado	M (x 10 <sup>-7</sup> mutaciones / generación)	IC 95 % (x 10 <sup>-7</sup> mutaciones / generación)
YEp	1,5029	(0,7132 ; 2,4934)
YEp :: M2	1,5764	(0,7476 ; 2,6160)
YEp :: M7	1,3714	(0,6252 ; 2,3167)
YEp :: M2 - M7	5,7818	(3,561 ; 8,3805)

M: tasa de mutaciones por generación celular. IC 95 %, intervalo de confianza del 95 %.

En este caso, puede observarse un aumento de la tasa de mutación de aproximadamente 4 veces al expresar ambas subunidades del complejo MutSy con respecto al control (YEp), que no es evidente al expresar las subunidades por separado.



En resumen, bajo el contexto de la cepa E134, que posee el MMR funcional, los marcadores de reversión no muestran ningún cambio respecto al control, ni tampoco *CANI* al expresar las subunidades AtMSH2 y AtMSH7 por separado. Sin embargo, la expresión conjunta de estas subunidades aumenta alrededor de 4 veces la tasa de mutaciones para el marcador *CANI*.

#### 6.6.2.2. Efecto de AtMSH2 y AtMSH7 sobre las tasas de mutaciones en cepas DAG60

Se evaluaron las tasas de mutaciones en la cepa DAG60 de forma similar a lo descrito previamente para la cepa E134. Es importante recordar que, en este caso, el sistema MMR de la levadura no se encuentra funcional debido a la ausencia de MSH2 endógena. Este hecho conlleva a observar tasas de mutaciones marcadamente más altas para cada uno de los marcadores. Ha sido previamente reportado que esta cepa deficiente en el MMR posee tasas de mutaciones para el marcador *lys2::InsE-A<sub>14</sub>* unas 10.000 veces mayores que la cepa E134 (Tran y col., 1997). De forma similar, el marcador *his7-2* muestra una tasa 200 veces mayor que en la cepa DAG60 (Shcherbakova y col., 2001). A partir de tales observaciones, se ratifica la función del sistema MMR para corregir lesiones que producen corrimientos del marco de lectura. Paralelamente, el marcador *CANI* muestra un aumento de aproximadamente 10 veces en la tasa de mutaciones en la cepa DAG60 con respecto a la cepa E134. En este caso el aumento no es tan evidente debido a que este marcador contabiliza cualquier tipo de mutaciones directas y no posee un sitio de alta probabilidad mutagénica, como son las secuencias repetitivas de adenina en los de genes reporteros anteriores.

Los resultados obtenidos para esta cepa indican que no hay diferencias significativas para ninguno de los marcadores genéticos al expresar las proteínas de



Arabidopsis. En la tabla 6.5 se muestran los valores obtenidos con cada marcador. De estos resultados podemos destacar principalmente la falta de complementación de las levaduras mutantes en *MSH2* con el ortólogo de *A. thaliana*. Adicionalmente, no se observa para ningún marcador cambios significativos en las tasas de mutaciones al expresar las subunidades AtMSH2 y AtMSH7 de forma independiente o conjunta.

**Tabla 6.5. Tasas de mutaciones en la cepa DAG60 para cada marcador molecular.**

Plásmido	Marcador molecular					
	<i>lys2::InsE-A<sub>14</sub></i>		<i>his7-2</i>		<i>CAN1</i>	
	M (x 10 <sup>-3</sup> )	IC 95 % (x 10 <sup>-3</sup> )	M (x 10 <sup>-7</sup> )	IC 95 % (x 10 <sup>-7</sup> )	M (x 10 <sup>-6</sup> )	IC 95 % (x 10 <sup>-6</sup> )
<b>YEp</b>	3,40	1,61 ; 5,66	4,62	2,68 ; 6,93	1,81	1,13 ; 2,61
<b>YEp :: M2</b>	1,42	0,27 ; 3,16	4,06	2,38 ; 6,04	2,22	1,41 ; 3,15
<b>YEp :: M7</b>	1,23	0,19 ; 2,87	3,22	1,80 ; 4,93	2,03	1,22 ; 2,99
<b>YEp :: M2-M7</b>	3,04	0,66 ; 6,58	3,43	1,98 ; 5,16	2,25	1,29 ; 3,38

M: tasa de mutaciones por generación celular. IC 95 %: intervalo de confianza del 95 %.

## 6.7. Confirmación de la formación del complejo funcional AtMutSy expresado de forma heteróloga

Ante los resultados obtenidos de los ensayos de fluctuación, se estudió la formación *in vivo* del complejo funcional AtMutSy. Cabe recordarse que no se cuenta con anticuerpos útiles para la detección de AtMSH7, por lo tanto, se realizaron diversos enfoques metodológicos para llevar a cabo el objetivo planteado. Las secciones siguientes describen los ensayos realizados.

### 6.7.1. Electroforesis no desnaturizante seguida de electrotransferencia e inmunodetección

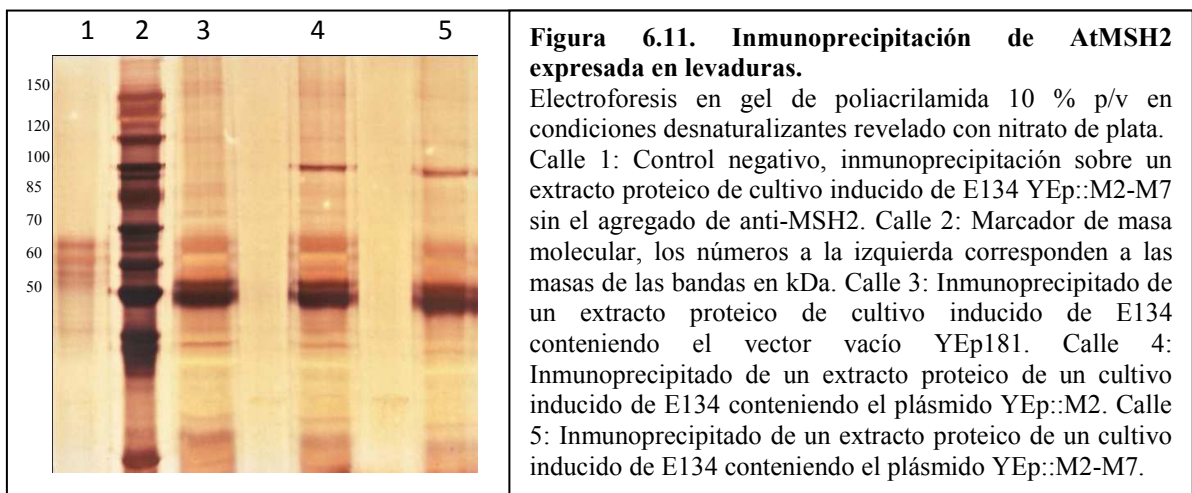
En primer lugar, se intentó corroborar la formación del complejo por comparación de muestras provenientes de extractos proteicos obtenidos en condiciones no desnaturizantes mediante electroforesis no desnaturizante seguida de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos anti-MSH2. Se ensayaron muestras provenientes de cultivos inducidos conteniendo los vectores YEp181 (vacío), YEp::M2 y YEp::M2-M7, respectivamente. Sin embargo, a diferencia de los ensayos similares de electrotransferencia e inmunodetección sobre muestras desnaturizadas, en este caso, las bandas obtenidas resultaron difusas y no mostraron patrones diferenciales

entre las distintas muestras. Los ensayos se repitieron variando diversas condiciones sin obtenerse en ningún caso resultados satisfactorios. Debido a esto, se utilizaron otras metodologías para lograr el objetivo propuesto.

### 6.7.2. Inmunoprecipitación del complejo AtMSH2-AtMSH7 expresado en *S. cerevisiae* seguido del análisis mediante espectroscopía de masa de tipo MALDI-TOF-TOF.

Para los ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales anti-AtMSH2 se utilizaron extractos celulares realizados en condiciones no desnaturizantes de cultivos inducidos de levaduras E134 transformadas con el vector YEp::M2-M7, como se describe en materiales y métodos. Como controles se utilizaron extractos similares transformados con el vector vacío o con el plásmido YEp::M2, controles negativo y positivo respectivamente.

Los productos de la inmunoprecipitación se sometieron a electroforesis en gels de poliácridamida y se revelaron por tinción con azul de Coomasie o, alternativamente, con nitrato plata, el cual es un método de revelado altamente sensible. En la figura 6.11 se observa el resultado de uno de estos ensayos.



Como se observa en la figura 6.11, se logró exitosamente la inmunoprecipitación de la proteína AtMSH2, de aproximadamente 105 kDa, a partir de extractos proteicos de cultivos de levaduras que expresan AtMSH2, a partir del plásmido YEp::M2, o ambas proteínas AtMSH2 y AtMSH7, a partir de YEp::M2-M7 (calles 4 y 5, respectivamente). La banda correspondiente a esta subunidad no se evidencia en inmunoprecipitaciones realizadas sobre extractos de levaduras que expresan AtMSH2 y AtMSH7 llevadas a

cabo en ausencia de anticuerpos (control negativo, calle 1), ni con extracto proteico de un cultivo inducido conteniendo el vector vacío YEp181 (control negativo, calle 3). Al comparar las calles 4 y 5, no se observan bandas de mayor masa molecular que pudieran corresponder a la subunidad MSH7 (aproximadamente 120 kDa). Por esta razón, se repitieron las inmunoprecipitaciones variando algunas condiciones de modo de disminuir la astringencia durante el ensayo. Principalmente, se varió la concentración del detergente no iónico utilizado en los lavados del inmunocomplejo. Sin embargo, al disminuir la concentración original de detergente, se obtuvieron calles saturadas de impurezas en las corridas electroforéticas que imposibilitaron la comparación deseada.

Los resultados de estos ensayos promovieron la selección de un nuevo método altamente sensible para la determinación ontogénica de proteínas, conocido como espectroscopía de masas. Para ello, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % p/v en condiciones desnaturalizantes de muestras obtenidas por inmunoprecipitación, seguido de tinción con azul de Coomasie. Las muestras se obtuvieron por inmunoprecipitación de un extracto proteico de un cultivo que expresa conjuntamente AtMSH2 y AtMSH7, y anticuerpos policlonales anti-AtMSH2, como se describió previamente. Se escindieron fragmentos del gel de aproximadamente 5 mm de ancho y 1 mm de alto desde la banda correspondiente a AtMSH2 hacia la sección superior. De esta forma, con los distintos fragmentos se abarcó la zona del gel de masa molecular correspondiente desde 100 kDa hasta 150 kDa. Estos fragmentos se enviaron a continuación al servicio del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectroscopía de Masa MALDI-TOF-TOF (Cequibiem, Departamento de Química Biológica, Fac. Ciencias exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires). Los resultados de estos estudios confirmaron la identidad de la subunidad AtMSH2 inmunoprecipitada, sin embargo, no logró detectarse señal correspondiente al péptido de interés, AtMSH7.

### **6.7.3. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)**

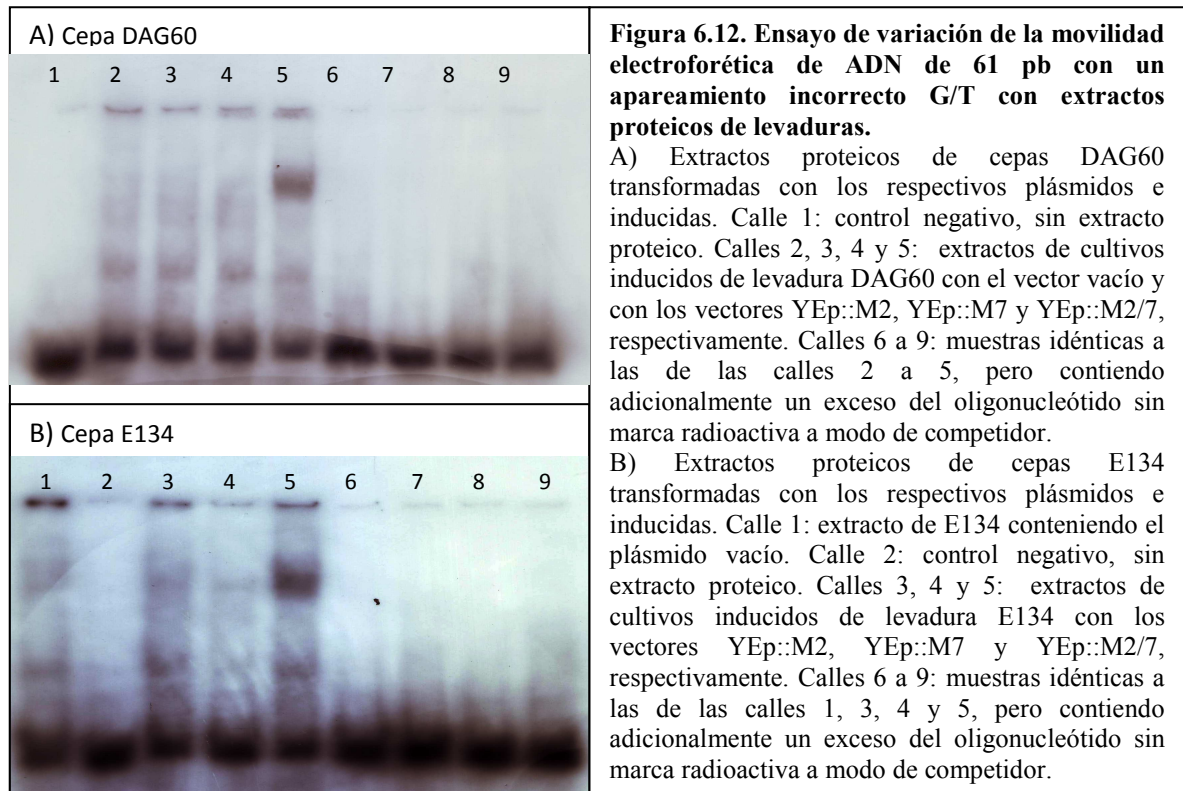
Finalmente, para confirmar la interacción entre AtMSH2 y AtMSH7 expresadas de forma conjunta en levaduras se realizaron ensayos de cambios de la movilidad electroforética con los extractos proteicos no desnaturalizantes obtenidos como se describe en materiales y métodos.

Para estos ensayos, se utilizó ADN de 61 pares de bases que presenta un apareamiento incorrecto en la posición 31 del tipo G/T. Previamente, fue reportado que

este tipo de lesión es reconocida por el dímero AtMSH2-AtMSH7 expresado *in vitro* (Wu y col., 2003). Este ADN utilizado como prueba se marcó en los extremos 5' con fosforo radiactivo ( $^{32}\text{P}$ ). La metodología empleada se describe con detalle en la sección correspondiente de materiales y métodos. Brevemente, idénticas cantidades de ADN marcado radiactivamente se incubaron en hielo durante 1 hora con los distintos extractos proteicos obtenidos de forma no desnaturalizante. Se emplearon extractos de cultivos inducidos de levaduras E134 y DAG60, transformadas con YEp vacío, YEp::M2; YEp::M7 y YEp::M2/7. Las muestras se sometieron luego a electroforesis no desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 5 % p/v, los cuales se revelaron por autoradiografía.

En la figura 6.12-A, se observa uno de estos ensayos realizado con extractos provenientes de cepas DAG60. En el mismo, se evidencia una banda de movilidad diferencial en la muestra correspondiente al extracto que expresa AtMSH2 y AtMSH7 conjuntamente (calle 5). Esta banda no es visible en el control negativo sin extracto proteico (calle 1), en las muestras correspondientes a extractos proteicos de cultivos inducidos con el vector YEp181 vacío (calle 2), ni en las provenientes de cultivos inducidos que expresan AtMSH2 (calle 3) y AtMSH7 (calle 4) de forma individual. Adicionalmente, se presentan en las calles 6 a 9, muestras idénticas a las de las posiciones 2 a 5 pero conteniendo un exceso de 1.000 veces del oligonucleótido sin marca radiactiva. Allí puede observarse la desaparición de las bandas de retraso, tanto inespecíficas como la correspondiente a AtMSH2-AtMSH7. Este tipo de control indica de forma indirecta que el retraso producido en todos los casos se debe específicamente a la interacción de los productos contenidos en los extractos con el ADN marcado. Cabe mencionarse que en todos los casos las mezclas de reacción contienen un exceso similar de ADN doble hebra para evitar retrasos inespecíficos, de esta forma, puede asegurarse que el único factor que produce el retraso diferencial sea el apareamiento incorrecto de bases G/T y no interacciones inespecíficas con el ADN doble hebra.

Ensayos similares a éste realizados con la cepa E134 arrojaron resultados exactamente equivalentes, revelando una banda de movilidad diferencial únicamente con la muestra del cultivo que expresa el dímero AtMSH2-AtMSH7, como puede observarse en la figura 6.12-B.



Finalmente, se evidencia que sólo los extractos provenientes de cultivos que expresan simultáneamente AtMSH2 y AtMSH7 originan una banda de movilidad diferencial única, la cual proviene, de la interacción del dímero AtMSH2-AtMSH7 con el ADN conteniendo el apareamiento incorrecto G/T. Las demás bandas que se observan con baja intensidad corresponden posiblemente a interacciones inespecíficas del ADN marcado con productos proteicos presentes en las muestras.

### 6.8. Estimación del espectro de mutaciones en el locus *CAN1* producido por la expresión heteróloga de AtMSH2-AtMSH7:

Se diseñó un ensayo para evaluar el tipo de mutaciones que produce la expresión conjunta de las subunidades de AtMutS $\gamma$  en el locus *CAN1* de levaduras E134. Cabe recordarse que, *CAN1* es un marcador directo para cualquier tipo de mutaciones. Como se comentó anteriormente, la expresión de AtMSH2-AtMSH7 produce un aumento en la tasa de mutaciones de este marcador pero no altera los valores de las tasas de mutaciones de marcadores de lesiones del tipo de corrimiento del marco de lectura en la cepa E134, poseyendo el sistema MMR funcional.

El presente ensayo consistió en la secuenciación de la región de ADN del gen *can1* de colonias mutantes producidas al expresar AtMSH2-AtMSH7 y la posterior

comparación con células mutantes *can1* generadas en condiciones control en cepas transformadas con el vector vacío (YEp181). De esta forma, se pueden establecer los espectros mutacionales en ambas condiciones y realizar comparaciones entre los mismos.

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de fluctuación para el marcador *CANI*, como se describió previamente. A continuación, se repicaron 24 colonias mutantes provenientes de cultivos que expresan AtMSH2-AtMSH7 y 24 colonias de cultivos control conteniendo el plásmido vacío, en nuevas placas SCDL conteniendo canavanina. Con estos repiques se inocularon cultivos de 5 ml en SCDL que se crecieron a saturación. Se extrajo ADN de cada cultivo y el mismo se utilizó para realizar PCR del fragmento que contiene el locus de interés. Para ello, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos de modo de amplificar la zona deseada en dos fragmentos que se solapan hacia la región central del gen. Los mismos se denominan A y B y poseen una longitud de 1386 y 1438 pb, respectivamente. Los fragmentos se solapan en 936 pb hacia el final del primero y el principio del segundo. De esta forma se cubre la totalidad de la secuencia *CANI*, de 1773 pb, y parte de las secuencias contiguas al gen, abarcando en total 1888 pb (figura 6.13).

```

GTTCTCAGACTTCTTAACCTCTGTAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCATAGCAatgACAAAATTCAAAAGAAGACGCCGACATAGAGGAGAA
GCATATGTACAATGAGCCGGTCACAACCCTCTTTCACGACGTTGAAGCTTCACAAACACACCACAGACGTGGGTCAATACCATTGAAAAGAT
GAGAAAAGTAAAGAATTGTATCCATTGCGCTCTTTCCCGACGAGAGTAAATGGCGAGGATACGTTCTCTATGGAGGATGGCATAGGTGATG
AAGATGAAGGAGAAGTACAGAACGCTGAAGTGAAGAGAGAGCTTAAGCAAAGACATATTGGTATGATTGCCCTTGGTGGTACTATTGGTAC
AGGCTTTTTCATTGGTTTATCCACACCTCTGACCAACGCCGGCCAGTGGCGCTCTTATATCATATTTATTTATGGGTTCTTTGGCATATTCT
GTCACGCAGTCTTTGGGTGAAATGGCTACATTCACCTGTTACATCCTCTTTCACAGTTTTCTCACAAAGATTCTTTTCCAGCATTGGGTG
CGGCAATGGTTACATGTATTGGTTTTCTTGGCAATCACTTTTGCCCTGGAAGCTTAGTGTAGTTGGCCAAGTCATCAATTTTGGACGTACA
AAGTTCACCTGGCGCATGGATTAGTATTTTTGGGTAATTATCAACAATAATGAAGTGTCCCTGTCAAATATTACGGTGAATTCGAGTTCT
GGGTCGCTTCCATCAAAGTTTTAGCCATTATCGGGTTTTCTAATACTGTTTTTGTATGGTTTGGTGTGGGGTTACCGGCCAGTTGGAT
TCCGTTATTGGAGAAAACCCAGGTGCCTGGGGTCCAGGTATAATATCTAAGGATAAAAAACGAAGGGAGGTTCTTAGGTTGGGTTTCTCTTTG
ATTAACGCTGCCTTACATTTCAAGTACTGAAGTACTGAGTTGGTATCACTGCTGGTGAAGCTGCAAACCCAGAAAATCCGTTCCAAGAGCCAT
CAAAAAAGTTGTTTTCCGTATCTTAACTTCTACATTGGCTCTCTATTATTATTGGACTTTTAGTTCATACAATGACCTAAACTAACACA
ATCTACTTCTACGTTTCTACTTCTCCCTTATTATTGCTATTGAGAAGTCTGGTACAAAAGGTTTTGCCACATATCTTCAACGCTGTTATCTTA
ACAACCATATTCTGCGCAAAATTCAAAATTTTACGTTGGTTCCGATTTTTATTGTTGTTCTATCAAAGAACAAGTTGGCTCCTAAATCTG
TCAAAGCACCAAAAGGTGGTGTCCATACATTGCAGTTTTCTGTTACTGCTGCATTTGGCGCTTTGGCTTACATGGAGACATCTACTGGTGTG
GACAAAAGTTTTGCAATGGCTATTAATATCACTGGTGTGACGGCTTTTTGTCATGGTTATTTATCTCAATCTCGCACATCAGATTTATGCAA
GCTTTGAAAATCCGTTGGATCTCTGACGAGTTACATTTAAAGCTAAATTAATGCCCAGCTGGCTTATTATGCGGCCACATTTATGACG
ATCATTATCATTATTCAGGTTTTCACGGCTTTTGCACCAAAAATTCAAATGGTGTAGCTTTGCTGCCGCTATATCTCTATTTTCTGTTCTTAG
CTGTTTGGATCTTATTTCAATGCATATTCAGATGCAGATTTATTTGGAAGATTGGAGATGTCGACATCGATTCCGATAGAAGAGACATTGAG
GCAATTTGATGGGAAGATCATGAACCAAAGACTTTTGGGACAAAATTTGGAATGTTGTAGCAtagATATGACGTTTTATTACCTTTGATCACA
TTTCCAGCCATTTTCGATTCTCACCTCATAAG

```

**Figura 6.13. Secuencia del locus *CANI*.**

En letras rojas se indican los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación del primer fragmento (fragmento A) y en celeste los utilizados para el segundo fragmento (fragmento B). Adicionalmente, se presentan los codones de inicio y terminación de la traducción en letra minúscula y subrayada.

Los productos de ADN se concentraron mediante precipitación con etanol y se disolvieron en cantidades necesarias de agua para obtener una concentración final mayor o igual a 100 ng/ml. La secuenciación de los productos amplificados se realizó mediante el servicio de secuenciación MacroGen Corea utilizando los oligonucleótidos

que se detallan en la tabla 6.6. Nótese que para la secuenciación se utilizaron dos oligonucleótidos adicionales (A-OP2 y B-OP3) a los utilizados para la amplificación de los fragmentos A y B.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	FRAGMENTO SECUENCIADO
AFW	GTTCTTCAGACTTCTTAACTCCTG	A
AREV	CACCAGTAGATGTCTCCATG	A
A-OP2	GTGCGGCCAATGGTTACATG	A
B FW	CATATTCTGTACGACAGTCC	B
B REV	CTTATGAGGGTGAGAATGCG	B
B-OP3	GCTATTGAGAACTCTGGTAC	B

**Tabla 6.6. Cebadores utilizados para secuenciar *CANI*.** En la tercera columna se indica que fragmentos se secuenciaron con dicho oligonucleótido.

### 6.8.1. Modificación del espectro de mutaciones de la cepa E134 por la expresión de *AtMutSy*:

Las secuencias obtenidas se analizaron en busca de diferencias con la secuencia salvaje de *CANI* mediante la interfaz informática MegAling<sup>®</sup> (Lasergene). La confirmación de las mutaciones en cada muestra particular se realizó mediante la observación directa de los espectros de electroforesis capilar enviados por el servicio de secuenciación.

De esta forma, se logró establecer las mutaciones responsables del fenotipo observado de resistencia a canavanina para 42 mutantes. De las mismas, 21 corresponden a muestras provenientes de colonias conteniendo el plásmido vacío y las otras 21 a muestras que sobreexpresan el dímero MSH2-MSH7 de *A. thaliana*. Las diferencias con el número de muestras enviadas se debieron a dificultades técnicas del servicio de secuenciación para tres muestras de cada tipo.

En el apéndice 6.a se pueden observar los espectros mutacionales completos para ambos grupos, especificándose cada mutación particular sobre la secuencia de *CANI*. En la tabla 6.7 se detallan los tipos de mutaciones observados para cada grupo analizado, denominados YEP y MM para hacer referencia a las muestras conteniendo el plásmido vacío o el plásmido conteniendo las secuencias codificantes de *AtMSH2* y *AtMSH7*, respectivamente. Los tipos de mutaciones encontrados corresponden a sustituciones de bases (SUSTITUCIONES), inserciones o eliminaciones de un par de bases (IDL(+/-1), duplicaciones entre repeticiones directas (DUPLICACIONES DIRECTAS), inserciones de más de un par de bases (INSERCCIONES GRANDES),

eliminaciones de más de un par de bases (ELIMINACIONES GRANDES). Es importante destacar que en ambos grupos el número de mutaciones determinadas (TOTAL) es mayor que el número de muestras analizadas debido a la presencia de mutaciones dobles en algunas de las muestras.

**Tabla 6.7.** Mutaciones en gen *CAN1* de colonias conteniendo el vector vacío (YEP) o expresando MutSy (MM).

	SUSTITUCIONES	IDL(+/-1)	DUPLICACIONES DIRECTAS	INSERCIONES GRANDES	ELIMINACIONES GRANDES	TOTAL
YEP	15	7	2	0	1	25
MM	26	3	0	1	0	30

La comparación de los tipos de mutaciones para los grupos YEP y MM mediante la prueba exacta de Fisher revela la existencia de diferencias significativas entre los datos ( $p=0,0385$ ).

Para establecer los tipos de mutaciones que generan la diferencia entre los grupos se realizaron comparaciones de cada tipo de mutación contra la suma del resto de las mutaciones presentes. Estos análisis se contrastaron mediante pruebas exactas de Fisher obteniéndose sólo un resultado menor al límite de significación (0,05) para la comparación de las sustituciones de bases contra el resto de las mutaciones ( $p=0,0318$ ), según la siguiente tabla de contingencia.

**Tabla 6.8.** Comparación de mutaciones por sustituciones de bases contra el resto de mutaciones detectadas, para muestras correspondientes a colonias conteniendo el vector vacío (YEp) o colonias que expresan el dímero AtMSH2-AtMSH7 (MM).

	YEP	MM
SUSTITUCIONES	15	26
OTRAS	10	4

Las demás comparaciones mostraron probabilidades asociadas mucho mayores que el nivel de significación, traduciéndose en independencia entre las variables analizadas. Como conclusión, estos resultados evidencian una dependencia entre el aumento de las mutaciones por sustitución de bases con la expresión del dímero heterólogo AtMutSy.

En la tabla 6.9 se especifican las frecuencias y las tasas de mutaciones específicas de cada tipo de mutaciones de cada grupo. Los valores de las tasas de mutaciones específicas se calcularon multiplicando las tasas de mutaciones generales de cada grupo



por la frecuencia relativa de cada mutación. Estos valores también se presentan graficados en la figura 6.14 para una mejor apreciación visual de las diferencias.

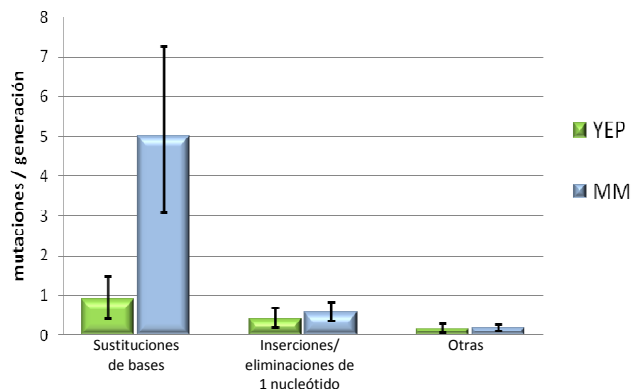
**Tabla 6.9. Frecuencias y tasas de mutaciones específicas de los distintos tipos de mutaciones en CAN1**

Tipo de mutación	YEP	MM	YEP	MM
	Frecuencia		Tasa de mutaciones específicas (x 10 <sup>7</sup> mutaciones/generación)	
<i>sustituciones</i>	0,6	0,87	0,902	5,011
<i>IDL (+/-1)</i>	0,28	0,1	0,421	0,578
<i>duplicaciones directas</i>	0,08	0	0,120	0,000
<i>eliminaciones grandes</i>	0,04	0	0,060	0,000
<i>inserciones grandes</i>	0,00	0,03	0,000	0,193

**Figura 6.14. Alteración de las tasas de mutaciones específicas al expresar el dímero AtMSH2-AtMSH7.**

YEP: cepa control, plásmido vacío.  
MM: cepa que expresa AtMSH2-AtMSH7.

En cada caso se indican el tipo de mutación específica en la parte inferior de las barras correspondientes a las tasas de mutaciones. Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95 %.



En la tabla 6.9 y en la figura 6.14 se evidencia el resultado comentado previamente. El 87 % de las mutaciones en el grupo que expresa AtMSH2-AtMSH7 (MM) corresponden a sustituciones de bases, mientras que en el grupo control (YEP) este tipo de mutaciones representa el 60 % del total. Es importante notar las diferencias entre las tasas de mutaciones específicas, principalmente para las mutaciones por sustitución de bases, donde se produce un aumento de aproximadamente 4 veces al expresar el dímero MSH2-MSH7. Adicionalmente, al comparar las tasas específicas para inserciones o eliminaciones de 1 par de bases no se observa una diferencia notoria, confirmando lo observado para los marcadores *lys2::InsE-A<sub>14</sub>* y *his7-2*. De mismo modo, no se evidencian diferencias para los tipos de mutaciones complejas (inserciones o eliminaciones grandes y duplicaciones directas).

Como resultado del análisis de estos datos, puede afirmarse que la diferencia entre las tasas de mutaciones generales observadas en los ensayos de fluctuación se debe a un

aumento específico de la tasa de mutaciones por sustituciones de bases producto de la expresión del dímero AtMutSy.

#### 6.8.1.1. Análisis de las diferencias de sustituciones de bases al sobreexpresar AtMutSy:

Se analizaron las mutaciones por sustituciones dentro de cada grupo para establecer algún tipo de diferencias entre los patrones representados. En la tabla 6.10 se resumen los tipos de sustituciones de bases encontrados para cada grupo de muestras, expresando AtMutSy (MM) o conteniendo el vector control vacío (YEP). Cabe destacarse que las sustituciones se encuentran informadas como los cambios de nucleótidos en la secuencia *CAN1* sobre la hebra codificante. El análisis de estos datos mediante prueba exacta de Fisher indica una independencia de las variables en estudio, con una  $p=0,25$ .

SUSTITUCIÓN	YEP	MM
G → A	2	7
G → C	4	3
G → T	2	1
T → A	0	3
T → C	0	3
T → G	1	4
A → T	1	1
A → C	0	1
A → G	1	0
C → T	1	2
C → T	1	1
C → G	2	0

**TABLA 6.10.** Sustitución de bases en las muestras inducidas de cepas E134 transformadas con el plásmido vacío (YEP) o con el plásmido con las secuencias codificantes de AtMSH2 y AtMSH7 (MM).  
A, T, G y C: nucleótidos de adenina, timina, guanina y citosina, respectivamente.

Mediante la realización de un análisis exploratorio de los datos puede inferirse un mayor número de sustituciones sobre nucleótidos de timidina en la secuencia original en el grupo que expresa el dímero AtMutSy (MM). Debido a esta observación se confeccionó la tabla de contingencia que agrupa las sustituciones según la base original mutada, comparándose estos datos entre los grupos control y sobreexpresante. La tabla de contingencia obtenida (tabla 6.11) tiene una probabilidad asociada de 0,11, calculada a partir de la prueba exacta de Fisher. Este resultado indica que no existe dependencia de las variables, tipo de base original mutada y grupo control o sobreexpresante de MutSy.

**TABLA 6.11.** Sustitución de bases sobre la secuencia original de *CANI* en las muestras inducidas de cepas E134 transformadas con el plásmido vacío (YEP) o con el plásmido conteniendo las secuencias codificantes de AtMSH2 y AtMSH7 (MM).

	G	T	A	C
YEP	8	1	2	4
MM	11	10	2	3

A, T, G Y C: nucleótidos de adenina, timina, guanina y citocina, respectivamente.

Se analizaron a continuación, las sustituciones de cada base original frente a la suma del resto de bases originales mutadas. De las cuatro tablas de contingencia generadas y analizadas por la prueba de Fisher, tres poseen probabilidades asociadas que superan ampliamente el nivel de significación establecido. Sólo la comparación de bases originales de timina mutadas versus el resto de bases originales mutadas presenta una  $p=0,033$ , que indica una asociación significativa de las variables. En términos biológicos, estos datos indican que la expresión de MutSy produce un aumento en la tasa de mutaciones por sustitución de nucleótidos de timina en la hebra codificante de *CANI*. Esta primera observación alentó la realización de análisis más profundos de los datos de sustituciones.

Para continuar las comparaciones, en primer lugar, se estableció un mecanismo de agrupación de los datos que permitiese detectar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Y luego, los datos agrupados se compararon de la forma habitual mediante la prueba de Fisher. El método establecido se basó en primer lugar en el siguiente supuesto: “Cada nucleótido de la secuencia de *CANI* posee una probabilidad de ser sustituido de magnitud constante y distinta de cero” (Lang y Murray, 2008). Este concepto sugiere que entre dos grupos de secuencias mutantes, crecidas en condiciones similares, las frecuencias de sustituciones de cada tipo de bases serán similares. Por lo tanto, en estas condiciones, las variaciones del número de sustituciones de bases entre los grupos se deben únicamente a procesos estocásticos. Otro punto importante a tener en cuenta es la condición de probabilidad de sustitución no nula planteada por el supuesto general. Esta condición se traduce en que no existen bases en la secuencia que tenga probabilidad de sustitución igual a cero. Todas las bases pueden ser sustituidas, a pesar que la probabilidad aparejada a cada tipo de ellas sea distinta y en algunos casos muy pequeña. Por lo tanto, si se analizara un grupo de secuencias mutantes lo suficientemente grande, se evidenciarían todos los tipos de sustituciones de bases posibles y las frecuencias de ocurrencia de las mismas. Bajo estas

condiciones se dice que se llegó a un estado de saturación de las mutaciones. Obviamente, la situación ideal de saturación planteada previamente no se logró en el presente trabajo. Por lo tanto, los análisis realizados deben contener ciertas restricciones y contrastarse adecuadamente por análisis estadísticos.

Otra observación a tener en cuenta es que el número de mutaciones es una variable discreta, sólo acepta valores enteros y se ajusta a una distribución de Poisson, con un valor esperado positivo y distinto de cero (Lea y Coulson, 1949). Por lo tanto, en dos grupos de mutantes obtenidas en condiciones similares la diferencia para cada tipo de sustituciones tenderá a cero. Sin embargo, una variable “diferencia” así generada no sigue una distribución de Poisson, a pesar de generarse a partir de variables que se distribuyen de esa manera, debido a que el número esperado es cero y la variable puede adoptar valores positivos y negativos. Debido a ello se definió una nueva variable a la que se denominó VDF (variable diferencia). Esta variable se obtuvo como se indica en la ecuación:

$$VDF_i = |\text{nro. de sustituciones}_i^{\text{MM}} - \text{nro. de sustituciones}_i^{\text{YEP}}| + 1$$

Donde, el subíndice *i* indica el tipo de sustitución particular y el superíndice MM y YEP indican los grupos expresando y no expresando el dímero MSH2-MSH7, respectivamente. De esta forma, se logra una variable que solo admite número enteros positivos y con un valor esperado igual a 1. La misma, se distribuye según Poisson, permitiendo el cálculo de la probabilidad asociada para cada valor de VDF. En la tabla 6.12 se observan los valores obtenidos para cada tipo de sustitución y la probabilidad asociada a cada uno de ellos bajo la distribución de Poisson. Se destacan en rojo los valores de *p* asociada menores al nivel de significación fijados para la contrastación de hipótesis (0,05). Esto significa que la diferencia para estas sustituciones es significativa.

TABLA 6.12. Identificación de sustituciones preferenciales en el grupo que expresa el heterólogo AtMSH2-AtMSH7 (MM). Valores de probabilidad asociada a cada tipo de sustitución mediante la variable VDF. En rojo se indican los valores de <i>p</i> menores al nivel de significación establecido en 0,05.	SUSTITUCIÓN	YEP	MM	VDF	p (Poisson)
		G → A	2	7	6
	G → C	4	3	2	0,1839397
	G → T	2	1	2	0,1839397
	T → A	0	3	4	0,0153283
	T → C	0	3	4	0,0153283
	T → G	1	4	4	0,0153283
	A → T	1	1	1	0,3678794
	A → C	0	1	2	0,1839397
	A → G	1	0	2	0,1839397
	C → T	1	2	2	0,1839397
	G → T	1	1	1	0,3678794
	C → G	2	0	3	0,0613132

A partir de este ensayo orientativo inicial se generaron dos grupos. El primer grupo, denominado A, corresponde a las sustituciones con  $p < 0,05$  y el segundo, denominado B, contiene aquellas sustituciones con  $p$  asociada  $\geq 0,05$ . Dentro de cada grupo, se sumaron las sustituciones respectivas para YEP y MM, generándose finalmente la tabla de contingencia 6.13.

**TABLA 6.13. Tabla de contingencia para las sustituciones de bases agrupadas según la probabilidad asociada a VDF.**

	SUMA A	SUMA B
YEP	3	12
MM	17	9

YEP: muestras inducidas de cepas E134 transformadas con el plásmido vacío. MM: muestras expresando el heterodímero AtMSH2 y AtMSH7. (Ver detalles en el texto)

Al analizar esta tabla mediante la prueba exacta de Fisher, se obtuvo una  $p=0,00884$ , indicando una fuerte dependencia entre las variables. Por lo tanto, puede afirmarse que la expresión de MutSy genera un aumento altamente significativo de las sustituciones agrupadas dentro del grupo A. Finalmente, todos estos análisis indican que las sustituciones desde un nucleótido de T a cualquier otra base, al igual que las sustituciones de un nucleótido de G por una de A, aumentan al sobreexpresarse el dímero MutSy.

### 6.8.2. Análisis de las mutaciones a nivel proteico:

Las secuencias de ADN resultantes de cada mutante *can1* se tradujeron bioinformáticamente para analizar posibles diferencias. En primer lugar, se determinaron las mutaciones por sustitución que producen cambios de aminoácidos, las sustituciones que provocan la generación de un codón de finalización de la traducción y las de corrimiento del marco de lectura. Este último grupo incluye las inserciones o eliminaciones de un nucleótido, las repeticiones directas y las inserciones o eliminaciones de varios nucleótidos. Es importante destacar que todas las mutantes generadas por corrimiento del marco de lectura, producen proteínas truncas no funcionales, debido a la generación de codones de terminación de la traducción tempranos, cercanos al sitio donde se produce el corrimiento.

Se compararon estos valores entre ambas cepas, conteniendo el vector vacío o expresando el dímero de Arabidopsis MutSy. Se obtuvo una  $p=0,01$  mediante la prueba

exacta de Fisher según los datos de la tabla de contingencia 6.14, que se muestra a continuación.

**Tabla 6.14. Tabla de contingencia.** Secuencias mutantes *can1* traducidas bioinformáticamente agrupadas según sustituciones de residuos aminoacídicos con generación de codón de terminación, sustituciones de residuos aminoacídicos que producen cambio de la identidad del aminoácido y corrimientos del marco de lectura.

	Sustituciones		Otras
	Generación de codón de terminación	Cambio de aminoácido	Corrimiento del marco de lectura
YEP	4	8	9
MM	1	20	4

YEP: colonias mutantes conteniendo el vector vacío. MM: colonias mutantes que expresan el dímero MutSy.

Este resultado indica dependencia entre la expresión del heterodímero y la distribución de los distintos tipos de mutaciones analizadas. Al agrupar todas las mutaciones por sustituciones de bases en el ADN y compararlas con las alteraciones en el ADN que producen corrimientos del marco se obtiene una  $p=0,056$ , para la tabla de contingencia 6.15, observándose una muy leve asociación entre las variables.

**Tabla 6.15. Tabla de contingencia.** Secuencias mutantes *can1* traducidas bioinformáticamente agrupadas según mutaciones por sustituciones de residuos aminoacídicos o corrimientos del marco de lectura.

	Sustituciones	Corrimiento del marco de lectura
YEP	12	9
MM	21	4

YEP: colonias mutantes conteniendo el vector vacío. MM: colonias mutantes que expresan el dímero

Paralelamente, se analizaron las sustituciones de bases en el ADN, separadas en los dos grupos, según produzcan cambios en la identidad del aminoácido codificado o un codón de terminación de la traducción (tabla 6.16).

**Tabla 6.16. Tabla de contingencia.** Secuencias mutantes *can1* traducidas bioinformáticamente agrupadas según sustituciones que producen cambios de la identidad aminoacídica o codones de terminación.

	Cambio de aminoácido	Codón de terminación
YEP	4	8
MM	1	20

YEP: colonias mutantes conteniendo el vector vacío. MM: colonias mutantes que expresan el dímero MutSy.

Se observa una diferencia entre la cepa control versus la que expresa AtMutSy con una probabilidad asociada de 0,047. Este valor, si bien es consistente con una

diferencia, está cercano al valor umbral, por lo que su significación no es decisiva, sino más bien indica una leve asociación de las variables.

Un hecho a tener en cuenta es que la cantidad de sustituciones de residuos aminoacídicos es menor que la cantidad total de bases mutadas en el ADN. Esto puede deberse a la presencia de colonias con más de una mutación, en las cuales, una de ellas puede producir un cambio a nivel del ADN sin alterar la identidad del aminoácido codificado. Adicionalmente, en los casos de mutaciones dobles donde una de ellas es un corrimiento del marco de lectura y la segunda una sustitución, sólo se contabiliza la sustitución en términos aminoacídicos, si se encuentra corriente arriba del sitio que provoca el corrimiento del marco. Esto se debe a que en todos los casos analizados de mutaciones por corrimiento del marco de lectura se generan codones de terminación de la traducción a corta distancia, generándose proteínas truncas no funcionales. Por lo tanto, cualquier mutación corriente abajo de estos sitios de terminación prematura no influirá en el fenotipo obtenido.

El análisis de las mutantes dobles reveló 2 sustituciones conservadoras y una sustitución corriente abajo de un IDL en el grupo control (YEp), y 2 sustituciones conservadoras y 3 sustituciones posteriores a IDL en el grupo que expresa MutS $\gamma$  (MM). De esta forma, los resultados de sustituciones obtenidos en base a la secuencia nucleotídica concuerdan perfectamente con los resultados obtenidos mediante el análisis de las secuencias mutantes a nivel proteico.

Al analizar las mutaciones de sustitución que generan cambios en la identidad aminoacídica contra las demás, sumando las de corrimiento del marco y las sustituciones que generan codones de terminación, se obtiene una  $p=0,0061$ . Los valores analizados se pueden observar en la tabla de contingencia 6.17.

**Tabla 6.17. Tabla de contingencia.** Secuencias mutantes *can1* traducidas bioinformáticamente agrupadas según sustituciones que producen cambios de identidad de aminoácidos o codones de terminación por sustitución o corrimiento del marco de lectura.

	Cambio de aminoácido	Codón de terminación prematuro generado por sustituciones o corrimiento del marco
YEP	8	13
MM	20	5

YEP: colonias mutantes conteniendo el vector vacío. MM: colonias mutantes que expresan el dímero MutS $\gamma$ .

El resultado indica una fuerte dependencia de las variables, traduciéndose en un aumento en las mutaciones por cambios de identidad de nucleótidos versus las

mutaciones que producen proteínas truncas, al expresar el dímero MutS $\gamma$ . Cabe destacarse que las mutaciones pertenecientes al segundo grupo teóricamente producen siempre fenotipos mutantes, debido a una alteración grande de la secuencia proteica. Este hecho, ha sido considerado en trabajos anteriores (Lang y Murray, 2008). Por lo tanto, el resultado hallado sugiere que la diferencia entre las cepas, en cuanto a la distribución de mutaciones por sustitución de bases se debe principalmente al tipo de sustitución que produce cambios de aminoácidos. Este resultado es lógico y condice con los obtenidos por análisis de cambios en el ADN, donde se puede observar un patrón distinto en la distribución de sustituciones y otras mutaciones para los grupos control y expresando AtMutS $\gamma$ .

En base a estos resultados, se puede concluir que al expresar AtMutS $\gamma$  se produce un aumento en las mutaciones que producen cambios en la identidad de residuos aminoacídicos en comparación con el grupo control. Finalmente, este tipo de mutaciones son las responsables del aumento de las tasas de mutaciones generales observados en los ensayos de fluctuación.



## 6.9. Discusión:

Ante la necesidad de generar un sistema de expresión de AtMSH2 y AtMSH7 de forma recombinante que permitiese la realización de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se optimizó la expresión de las proteínas de la planta *A. thaliana* en distintas cepas de levaduras.

### 6.9.1. Ensayos en las cepas T334, YLKL313 e YRG313:

En primer lugar, se utilizaron cepas que permiten la expresión de proteínas heterólogas en grandes cantidades denominadas T334 e YLKL313. La elección de estas cepas se realizó en vistas de obtener buenas cantidades de proteínas recombinantes que permitiesen, a continuación, la realización de ensayos con el objetivo de esclarecer el espectro de afinidad de MutSγ por lesiones del ADN. Como se comenta en resultados, se logró la sobreexpresión de AtMSH2 en estas cepas. Sin embargo, ante la carencia de anticuerpos anti-MSH7 funcionales, no se pudo evidenciar la expresión de AtMSH7.

Adicionalmente, la cepa YLKL313 cuenta con un locus que permite la evaluación de tasas de mutaciones del tipo de inserciones o eliminaciones de nucleótidos producidas por desplazamiento de la ADN polimerasa durante la replicación. A partir de la misma, se generó una nueva cepa denominada YRG313, genotípicamente idéntica a la progenitora pero carente de la secuencia codificante de Msh2. La metodología involucrada radicó en la disrupción génica del locus *MSH2* original, reemplazándolo por el gen *TRP1*, el cual revierte la auxotrofia por triptófano de la cepa progenitora. De esta forma, se obtuvo una cepa donde la secuencia de *MSH2* se encuentra totalmente eliminada del genoma, residiendo en su lugar el marcador de selección *TRP1*. La disrupción se confirmó mediante PCR utilizando una colección de cebadores que permiten discernir entre el locus *MSH2* funcional y el locus mutante producto de la disrupción génica.

Se evaluó la capacidad de AtMSH2 de complementar la función perdida en la cepa YRG313 utilizando ensayos de reversión del fenotipo mutante producto del locus *lys2::InsE-A4*. Las cepas conteniendo este gen mutante son auxótrofas en lisina requiriendo la adición del aminoácido al medio de cultivo. Sin embargo, dentro de la secuencia *InsE* responsable de la anulación funcional del gen *LYS2*, existe un sector conteniendo cuatro residuos de adenina sucesivos. Este es un sitio de mayor probabilidad de mutaciones por corrimiento de marco de lectura producidos por la ADN

polimerasa. Al producirse la eliminación de un nucleótido en esta región se restituye el marco de lectura original, generándose un producto funcional *Lys2* que elimina la auxotrofia en lisina. Adicionalmente, la inserción de dos nucleótidos en esta zona o la eliminación completa del fragmento *InsE*, de 61 pares de bases, podrían generar la restitución del marco de lectura de *lys2*. Sin embargo, se ha observado que la eliminación de un nucleótido en dicha región es la principal responsable del fenotipo revertante (Tran y col., 1996). Dada esta característica este reportero se utiliza para la realización de ensayos de fluctuación, evaluando la cantidad de células revertantes que crecen en medios de cultivo sin agregado de lisina. Sin embargo, como la secuencia repetitiva contiene solo 4 adeninas, los valores de reversión son extremadamente bajos, dificultando técnicamente la utilización del marcador.

No se evidenciaron diferencias significativas en las tasa de mutaciones obtenidas para la cepa con el MMR funcional al expresar las proteínas de *A. thaliana*, MSH2 y MSH7. Adicionalmente, la cepa deficiente en el MMR muestra un aumento de aproximadamente 10 veces en la tasa de reversión. Este hecho es consistente con la falta de un sistema MMR funcional, debido a la carencia de Msh2 endógena. Esta tasa permanece sin alteración significativa al expresar la proteína homóloga de Arabidopsis, AtMSH2. Este resultado se traduce en una falta de complementación entre los productos génicos MSH2 de levadura por el análogo de plantas.

### 6.9.2. Ensayos en las cepas E134 y DAG60:

Ante las dificultades técnicas halladas en la utilización de las cepas anteriores se decidió ensayar en las cepas E134 y DAG60, utilizadas con similares objetivos en trabajos previos (Clark y col. 1999; Shcherbakova y Kunkel, 1999; Drotschmann y col., 1999). Se expresaron las proteínas de Arabidopsis AtMSH2 y AtMSH7, de forma individual y conjunta en cepas de levaduras relacionadas entre sí denominadas E134 y DAG60. La última es genótipicamente idéntica a la primera pero carece de la secuencia codificante de *MSH2*. Por lo tanto, DAG60 es una cepa deficiente en el sistema MMR, debido a la carencia de uno de sus productos proteicos claves.

La expresión de las proteínas se confirmó por distintos métodos. En primer lugar, la subunidad AtMSH2 se evidenció mediante electroforesis seguida de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos específicos. Paralelamente, para demostrar la formación del complejo con AtMSH7 se utilizaron distintos enfoques metodológicos. En primer lugar, se intentó evidenciar el supuesto complejo AtMSH2 y

AtMSH7 generado al expresar ambas subunidades de forma conjunta mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes seguidas de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos anti-MSH2. Bajo la hipótesis de la formación del citado complejo se esperaba la visualización de bandas correspondientes a mayor masa molecular que la subunidad MSH2, al revelar con el anticuerpo contra dicha subunidad. Sin embargo, esta técnica no resultó satisfactoria. Este hecho podría deberse en primer lugar a las limitaciones y restricciones técnicas propias de la metodología de electroforesis no desnaturizante. Es importante aclarar que los anticuerpos utilizados fueron generados con la proteína AtMSH2 desnaturizada (Gomez y col., 2011). En el presente ensayo, realizado en condiciones nativas, los epítopes inmunogénicos podrían ser parcialmente inaccesibles a los anticuerpos debido a la estructura proteica y a interacciones con otras proteínas. Esta línea de razonamiento se sustenta ante la imposibilidad de obtener bandas definidas en la inmunodetección de AtMSH2 expresada de forma individual. Sin embargo, como se comenta a continuación, los anticuerpos resultaron útiles en ensayos de inmunoprecipitación sobre muestras no desnaturizantes. Cabe destacar, que aunque ambos son inmunoensayos las condiciones de los mismos son muy diferentes, lo cual podría explicar la disparidad de los resultados.

En segundo lugar, se ensayó la co-inmunoprecipitación del complejo AtMSH2-AtMSH7, utilizando anticuerpos anti-AtMHS2. Los productos de la inmunoprecipitación se analizaron, a continuación, mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes con revelado por nitrato de plata. Bajo la hipótesis de una co-inmunoprecipitación satisfactoria del complejo MSH2-MSH7 con anticuerpos contra MSH2, se esperaría una banda adicional en la electroforesis desnaturizante de los productos, para la muestra proveniente de extractos de levaduras que expresan ambas subunidades. Esta banda, de mayor masa molecular que AtMSH2, debería evidenciarse en estas muestras de forma diferencial, sin obtenerse en muestras donde no se expresó ninguna subunidad o aquellas donde solo se expresó una de las subunidades. Sin embargo, no fue este el resultado obtenido. Sólo se observó mediante el análisis electroforético una banda correspondiente a AtMSH2, pero no se obtuvieron bandas de mayor masa molecular que pudiesen adjudicarse a AtMSH7.

Este resultado podría deberse, en principio, a que las condiciones en las que se realizaron las inmunoprecipitaciones podrían no ser las adecuadas para la correcta estabilidad del dímero AtMSH2-AtMSH7. Sin embargo, cuando se ensayaron

condiciones menos astringentes aumentó la presencia de bandas inespecíficas. Estas inespecificidades podrían enmascarar la existencia de bajas cantidades de MSH7, provenientes de la co-inmunoprecipitación en forma parcial del complejo. Ante tal posibilidad, se intentó confirmar la presencia de AtMSH7 mediante MALDI-TOF-TOF. Se utilizaron muestras sobreexpresantes de ambas subunidades sometidas a inmunoprecipitación en condiciones de alta astringencia y electroforesis, como se comentó previamente. Mediante este ensayo se corroboró la identidad de la subunidad AtMSH2, pero no se logró evidenciar AtMSH7.

#### **6.9.2.1. Ensayos de cambio de movilidad electroforética:**

Este ensayo constituyó la máxima evidencia de la expresión de AtMSH7 y la formación de un complejo funcional junto a AtMSH2. Se sustentó en trabajos previos en los cuales se determinó parcialmente el espectro de unión del dímero AtMutSy obtenido por transcripción y traducción *in vitro*, observándose alta afinidad por ADN doble hebra conteniendo un apareamiento incorrecto del tipo G/T (Wu y col., 2003). En base a esto, se utilizó un heteroduplex de ADN de 61 pares de bases que presenta un apareamiento incorrecto en la posición 31 del tipo G/T, el cual se marcó radiactivamente en ambos extremos.

Se realizaron ensayos de cambios de movilidad electroforética con el ADN citado previamente y distintos extractos expresando las proteínas de *A. thaliana*, de forma individual o conjunta y extractos proteicos de cepas control. Los mismos se efectuaron para ambas cepas, E134 y DAG60, obteniéndose resultados similares.

Pudo determinarse que sólo extractos conteniendo las subunidades AtMSH2 y AtMSH7, expresadas en forma conjunta producen un retraso particular del ADN marcado. Los demás extractos, sin proteínas heterólogas o con cada una de las subunidades por separado, no presentaron la banda correspondiente. Adicionalmente, se observó la eliminación del retraso específico en extractos de MSH2-MSH7 por competencia con ADN similar sin marcado radiactivo en un exceso de 1.000 veces. Cabe destacarse que los ensayos se realizaron en presencia de exceso de ADN doble hebra homoduplex no marcado radiactivamente, con la finalidad de disminuir posibles interacciones no específicas.

Estos datos, en su conjunto, indican la presencia de un complejo proteico funcional formado por AtMSH2 y AtMSH7 con especificidad de unión a ADN doble hebra conteniendo un apareamiento incorrecto G/T.

### 6.9.2.2. Ensayos de Fluctuación: Medidas de las tasas de mutaciones:

Las cepas E134 y DAG60 presentan tres marcadores útiles para la estimación de tasas de mutaciones mediante la realización de ensayos de fluctuación. El primero de estos marcadores es similar al comentado para las cepas YLKL313 e YRG313, confiriendo auxotrofia para lisina a las levaduras. El locus se denomina *lys2::InsE-A<sub>14</sub>*, debido a la presencia de un sector de 14 adeninas sucesivas dentro de la secuencia *InsE*, que constituye un sitio de alta probabilidad para lesiones de corrimiento del marco de lectura. La cepa DAG60, carente del sistema MMR funcional, presenta un aumento de 10.000 veces en la tasa de mutaciones para esta lesión (Tran y col., 1997). Este locus por lo tanto, es un marcador altamente sensible y específico para mutaciones producidas por corrimiento del marco de lectura. La eliminación de un nucleótido, o la inserción de dos nucleótidos, en este sitio producen un corrimiento en el marco de lectura que elimina la auxotrofia por lisina de las células. De esta forma, los ensayos de fluctuación se realizan utilizando medios de cultivo sin lisina para evaluar la cantidad de células revertantes y posterior cálculo de las tasas de mutaciones.

Las cepas utilizadas también cuentan con otro marcador del mismo tipo que el comentado previamente. Este locus, denominado *his7-2*, proviene de una mutación en el gen original de levadura *HIS7*, debida a la eliminación de un residuo de adenina en una región conteniendo 8 adeninas consecutivas. De esta forma, el gen mutante *his7-2*, presenta 7 adeninas con la consiguiente modificación en el marco de lectura del producto génico y pérdida de función. Por lo tanto, las cepas conteniendo este marcador son auxótrofas para histidina, la cual revierte mediante mutaciones por inserción de un residuo de adenina o eliminación de dos residuos en dicha región. Cabe destacarse, que la longitud de la región de adeninas consecutivas es la mitad que la del marcador previamente descrito *lys2::InsE-A<sub>14</sub>*. Este hecho se evidencia en la diferencia de alrededor de dos órdenes de magnitud entre las tasas de mutaciones de estos marcadores en cepas conteniendo el MMR funcional. Adicionalmente, el marcador *his7-2* resulta menos sensible a la pérdida de *MSH2*, en comparación con el locus altamente sensible *lys2::InsE-A<sub>14</sub>*. Estos marcadores presentan un aumento de 200 y 10.000 veces respectivamente en DAG60 en comparación con las tasas obtenidas en E134.

Finalmente, las cepas en cuestión cuentan con un último marcador útil para medir tasas de mutaciones mediante la implementación de ensayos de fluctuación. El gen *CAN1* codifica para un transportador de arginina que también puede transportar el

análogo tóxico canavanina. Al ingresar a la célula este análogo produce la muerte celular. Sin embargo, si se origina cualquier tipo de mutación sobre la secuencia de *CANI* provocando un producto proteico no funcional, la célula en cuestión no puede transportar canavanina y, por lo tanto, puede crecer en medios de cultivo que contengan este compuesto. El fenotipo observado se denomina comúnmente como resistente a canavanina y se denota  $CAN^r$  o *can1*. Este marcador se utiliza para medir mutaciones directas de todo tipo, a diferencia de los marcadores de reversión comentados previamente.

Bajo este escenario, resultan sumamente interesantes los valores obtenidos de los ensayos de mutaciones para todos estos marcadores cuando se comparan entre cepas que sobreexpresan las distintas subunidades de AtMutS $\gamma$  de forma individual y conjunta, respecto del control.

El primer hecho destacable es que, en la cepa E134 conteniendo el MMR funcional, no se alteraron las tasas de mutaciones de los marcadores de reversión al expresar las proteínas de plantas. Sin embargo, la expresión de ambas subunidades de AtMutS $\gamma$  incrementó cuatro veces la tasa de mutaciones del marcador *CANI*. Estos datos indicarían que la expresión del dímero funcional de Arabidopsis reconocería ciertas lesiones distintas a IDLs y actuaría en detrimento de la reparación de ciertas lesiones por el MMR endógeno de la levadura.

Adicionalmente, no se observaron cambios con ninguno de los marcadores en la cepa deficiente en el MMR al expresar las proteínas de interés. Este último hecho se traduce en la incapacidad de la proteína AtMSH2 de complementar cepas mutantes para dicha subunidad y condice con los resultados obtenidos con la cepa YRG313. Cabe destacarse que los ortólogos MSH2 de levaduras y Arabidopsis comparten una identidad a nivel aminoacídico del 43 %. Por lo tanto, la falta de complementación podría deberse en principio a diferencias a nivel proteico que impidan la formación de los dímeros funcionales o la interacción con los otros productos proteicos implicados corriente abajo en el mecanismo de la reparación.

La falta de complementación, el aumento de las tasas de mutaciones directas en *CANI* sólo al expresar el dímero AtMutS $\gamma$  y la evidencia obtenida por ensayos de retraso de movilidad electroforética, indicarían la formación del dímero funcional AtMutS $\gamma$  en las levaduras. Sin embargo, al interaccionar con sus lesiones dianas, estas permanecerían sin corregirse, y se evidenciarían como mutaciones durante la siguiente ronda de replicación. El hecho de producir aumento sólo en este marcador y no en los

demás marcadores específicos para lesiones por corrimiento de marco de lectura, sugiere que el complejo AtMutS $\gamma$  no reconocería lesiones del tipo IDLs. En trabajos previos con el dímero expresado por transcripción y traducción *in vitro*, se observó mediante ensayos de variación de movilidad electroforética, muy baja especificidad por inserciones de 1 nucleótido extra en ADN doble hebra cortos (IDL +1) e interacción nula con ADN doble hebra conteniendo inserciones de tres nucleótidos extras (IDL +3). A su vez, se observó una alta capacidad de unión del complejo a lesiones del tipo G/T entre otros apareamientos incorrectos de bases, que incluyen también los tipos A/C y G/G (Culligan y Hays, 2000; Wu y col., 2003). Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde no se observan alteraciones al evaluar lesiones del tipo IDLs, pero si al evaluar cualquier mutación, entre las que se encuentran principalmente, apareamientos incorrectos de bases.

En conclusión, los resultados obtenidos permiten proponer una afinidad de unión de AtMutS $\gamma$  a lesiones distintas a IDLs, probablemente del tipo de apareamientos incorrectos. Adicionalmente, se generó un sistema útil para la futura determinación de otras lesiones diana de AtMutS $\gamma$  mediante ensayos de variación de la movilidad electroforética con extractos de levaduras que expresan el complejo de interés. Estos ensayos permitirán esclarecer el espectro de lesiones reconocidas por el dímero MSH2-MSH7.

#### **6.9.2.3. Estimación de especificidad de unión del dímero AtMutS $\gamma$ :**

Con el objetivo de determinar la preferencia de este dímero por lesiones específicas en el ADN se llevó a cabo un ensayo donde se secuenciaron mutantes *can1* provenientes de cepas E134 control que expresan el dímero AtMutS $\gamma$ . Estos ensayos fueron incentivados por la observación de un aumento en la tasa de mutaciones con el marcador *CANI* al expresar el dímero en esta cepa, sin la modificación de los marcadores que contabilizan mutaciones por corrimiento del marco de lectura. Ante este escenario, la hipótesis planteada consistió en que el dímero expresado poseería especificidad de unión para lesiones del tipo de sustitución de bases y no para lesiones del tipo de inserción o eliminación de nucleótidos. La finalidad del estudio fue evidenciar diferencias en la aparición de mutantes de determinados tipos al expresarse el dímero en comparación con las mutaciones espontáneas que se producen en condiciones normales. De esta manera, sería posible inferir *in vivo* la unión preferencial de MutS $\gamma$  a ciertas lesiones.

Los resultados obtenidos indican, en primer lugar, que la expresión de AtMSH2 y AtMSH7 en forma conjunta genera un aumento de las tasas de mutaciones por lesiones del tipo de sustituciones de bases, sin modificarse de forma notable los demás tipos al expresar el dímero MSH2-MSH7. Adicionalmente, se confirmó que las sustituciones de bases son responsables, a nivel proteico, de un incremento en las modificaciones de la identidad de los aminoácidos codificados con la consiguiente pérdida de funcionalidad.

En resumen, estos resultados revelan que el aumento en las tasas de mutaciones de *CANI*, al expresar el complejo MutSy, se debe al aumento de mutaciones por sustituciones de bases, las cuales producen cambios de identidad de los aminoácidos codificados, con la consiguiente abolición de la funcionalidad.

Es importante señalar que las tasas de mutaciones en el locus *CANI* obtenidas en este trabajo en condiciones control (YEP), se corresponden perfectamente con valores informados en estudios previos por otros investigadores en cepas y condiciones semejantes (Drake 1991; Marsischky y col., 1996; Huang y col., 2002; Huang y col., 2003; Harrinton y Kolodner, 2007; Lang y Murray, 2008). Adicionalmente, las distribuciones de los tipos de mutaciones muestran alta homología, obteniéndose frecuencias similares de sustituciones de bases, IDLs y mutaciones grandes. Todas estas comparaciones se confirmaron mediante las pruebas estadísticas pertinentes por comparación de los datos experimentales con los resultados publicados en la literatura mencionada previamente.

Al comparar los resultados obtenidos al sobreexpresar AtMutSy con estudios previos realizados en cepas deficientes en *MSH6* endógeno se observan similitudes y diferencias destacables (Marsischky y col., 1996; Ni y col., 1999; Harrinton y Kolodner, 2007). En primer lugar, las tasas de mutaciones reportadas en las cepas carentes de Msh6 presentaron tasas de mutaciones de 8 a 10 veces superiores a las obtenidas en cepas con el MMR totalmente funcional. Estos incrementos son aproximadamente el doble del observado en el presente trabajo producto de la expresión del dímero de *A. thaliana* respecto al control. Sin embargo, la comparación de los espectros mutacionales indica una equivalencia entre los tipos de mutaciones observados en cepas deficientes en *MSH6* y la sobreexpresante de AtMutSy. En ambos casos, es notorio el aumento de las sustituciones de bases y la disminución concomitante de los demás tipos de mutaciones (Harrington y Kolodner, 2007; Ni y col., 1999; Marsischky y col., 1996). Estas observaciones podrían traducirse en una supresión parcial del MMR, mediado por

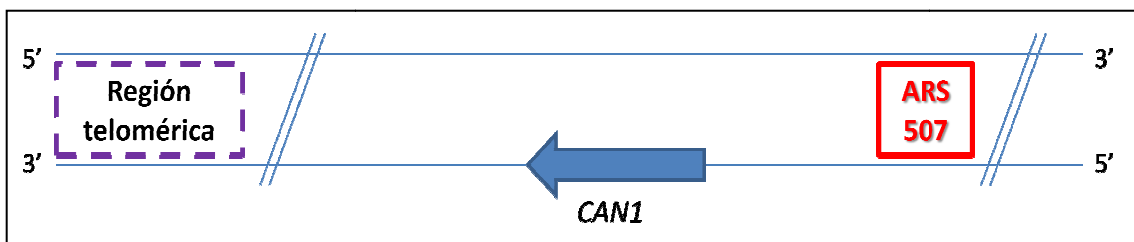


ScMutS $\alpha$  (MSH2-MSH6), debido a la competencia de AtMutSy por alguna de las lesiones dianas.

En base a la hipótesis de unión preferencial de AtMutSy por ciertos tipos de lesiones que son originalmente dianas de MutS $\alpha$ , se analizaron particularmente los tipos de sustituciones de bases. Se observa un incremento mayor en algunos tipos de sustituciones de bases con respecto a los demás. Para ampliar estos resultados se estableció un método de comparación, meramente orientativo, basado en una variable construida para dicho fin y en la distribución de probabilidad de Poisson. Esta variable, denominada VDF, se define como la sumatoria de 1 más el valor absoluto de la diferencia entre sustituciones de un tipo para las dos condiciones distintas. De esta forma, cuando la diferencia entre los valores de un tipo de sustitución se alejan del esperado, la variable tomará valores mayores y la probabilidad calculada mediante la distribución de Poisson se hará menor. De esta forma, se encontraron cuatro sustituciones con  $p < 0,05$ , tomando este valor como nivel de confianza de la prueba. Estos tipos de sustituciones se agruparon y se compararon contra el resto mediante prueba exacta de Fisher para corroborar estadísticamente la diferencia. Así, se encontró una fuerte asociación entre las variables. Este resultado evidenció que las sustituciones en nucleótidos de Timina original ( $T \rightarrow A$ ;  $T \rightarrow G$ ;  $T \rightarrow C$ ) junto a sustituciones de nucleótidos de Guanina original que se convierten en Adenina ( $G \rightarrow A$ ), aumentan significativamente al expresar MutSy. Cabe destacarse que las sustituciones están evaluadas sobre la secuencia codificante o hebra no transcripta del gen *CAN1*. Este hecho, a primera vista intrigante, puede deberse inicialmente a la asimetría intrínseca del proceso de replicación del ADN, en el cual una de las hebras se replica de forma continua (hebra adelantada) mientras la otra lo hace de forma discontinua (hebra rezagada) (Pavlov y col., 2002). En levaduras, la replicación continua de la hebra adelantada se lleva a cabo casi exclusivamente por la ADN polimerasa  $\epsilon$  (Pursell y col. 2007; Aksenova y col., 2010). Sin embargo, la hebra rezagada, se sintetiza por la acción catalítica de las ADN polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$ , en forma de fragmentos de Okasaki de aproximadamente 300 a 400 nucleótidos. Estos fragmentos son iniciados por la actividad primasa asociada a la ADN polimerasa  $\alpha$ , que polimeriza alrededor de 10 nucleótidos de ARN a partir de los cuales extiende 20 a 30 nucleótidos de ADN. Luego, se produce un cambio de polimerasa y entra en acción la ADN polimerasa  $\delta$ , que extiende el fragmento unos 300 a 400 nucleótidos hasta el próximo fragmento de Okazaki (Pursell y col., 2007; Nick McElhinny y col., 2008; Kunkel y Burgers, 2008).

A diferencia de las ADN polimerasas replicativas  $\delta$  y  $\epsilon$ , la ADN polimerasa  $\alpha$ , posee una fidelidad de replicación de 10 a 100 veces inferior debido a la carencia de actividad correctora de prueba 3'-5'. Se ha estimado que esta enzima comete, en promedio, 1 error cada  $10^4$  nucleótidos sintetizados (Pavlov y col. 2006). En consecuencia, la tasa de errores global producto de la replicación para la hebra rezagada es mayor que para la hebra conductora o adelantada. Sin embargo, en *S. cerevisiae* se ha establecido que el sistema de corrección MMR post-replicativo es más eficiente en la hebra rezagada que en la hebra conductora. Se sugiere que este fenómeno estaría relacionado a cierta optimización del sistema de reparación en la hebra que mayor cantidad de lesiones acumula producto de la replicación, la hebra rezagada. Se propone que esta especialización se debería a una estrecha asociación entre el MMR y el aparato de replicación, principalmente mediada por la interacción con PCNA y la cercanía a los extremos de ADN simple hebra (Pavlov y col., 2003; Kow y col., 2007; Nick McElhinny y col., 2010).

El gen *CAN1* se encuentra situado en el cromosoma V de *S. cerevisiae* y se replica a partir del origen denominado ARS507. La replicación comienza en esta secuencia de replicación autónoma continuando a través de *CAN1* hacia la región telomérica. (Raghuraman y col. 2001; Yabumi y col. 2002; Kim y col. 2008). En la figura 6.14 se esquematiza la organización del fragmento del cromosoma V conteniendo los sitios de interés.



**Figura 6.14. Ubicación cromosomal del locus *CAN1*.** Se esquematiza el locus como una flecha rellena indicando el sentido de la transcripción, el sitio de inicio de la replicación, ARS507 y la región final del cromosoma conteniendo la región telomérica.

Como puede observarse la secuencia codificante de *CAN1* se encuentra en la hebra inferior, también denominada hebra Crick. La misma, durante la replicación a partir del ARS507 sirve de molde para la síntesis de la hebra rezagada mediada por las ADN polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$ . Por lo tanto, existe una mayor tendencia a acumular lesiones,

principalmente del tipo de apareamientos incorrectos y una mayor dependencia con el sistema MMR.

Adicionalmente, existen mecanismos de reparación preferencial para la hebra que sirve de molde para la transcripción del ADN o hebra no codificante. Se ha informado una mayor eficiencia de los mecanismos de reparación por eliminación de nucleótidos y eliminación de bases asociadas a la hebra que se transcribe (Bohr y col., 1985; Mellon y col., 1987; Sweder y col., 1996; Liu y col., 2002; Kim y Jinks-Robertson, 2010; Reis y col., 2012). Sin embargo, no existe evidencia concreta que relacione el sistema MMR a la transcripción. Por lo tanto, la reparación de la hebra no codificante de *CAN1* estaría reforzada por algunos mecanismos específicos independientemente del sistema MMR.

Todo este conjunto de observaciones indican que al afectar el sistema MMR es esperable obtener un aumento de las lesiones en la hebra codificante de *CAN1*, que actúa como molde para la replicación de la hebra rezagada y no recibe especial atención por otros sistemas como el BER y el NER. De esta manera, los resultados obtenidos se corresponden plenamente con la hipótesis planteada, en la cual la expresión del complejo MutS $\gamma$  sería perjudicial para el correcto funcionamiento del MMR endógeno, altamente involucrado en la reparación de la hebra rezagada.

Adicionalmente, el hecho de que algunos tipos de sustituciones se presentan de forma más frecuente que otros, indicaría cierta preferencia de MutS $\gamma$  por algunos tipos de apareamientos incorrectos. Es notable el aumento de las sustituciones en nucleótidos de timidina, que podrían deberse a la unión preferencial del complejo a apareamientos incorrectos que involucren al menos una T. En la misma línea de pensamiento, la observación de un aumento de sustituciones de nucleótidos de guanina por nucleótidos de adenina (G $\rightarrow$ A) nos permite inferir cierta tendencia de unión de MutS $\gamma$ . En este caso, los intermediarios mal apareados que podría generar esta sustitución serían guanina en la hebra codificante apareada con timina, o citosina en la hebra no codificante apareada con adenina. En trabajos previos donde se estableció el espectro mutacional de *CAN1* en condiciones normales, se observa que la sustitución G $\rightarrow$ A en la hebra codificante, es la principal lesión evidenciada, constituyendo entre un 20 a 30 % del total de las sustituciones contabilizadas (Harrington y Kolodner, 2007; Lang y Murray, 2008; Lynch y col., 2008). Adicionalmente, en estudios similares realizados con cepas deficientes en *MSH6*, se observa un aumento marcado de estas lesiones llegando a corresponder a más del 50 % de las sustituciones totales (Marsischky y col., 1996; Ni y col., 1999). Esto indica una asimetría intrínseca de la lesión G  $\rightarrow$  A en la hebra codificante, y una

marcada sensibilidad al MMR. Por lo tanto, es esperable que una condición que afecte el funcionamiento del MMR, mediado principalmente por el dímero MutS $\alpha$ , produzca un aumento notable de este tipo de sustituciones.

Paralelamente, en un estudio donde se determinó el espectro mutacional de *A. thaliana* se observó el mismo tipo de asimetría por errores del tipo G:C  $\rightarrow$  A:T. (Ossowsky y col., 2010). Este tipo de lesión constituyó, por mucho, el mayor tipo de lesiones observado. Los autores proponen que este sesgo se debe principalmente a dos procesos generales. En primer lugar, la desaminación de 5-metilcitosina que produce timina, el cual es un evento muy común en contextos CpG, donde se produce un alto grado de metilación de citosinas. Y en segundo lugar, la formación de dímeros de pirimidinas inducida por luz ultravioleta en sitios donde se encuentran residuos de pirimidinas adyacentes. Estos dos procesos, altamente mutagénicos en plantas, podrían requerir cierta especialización de los sistemas de reparación del ADN para poder lidiar con ellos y en especial del sistema MMR. Esta especialización podría llevarse a cabo mediante la acción del complejo MutSy, el cual es único de plantas y, como se propone en el presente trabajo de tesis, evidencia afinidad por los tipos de lesiones citadas.

### 6.9.3. Conclusiones generales:

El conjunto de los resultados obtenidos, analizados intensamente bajo el contexto teórico sustentado por la literatura actual, permiten establecer una hipótesis tentativa sobre los sucesos descritos. La misma se resume a continuación.

El dímero AtMutSy se expresa en levaduras de forma funcional evidenciando unión a apareamientos incorrectos en el ADN y evitando parcialmente que dichas lesiones sean reconocidas por los dímeros específicos de la levadura, principalmente MutS $\alpha$ . De esta forma, aquellos apareamientos incorrectos a los que se une MutSy permanecerían sin repararse y provocarían la fijación de mutaciones durante la siguiente ronda de replicación. Sin embargo, el aumento moderado en la tasa de mutaciones general para la cepa que expresa este complejo heterólogo indica que no se produce una abolición total del sistema de reparación endógeno. Esta disminución en la eficiencia de reparación sería particularmente notoria para algunos tipos de lesiones dentro del grupo de los apareamientos incorrectos de bases, descartándose lesiones por eliminaciones o inserciones de nucleótidos. Se propone entonces, una afinidad preferencial del dímero MutSy por apareamientos incorrectos que contengan al menos una base de timina, especialmente el de tipo G/T, que se evidencia en el marcado aumento de sustituciones

del tipo GC → AT. Los mismos se observan preferencialmente sobre la hebra no codificante de *CAN1* debido a su replicación como hebra rezagada. La misma, acumula más errores biosintéticos y depende en mayor medida del MMR que la hebra contraria. Adicionalmente, al ser ésta la hebra no transcripta recibe menor atención por parte de otros sistemas de reparación como los de eliminación de nucleótidos y de bases (NER y BER).

Bajo esta hipótesis la especificidad de AtMutS $\gamma$ , podría deberse a la alta necesidad de reparación de lesiones comunes en plantas, provenientes de desaminación de citosinas o lesiones del tipo de dímeros de pirimidinas. Sin embargo, podrían existir otras lesiones dianas del complejo MutS $\gamma$  que no se evidencian en las condiciones experimentales ensayadas. De esta forma, el presente trabajo abre nuevas perspectivas para la futura investigación del rol funcional de MutS $\gamma$  en plantas, proponiéndose un rol especial en la reparación de determinados tipos de lesiones.

## 6.A. APÉNDICE:

En el presente apéndice se presentan las mutaciones obtenidas a partir de la secuenciación de muestras provenientes de colonias resistentes a canavanina obtenidas del grupo control, que contiene el vector vacío, denominado YEP, y del grupo proveniente de las muestras que expresan el dímero AtMSH2-AtMSH7. Para cada grupo se detalla sobre la secuencia codificante original de *CAN1* las mutaciones establecidas por secuenciación, como se comenta en la sección de resultados.

### Referencias:

En letra minúscula y subrayada se indican los codones de inicio y finalización de la traducción, atg y tag respectivamente.

Las mutaciones se indican sobre la secuencia original de *CAN1* siguiendo un patrón de colores: En rojo se indican las mutaciones correspondientes a sustituciones de bases, en azul se indican las mutaciones de inserción o eliminación de un nucleótido y en verde mutaciones por inserción o eliminación de nucleótidos grandes. **SUSTITUCIONES - IDLs - DUPLICACIONES DIRECTAS Y ELIMINACIONES.**

Sobre cada sitio marcado en la secuencia original se detalla la mutación detectada.

<sup>#</sup> Con este símbolo se indican los sitios que presentan la misma mutación en más de una muestra.

<sup>(n)</sup> Cada número corresponde a una muestra particular que contienen más de una mutación. Las mutaciones modificadas con el mismo número corresponden a una misma muestra.

<sup>§</sup> Dos muestras con eventos de sustitución distinta en la misma base.

### 6.a.1. Muestras conteniendo el vector vacío (Grupo YEP, control):

GTTCTTCAGACTTCTTAACTCCTGTAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCATAGCA

atgACAAATTCAAAGAAGACGCCGACATAGAGGAGAAGCATATGTACAATGA

GCCGGTCACAACCCTCTTTCACGACGTTGAAGCTTCACAAACACACCACAGAC

GTGGGTCAATACCATTGAAAGATGAGAAAAGTAAAGAATTGTATCCATTGCGC

TCTTTCCCGACGAGAGTAAATGGCGAGGATACGTTCTCTATGGAGGATGGCAT

AGGTGATGAAGATGAAGGAGAAGTACAGAACGCTGAAGTGAAGAGAGAGCTT  
AAGCAAAGACATATTGGTAT<sup>C<sup>(1)</sup></sup>GATTGCCCTTGGTGGTACTATTGGTAC<sup>G</sup>CAGGTCTT  
TTCATTGGTTTATCCACACCTCTGACCAACGCCGG<sup>+C</sup>CCCAGTGGGCGCTCTTATA  
TCATATTTATTTATGGGTTCTTTGGCATATTCTGTACGCAGTCCTTGGGTGAAA  
TGGCTAC<sup>A<sup>(3)</sup></sup>ATTCATCCCTGTTACATCCTCTTTCACAGT<sup>G<sup>(1)</sup></sup>TTTCTCACAAAGATTCTT  
Duplicación directa +(TGCGG)  
TTCTCCAGCATTGGT<sup>TGCGG</sup>CCAATGGTTACATGTATTGGTTTTCTTGG  
GCAATC<sup>T</sup>ACTTTTGGCCTGGAAGTCTAGTGTAGTTGGCCAAGTCATTCAATTTGG  
ACGTACAAAGTTCCACTGGCGGCATGGATTA<sup>-A<sup>(2)</sup>C</sup>GTAT<sup>+T</sup>TTTTTTGGGTAATTATCACA  
ATAATGAACTTGTTCCCTGTCAAATATTACGGTGAATTC<sup>C</sup>GAGTTCTGGGTCGCT  
TCCATCAAAGTTTTAGCCATTATCGGGTTTCTAATACTGTTTTTGTATGG<sup>-T</sup>TTT  
GTGGTGCTGGGGTTACCGGCCAGTTGGATTCCGTTATTGGAGAAACCCAGGT  
GCCTGGGGTCCAGGTATAATATCTAAGGATAAAAACGAAGGGAGGTTCTTAGG  
TTGGGTTTCCTCTTTGATTAACGCTGCCTTCACATTTCA<sup>G</sup>AAGGTAAGTACTGAACTAGTT  
GGTATCACTGCTGGTGAAGCTGCAAACCCAGAAAATCCGTTCCAAGAGCCAT  
<sup>-A<sup>#</sup></sup>CAAAAAGTTGTTTTCC<sup>T</sup>GTATCTTAACCTTCTAC<sup>G</sup>ATTGGCTCTCTATTATTCATT  
GGACTTTTAGTTCCATAACAATGACCCTAAACTAACACAATCTACTTCCTACGTT  
TCTACTTCTCCCTTTATTATTGCTATTGAGAACTCTGGTACAAAGTTTTGCCAC  
ATATCTTCAACGCTGTTATCTTAACAACCATTATTTCTGCCGCAAATTCAAATAT

TTACGTTGGTCCCG<sup>A</sup>TATTTTATTTGGTCTATCAAAGAACAAGTTGGCTCCTAA  
ATTCC<sup>T<sup>(2)/(3)</sup></sup>GTCAAGGACCACCAAAGGTGGTGTTCATACATTGCAGTTTTTCGTTAC  
TGCTGCATTTGGCGCTTTGGCTTACATGGAGACATCTACTGGTGGTGACAAAGT  
TTTCGAATGGCTATTAATATCACTGGT<sup>C</sup>TTGCAGGCTTTTTTGCATGGTTATTT  
ATCTCAATCTCGCACATCAGATTTATGCAAGCTTTGAAATACCGTGGCATCTCT  
CGTGACGAGTTACCA<sup>-T</sup>TTTAAAGCTAAATTAATGCCCGGCTTGGCTTATTATGCG  
GCCACATTTATGACGATCATTATCATTATTCAAGGTTTCACGGCTTTTGCACCA  
Duplicación directa +(TTGCTGCCGCCTATATCTCTATTTTCCTGTTCTTAGCT)  
AAATTCAATGGTGTAGCT<sup>↓</sup>TTGCTGCCGCCTATATCTCTATTTTCCTGTTCTTAG  
CTGTTTGG<sup>A</sup>ATCTTATTCAATGCATATTCAGATGCAGATTTATTTGGAAGATTG  
GAGATGTGACATCGATTCCGATAGAAGAGACATTGAGGCAATTGTATGGGAA  
GATCATGAACCAAAGACTTTTTGGGACAAATTTTGGAAATGTTGTAGCA<sup>tag</sup>ATAT  
GACGTTTTATTACCTTTGATCACATTTCCACGCCATTTTCGCATTCTCACCCCTCAT  
AAG

**6.a.2. Muestras que expresan AtMSH2-AtMSH7 (grupo MM):**

GTTCTTCAGACTTCTTAACTCCTGTAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCATAGCA  
AtgACAAATTCAAAGAAGACGCCGACATAGAGGAGAAGCATATGTACAATGA  
GCCGGTCACAACCCTTTTCACGACGTTGAAGCTTCACAAACACACCACAGAC  
GTGGGTCAATACCATTGAAAGATGAGAAAAGTAAAGAATTGTATCCATTGCGC



TCTTTCCCGACGAGAGTAAATGGCGAGGATACGTTCTCTATGGAGGATGGCAT  
AGGTGATGAAGATGAAGGAGAAGTACAGAACGCTGAAGTGAAGAGAGAGCTT  
AAGCAAAGACATATTGGTAT<sup>A</sup>GATTGCCCTTGGTGGTACTATTGGTACAGGTCTT  
TTCATTGGTTTATCCACACCTCTGACCAACGCCGGCC<sup>T<sup>(8)</sup></sup>CAGTGGGCGCTCTTATA  
TCATATTTATTTATGGGTTCTTTGGCATATTCTGTACGCAGTCCTTGGGTGAAA  
TGGCTACATTCATCCCTGTTACATCCTCTTTCACAGT<sup>G<sup>(2)(3)</sup></sup>TTTCTCACAAAGATTCTT  
TTCTCCAGCATTG<sup>A<sup>(7)</sup></sup>GTGCGGCCA<sup>+7A</sup>ATG<sup>A</sup>GTTACATGTATTGGTTTTCTTGGGCAATC  
ACTT<sup>C</sup>TGCCCCTGGAACCTTAGTGTAGTTGGCCAA<sup>C<sup>(6)</sup></sup>GTCATTCAATTTTGGACGTAC  
AAAGTTCCACTGGCGGCATGGATTAG<sup>C</sup>TATTTTTTGGGTAATTATCACAATAATG  
AACTTGTTCC<sup>T<sup>(1)</sup></sup>CTGT<sup>A</sup>CAAATATTACGGTGAATTCGAGTTCTGGGTCGCTTCCATC  
AAAGTTTTAGCCATTATCGGGTTTCTAATATACTGTTTTTGTATGGTTTTGTGGTG  
CTGGGGTTACCGGCCCAGTTGGATTCCGTTAT<sup>C<sup>(2)</sup></sup>TGGAGAAACCCAGGTGCCTGG  
GGTCCAGGTATAATATCTAAGGATAAAAACGAAGGGAGGTTCTTAGGTTGGGT  
TTCCTCTTTGATTAACGCTGCCTTCACATTTCAAG<sup>A</sup>GGTACTGAACTAGTTGGTATC  
ACTGCTGGTGAAGCTGCAAACCCAGAAAATCCGTTCCAAGAGCCATCA<sup>-A</sup>AAAA  
AGTTGTTTTCCGTAT<sup>-C<sup>(4)</sup></sup>CTT<sup>A<sup>(3)</sup></sup>AACCTTCTACATTGGCT<sup>A<sup>(5)</sup></sup>CTCT<sup>T<sup>(5)</sup></sup>ATTATTCATT<sup>A<sup>(6)(#)</sup></sup>GGACTTT  
TAGTTCCATACAA<sup>G</sup>TGACCCTAAACTAACACAATCTACTTCTACGTTTCTACTTC  
TCCCTTTATTATTGCTATTGAGAACTCTGGTACAAAGTTTTGCCACATAT<sup>G<sup>(7)</sup></sup>CTTC

AACGCTGTTATCTTAACAACCATTATTTCTGCCGCAAATTCAAATATTTACGTT  
GGTTC<sup>A</sup>CCCGTATTTTATTTGGTCTATCAAAGAACAAGTTGGCTCCTAAATTCCTGT  
CAAGGACCACCAAAGGTGGTGTTCATACATT<sup>G<sup>(9)</sup>/A<sup>(4)</sup>S</sup>TGCAGTTTTTCGTTACTGCTGCAT  
TTGGCGCTTTGGCT<sup>C<sup>(8)</sup></sup>TACATGGAGACATCTACTGGTGGTGACAAAGTTTTCGAAT  
GGCTATT<sup>A</sup>AAAT<sup>C<sup>(1)</sup></sup>ATCACTGGTGTTCAG<sup>A<sup>(9)</sup></sup>GCTTTTTTGCATGGTTATTTATCTCAAT  
CTCGCACATCAGATTTATGCAAGCTTTGAAATACCGTGGCATCTCTCGTGACGA  
GTTACCATTTAAAGCTAAATTAATGCCCGGCTTGGCTTATTATGCGGCCACATT  
TATGACGATCATTATCATTATTCAAGGTTTCACGGCTTTTGCACCAAATTCAA  
TGGTGTAGCTTTGCTGCCGCCTATATCTCTATTTTCCTGTTCTTAGCTGTTTGG  
ATCTTATTTCAATGCATATTCAGATGCAGATTTATTTGGAAGATTGGAGATGTC  
GACATCGATTCCGATAGAAGAGACATTGAGGCAATTGTATGGGAAGATCATGA  
ACCAAAGACTTTTTGGGACAAATTTTGGGAATGTTGTAGCA<sup>tag</sup>ATATGACGTTTT  
ATTACCTTTGATCACATTTCCACGCCATTTTCGCATTCTCACCCCTCATAAG

## *CONCLUSIONES*

### 7. CONCLUSIONES:

- Se purificó a homogeneidad la subunidad AtMSH2 expresada de forma recombinante en un sistema bacteriano.
- Se estableció el perfil transcripcional del gen *AtMSH2* en plántulas y callos de plantas salvajes.
- Se evidenció la presencia de un parálogo en *Brassica oleracea* utilizando anticuerpos generados contra AtMSH2.
- Se evaluaron cambios transcripcionales de los genes *AtMSH2*, *AtMSH6*, *AtPMS1* y *AtMLH1* en condiciones de estrés oxidativo (tratamiento con MV) y salino (tratamiento con NaCl).
- Se estudiaron cambios en el contenido de clorofilas, crecimiento de raíces, tasas de germinación y acumulación de 8-oxoG en el ADN de plantas salvajes y mutantes *msh2* sometidas a estrés oxidativo (tratamiento con MV) y salino (tratamiento con NaCl). No se evidenciaron comportamientos diferenciales correspondientes a la presencia o ausencia del locus salvaje *MSH2*.
- Se expresó exitosamente el dímero funcional AtMutSy de forma recombinante en distintas cepas de *S. cerevisiae*.
- Se confirmó, de forma directa, la expresión de AtMSH2 en levaduras mediante inmunoensayos y MALDI-TOF-TOF.
- Se confirmó la habilidad de AtMutSy de formar complejos estables con ADN conteniendo una base incorrectamente apareada mediante ensayos de cambio de la movilidad electroforética.
- Se determinó el efecto de las subunidades AtMSH2 y AtMSH7, expresadas de forma individual o conjunta sobre las tasas de mutaciones de distintos reporteros moleculares. Se estableció una relación directa entre la expresión del dímero AtMutSy y el aumento de mutaciones sobre el gen reportero *CAN1*. No se observaron alteraciones para las tasas de mutación de los otros marcadores utilizados.

- Se determinó que el aumento de la tasa general de mutaciones de *CANI* se debe exclusivamente a sustituciones de bases en el ADN que producen cambios en la identidad de los aminoácidos codificados.
- Se estableció una relación directa entre la expresión de AtMutS $\gamma$  y el aumento de sustituciones de T por A, G o C y de G por A, en la hebra codificante de *CANI*, indicando cierto reconocimiento preferencial de AtMutS $\gamma$  por algunos tipos de apareamientos incorrectos.

# *RESUMEN*

### 8. RESUMEN:

El sistema MMR, constituye uno de los pilares fundamentales del mantenimiento de la estabilidad génica de todos los organismos. Su funcionalidad está altamente relacionada a los pasos post replicativos, sin embargo, han sido propuestos roles adicionales del sistema entre los que se encuentra la corrección de lesiones oxidativas sobre el ADN.

El sistema MMR se encuentra conservado desde organismos procariontas a eucariotas, presentando mayor complejidad en estos últimos. El paradigma bacteriano se estableció en primer lugar en *E. coli* donde existen tres homodímeros específicos del sistema denominados MutS, MutL y MutH. En eucariotas, se ha demostrado la existencia de parálogos de MutS (denominados MSHs) y de MutL (denominados MLH y PMS) que forman heterodímeros funcionales específicos. Sin embargo, no existen homólogos eucariotas de MutH. El primer paso del sistema involucra el reconocimiento de lesiones en el ADN, principalmente apareamientos incorrectos o desapareamientos de bases, por complejos del tipo MutS. En eucariotas existen dos heterodímeros conservados que difieren en su especificidad de reconocimiento de lesiones. El primero se denomina MutS $\alpha$  y está formado por las subunidades MSH2 y MSH6, mientras el segundo se denomina MutS $\beta$  y se encuentra conformado por las subunidades MSH2 y MSH3. En *A. thaliana* y otras plantas estudiadas existe un tercer parálogo de MutS denominado MSH7. Esta subunidad forma junto con MSH2 el complejo heterodimérico MutS $\gamma$ . Existen numerosos estudios sobre el sistema MMR en bacterias, células humanas y levaduras, sin embargo, el conocimiento del mismo en plantas es aún escaso. Ante este escenario se planteó como uno de los objetivos del presente trabajo extender el conocimiento sobre el sistema MMR de plantas, principalmente centrándose en el rol del complejo MutS $\gamma$ , exclusivo de estos organismos. Adicionalmente, se estudió la relación del sistema MMR con la reparación del daño oxidativo en el ADN.

En primer lugar, se expresó la subunidad AtMSH2 en un sistema bacteriano y se purificó a homogeneidad con la finalidad de utilizar esta proteína en futuros ensayos bioquímicos *in vitro*. Adicionalmente, se utilizaron anticuerpos generados contra esta subunidad para demostrar la existencia de un ortólogo de MSH2 en inflorescencias de *Brassica oleracea*, especie relacionada filogenéticamente con *A. thaliana*. La presencia de

la proteína en inflorescencias sería importante para mantener la fidelidad genética durante la siguiente generación. De hecho, también se observó que los niveles transcripcionales del gen *MSH2* en *A. thaliana* son 70 veces superior en callos con respecto a los valores de plántulas, asociado probablemente a la mayor tasa de replicación existente en estos tejidos.

Los niveles de expresión de los genes *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* y *PMS1*, también, se evaluaron en plantas salvajes sometidas a condiciones de estrés oxidativo, por tratamiento con MV y estrés salino, por tratamiento con NaCl. En general, todos los genes mostraron un aumento en su expresión en relación a las condiciones control, sin embargo, los incrementos dependieron del gen en estudio y del tratamiento. *AtPMS1* fue el único gen que mostró una disminución en su expresión relativa cuando se estudió el efecto de NaCl.

Estos experimentos se extendieron a estudiar el efecto del estrés oxidativo y salino en plantas de *A. thaliana* salvajes o mutantes en el gen *MSH2*. Se observaron disminuciones de las cantidades de clorofilas a y b y en la elongación de raíces, tanto en plantas salvajes (control) como en plantas mutantes sometidas a tratamientos de estrés. Adicionalmente, se observó una mayor acumulación de bases oxidadas, 8-oxoG, en el ADN de plantas sometidas a estrés oxidativo, sin evidenciarse diferencias atribuibles a los genotipos. En conjunto, estos datos no permiten establecer una relación directa entre el sistema MMR y la reparación del daño oxidativo en el ADN.

Finalmente, se caracterizó la función de *AtMutS $\gamma$*  en un sistema *in vivo*. Para ello, se expresaron las subunidades *AtMSH2* y *AtMSH7* en un huésped heterólogo. La expresión funcional del complejo se confirmó mediante ensayos de cambios de movilidad electroforética y medidas de tasas de mutaciones de distintos marcadores moleculares. A partir de la comparación de las tasas de mutaciones, se determinó que la expresión de *AtMutS $\gamma$*  produce un aumento en la frecuencia de mutaciones del tipo de sustitución de bases en el ADN, evidenciada por uno de los genes reporteros utilizados (*CANI*). El análisis del espectro mutacional de *CANI* permitió confirmar que el aumento en la tasa de mutaciones se debe a sustituciones de bases. Adicionalmente, los resultados obtenidos permitieron inferir cierta especificidad de reconocimiento de *AtMutS $\gamma$* , mediante la prevalencia de ciertas sustituciones sobre las demás. Estas sustituciones involucran los cambios de T por A, C o G y de G por A en la hebra codificante del *CANI*. De esta forma, *AtMutS $\gamma$*  reconocería preferencialmente los apareamientos incorrectos que causan estas



mutaciones. Estos datos, abren nuevas perspectivas para continuar avanzando en la elucidación de las bases moleculares y bioquímicas de este sistema de reparación en plantas.

## *REFERENCIAS*

## 9. REFERENCIAS:

- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M.F., Guerrette, S., Marsischky, G.T., Kolodner, R., y Fishel, R. (1996). hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **93**, 13629-13634.
- Ade, J., Belzile, F., Philippe, H., and Doutriaux, M.P. (1999). Four mismatch repair paralogues coexist in *Arabidopsis thaliana*: AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6-1 and AtMSH6-2. *Mol. Gen Genet* **262**, 239-249.
- Ade, J., Haffani, Y., & Belzile, F. (2001). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* mismatch repair gene MSH2. *Genome* **44**, 651-657.
- Aksenova, A., Volkov, K., Maceluch, J., Pursell, S.F., Rogozin, I.B., Kunkel, T.A., Pavlov, Y.I. y Johansson, E. (2010). Mismatch Repair-Independent Increase in Spontaneous Mutagenesis in Yeast Lacking Non-Essential Subunits of DNA Polymerase  $\epsilon$ . *PLoS Genet* **6**(11), e1001209.
- Allan, A. C. y Fluhr R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**, 1559-1572.
- Allen, D.J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P., and Griffith, J.D. (1997). MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *EMBO J* **16**, 4467-4476.
- Allen, R.D. (1995). Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. *Plant Physiol* **107**, 1049-1054
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N, Leisse, T., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D. y Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., , C. C. y Ecker, J. R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Alou, A., Azaiez, A., Jean, M., & Belzile, F. (2004). Involvement of the *Arabidopsis thaliana* AtPMS1 gene in somatic repeat instability. *Plant Molecular Biology* **56**, 339-349.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L. y Cramer, C.L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant* **100**, 224-233.
- Alscher, R.G. y Hess, J.L. (1993). Antioxidants in Higher Plants, CRC Press, Boca Raton.
- Amoroso A., Concia L., Maggio, C., Raynaud, C., Bergounioux C., Crespan E., Cella, R., y Maga, G. (2011). Oxidative DNA damage bypass in *Arabidopsis thaliana* requires DNA polymerase  $\lambda$  and proliferating cell nuclear antigen 2. *The Plant Cell* **23**, 806-822.
- Anderson, H.J., Vonarx, E.J., Pastushok, L., Nakagawa, M., Katafuchi, A., Gruz, P., Di Rubbo, A., Grice, D.M., Osmond, M.J., Sakamoto, A.N., Nohmi, T., Xiao, W y, Kunz, B.A. (2008). *Arabidopsis thaliana* Y-family DNA polymerase  $\eta$  catalyses translesion synthesis and interacts functionally with PCNA2. *Plant J* **55**, 895-908.
- Apel, K y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399.

- Apostol, I., Heinstein, P.F. y Low, P.S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant Physiol* **90**, 109–116
- Aravind, L., Walker, D.R., y Koonin, E.V. (1999). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* **27**, 1223–1242.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* **141**, 391–396.
- Attia, H., Arnaud, N., Karray, N. y Lachaâl, M. (2008). Long-term effects of mild salt stress on growth, ion accumulation and superoxide dismutase expression on Arabidopsis rosette leaves. *Physiol Planta* **132**, 293–305.
- Au, K., Welsh, K., y Modrich, P. (1992). Initiation of methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **267**, 12142–12148.
- Ausubel FM, Brent R, Kingstom RE, Moore DD, Seidman JD, Smith JA, Struhl K. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ta ed. Wiley & Sons, NY.
- Babbs, C.F., Pham, J.A. y Coolbaugh, R.C. (1989). Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol* **90**, 1267–1270.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech* **60**, 411–421.
- Barnes, D.E., Lindahl, T. y Sedgwick, B. (1993). DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 424–433.
- Barnes, D.E. y Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* **38**, 445–476.
- Bartels, D. y Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 23–58.
- Bebenek, K., y Kunkel, T. (2000). Streinsinger Revisited: DNA synthesis errors mediated by substrate misalignments. Cold Spring Harbor Symp. *Quant Biol* **65**, 81–91.
- Bignami, M., Casorelli, I., y Karran, P. (2003). Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumour therapies. *Eur J Cancer* **39**, 2142–2149.
- Bleuyard, J.Y., Gallego, M.E. y White, C.I. (2006). Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Rep* **5**, 1–12.
- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S. y Hanawalt, P.C (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* **40**(2), 359–369.
- Boiteux, S., Gellon, L. y Guibourt, N. (2002). Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med* **32**, 1244–1253.
- Bolwell, G.P., Davies, D.R., Gerrish, C., Auh, C.K. y Murphy, T.M. (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol* **116**, 1379–1385.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C. y Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a tree component system. *J Exp Bot* **53**, 1367–1376.

- Bolwell, G.P. y Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant pathology* **51**, 347-366.
- Boorstein, R., Hilbert, T., Cunningham, R., y Teebor, G. (1990). Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA. *Biochemistry* **29**, 10455-10460.
- Brieger, A., Plotz, G., Raedle, J., Weber, N., Baum, W., Caspary, W.F., Zeuzem, S. y Trojan J. (2005). Characterization of the nuclear import of human MutL $\alpha$ . *Mol Carcinog* **43**(1), 51-58.
- Britt, A. B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Biol* **47**, 75-100.
- Bruskov, V.I., Malakhova, L.V., Masalimov, Z.K. y Chernikov, A.V. (2002). Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* **30**, 1354-1363.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Amer Soc Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Burdett, V., Baitinger, C., Viswanathan, M., Lovett, S. y Modrich, P. (2001). In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **98**, 6765–6770.
- Burrows, C.J. y Muller, J.G. (1998). Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem Rev* **98**, 1109–1152.
- Byrne, L.J., O’Callaghan, K.J. y Tuite, M.F. (2005). Heterologous gene expression in yeast. *Therapeutic Proteins Methods and Protocols* published by Humana Press, 51-64.
- Byrne, L. J., O’callaghan K. J. y Tuite, M. F. (2005). Heterologous gene expression in yeast: THERAPEUTIC PROTEINS. *Meth Mol Biol* **308**, 51-64.
- Cai, J.P., Ishibashi, T., Takagi, Y., Hayakawa, H. y Sekiguchi, M. (2003). Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 1073–1077.
- Casati, P. y Walbot, V. (2003). Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiol* **132**, 1739-1754.
- Cheeseman, J.M. (2006). Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *J Exp Bot* **57**, 2435–2444.
- Chen, C., Merrill, B.J., Lau, P.J., Holm, C., and Kolodner, R.D. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* pol30 (proliferating cell nuclear antigen) mutations impair replication fidelity and mismatch repair. *Mol Cell Biol* **19**, 7801–7815.
- Chen, S., Bigner, S., y Modrich, P. (2001). High rate of CAD gene amplification in human cells deficient in MLH1 or MSH6. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13802-13807.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. y Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J Biol Chem* **267**, 166–172.
- Christmann, M., Tomicic, M.T. y Kaina, B. (2002). Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutS $\alpha$  mismatch-binding activity. *Nucleic Acids Res* **30**(9), 1959-1966.

- Christmann, M. y Kaina, B. (2000). Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. *J Biol Chem* **275**(46) 36256-36262.
- Clark, A., Cook, M., Tran, H., Gordenin, D., Resnick, M., y Kunkel, T.A. (1999). Functional analysis of human MutSa and MutS $\beta$  complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* **27**, 736-742.
- Clark, A., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R., y Kunkel, T. (2000). Functional Interaction of Proliferating Cell Nuclear Antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 Complexes. *J Biol Chem* **275**, 36498-36501.
- Colussi, C., Parlanti, E., Degan, P., Aquilina, G., Barnes, D., Macpherson, P., Karran, P., Crescenzi, M., Dogliotti, E. y Bignami, M. (2002). The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* **12**, 912-918.
- Constantin, N., Dzantiev, L., Kadyrov, F., Modrich, P., (2005) Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction, *J Biol Chem* **280**, 39752-39761.
- Cristóvão, M., Sisamakís, E., Hingorani, M.M., Marx, A.D., Jung, C.P., Rothwell, P.J., Seidel, C.A. y Friedhoff, P. (2012). Single-molecule multiparameter fluorescence spectroscopy reveals directional MutS binding to mismatched bases in DNA. *Nucleic Acids Res* **40**(12), 5448-5464.
- Culligan, K.M., Meyer-Gauen, G., Lyons-Weiler, J., and Hays, J.B. (2000). Evolutionary origin, diversification, and specialization of eukaryotic MutS-homolog mismatch-repair proteins. *Nucleic Acids Res* **28**, 463-471.
- Culligan, K., & Hays, J. (2000). Arabidopsis MutS homologs- AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a novel AtMSH7-form three distinct protein heterodimers with different specificities for mismatched DNA. *Plant Cell* **12**, 991-1002.
- David, S.S., O'Shea, V.L., y Kundu, S. (2007). Review Article Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **447**, 941-950.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G.J. y Hoeijmakers, J.H.J. (1999). Molecular mechanisms of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**, 768-785.
- del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M. y Barroso, J.B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling, *Plant Physiol* **141** 330-335.
- Depeiges, A., Farget, S., Degroote, F., & Picard, G. (2005). A new transgene assay to study microsatellite instability in wildtype and mismatch-repair defective plant progenies. *Plant Science* **168**, 939-947.
- Desikan, R., Burnett, E.C., Hancock, J.T. y Neill, S.J. (1998b). Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-phox in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* **49**, 1767-1771.
- DeWeese, T. L., Shipman, J. M., Larrier, N. A., Buckley, N. M., Kidd, L. R., Groopman, J. D., Cutler, R. G., te Riele, H. and Nelson, W. G. (1998). Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11915-11920.
- Dherin, C., Radicella, J.P., Dizdaroglu, M. y Boiteux, S. (1999). Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-

- hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res* **27**(20), 4001-4007.
- Dion, E., Li, L., Jean, M., & Belzile, F. (2007). An Arabidopsis MLH1 mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination. *The Plant Journal* **51**, 431–440.
- Dizdaroglu, M. (1985). Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution. *Biochemistry* **24**, 4476– 4481.
- Dizdaroglu, M. (1993). Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins, in: B. Halliwell, O.I. Aruoma (Eds.). *DNA and Free Radicals*, Ellis Horwood, London, pp. 19–39.
- Dizdaroglu, M. (2005). Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res* **591**, 45–59.
- Doetsch, P.W., Zastawny, T.H., Martin, A.M., y Dizdaroglu, M. (1995). Monomeric Base Damage Products from Adenine, Guanine, and Thymine Induced by Exposure of DNA to Ultraviolet Radiation? *Biochemistry* **34**, 737-742.
- Doke N. (1985). NADPH-dependent O<sub>2</sub>-generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* **27**, 311–322.
- Dong, C., Whifford, R., y Langridge, P. (2002). A DNA mismatch repair gene links to the Ph2 locus in wheat. *Genome* **45**, 116-124.
- Drake, J.W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7160-7164.
- Dronkert, M., y Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* **486**, 217-247.
- Drotschmann, K., Clark, A.B., Tran, H.T., Resnick, M.A., Gordenin, D.A., Kunkel, T.A. (1999) Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the MSH2 gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**, 2970–2975.
- Drotschmann, K., Shcherbakova, P.V. y Kunkel, T.A. (2000). Mutator phenotype due to loss of heterozygosity in diploid yeast strains with mutations in MSH2 and MLH1. *Toxicol Lett* **112-113**, 239-244.
- Drummond, J. T., Li, G.-M., Longley, M. J., & Modrich, P. (1995). Isolation of an hMSH2–p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* **268**, 1909–1912.
- Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer R, Burgers P, Modrich P (2004) A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol Cell* **15**, 31–41.
- Earley, M.C. y Crouse, G.F. (1998) The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15487–15491.
- Egashira, A., Yamauchi, K., Yoshiyama, K., Kawate, H., Katsuki, M., Sekiguchi, M., Sugimachi, K., Maki, H. y Tsuzuki, T. (2002). Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the MSH2 genes. *DNA Repair* **1**, 881–893.
- Elstner EF. (1991). Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In *Active Oxygen/Oxidative Stress in Plant Metabolism*, eds. E.J. Pelland, K.L. Steffen. *Am Soc Plant Physiol* Rockville, MD: pp.13–25.

- Emmanuel, E., Yehuda, E., Melamed-Bessudo, C., Avivi-Ragolsky, N., & Levy, A. A. (2006). The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Report* **7**, 100–105.
- Fedier, A., y Fink, D. (2004). Mutations in DNA mismatch repair genes: Implications for DNA damage signaling and drug sensitivity. *Int J Oncol* **24**, 1039–1047.
- Ferreira, M.G. y Cooper, J.P. (2004). Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev* **18**, 2249–2254.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P. y Kunert, K.J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* **17**, 507-523.
- Foyer, C.H. y Harbinson, J.C. (1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plant*, eds. CH Foyer, PM Mullineaux. pp. 1–42. Boca Raton, Fla.: CRC.
- Fras, A., Juchimiuk, J., Siwinska, D., & Maluszynska, J. (2007). Cytological events in explants of *Arabidopsis thaliana* during early callogenesis. *Plant Cell Reports* **26**, 1933–1939.
- Fras, A., y Maluszynska, J. (2005). The correlation between the chromosome variation in callus and genotype of explants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* **121**, 145–154.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. y Siede, W. (1995). DNA Repair and Mutagenesis. Washington, DC: *Am Soc Microbiol* **698**.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. y Ellenberger, T. (2006). DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, DC.
- Genschel, J., Littman, S., Drummond, J., & Modrich, P. (1998). Isolation of MutSb from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSb and MutSa. *J Biol Chem* **273**, 19895–19901.
- Genschel, J., Bazemore, L., y Modrich, P. (2002). Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J Biol Chem* **277**, 13302-13311.
- Goldstein, S., Meyerstein, D. y Czapski, G. (1993). The Fenton reagents. *Free Rad Biol Med* **15**, 435–445.
- Gomez, R.L., Galles, C., Spampinato, C.P. (2011). High-level production of MSH2 from *Arabidopsis thaliana*: a DNA mismatch repair system key subunit. *Mol Biotechnol* **47**, 120-129.
- Gomez, R.L. (2007). “Reparación de las bases incorrectamente apareadas en el ADN de *Arabidopsis thaliana*: clonado, caracterización y distribución tisular de MutS-a y MutS-g”. Tesina de licenciatura. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.
- Gassman, N.R., Clodfelter, J.E., McCauley, A.K., Bonin, K., Salsbury F.R. Jr. y Scarpinato K.D. (2011). Cooperative Nuclear Localization Sequences Lend a Novel Role to the N-Terminal Region of MSH6. *PLoS ONE* **6**(3), e17907.
- Greene R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In CR Somerville, EM Myerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Grilley, M., Griffith, J.D. & Modrich, P. (1993). Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* **268**, 11830-11837.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H. y Razin, A. (1981). Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* **292**, 860–62



- Gu, Y.S., Parker, A., Wilson, T.M., Bai, H.B., Chang, D.Y. y Lu, A.L. (2002). Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem* **277**, 11135–11142.
- Haber, F. y Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron Salts. *Proc R Soc Lond Ser A* **147**, 332–351.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad and the ugly. *EMBO J* **27**, 589-605.
- Hall, B.M., Ma, C.-xing, Liang, P. & Singh, K.K. (2009). Fluctuation AnaLysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria – Delbrück fluctuation analysis. *Bioinformatics* **25**, 1564-1565.
- Hanawalt, P.C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* **21**, 8949–8956.
- Harrington, J.M. y Kolodner, R.D. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Msh2–Msh3 acts in repair of base–base mispairs. *Mol Cell Biol* **27**, 6546–6554.
- Hawn, M. T., Umar, A., Carethers, J. M., Marra, G., Kunkel, T. A., Boland, C. R., y Koi, M. (1995). Evidence for a Connection between the Mismatch Repair System and the G2 Cell Cycle Checkpoint. *Cancer Res* **55**, 3721–3725.
- Hayes, A. P., Sevi, L. A., Feldt, M. C., Rose, M. D. y Gammie, A. E. (2009). Reciprocal Regulation of Nuclear Import of the Yeast MutS $\alpha$  DNA Mismatch Repair Proteins Msh2 and Msh6. *DNA Repair* **8**, 739–751.
- Hays, J., Hoffman, P., y Wang, H. (2005). Discrimination and versatility in mismatch repair. *DNA Repair* **4**, 1463–1474.
- Hays, J.B. (2002). *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair* **1**, 579-600.
- Hewish, M., Lord, C.J., Martin, S.A., Cunningham, D., y Ashworth, A. (2010). Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 197-208.
- Hoffman, P., Leonard, J., Lindberg, G., Bollmann, S., & Hays, J. (2004). Rapid accumulation of mutations during seed-to-seed propagation of mismatch-repair-defective *Arabidopsis*. *Genes & Dev* **18**, 2676–2685.
- Hollingsworth, N.M., Ponte, L., y Halsey, C. (1995). MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Dev* **9**, 1728-1739.
- Horwath, M., Kramer, W., & Kunze, R. (2002). Structure and expression of the *Zea mays* mutS-homologs Mus1 and Mus2. *TheorAppl Gen* **105**, 423–430.
- Hsieh, P., & Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* **129**, 391–407.
- Huang, M-E., Rio, A-G., Galibert, M-D. y Galibert, F. (2002). Pol32, a subunit of *saccharomyces cerevisiae* dna polymerase  $\delta$ , suppresses genomic deletions and is involved in the mutagenic bypass pathway. *Genetics* **160**, 1409-1422.

- Huang, M-E., Rio, A-G., Nicolas, A. y Kolodner, R.D. (2003). A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **100**, 11529-11534.
- Huff, A., y Topal, M. (1987). DNA damage at thymine N-3 abolishes base-pairing capacity during DNA synthesis. *J Biol Chem* **262**, 12843 - 12850.
- Hutchinson, F. (1957). The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell. *Radiat Res* **7**, 473–483.
- Ishibashi, T., Hayakawa, H. y Sekiguchi, M. (2003). A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides. *EMBO Rep* **4**, 479–483.
- Iyer, R., Pluciennik, A., Burdett, V., & Modrich, P. (2006). DNA mismatch repair: Functions and mechanisms. *Chemical Reviews* **106**, 302–323.
- Jean M, Pelletier J, Hilpert M, Belzile F, Kunze R (1999) Isolation and characterization of AtMLH1, a MutL homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **262**, 633–642.
- Jiricny, J., y Marra, G. (2003). DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 61–69.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Review Molecular Cell Biology* **7**, 335–346.
- Johnson, R., Kovvali, G., Guzder, S., Amin, N., Holm, C., Habraken, Y., et al. (1996). Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J Biol Chem Review* **271**, 27987–27990.
- Johnson R. E., Yu, S-L., Prakash S., y Prakash L. (2002). Yeast DNA polymerase zeta ( $\zeta$ ) is essential for error-free replication past thymine glycol. *Genes & Dev* **17**, 77–87.
- Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P (2006) Endonucleolytic function of MutLa in human mismatch repair. *Cell* **126**, 297–308.
- Kadyrov FA, Holmes SF, Arana ME et al (2007) *Saccharomyces cerevisiae* MutLa is a mismatch repair endonuclease. *J Biol Chem* **282**, 37181–37190.
- Kadyrov, F.A., Genschel, J., Fang, Y., Penland, E., Edelmann, W. & Modrich, P. A possible mechanism for exonuclease 1-independent eukaryotic mismatch repair. *Proc Natl Acad of Sci U.S.A.* **106**, 8495–8500 (2009).
- Kamiya, H., Murata-Kamiya, N., Fujimuro, M., Kido, K., Inoue, H., Nishimura, S., Masutani, C., Hanaoka, F. y Ohtsuka, E. (1995). Comparison of incorporation and extension of nucleotides in vitro opposite 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. *Jpn J Cancer Res* **86**, 270–276.
- Kamiya, H. (2003). Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary. *Nucleic Acids Res* **31**, 517–531.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. y Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* **6**(2), e16015.
- Kasai, H., Tanooka, H. y Nishimura, S. (1984). Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann* **75**, 1037–1039.

- Kasai, H. y Nishimura, S. (1984). Hydroxylation of deoxyguanine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res* **12**, 2137–2145.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A. y Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell* **10**(2), 255-266.
- Keyer, K., Gort, A. S. e Imlay, J. A. (1995) Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* **177**, 6782-6790.
- Kim, H-M., Narayanan, V., Mieczkowski, P.A., Petes, T., Krasilnikova, M.M., Mirkin, S.M. y Lobachev, K. (2008). Chromosome fragility at GAA tracts in yeast depends on repeat orientation and requires mismatch repair. *EMBO J.* **27**, 2896-2906.
- Kim, N. y Jinks-Robertson, S. (2010). Abasic sites in the transcribed strand of yeast DNA are removed by transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol* **30**(13), 3206-3215.
- Kimura, S. y Sakaguchi, K. (2006). DNA repair in plants. *Chem Rev* **106**, 753–766.
- Klaunig, J.E. y Kamendulis, L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 239-267.
- Klotz, L.O. (2002). Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem* **383**(3-4), 443-456.
- Kolodner, R., y Marsischky, G. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 89-96.
- Kow, Y.W., Bao, G., Reeves, J.W., Jinks-Robertson, S., Crouse, G.F. (2007) Oligonucleotide transformation of yeast reveals mismatch repair complexes to be differentially active on DNA replication strands. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **104**, 11352– 11357.
- Krokan, H.E., Standal, R. y Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* **325**, 1-16.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. y Slupphaug, G. (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* **476**, 73–77.
- Kuhnlein, U. (1985). Comparison of apurinic DNA-binding protein from an ataxia telangiectasia and a HeLa cell line. Evidence for an altered processing of apurinic/apyrimidinic endonuclease. *J Biol Chem* **260**, 14918-14924.
- Kunkel, T.A., y Burgers, P.M. (2008). Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends Cell Biol* **18**, 521–527.
- Kunkel, T., & Erie, D. (2005). DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry*, **74**, 681–710.
- Kunkel, T.A., y Soni, A. (1988). Mutagenesis by Transient Misalignment. *J Biol Chem* **263**, 14784-14789.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lafleuriel, J., Degroote, F., Depeiges, A., & Picard, G. (2007). Impact of the loss of AtMSH2 on double-strand break-induced recombination between highly diverged homeologous sequences in Arabidopsis thaliana germinal tissues. *Plant Mol Biol* **63**, 833–846.

- Lai, M., y Beattie, K. (1988). Influence of DNA sequence on the nature of mispairing during DNA synthesis. *Biochemistry*. **27**, 1722-1728.
- Lamers, M., Perrakis, A., Enzlin, J., Winterwerp, H., de Wind, N., y Sixma, T. (2000). The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G-T mismatch. *Nature* **407**, 712-717.
- Lamers, M., Winterwerp, H., y Sixma, T. (2003). The alternating ATPase domains of the DNA mismatch repair enzyme MutS control DNA mismatch repair. *EMBO J.* **22**, 746-756.
- Landry, L.G., Chapple, C.C. y Last R.L. (1995). Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**, 1159–1166.
- Lang, G. I. y Murray A. W. (2008). Estimating the per-base-pair mutation rate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**, 67-82.
- Lario, L.D., Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C., Casati, P. y Spampinato, C.P. (2011). Regulation of plant MSH2 and MSH6 genes in the UV-B-induced DNA damage response. *J Exp Bot* **62**, 2925-2937.
- Larkins, B.A., Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coehlo, C.M., Woo, Y.-M. & Liu, Y. (2001). Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J Exp Botany* **52**, 183-192.
- Larson, E. D., Iams, K. y Drummond, J. T. (2003). Strand-specific processing of 8-oxoguanine by the human mismatch repair pathway: inefficient removal of 8-oxoguanine paired with adenine or cytosine. *DNA Repair* **2**, 1199–1210.
- Le Page, F., Guy, A., Cadet, J., Sarasin, A. y Gentil, A. (1998). Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **26**, 1276–1281.
- Le Page, F., Klungland, A., Barnes, D.E., Sarasin, A. y Boiteux, S. (2000). Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the Ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **97**, 8397–8402.
- Lea D.E. y Coulson, D.A. (1949). The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J Genet* **49**, 264–285.
- Leadon, S.A. y Avrutskaya, A.V. (1997). Differential involvement of the human mismatch repair proteins, hMLH1 and hMSH2, in transcription-coupled repair. *Cancer Res* **57**, 3784-3791.
- Leadon S. A., Avrutskaya A. V. (1998). Requirement for DNA mismatch repair proteins in the transcription-coupled repair of thymine glycols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **407**, 177-187.
- Lee, t., Zhai, J. y Meyer, B.C. (2010). Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(20), 9027–9028.
- Lees-Miller, S.P. y Meek, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* **85**(11), 1161-1173.
- Leonard, J., Bollmann, S., & Hays, J. (2003). Reduction of stability of Arabidopsis genomic and transgenic DNA-repeat sequences (microsatellites) by inactivation of AtMSH2 mismatch- repair function. *Plant Physiology* **133**, 328–338.

- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F. y Giraudat, J. (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**, 1448-1452
- Li, L., Jean, M., y Belzile, F. (2006). The impact of sequence divergence and DNA mismatch repair on homeologous recombination in Arabidopsis. *The Plant Journal* **45**, 908–916.
- Li, L., Dion, E., Richard, G., Domingue, O., Jean, M. y Belzile, F. J. (2009). The Arabidopsis DNA mismatch repair gene PMS1 restricts somatic recombination between homeologous sequences. *Plant Mol Biol* **69**, 675-684.
- Li, X y Heyer, W.D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**(1), 99-113.
- Li G. y Modrich P. (1995). Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1950–1954.
- Li, G. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* **18**, 85–98.
- Lin, Y., Shivji, M., Chen, C., Kolodner, R., Wood, R., Dutta, A. (1998) The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J Biol Chem* **273**, 1453–1461.
- Lin, D.P., Wang, Y., Scherer, S.J., Clark, A.B., Yang, K., Avdievich, E., Jin, B., Werling, U., Parris, T., Kurihara, N., Umar, A., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Kunkel, T.A., y Edelmann, W. (2004). An Msh2 Point Mutation Uncouples DNA Mismatch Repair and Apoptosis. *Cancer Res* **64**, 517–522.
- Lynch M., Sung, W., Morris, K., Coffey, N., Landry, C.R., Dopman E.B., Dickinson W.J., Okamoto, K., Kulkarni, S., Hartl, D.L. y Thomas, W.K. (2008). A genomewide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9272–9277.
- Lindahl, T., y Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**, 3610-3617.
- Liu, L., Rice, M.C., Drury, M., Cheng, S., Gamper, H., y Kmiec, E.B. (2002). Strand Bias in Targeted Gene Repair Is Influenced by Transcriptional Activity. *Mol Cell Biol* **22**, 3852–3863.
- Liu, Z., Hossain, G.S., Islas-Osuna, M.A., Mitchell, D. L. y Mount, D. W. (2000). Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: Arabidopsis UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. *Plant J* **21**, 519–528.
- Liu, W., Zong, W., Wu, G., Fujita, T., Li, W., y col. (2010). Turnover of BRCA1 Involves in Radiation-Induced Apoptosis. *PLoS ONE* **5**(12), e14484.
- Liu, Z., Tyo, K.E.J, Martínez, J.L., Petranovic, D. y Nielsen, J. (2012). Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech and Bioeng* **109**(5), 1259–1268.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lloyd, A. H., Milligan, A. S., Langridge, P., & Able, J. A. (2007). TaMSH7: A cereal mismatch repair gene that affects fertility in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology* **7**, 67.

- Longley, M., Pierce, A.J. y Modrich, P. (1997). DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* **272**, 10917–10921.
- Luria, S.E. y Delbrück, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **6**, 491– 511.
- Ma, W.T., Sandri, G.v.H. y Sarkar, S. (1992). Analysis of the Luria-Delbruck distribution using discrete convolution powers. *J Appl Prob* **29**, 255-267.
- Macpherson, P., Barone, F., Maga, G., Mazzei, F., Karran P. y Bignami, M. (2005) 8-Oxoguanine incorporation into DNA repeats in vitro and mismatch recognition by MutS $\alpha$ . *Nucleic Acids Res* **33**, 5094-5105.
- Malan, C., Gregling, M.M. y Gressel, J. (1990). Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Sci* **69**, 157–166.
- Markkanen, E., van Loon, B., Ferrari, E., Parsons, J.L., Dianov, G.L. y Hübscher, U. (2012). Regulation of oxidative DNA damage repair by DNA polymerase  $\lambda$  and MutYH by cross-talk of phosphorylation and ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(2), 437-42.
- Marsischky, G., Filosi, N., Kane, M., & Kolodner, R. (1996). Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes & Devel* **10**, 407–410.
- Marti, T., Kunz, C., y Fleck, O. (2002). DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol* **191**, 28–41.
- Masih, P. J., Kunnev, D. y Melendy ,T. (2008). Mismatch repair proteins are recruited to replicating DNA through interaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). *Nucleic Acids Res* **36**, 67–75.
- Mathur, J. y Koncz, C. (1998). Callus culture and regeneration. In J. Martinez-Zapater & J. Salinas (Eds.), *Arabidopsis protocols: Methods in molecular biology* (Vol. 82, pp. 31–34). Totowa, New Jersey: Humana Press, Inc.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. y McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**, 8271–8276.
- Mazurek, A., Berardini, M. y Fishel, R. (2002). Activation of human MutS homologs by 8-oxoguanine DNA damage. *J Biol Chem* **277**, 8260–8266.
- McHugh, P.J., Sones, W.R., y Hartley, J.A. (2000). Repair of Intermediate Structures Produced at DNA Interstrand Cross-Links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**, 3425-3433.
- Mehlhorn, H., Tabner, B.J. y Wellburn, A.R. (1990). Electron-spin-resonance evidence for the formation of free-radicals in plants exposed to ozone. *Physiol Plant* **79**, 377–383.
- Mellon, I., Spivak, G. y Hanawalt, P. C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**, 241-249.
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H. et al. (2000). Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4156–4161.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **9**, 490-498.

- Modrich, P., y Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65**, 101-133.
- Modrich, P. (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* **281**, 30305–30309.
- Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Iino H., Wakamatsu, T., Fukui, K., Nakagawa, N., Masui, R. y Kuramitsu, S. (2010). Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J Nucleic Acids* 1-32
- Muller, A., y Fishel, R. (2002). Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Investig* **20**, 102–109.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473–497
- Natrajan, G., Lamers, M.H., Enzlin, J.H., Winterwerp, H.H., Perrakis, A., y Sixma, T.K. (2003). Structures of Escherichia coli DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res* **31**, 4814-4821.
- Neeley, W. L. y Essigmann, J. M. (2006). Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* **19**, 491-505.
- Nelson, N. y Ben Shem, A. (2004). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 971-982.
- Ni, T. T., Marsischky, G. T. y Kolodner, R. D. (1999). MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **4**, 439–444.
- Nick McElhinny, S.A., Gordenin, D.A., Stith, C.M., Burgers, P.M. y Kunkel, T.A. (2008). Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell* **30**, 137–144.
- Nick McElhinny, S.A., Kissling, G.E. y Kunkel, T.A. (2010). From the Cover: Differential correction of lagging-strand replication errors made by DNA polymerases  $\alpha$  and  $\delta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(49), 21070-21075.
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 333-359.
- O'Brien, V. y Brown, R. (2006). Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis* **27**, 682–692.
- Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P., y Yang, W. (2000). Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* **407**, 703-710.
- Ollila, S., Dermadi Bebek, D., Jiricny, J. y Nyström, M. (2008). Mechanisms of pathogenicity in human MSH2 missense mutants. *Hum Mutat* **29**(11), 1355-1363.
- Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledó, J. I., Warthmann, N., Clark, R. M., Shaw, R. G., Weigel, D., y Lynch, M. (2010). The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **327**, 92-94.
- Otterlei M., Warbrick, E., Nagelhus, T. A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M. , Aas, P. A., Steinsbekk, K., Bakke, O. y Krokan, H. E. (1999). Post-replicative base excision repair in replication foci. *EMBO J* **18**, 3834–3844.

- Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., et al. (1995). GTBP a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* **268**, 1912–1914.
- Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T., & Jiricny, J. (1996). hMutS $\beta$ , a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* **6**, 1181–1184.
- Paterson, M. C., Lohman, P. H. M., Westerveld, A., y Sluyter, M. L. (1974). DNA Repair in Human/Embryonic Chick Heterokaryons, Ability of Each Species to Aid the Other in the Removal of Ultraviolet-Induced Damage. *Biophys J* **14**(11), 835–845.
- Pavlov, Y.I., Frahm, C., Nick McElhinny, S.A., Niimi, A., Suzuki, M. y Kunkel T.A. (2006). Evidence that errors made by DNA polymerase alpha are corrected by DNA polymerase delta. *Curr Biol* **16**(2), 202-207.
- Pavlov, Y.I., Newlon, C.S. y Kunkel, T.A. (2002). Yeast origins establish a strand bias for replicational mutagenesis. *Mol Cell* **10**, 207–213.
- Pavlov, Y.I., Mian, I.M., Kunkel, T.A. (2003) Evidence for preferential mismatch repair of lagging strand DNA replication errors in yeast, *Curr Biol* **13**, 744–748.
- Penefsky, H. S. (1977). Reversible binding of pP<sub>i</sub> by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **252**, 2891-2899.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. y Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**(18), 3551-3567.
- Platt, A. y Reece, R.J. (1998). The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J* **17**(14), 4086-4091.
- Pluciennik, A. y Modrich, P. (2007) Protein roadblocks and helix discontinuities are barriers to the initiation of mismatch repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12709–12713.
- Polanco, C., & Ruiz, M. L. (2002). AFLP analysis of somaclonal variation in Arabidopsis thaliana regenerated plants. *Plant Science* **162**, 817–824.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., y Stewart, C.R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* **6**, 65-74.
- Price, A. H., Hendry, N. (1991). Iron catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ* **14**, 477–488.
- Prolla T, Christie D, Liskay R (1994) Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial mutL gene. *Mol Cell Biol* **14**, 407–415.
- Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* **56**, 1–14.
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundström, E.B., Johansson, E. y Kunkel, T.A. (2007). Yeast DNA polymerase  $\epsilon$  participates in leading-strand DNA replication. *Science* **317**, 127–130.



- Raghuraman, M.K., Winzeler, E.A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D.J., Davis, R.W., Brewer, B.J. y Fangman W.L. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* **294**, 115–121.
- Reenan, R.A., y Kolodner, R.D. (1992). Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: Evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics* **132**, 975-985.
- Reis, A.M., Mills, W.K., Ramachandran, I., Friedberg, E.C., Thompson, D. y Queimado, L. (2012). Targeted detection of in vivo endogenous DNA base damage reveals preferential base excision repair in the transcribed strand. *Nucleic Acids Res* **40**(1), 206–219.
- Richards, E.J. (1997). DNA methylation and plant development. *Trends Genet* **13**, 319–323.
- Roldan-Arjona, T. y Ariza, R. R. (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* **681**: 169-179.
- Romanos M.A., Scorer, C.A. y Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.
- Ross-Macdonald, P., y Roeder, G.S. (1994). Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* **79**, 1069-1080.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H. y Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**, 5706–5715.
- Russo, M. T., Blasi, M. F., Chiera, F., Fortini, P., Degan, P., Macpherson, P., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., Karran, P., Aquilina, G. et al. (2004). The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. *Mol Cell Biol* **24**, 465–474.
- Sakumi, K., Furuichi, M., Tsuzuki, T., Kakuma, T., Kawabata, S., Maki, H. y Sekiguchi, M. (1993). Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem* **268**, 23524–23530.
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning—a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sarkar, S., Ma, W.T. y Sandri, G.v.H. (1992). On fluctuation analysis: a new, simple and efficient method for computing the expected number of mutants. *Genetica* **85**, 173-179.
- Schmidt, K.H., Pennaneach, V., Putnam, C.D. y Kolodner, R.D. (2006). Chapter 27: Analysis of Gross-Chromosomal Rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **409**, 462-476.
- Schofield, M.J., Brownwell, F.E., Nayak, S., Du, C., Kool, E.T., y Hsieh, P. (2001). The Phe-X-Glu DNA Binding Motif of MutS. The Role of Hydrogen Bonding in Mismatch Recognition. *J Biol Chem* **276**, 45505 - 45508.
- Schofield, M.J. y Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Ann Rev Microbiol* **57**, 579–608.
- Sedgwick, B., Bates, P.A., Paik, J., Jacobs, S.C. y Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair* **6**(4), 429-42.
- Sedmak, J., y Grossberg, S. (1977). A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie blue G250. *Anal Biochem* **79**, 544-552.

- Shcherbakova P, Hall M, Lewis M et al (2001) Inactivation of DNA mismatch repair by increased expression of yeast MLH1. *Mol Cell Biol* **21**, 940–951.
- Shcherbakova, P. y Kunkel, T. (1999) Mutator phenotypes conferred by MLH1 overexpression and by heterozygosity for mlh1 mutations. *Mol Cell Biol* **19**, 3177–3183.
- Sheen, J. (2002). A transient expression assay using Arabidopsis mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>
- Shuck, S.C., Short, E.A. y Turchi, J.J. (2008). Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* **18**(1), 64-72.
- Sia, E.A., Kokoska, R.J., Dominska, M., Greenwell, P. y Petes, T.D. (1997). Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Mol Cell Biol* **17**(5), 2851-2858.
- Sinha, R.P. & Häder, D.-P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* **1**, 225-236.
- Slupphaug, G. Kavli, B. y Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* **531**, 231–251.
- Spampinato, C. P., Gomez, R. L., Galles, C., & Lario, L. D. (2009). From bacteria to plants: A compendium of mismatch repair assays. *Mutation Research: Reviews in Mutation Research* **682**, 110–128.
- Spampinato C, Modrich P (2000) The MutL ATPase is required for mismatch repair. *J Biol Chem* **275**, 9863–9869.
- Stapleton, A. y Walbot, V. (1994). Flavonoids protect maize DNA from UV damage. *Plant Physiol* **105**, 881-889.
- Strausberg, R.L. y Strausberg, S.L. (2001). Overview of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 5, Unit5.6
- Su, S., Lahue, R., Au, K., y Modrich, P. (1988). Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro. *J Biol Chem* **263**, 6829-6835.
- Suga, M. y Hatakeyama, T. (2003). High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium. *Curr Genet* **43**, 206-211.
- Sweder, K.S., Verhage, R.A., Crowley, D.J., Crouse, G.F., Brouwer, J. y Hanawalt, P.C. (1996) Mismatch repair mutants in yeast are not defective in transcription-coupled DNA repair of UV-induced DNA damage. *Genetics* **143**(3), 1127-1135.
- Tam, S. M., Hays, J. B. y Chetelat, R. T. (2011). Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on homeologous recombination in tomato. *Theor Appl Genet* **123**(8), 1445-58.
- Tam, S. M., Samipak, S., Britt, A., & Chetelat, R. T. (2009). Characterization and comparative sequence analysis of the DNA mismatch repair MSH2 and MSH7 genes from tomato. *Genetica*, **137**, 1–14.
- Thompson, L.H. y Schild, D. (2002). Recombinational DNA repair and human disease, *Mutat Res* **509**, 49–78.
- Tompa, R., McCallum, C. M., Delrow, J., Henikoff, J. G., van Steensel, B. y Henikoff, S. (2002). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE3. *Curr Biol* **12**, 65-68.

- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E. y Jones, J.D. (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J* **14**(3), 365-370.
- Tran, H. T., Degtyareva, N. P., Koloteva, N. N., Sugino, A., Masumoto, H., Gordenin, D. A. y Resnick, M. A. (1995). Replication slippage between distant short repeats in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the direction of replication and the RAD50 and RAD52 genes. *Mol Cell Biol* **15**, 5607–5617.
- Tran, H.T., Gordenin, D.A., Resnick, M.A. (1996) The prevention of repeat-associated deletions in *Saccharomyces cerevisiae* by mismatch repair depends on size and origin of deletions. *Genetics* **143**, 1579–1587.
- Tran, H.T., Keen, J.D., Krickler, M., Resnick, M.A., Gordenin, D.A. (1997) Hypermutability of homonucleotide runs in mismatch repair and DNA polymerase proofreading yeast mutants. *Mol Cell Biol* **17**, 2859–2865.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K. y Kobayashi, H. (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* **11**, 1195–1206.
- Umar, A., Risinger, J.I., Glaab, W.E., Tindall, K.R., Barrett, J.C., y Kunkel, T.A. (1998). Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. *Genetics* **148**, 1637-1646.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J.F y Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **161**, 405–414.
- Vasen, H.F., Stormorken, A., Menko, F.H., Nagengast, F.M., Kleibeuker, J.H., Griffioen, G, Taal, B.G., Moller, P. y Wijnen, J.T. (2001). MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol* **19**(20):4074-4080.
- Warren, J.J., Pohlhaus, T.J., Changela, A., Iyer, R.R., Modrich, P., Beese, L.S. (2007) Structure of the human MutSa DNA lesion recognition complex. *Mol Cell* **26**, 579– 592.
- Welsh, K., Lu, A., Clark, S., y Modrich, P. (1987). Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutH gene product. *J Biol Chem* **262**, 15624-15629.
- Wintermans, J., F. y de Mots. A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b their pheophytins in ethanol. *Biochem Biophys Acta* **109**, 448-453.
- Wood, M. L., Esteve, A., Morningstar, M. L., Kuziemko, G. M. y Essigmann, J. M. (1992). Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **20**, 6023–6032.
- Wu, S.-Y., Culligan, K., Lamers, M., & Hays, J. (2003). Dissimilar mispair-recognition spectra of *Arabidopsis* DNA-mismatch- repair proteins MSH2\*MSH6 (MutSa) and MSH2\*MSH7 (MutSy). *Nucleic Acids Research* **31**, 6027–6034.
- Wyrzykowski, J. y Volkert, M.R. (2003). The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. *J Bacteriol* **185**(5), 1701-1704.
- Xu Y.Z., Arrieta-Montiel M.P., Viridi K.S., de Paula W.B., Widhalm J.R., Basset G.J., Davila J.I., Elthon T.E., Elowsky C.G., Sato S.J., et al. (2011). MutS HOMOLOG1 is a nucleoid

- protein that alters mitochondrial and plastid properties and plant response to high light. *Plant Cell* **23**, 3428–3441.
- Yabuki, N., Terashima, H. y Kitada, K. (2002). Mapping of early firing origins on a replication profile of budding yeast. *Genes Cells* **7**, 781–789.
- Yang, W. (2000). Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat Res* **460**, 245-256.
- Yoshioka K-i, Yoshioka Y, Hsieh P. (2006). ATR kinase activation mediated by MutSa and MutLa in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* **22**:501-510.
- Zhao, M., Zhao, X., Wu, Y. y Zhang, L. (2007). Enhanced sensitivity to oxidative stress in an Arabidopsis nitric oxide synthase mutant. *J Plan Physiol* **164**, 737-745.
- Zharkov, D.O. (2008). Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci* **65**(10), 1544-1565.
- Zhou, H., Suzuki, M., Ryers-Pehrson, G., Vannais, D., Chen, G., Trosko, J.E., Waldren, C.A., y Hei, T.K. (2001). Radiation risk to low fluences of particles may be greater than we thought. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **98**, 14410-14415.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**, 2621–2632.