

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio estructural y funcional de la transferencia
conjugativa de ADN en bacterias simbiotes de
leguminosas**

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas

Daniel Pérez Mendoza

para aspirar al grado de Doctor

Fdo. Daniel Pérez Mendoza

VºBº

El Director

VºBº

El Director

Fdo. Juan Sanjuán Pinilla
Doctor en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del CSIC

Fdo. Jose A. Herrera Cervera
Doctor en Ciencias Biológicas
Investigador Ramón y Cajal de
la Universidad de Granada

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estudio estructural y funcional de la transferencia
conjugativa de ADN en bacterias simbiotes de
leguminosas**

Daniel Pérez Mendoza

**TESIS DOCTORAL
2004**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidin (C.S.I.C), Granada, durante los años 2000-2004.

A mi hermano, por abrir vía

*A mis padres, por asegurar
todos mis pasos*

*A Olga, por darle color a la
vida*

Según M. Hoagland "...la curiosidad empuja a la acción, una acción en forma de indagación. Indagar significa observar, mirar, palpar, probar, oler, escuchar, preguntar. Y al poner por escrito lo que se observa, se evita que se olvide o se extravíe, y de este modo se puede enseñar a otros".

Todos poseemos la capacidad innata para aprender, lo que hasta puede ser un remedio para la tristeza, según Terence White en "The Once and Future King":

"Lo mejor para la tristeza, contesto Merlín empezando a soplar y resoplar, es aprender algo. Es lo único que no falla nunca. Puedes envejecer y sentir toda tu anatomía temblorosa; puedes permanecer durante horas por la noche escuchando el desorden de tus venas; puedes echar de menos a tu único amor; puedes ver el mundo a tu alrededor devastado por locos perversos; o saber que tu honor es pisoteado por inteligencias inferiores. Entonces sólo hay una cosa posible: aprender. Aprende por qué se mueve el mundo y lo que hace que se mueva. Es lo único que la inteligencia no puede agotar, ni alienar, que nunca le torturará, que nunca le inspirará miedo ni desconfianza y que nunca soñará con lamentar, de lo que nunca se arrepentirá. Aprender es lo que te conviene. Puedes aprender Astronomía en el espacio de una vida, Historia Natural en tres, Literatura en seis. Y entonces, después de haber agotado un millón de vidas en Biología y Medicina y Teología y Geografía e Historia y Economía, pues, entonces puedes empezar una rueda de carreta con la madera más apropiada, o pasar cincuenta años aprendiendo a empezar a vencer a tu contrincante en esgrima. Y después de eso, puedes empezar de nuevo con las Matemáticas hasta que sea tiempo de aprender a arar la tierra".

Agradecimientos

De ninguna manera hubiera sido capaz de realizar esta tesis doctoral sin la ayuda y el apoyo constante de mucha gente que poniendo su confianza en mí, ha permitido que este “barco llegue a buen puerto”. Quiero demostrar mi más sincero agradecimiento a tanta y tanta gente que de algún modo u otro ha contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

A los doctores Juan Sanjuán y José A. Herrera, por la magnífica dirección de esta tesis. A Juan quiero agradecerle la confianza y seguridad que me ha transmitido a lo largo de todos estos años. Mediante su apoyo y ánimo constante siempre ha sabido hacerme sentir seguro con el trabajo que estaba realizando. Porque muchos de los resultados de esta tesis se deben a las “magníficas luces” que se le han encendido, por escuchar mis ideas por peregrinas que fueran, y en definitiva porque siempre ha estado ahí cuando lo he necesitado. A José quiero agradecerle el esfuerzo que ha realizado durante el desarrollo de toda la tesis, y especialmente en estos últimos meses de tan duro trabajo. Porque a pesar de la distancia siempre ha intentado estar cerca de mí. Creo que al final, juntos hemos hecho un buen trabajo.

Por supuesto también tengo que agradecer a Don José Olivares el haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Porque su carrera profesional es todo un ejemplo para cualquier persona que quiera dedicarse a esto que llamamos ciencia. Por su talante como persona y como científico.

Igualmente quiero transmitir mi más sincero agradecimiento a la gente que “me ha sufrido” día a día en el laboratorio. A Soco, porque no sólo ha sido mi mano derecha, sino también la izquierda e incluso mis rodillas en los tiempos malos. Trabajar a tu lado ha sido un verdadero placer. A Maria José porque ha sido como “un vademécum de laboratorio” que durante estos años ha resuelto mis dudas. Porque siempre ha demostrado un gran interés por mi trabajo y el de mis compañeros, este grupo y la ciencia de este país necesitan científicos como tú.

¡Y como no! a los soldados rasos, a los precarios predoctorales del laboratorio. A Ana por legarme un tema tan interesante y algunos de los resultados aquí presentados, gracias también por tu amistad. A los nuevos fichajes, Juan y Rebeca. Gracias a One ¡hemos podido mantener algo de testosterona dentro del grupo! y porque me ha demostrado que cuando lo necesito puedo contar con él. A Rebeca, porque ha sido como una ráfaga de aire fresco en el laboratorio y con su sonrisa nos ha contagiado a todos, ¡ánimo con esa tesis! A Helena nuestra flamante becaria. A Lola, Mari Carmen y Virginia

Agradecimientos

por su inestimable ayuda técnica. A los que ya se han ido, como Julio y mi querida Quinita a la que tanto echamos de menos.

A tantas personas que mediante diversas estancias en el laboratorio han compartido un cachito de sus vidas con nosotros, muy especialmente a Michael Hynes, porque en este último año mi conocimiento sobre la transferencia en *Rhizobium* ha subido como la espuma gracias a él.

A mis compañeros del club del Tupperware, Patri, Chechu, Fran, Jesus, Emilio, María, Rebe, One, Ana, Eloy, Pepe, Soco, M^a Jesús, Carlota, Sergio,..., porque habéis conseguido que me sienta en la biblioteca de la segunda planta como en el comedor de mi casa, por las animadas conversaciones de sobremesa, a veces un poco escatológicas, que se entablan. A los demás compañeros del centro, porque con ellos he compartido miles de cafés, cigarros y cervezas. A mis queridas Ana Leon e Inma Sampedro, Antonio, Patricia B., Tesi, Rosa, Beatriz, José Ángel, Amada, ... A Martín mi hermano argentino porque siempre nos quedará el ribeiro y una gran amistad, al resto de becarios por lo bien que lo hemos pasado en las fiestas. A Cesar por resolver mis frecuentes problemas informáticos y a Virginia la limpiadora por recordarme todos los viernes qué día es.

A la Prof. Eva Valdivia, mi tutora, quiero agradecerle su disponibilidad siempre que he acudido a ella.

Al grupo de Susana Brom y David Romero, así como a sus colaboradores Edgardo Sepúlveda, Victoria Pando y Laura Cervantes, por ser mis homólogos al otro lado del charco. Porque colaborar con ellos siempre ha sido muy fácil a pesar de la distancia.

Agradecer al Prof. Fernando de la Cruz por abrirme las puertas de su laboratorio en Santander, así como a todo su grupo, porque desde que llegué se volcaron conmigo haciéndome sentir como uno más. Mención especial a María, simplemente porque es una chica genial, por haber tenido paciencia infinita conmigo e iniciarme en el sorprendente mundo de la relaxasas. A Cristina, es sorprendente como uno puede hacer amigos para toda la vida en tan solo unos meses, por corregir parte de este manuscrito y prestarme su ayuda cada vez que la he pedido. A Mapi y Alain, porque nunca podía imaginar que el Caribe tenía una sucursal en el frío y lluvioso Santander, es imposible expresar con palabras lo a gusto que me he sentido viviendo con vosotros.

No quiero dejar de agradecer a la gente que ha estado conmigo durante estos años fuera de estos muros. A mis tres mosqueteros, José, Javi y Gonzalo, por estar dispuestos a

Agradecimientos

malgastar el tiempo conmigo derrochando risas, relajando mis neuronas. A mis ex-compañeros de piso y amigos, David Bustamante, Pablo, Andrés, Emilio, Arantxa, Vito, Emma, porque si existe el paraíso en la tierra seguro que se parece a una de nuestras reuniones en las que coincidimos todos juntos.

A mi compañero de carrera David Martín Oliva, porque mano a mano con él comencé a dar mis primeros pasos en la investigación.

A Olga porque nadie mejor que ella sabe el esfuerzo que he realizado, por su comprensión infinita en tantas y tantas miradas perdidas, males humores, distancias y preocupaciones. Porque siempre ha sabido entender todo lo que significa este trabajo para mí, de rodillas me tiene.

A mis padres y mi hermano Manuel, porque ellos tres han sido mi referente, mi apoyo y mi recompensa, no hay un solo día que pase que no me sienta orgulloso de vosotros, gracias por haber estado siempre a mi lado. Al resto de mi familia tanto de aquí como de mi México lindo.

Que no se venguen tantos y tantos olvidados por mis maltrechas neuronas.

Para cumplir con los cánones, después de haber plantado en el jardín de mi casa uno de esos pinos que repartían a la salida de la facultad y de haber escrito este libro, como siempre, me dejo lo más difícil para el final...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.	1
1. Transferencia genética lateral entre organismos.	1
2. Transferencia genética horizontal en bacterias.	2
2.1. Transformación.	3
2.2. Transducción.	4
2.3. Conjugación.	5
3. Antecedentes e historia de la conjugación bacteriana.	5
4. Mecanismo de transferencia conjugativa.	7
4.1. Funciones implicadas en el procesamiento del ADN (Dtr).	9
4.2. Origen de transferencia u <i>oriT</i> .	15
4.3. Proteínas acopladoras.	16
4.4. Formación del par conjugativo (Mpf).	17
4.5. Relación del Mpf con otros sistemas de secreción.	21
4.6. Establecimiento de la información genética adquirida en la célula receptora.	23
4.7. Regulación de los sistemas de transferencia.	24
4.7.1. Regulación de los plásmidos IncF.	25
4.7.2. Regulación de los plásmidos IncP.	27
4.7.3. Regulación del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	28
5. Transferencia conjugativa en bacterias del orden Rhizobiales.	33
5.1. Transferencia en el género <i>Agrobacterium</i> .	34
5.1.1. Transferencia conjugativa del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> .	35
5.1.2. Transferencia del ADN-T del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> .	38
5.2. Transferencia conjugativa en bacterias simbiotes de leguminosas.	39
5.2.1. Nodulación y fijación de nitrógeno por los rizobios.	39
5.2.2. Plásmidos e islas simbióticas.	42
5.2.3. Evidencias de la transferencia conjugativa de ADN.	45
5.2.4. Sistemas de transferencia conjugativa de ADN.	47
 OBJETIVOS.	 53
 MATERIAL Y MÉTODOS.	 55
1. Técnicas microbiológicas.	55
1.1. Cepas bacterianas y plásmidos.	55
1.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> .	60
1.3. Medios de cultivo para rizobios.	60
1.4. Conservación de cepas bacterianas.	62
1.5. Antibióticos.	62
1.6. Transferencia conjugativa en condiciones de laboratorio.	63

Índice

1.6.1.	Conjugaciones biparentales.	63
1.6.2.	Conjugaciones triparentales.	63
2.	Técnicas analíticas.	63
2.1.	Determinación de actividad β -glucuronidasa.	63
3.	Técnicas de biología molecular.	64
3.1.	Aislamiento de ADN plasmídico.	64
3.2.	Aislamiento de ADN genómico total.	67
3.3.	Determinación de la concentración de ADN.	68
3.4.	Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.	69
3.5.	Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa.	69
3.5.1.	Electroforesis de ADN.	69
3.5.2.	Revelado de geles y fotografía.	70
3.5.3.	Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción.	70
3.6.	Separación de megaplásmidos mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa.	70
3.7.	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.	71
3.8.	Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.	72
3.9.	Transformación celular.	72
3.9.1.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$.	72
3.9.2.	Preparación de células electrocompetentes.	73
3.9.3.	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .	73
3.9.4.	Electroporación.	74
3.10.	Experimentos de hibridación ADN-ADN.	74
3.10.1.	Transferencia de ADN a filtros de nylon.	74
3.10.2.	Marcaje de sondas de ADN no radioactivas.	75
3.10.3.	Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactivas.	76
3.11.	Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	77
3.12.	Secuenciación de ADN.	78
3.12.1.	Secuenciación de ADN de doble cadena.	78
3.12.2.	Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas.	79
3.13.	Purificación y análisis de proteínas.	79
3.13.1.	Tampones y disoluciones.	79
3.13.1.1.	Purificación.	79
3.13.1.2.	Geles SDS-PAGE.	80
3.13.2.	Metodología.	81
3.13.2.1.	Sobre-expresión de proteínas.	81
3.13.2.2.	Purificación de proteínas.	82
3.13.2.3.	Dialización de proteínas.	83
3.13.2.4.	Electroforesis de Proteínas.	83
3.13.2.5.	Medida de concentración de proteínas.	83

3.13.2.6. Marcaje de oligonucleótidos.	84
3.13.2.7. Ensayos de unión a ADN de cadena sencilla.	84
3.13.2.8. Ensayos de corte y transferencia sobre ADN de cadena sencilla.	85
3.13.2.8.1. Oligonucleótidos ensayados.	85
3.13.2.8.2. Metodología.	86
4. Ensayos con plantas.	86
4.1. Esterilización y germinación de semillas de alfalfa.	86
4.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas.	87
4.3. Cultivo de plantas.	88
4.3.1. Cultivo axénico en tubos.	88
4.3.2 Medida del grado de infectividad.	88
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	 89
 1. LOCALIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ORÍGENES DE TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN EL GENOMA DE <i>Sinorhizobium meliloti</i> Y <i>Rhizobium etli</i> .	 89
1.1. Antecedentes.	90
1.2. Análisis de 9 de las regiones identificadas como <i>mob</i> en el genoma de <i>S. meliloti</i>.	91
1.3. Modificación de la estrategia de identificación de regiones <i>mob</i>.	94
1.4. Identificación de regiones <i>mob</i> en el genoma de <i>S. meliloti</i> GR4.	94
1.5. Identificación de regiones <i>mob</i> en el genoma de <i>R. etli</i>.	95
1.6. Localización genómica y caracterización de la familia de cósmidos pRe182R1 de <i>R. etli</i>.	97
1.7. Transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pRetCFN42d de <i>R. etli</i>.	99
1.8. La sobre-expresión del gen <i>yp028</i> promueve la transferencia del plásmido simbiótico de <i>R. etli</i>.	101
1.9. La transferencia del plásmido pRetCFN42d mediada por el gen <i>yp028</i> es dependiente de <i>traA</i>	104
1.10. La sobre-expresión del gen <i>yp028</i> eleva la expresión de los genes <i>tra</i> del plásmido simbiótico de <i>R. etli</i>.	104
1.11. Discusión.	107
ANEXO CAPÍTULO I.	111
 2. REGULACIÓN DE LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS pRetCFN42d DE <i>R. etli</i> Y pSymA DE <i>S. meliloti</i> .	 113
2.1. Regulación de la transferencia del plásmido simbiótico de <i>R. etli</i>.	113
2.1.1. Estrategia de identificación de genes implicados en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de <i>R. etli</i> .	114
2.1.2. Localización de genes implicados en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de <i>R. etli</i> .	116

Índice

2.1.3. Caracterización de los mutantes en el gen <i>rctA</i> del plásmido pRetCFN42d de <i>R. etli</i> .	122
2.1.3.1. Complementación genética de los mutantes Tn5.1 y Tn5.2 del plásmido pRetCFN42d de <i>R. etli</i> .	122
2.1.3.2. Funcionalidad de los genes homólogos a <i>rctA</i> en la familia <i>Rhizobiaceae</i> .	124
2.1.3.3. Influencia de <i>rctA</i> en la expresión de genes implicados en la transferencia conjugativa en el plásmido simbiótico de <i>R. etli</i> .	125
2.1.4. Caracterización de la inserción Tn5.6.	128
2.1.4.1. Papel del gen <i>rctB</i> en la expresión de genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d.	128
2.1.4.2. La actuación de los genes <i>rctB</i> y <i>rctA</i> está relacionada.	131
2.2. Regulación de la transferencia del plásmido simbiótico pSymA de <i>S. meliloti</i>.	132
2.2.1. Mutagénesis con Tn5 de las cepas GRM8 y 1021 de <i>S. meliloti</i> .	134
2.2.2. Mutagénesis dirigida a <i>rctA</i> de <i>S. meliloti</i> .	134
2.2.3. Expresión de los genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pSymA y pSymB de <i>S. meliloti</i> .	137
2.2.4. Efecto de los mutantes pSymA RctA ⁻ de las cepas GR4 y 1021 en la simbiosis con alfalfa	139
2.2.5. Mutagénesis aleatoria de las cepas 1021 RctA ⁻ y GR4 RctA ⁻ de <i>S. meliloti</i> con el transposón Tn5.	140
2.2.6. Efecto del plásmido pRetCFN42d sobre la transferencia del plásmido pSymA de <i>S. meliloti</i> .	143
2.3. Discusión.	145
ANEXO CAPÍTULO II.	155
3. RELAXASA DEL PLÁSMIDO SIMBIÓTICO DE <i>R. etli</i>; IMPLICACIONES EVOLUTIVAS EN PLÁSMIDOS DEL ORDEN RHIZOBIALES.	159
3.1. Caracterización de la proteína TraA del plásmido simbiótico de <i>R. etli</i>.	160
3.2. Estudio <i>in vitro</i>.	165
3.2.1. Purificación del dominio relaxasa de la proteína TraA.	165
3.2.2. Estudio del reconocimiento y unión de la proteína N265TraAHis a distintos sitios <i>nic</i> .	170
3.2.3. Estudio de la capacidad de corte/religación de la proteína N265TraAHis sobre distintos sitios <i>nic</i> .	174
3.3. Estudio <i>in vivo</i>.	178
3.3.1. Estudio de la movilización de diferentes <i>oriTs</i> por el plásmido simbiótico de <i>R. etli</i> .	178
3.3.2. Evaluación de la funcionalidad de actuación <i>cis/trans</i> de la relaxasa TraA del plásmido pRetCFN42d sobre su <i>oriT</i> .	182
3.4. Discusión.	185
ANEXO CAPÍTULO III.	191

4. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS CRÍPTICOS DE <i>S. meliloti</i> GR4	195
4.1 Secuenciación y anotación de 10 Kb del plásmido pRmeGR4a alrededor de la región <i>mob</i> .	195
4.2. Región Dtr del plásmido pRmeGR4a.	201
4.2.1. Mutagénesis del ORF3 de pRmeGR4a.	206
4.3. Identificación del sistema Mpf del plásmido pRmeGR4a: Secuenciación y anotación de los fragmentos <i>EcoRI</i> 69E1 y 69E0 del cósmido pRmOR69.	206
4.4. Discusión.	216
ANEXO CAPÍTULO IV.	221
CONCLUSIONES.	223
BIBLIOGRAFÍA.	225

INTRODUCCIÓN

1. Transferencia genética lateral entre organismos.

La molécula de ADN es universalmente conocida como una de las moléculas más importantes en el desarrollo de la vida. Lo que no es tan conocido es que la composición de ADN de un organismo puede tener un carácter “fluido” o dinámico. Con gran frecuencia el ADN puede ser transferido de un organismo a otro, incorporarse al genoma del organismo receptor y producir cambios genéticos estables y permanentes en éste. Este proceso se conoce como “transferencia lateral” (término que se usa habitualmente cuando la transferencia genética se produce entre especies de distintos reinos) o “transferencia horizontal” (más usado cuando el intercambio genético se produce entre especies del mismo reino), a diferencia de la transferencia de genes transmitida a la descendencia, proceso conocido como transferencia genética vertical. La idea de que los genes son transferidos lateralmente entre organismos ha dejado de ser “un fenómeno de laboratorio”, o “una interesante excepción a los mecanismos de transferencia clásicos”, para convertirse en un concepto básico a la hora de entender la evolución de las diferentes especies. La cuantificación de la transferencia genética lateral entre organismos es difícil de determinar, debido a la universalidad del código genético (únicamente 4 letras), como también porque la secuencia genética adquirida debe expresarse en sincronía con la del hospedador (Heinemann y Roughan, 2000). No obstante existen numerosos ejemplos que apuntan a que este proceso se produce a gran escala entre los diferentes organismos que habitan el planeta. Por ejemplo, se ha sugerido que se produce transferencia genética horizontal por transducción entre poblaciones de bacterias acuáticas marinas una vez cada 10^8 infecciones por bacteriófagos. Esta frecuencia puede no parecer muy alta, pero si consideramos las concentraciones de bacterias y virus existentes en el agua marina, y el enorme volumen de ésta, tenemos que la transferencia genética horizontal entre estos organismos se produce unos 2×10^{13} de veces por segundo en los océanos (Bushman, 2002).

Este proceso, lejos de ser un evento particular entre un determinado tipo de organismos, se ha descrito entre gran número de especies pertenecientes a distintos reinos. Incluso se ha detectado transferencia lateral entre organismos de distintos dominios como son procariotas y eucariotas. Así se ha determinado transferencia lateral entre enterobacterias y levaduras (Heinemann y Sprague, 1989), entre bacterias como *Agrobacterium* y plantas superiores (Stroun *et al.*, 1970; Nester y Kosuge, 1981; Zhu *et al.*, 2000), o entre bacterias y vertebrados (Salzberg *et al.*, 2001). También se han encontrado

Introducción

indicios de transferencia lateral entre bacterias y arqueas. Por ejemplo *Aquifex* y *Thermotoga*, ambas bacterias extremófilas, contienen el 16% y el 24% de genes de arqueas, respectivamente (Deckert *et al.*, 1998; Ochman *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1999). También se ha especulado sobre la transferencia lateral entre el material genético de organelas y núcleo de células eucariotas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), demostrando todos estos ejemplos la universalidad de este proceso.

2. Transferencia genética horizontal en bacterias.

Las bacterias son organismos unicelulares cuyos genomas pueden variar en más de un orden de magnitud de unas especies a otras. Además, presentan una heterogeneidad extraordinaria en sus propiedades metabólicas, estructuras celulares y estilos de vida. Son muchos los mecanismos que parecen ser responsables de estas diferencias entre especies bacterianas. Uno de ellos es la aparición de mutaciones puntuales y/o reorganizaciones genéticas que generan modificación, inactivación o regulación diferencial de los genes existentes. Esto ha contribuido a la diversificación de los microorganismos en una escala de tiempo evolutiva. Sin embargo, resulta difícil justificar la capacidad de las bacterias para sobrevivir en nuevos ambientes por la simple acumulación de mutaciones. De hecho, ninguna de las características fenotípicas que se usan habitualmente para diferenciar la bacteria entérica *Escherichia coli* de la especie hermana patogénica *Salmonella enterica* pueden ser asignadas a la evolución por mutación puntual en los genes comunes a ambas (Lawrence y Ochman, 1998). En cambio, hay evidencias crecientes de que la transferencia genética horizontal de genes ha jugado un papel principal en la evolución de los genomas bacterianos.

La transferencia genética horizontal necesita tres requisitos: (i) la presencia de un medio por el cual el ADN pase de la célula donadora a la receptora; (ii) que las secuencias adquiridas sean incorporadas en el cromosoma de la célula receptora, o bien, quedar asociadas a un elemento replicativo autónomo; (iii) que los genes incorporados sean expresados de forma que beneficien al microorganismo receptor, o que al menos no representen una carga para éste. Se conocen en bacterias 3 mecanismos por los que la transferencia genética horizontal puede ocurrir: transformación, transducción y conjugación.

2.1. Transformación

Implica la toma de ADN desnudo del ambiente seguido de la expresión de ese ADN en la célula receptora (Figura Int.1). Aunque en condiciones de laboratorio se ha conseguido transformar tanto células eucariotas como procariotas, solamente las bacterias parecen ser altamente transformables bajo condiciones naturales. Mediante este mecanismo es posible la transmisión de ADN entre organismos muy alejados. Algunas especies bacterianas como *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* se encuentran siempre en estado competente para aceptar ADN, mientras que otras, como *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae* precisan alcanzar un cierto estado fisiológico en su ciclo celular (Dubnau, 1999). Para que tenga lugar una transformación efectiva en *N. gonorrhoeae* y *H. influenzae*, es necesaria la presencia de unas secuencias de reconocimiento específicas (5'-GCCGTCTGAA-3' y 5'-AAGTGCGGT-3'), que están presentes en sus respectivos genomas en una frecuencia mucho mayor de la esperada al azar (Goodman y Scocca, 1988; Elkins *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1995). Aunque la presencia de secuencias específicas aumenta la eficiencia de transformación entre especies relacionadas, muchas de las bacterias naturalmente transformables no muestran preferencia por una secuencia y son capaces de altos niveles de transformación (Dubnau, 1999; Davison, 1999).

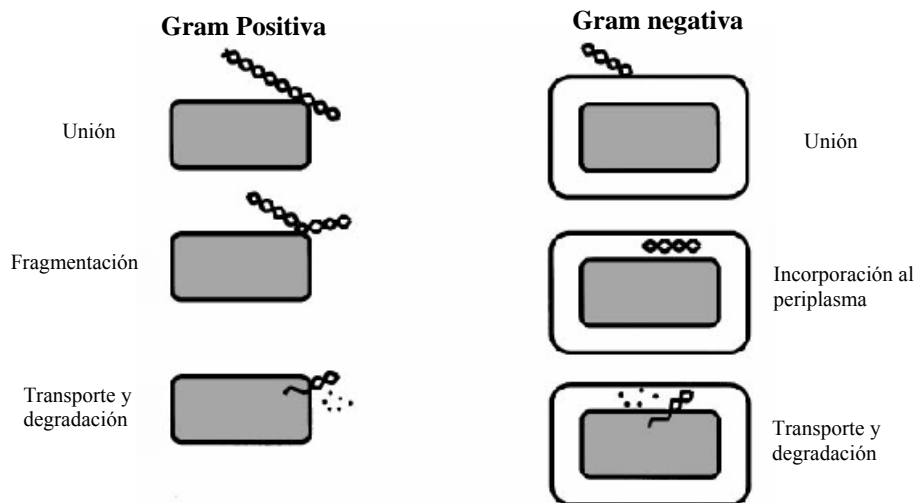


FIGURA Int.1. Transformación bacteriana.

Rutas de transformación en bacterias Gram-positivas (*B. subtilis* y *S. pneumoniae*), donde el ADN debe atravesar la pared bacteriana y la membrana citoplásmica, y Gram-negativas (*H. influenzae* y *N. Gonorrhoeae*), donde, además, debe atravesar la membrana externa. En los dos casos, el ADN se une a la superficie celular y sufre un proceso de fragmentación antes de ser transportado al interior celular. Modificado de Dubnau *et al.*,1999; por cortesía de Cristina Machón.

Introducción

2.2. Transducción

Es posible introducir material genético nuevo en una bacteria mediante un bacteriófago que previamente se ha replicado en un microorganismo donante y ha empaquetado fragmentos de su genoma (Figura Int.2). Este empaquetamiento puede ser aleatorio, dando origen a la denominada transducción generalizada, o bien limitarse al ADN adyacente a los sitios de integración del fago, con lo que estaríamos ante un caso de transducción especializada. La cantidad de ADN que puede ser transferida en un único suceso está limitada por el tamaño de la cápsida del fago. Aunque los fagos se encuentran dispersos en el ambiente (Jiang y Paul, 1998; Schicklmaier y Schmieger, 1995), el espectro de microorganismos que pueden infectar está limitada por la especificidad del bacteriófago. Como en el caso de la transformación, en la transducción no es necesaria la presencia de células donadoras y receptoras en el mismo tiempo y lugar. Por otra parte, las proteínas codificadas por el fago no sólo intervienen en la liberación del ADN de cadena doble en el citoplasma del receptor, sino que también promueven la integración de éste en el cromosoma, y lo protegen de la degradación por endonucleasas de la bacteria receptora.

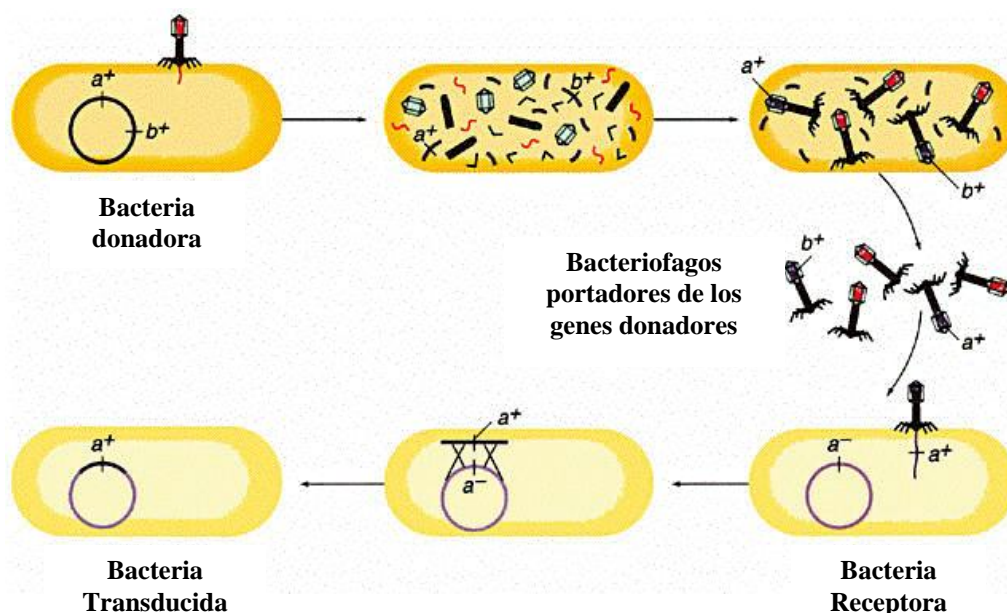


FIGURA Int.2. Transducción bacteriana.

En la figura se representa, esquemáticamente, el ciclo lítico de un bacteriófago. En un primer paso, el fago introduce su ADN en la bacteria, y éste se integra en el genoma bacteriano. Posteriormente, se sintetizan todos los componentes de la cápsida y se produce la replicación del ADN, que será empaquetado en ésta. Se generan así nuevos bacteriófagos, que terminan lisando la célula. Por error, se incluye parte del ADN de la célula huésped (a^+). Este fago, al infectar otra bacteria, introducirá en ésta ADN de la bacteria anterior, produciéndose el fenómeno de la transducción. Figura tomada de "Bacterial genetics" <http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/roanoke/genetics980309.html>.

2.3. Conjugación

La conjugación bacteriana implica un contacto físico entre dos células vivas, donadora y receptora (Figura Int.3), y puede mediar el intercambio de material genético entre dominios, tal y como se ha apuntado anteriormente. Típicamente, el ADN es transferido de una cepa donadora a una receptora, por un plásmido auto-transmisible o por uno movilizable (con la ayuda del primero). La conjugación también puede originar la transferencia de secuencias cromosómicas, mediante plásmidos que se integran en el cromosoma, formando así cepas donantes Hfr (de “high frequency of recombination”), o por transposones conjugativos, que codifican las proteínas necesarias para su escisión de la donadora, la formación de un puente conjugativo y la transposición en la cepa receptora.

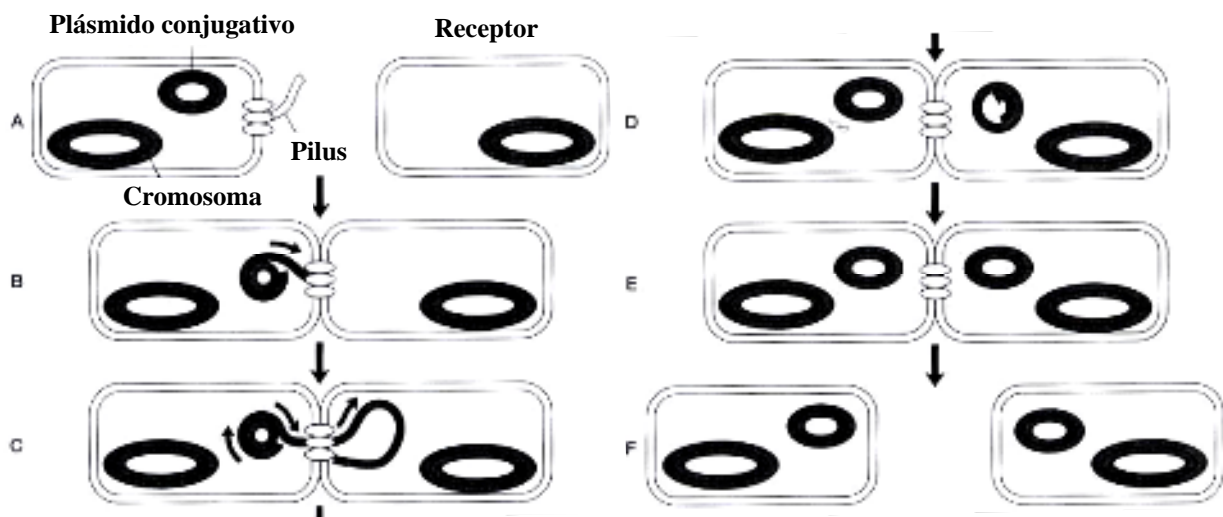


FIGURA. Int.3. Conjugación bacteriana.

En la figura se representa el proceso de conjugación bacteriana. A) Representación de la célula donadora y receptora. B) Formación de complejo de agregación y corte sitio específico de la hebra que va a ser transferida a la célula receptora. C) Progreso de la transferencia del ADN mediante replicación por círculo rodante (RCR). D) Síntesis de la hebra complementaria de la cadena de ADN transferida en la célula receptora. E) Religación a nivel del *oriT* del ADN Transferido. F) Separación de las células y fenómenos de exclusión de superficie. Modificado de “Lateral DNA Transfer Mechanism and Consequences” (Bushman, 2002).

A pesar de toda esta diversidad de mecanismos, la introducción de ADN en el citoplasma de las células receptoras no garantiza que la transferencia horizontal de genes tenga éxito, salvo que las secuencias transferidas se mantengan estables en el microorganismo receptor. La adquisición de ADN en el genoma bacteriano puede tener lugar por varios procesos, como por ejemplo, la persistencia como forma replicativa autónoma, la recombinación (homóloga o no) o la integración (mediada por integrasas de bacteriófagos o transposasas de elementos móviles). A través de estos mecanismos

Introducción

cualquier secuencia de ADN puede ser intercambiada entre bacterias. Sin embargo, el pequeño tamaño de los genomas bacterianos implica que la proporción de ADN adquirido, o su mantenimiento, es muy bajo o bien éste es compensado con la pérdida de secuencias pre-existentes.

3. Antecedentes e historia de la conjugación bacteriana.

La conjugación bacteriana es una de las principales rutas de intercambio genético entre procariotas. A pesar de que el proceso ha sido estudiado durante 50 años, la enzimología de muchos de sus pasos resulta ser, todavía hoy, un misterio.

En 1946, Ledeberg y Tatum descubrieron que la cepa *E. coli* K12 podía actuar como donadora de genes cromosómicos. Posteriormente, se comprobó que el responsable de esta actividad era un plásmido conjugativo críptico, el factor F (Cavalli *et al.*, 1953; Hayes, 1953). El factor F contiene multitud de copias de secuencias de inserción (IS), que se encuentran también en el cromosoma de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas. Estas secuencias de inserción son puntos calientes para la integración del factor F en el cromosoma, por recombinación homóloga. En el estado integrado, denominado Hfr, la transferencia de genes cromosómicos tiene lugar con una alta probabilidad. Ésta comienza con la integración del plásmido y es unidireccional. Esta propiedad se usó, por ejemplo, para el mapeo de genes cromosómicos, mediante la determinación del periodo de tiempo requerido para que un determinado marcador llegase a la célula receptora. Gracias a esta técnica pudo demostrarse además que el cromosoma de *E. coli* era circular (Jacob y Wollman, 1958).

La conjugación bacteriana también es empleada como herramienta para introducir información genética en organismos donde los protocolos de transformación son complicados. Así, empleando vectores con orígenes de replicación alternativos, se puede transferir y mantener de forma estable información genética entre especies filogenéticamente muy alejadas, como por ejemplo entre *E. coli* y *Sacharomyces cerevisiae* (Heinemann y Sprague, 1989).

Con la aparición de los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas y como suplemento en la dieta animal, empezaron a detectarse cepas bacterianas resistentes a multitud de estos antibióticos (Watanabe, 1963). Se pudo comprobar que estas estirpes contenían elementos extracromosómicos, plásmidos conjugativos y factores de resistencia

(R-), que contenían la información genética para ese fenotipo (Watanabe y Fukasawa, 1960). Así, los genes de resistencia a antibióticos se encontraban en muchos casos formando parte de elementos transponibles, sugiriendo que los plásmidos habían adquirido esos genes recientemente en respuesta a un cambio ambiental impuesto por sus huéspedes. El fenómeno de propagación de la resistencia a antibióticos debería servir como ejemplo del potencial que tienen los procariontes para adaptarse rápidamente a los cambios medioambientales. Otros ejemplos de genes que se localizan en plásmidos y que podrían ayudar a su huésped a existir bajo ciertas condiciones especiales, son los genes de virulencia, genes de utilización de determinados carbohidratos o genes para la biodegradación de hidrocarburos aromáticos (Amabile-Cuevas y Chicurel, 1992).

La conjugación bacteriana es modelizada actualmente como la suma de dos procesos tan distintos como son la replicación del ADN por círculo rodante (RCR) y la secreción de macromoléculas (Llosa *et al.*, 2002). Las enzimas encargadas del procesamiento del ADN en la conjugación, codificado por los genes Dtr (de “DNA transfer and replication”), y las secuencias que aquéllas reconocen, son componentes del denominado relaxosoma y muestran una gran similitud de secuencia con los sistemas de replicación por círculo rodante (Waters y Guiney, 1993). Por otra parte, el conjunto de proteínas conjugativas denominadas proteínas Mpf (de “mating pair formation”), que se ensamblan para formar un transportador en la membrana, pertenecen a la familia de sistemas de secreción tipo IV (T4SS) (Christie, 2001). Estos dos procesos se conectan gracias a una proteína presente en los sistemas conjugativos, denominada proteína acopladora, la cual juega un doble papel conectando el relaxosoma con el transportador de la membrana y participando en el transporte activo del ADN (Llosa *et al.*, 2002).

4. Mecanismo de transferencia conjugativa

Como se ha apuntado anteriormente, la conjugación es el proceso por el cual una molécula de ADN es transferida desde un donador hasta una célula receptora, por medio de un complejo proteico conocido como aparato conjugativo. La conjugación bacteriana presenta varias características relevantes, como son: (i) requiere un contacto físico entre dos bacterias vivas, la donadora y la receptora, (ii) usualmente está mediada por plásmidos o transposones conjugativos, y (iii) como consecuencia de la alta diversidad plasmídica, hay numerosas diferencias de unos sistemas a otros. Se puede encontrar numerosa y

Introducción

detallada bibliografía sobre este proceso. Se han escrito varios libros sobre la materia. Una buena primera revisión de estos estudios es el libro “Bacterial conjugation” (Clewell, 1993) seguida cronológicamente por “The horizontal gen pool” (Thomas, 2000). Igualmente se pueden encontrar numerosas revisiones bibliográficas más concretas (Lanka y Wilkins, 1995; Pansegrau y Lanka, 1996; Farrand, 1998; de la Cruz y Lanka, 1998).

Tal y como se ha apuntado anteriormente, la primera conclusión que se extrae de cualquier revisión sobre los sistemas de transferencia conjugativa presentes en bacterias, es la amplia diversidad de estrategias desarrolladas por los diferentes elementos conjugativos implicados en dicha transferencia. El amplio espectro de sistemas abarca desde los plásmidos del grupo de incompatibilidad (Inc) F e IncI, de estrecho rango de hospedador, hasta los plásmidos de amplio rango de hospedador pertenecientes a los grupos IncN, P y W de bacterias Gram-negativas. Sin embargo, en oposición a esta diversidad funcional, se han descrito varios mecanismos principales conservados en todos estos sistemas. Estos principios establecen la premisa de que muchos sistemas de transferencia de ADN incluyen, por ejemplo, la síntesis de un pilus conjugativo o algún otro sistema que medie en el contacto intercelular; todos los sistemas, tanto autoconjugativos como movilizables, suelen portar funciones implicadas en el procesamiento del ADN a transferir, presentan algún tipo de mecanismo para el establecimiento del ADN adquirido por el receptor, y suelen llevar vinculados sistemas de regulación que establecen en qué condiciones se produce la transferencia.

Históricamente la conjugación ha sido estudiada mayoritariamente a través del análisis de los plásmidos de resistencia a antibióticos de bacterias Gram-negativas, y particularmente los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Este hecho responde por una parte a la importancia desde el punto de vista sanitario que implica la transferencia de este tipo de plásmidos, y por otra a la relativa facilidad metodológica que supone la investigación con este tipo de bacterias. Los resultados de estos estudios han sido extrapolados para facilitar la investigación de la transferencia conjugativa en otros grupos bacterianos. Por lo tanto, la revisión de los mecanismos de transferencia conjugativa descritos en esta introducción atiende a los procesos de muchos de los plásmidos de bacterias Gram-negativas, que difieren de las estrategias utilizadas por otros sistemas, como los utilizados por bacterias Gram-positivas.

4.1. Funciones implicadas en el procesamiento del ADN (Dtr)

Las relaxasas son los enzimas clave en el comienzo de la transferencia del ADN por RCR, catalizando el corte sitio- y hebra- específico del ADN en el sitio *nic*, de un origen de transferencia (*oriT*). Junto con proteínas accesorias, codificadas tanto por el plásmido como por el huésped, las relaxasas forman un complejo multiproteico en el *oriT*, denominado relaxosoma (Fürste *et al.*, 1987). En todos los sistemas estudiados, ya sean plásmidos autotransmisibles o movilizables, la reacción de corte se produce por una reacción de transferencia de cadena, que implica la formación de un intermediario covalente ADN-relaxasa. La formación de éste se cree que permite la restauración de la molécula circular original después de completarse la transferencia del ADN, mediante una nueva reacción de transferencia de cadena inversa a la primera (por un ataque nucleófilo del extremo 3'-hidroxilo del ADN libre al extremo 5' covalentemente unido). Han sido estudiadas numerosas relaxasas de diferentes sistemas conjugativos. Las mejor caracterizadas son claramente aquéllas en las cuales se han realizado estudios de actividad *in vitro* mediante su previa purificación. Estas incluyen las relaxasas de plásmidos IncP (Pansegrau *et al.*, 1990a; Pansegrau *et al.*, 1993b), IncQ (Scherzinger *et al.*, 1992) e IncF (Inamoto *et al.*, 1994; Inamoto *et al.*, 1991; Fukuda y Ohtsubo, 1997; Matson y Morton, 1991; Sherman y Matson, 1994), así como el sistema de transferencia de ADN-T del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Pansegrau *et al.*, 1993a; Scheiffle *et al.*, 1995). Recientemente se han descrito otros sistemas como el del plásmido R388 IncW (Llosa *et al.*, 1995) en el que se ha resuelto por primera vez la estructura tridimensional de una relaxasa (Guasch *et al.*, 2003). Estas proteínas se caracterizan por poseer uno o varios dominios según el tipo de sistema conjugativo al que pertenecen, donde el dominio relaxasa puede estar acompañado de otros dominios relacionados con su función, como son los dominios helicasa o primasa.

Dentro del dominio relaxasa de un plásmido IncP se han descrito hasta 3 motivos conservados (Pansegrau *et al.*, 1994; Pansegrau y Lanka, 1991) que parecen ser bastante constantes en las relaxasas de diferentes bacterias Gram-negativas y en menor medida en bacterias Gram-positivas, aunque también distinguibles (como ejemplo la proteína MobM relaxasa de pMV158; Guzmán y Espinosa, 1997; Figura Int.4A y B). Por tanto han servido como motivos modelo para el estudio de las relaxasas de diferentes grupos. Diversos estudios mutacionales han permitido asignar funciones a los distintos motivos de este

Introducción

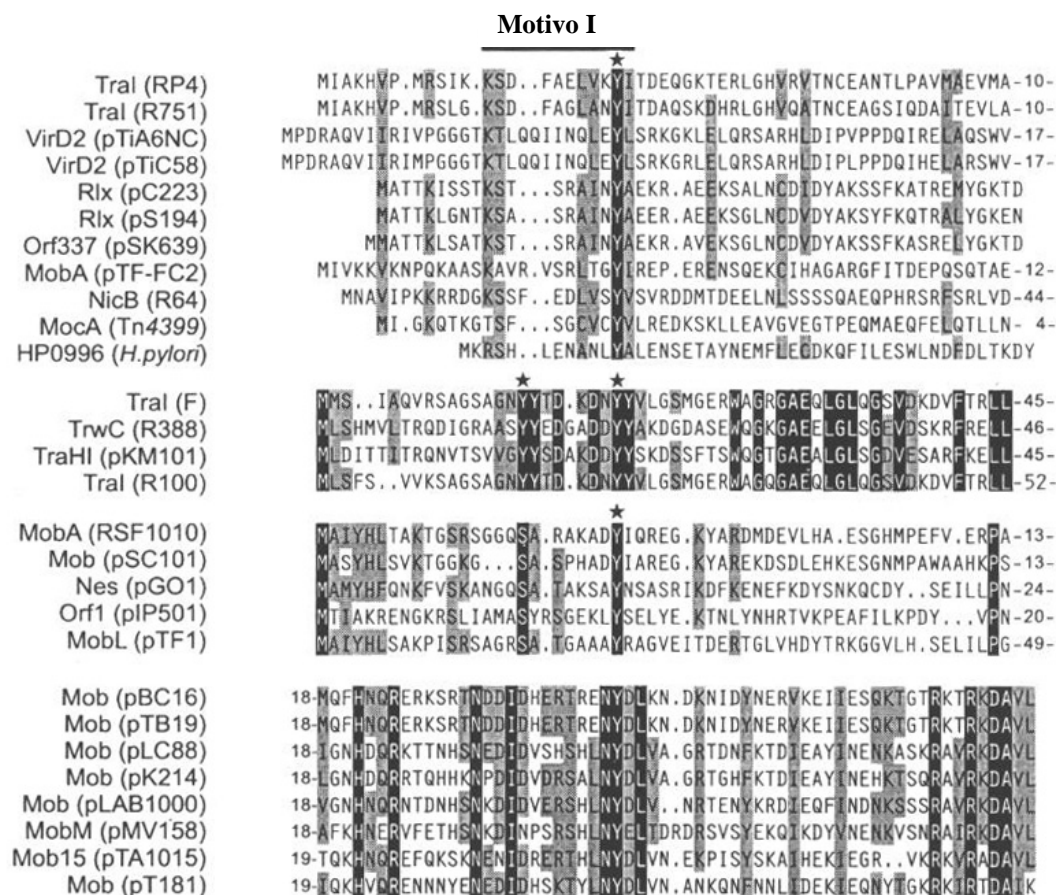


FIGURA Int.4A. Conservación del motivo I en diferentes relaxasas.

Las posiciones aminoacídicas conservadas se representan en fondo negro. En fondo gris se muestran las posiciones donde se ha producido alguna sustitución aminoacídica. La localización y delimitación de la conservación del motivo I identificado en las relaxasas tipo IncP se indica mediante una barra negra sobre la secuencia. La tirosina activa del motivo I está marcada mediante un asterisco. Figura tomada de “Conjugative-DNA transfer process” (Zechner *et al.*, 2000).

dominio. El motivo I contiene un residuo de tirosina (Tyr-22 en TraI de RP4) que “ataca” de forma reversible al enlace fosfodiéster del ADN a nivel del sitio *nic* en la reacción de corte y religación. Un residuo de serina en el motivo II (Ser-74 en TraI de RP4) está involucrado en la unión covalente de la Tyr de la relaxasa al extremo 3'-OH del sitio *nic* generado tras el corte. Asimismo, el motivo III contiene 2 residuos de histidina (His-116 e His-118, en TraI de RP4), los cuales parecen estar implicados en la activación de la tirosina del motivo I. Esta pareja de histidinas está conservada igualmente en varias proteínas iniciadoras del proceso RCR (Ilyina y Koonin, 1992).

- Relaxasas tipo IncP: Las relaxasas tipo IncP poseen una estructura común por dominios. Un dominio catalítico N-terminal de unos 250 aminoácidos, que contiene los

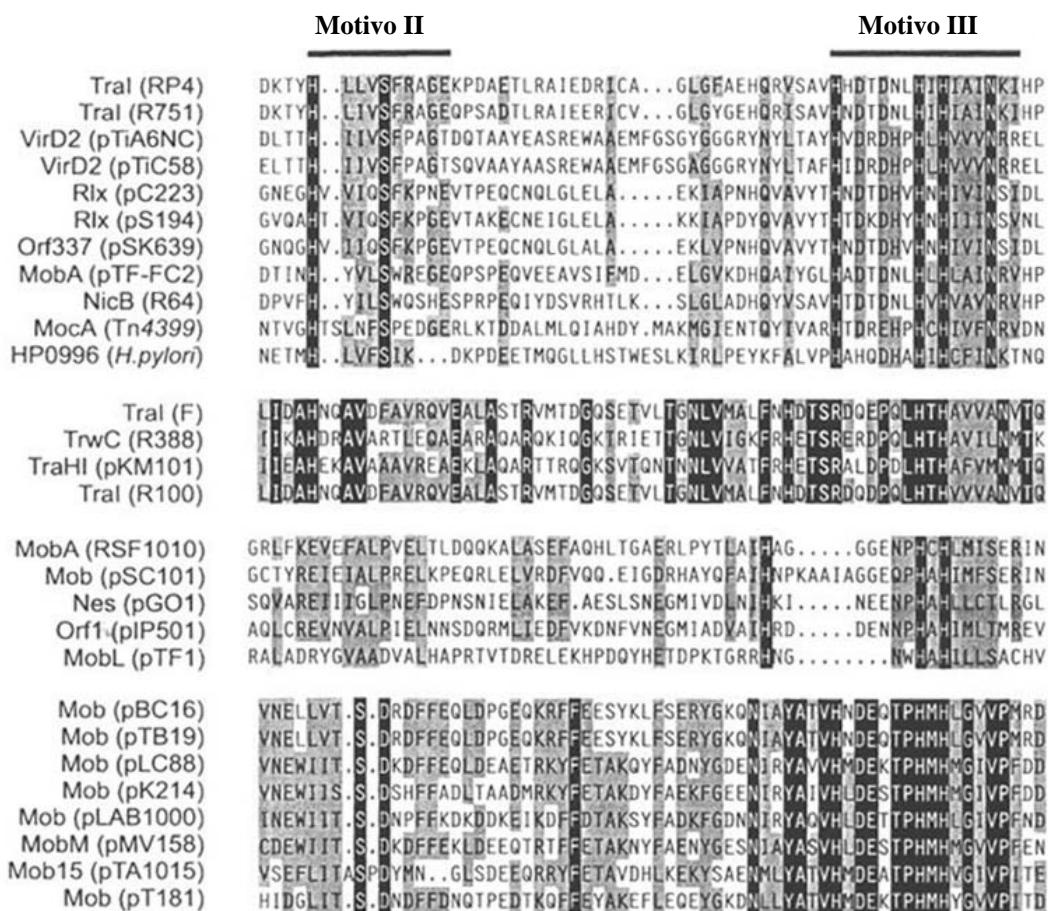


FIGURA Int.4B. Motivos II y III conservados en las diferentes relaxasas.

Las posiciones aminoacídicas conservadas se representan en fondo negro, En fondo gris se muestran las posiciones donde se ha producido alguna sustitución aminoacídica. La localización y delimitación de la conservación del motivo II y motivo III identificados en las relaxasas tipo IncP se indican mediante barras negras sobre la secuencia. Figura tomada de “Conjugative-DNA transfer process” (Zechner *et al.*, 2000).

tres motivos conservados descritos anteriormente, cada uno de los cuales incluye, al menos, un residuo invariable (Figura Int.4A y Int.4B); y un dominio C-terminal de tamaño variable, que aparentemente interviene en la interacción con otros componentes de la maquinaria de transferencia. En el caso de la relaxasa VirD2 codificada por el plásmido Ti, el dominio C-terminal contiene señales de localización nuclear que van a dirigir el complejo-T al núcleo de la planta (Howard *et al.*, 1992; Steck *et al.*, 1990; Tinland *et al.*, 1992).

Tanto TraI como VirD2 pueden cortar de forma reversible oligonucleótidos que contengan la secuencia de la región *nic* del *oriT* de RP4 o el borde del ADN-T, respectivamente (Pansegrau *et al.*, 1993b; Pansegrau *et al.*, 1993a). Además son capaces de relajar plásmidos superenrollados que contengan el *oriT* de RP4 o el borde del ADN-T, en

Introducción

presencia de una combinación de las proteínas TraJ/TraI (Pansegrau *et al.*, 1990a) o VirD1/VirD2 (Scheiffele *et al.*, 1995), respectivamente. Las condiciones óptimas en las que el corte tiene lugar son baja fuerza iónica, presencia de iones Mg^{2+} y pH 8,5.

En RP4, para la formación de un relaxosoma estable en un plásmido superenrollado que contenga el *oriT*, es necesaria la presencia de al menos dos proteínas accesorias. La primera de ellas es la proteína homodimérica TraJ, que actúa como un determinante de especificidad al reconocer una secuencia repetida invertida de 38 pb próxima al *nic* (Ziegelin *et al.*, 1989). Se ha propuesto que este reconocimiento es el primer paso que desencadena la formación del relaxosoma (Pansegrau *et al.*, 1990a), ya que la unión de TraJ alteraría localmente la estructura del ADN y permitiría el acceso de TraI a su sitio de reconocimiento (Figura Int.5).

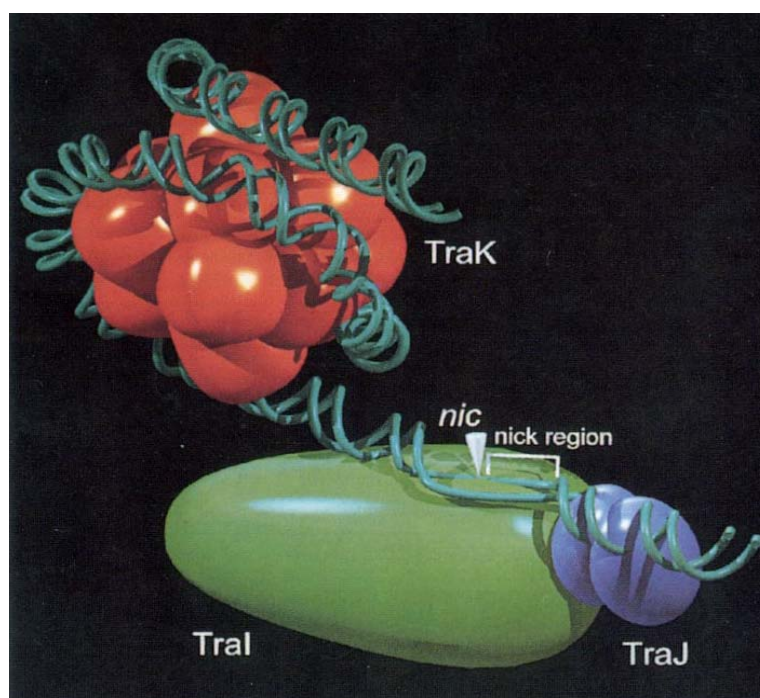


FIGURA Int.5. Modelo del relaxosoma propuesto para plásmidos IncP.

En la figura se muestra el modelo propuesto para la formación de un relaxosoma tipo IncP. Ver texto para la explicación. Figura tomada de “Conjugative-DNA transfer process” (Zechner *et al.*, 2000).

La segunda proteína accesoria es TraH, un polipéptido que interacciona específicamente con TraI y TraJ estabilizando el complejo multiproteico relaxosomal. Se ha propuesto que TraH tiene actividad chaperona. Otra proteína accesoria identificada como un segundo determinante específico que interacciona con el *oriT* es TraK (Ziegelin

et al., 1992). Aunque TraK no es esencial ni para la reacción de corte ni para la formación estable del relaxosoma *in vitro*, es un factor esencial *in vivo* (Fürste *et al.*, 1989). Analizando el complejo nucleoproteico TraK-*oriT* *in vitro*, se observó que TraK enrolla alrededor de sí misma una región de 180 pb del origen de transferencia (Figura Int.5) (Ziegelin *et al.*, 1992). El cambio local en el superenrollamiento podría ayudar a desenrollar la región *nic*, facilitando el acceso de TraI a su sitio de unión.

- Relaxasas tipo IncQ: El prototipo de relaxasa de este grupo es la proteína MobA del plásmido movilizable RSF1010 y del virtualmente idéntico R1162. MobA es una proteína multifuncional, ya que además del dominio relaxasa N-terminal contiene un dominio primasa C-terminal, activo en la replicación vegetativa del plásmido (Scherzinger *et al.*, 1991), que aparentemente también está implicado en la replicación vinculada a la transferencia (Henderson y Meyer, 1996). Presenta varios de los motivos conservados en el dominio relaxasa tal y como se muestra en la Figura Int.4A y B. La función primasa, así como su sitio de iniciación cercano al *oriT* es imprescindible para la transferencia óptima de RSF1010. La asociación de ambos motivos, relaxasa y primasa, de MobA parece promover la eficiente iniciación de la síntesis de la hebra complementaria en la célula receptora. Las propiedades bioquímicas requeridas para la reacción de corte de un ADN de cadena doble (ADNs) o sencilla (ADNs) son similares a las descritas para otras relaxasas (Scherzinger *et al.*, 1992). Aunque el dominio relaxasa es suficiente para producir corte, se ha determinado que la presencia de las proteínas accesorias MobB y MobC incrementan la eficiencia del mismo (Scherzinger *et al.*, 1992). MobC se ha propuesto como una proteína accesoria que funcionaría a modo de “cuña” sobre el ADN, facilitando la unión de MobA al sitio *nic* de cadena sencilla. Por otro lado, MobB parece incrementar la estabilidad del relaxosoma, y es capaz de desplazar el equilibrio corte/religación del sitio *nic* hacia el estado de corte (Perwez y Meyer, 1996).

El plásmido Ti de *A. tumefaciens* se caracteriza por portar 3 genes que codifican 3 relaxasas diferentes. 2 de ellas son las relaxasas implicadas en la transferencia del ADN-T del plásmido Ti de *A. tumefaciens* hasta la célula receptora (VirD1 y VirD2), que son de tipo IncP. TraA, la tercera relaxasa codificada por este plásmido, está supuestamente implicada en la transferencia conjugativa del plásmido Ti entre bacterias, y ha sido descrita como una proteína quimérica, en términos evolutivos, entre las relaxasas MobA y TraI de los plásmidos RSF1010 (IncQ) y F (IncF), respectivamente (Farrand *et al.*, 1996). De esta

Introducción

forma, TraA presenta motivos dentro del dominio relaxasa, muy parecidos a los descritos en MobA y motivos dentro del dominio helicasa similares a los descritos para TraI (para más información véase Capítulo 3 de esta tesis).

- Relaxasas tipo IncF, IncN e IncW: Las relaxasas codificadas por los plásmidos IncF, IncN e IncW tienen una estructura por dominios idéntica, consistente en un dominio N-terminal relaxasa y uno C-terminal helicasa (Byrd y Matson, 1997; Llosa *et al.*, 1996; Matson y Morton, 1991). Es debido a este último que la proteína TraI del plásmido F fue inicialmente denominada ADN helicasa I (Abdel-Monem y Hoffmann-Berling, 1976). Posteriormente se corrigió este error y se determinó la actividad de corte específico del *oriT* (Matson y Morton, 1991; Reygers *et al.*, 1991).

Por otra parte, se demostró que la actividad ADN helicasa de la relaxasa tipo IncW, TrwC, era esencial para la transferencia conjugativa del ADN, mediante la disección de los dos dominios, relaxasa y helicasa (Llosa *et al.*, 1996). Aunque la transferencia podía ser restablecida expresando independientemente estos dos dominios, la frecuencia a la que aquella tenía lugar era menor que en el caso de la proteína nativa, demostrándose así que era necesaria la unión física de los dos dominios (Llosa *et al.*, 1996).

En la reacción reversible de corte, catalizada por las relaxasas tipo IncF/IncW *in vitro*, es necesaria la presencia de iones Mg^{2+} . Como producto de ella, la relaxasa queda covalentemente unida al extremo 5' del ADN (Inamoto *et al.*, 1994; Llosa *et al.*, 1995; Matson *et al.*, 1993). Cuando el ADN a cortar es de doble cadena, ya sea en forma relajada o lineal, se requiere, además, la presencia de proteínas accesorias como TraY e IHF (de “integration host factor”, proteína codificada por el huésped) en el caso de IncF (Inamoto *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995), y TrwA en el sistema IncW (Llosa *et al.*, 1996; Moncalián *et al.*, 1997). TraY y TrwA son proteínas específicas de unión a ADN que reconocen dos sitios diferentes en sus orígenes de transferencia. Ambas proteínas son oligoméricas y pertenecen a la familia de represores Arc/Mnt (Knight *et al.*, 1989).

Los sitios de unión de TraY y TraI en el *oriT* de IncF están demasiado lejos uno del otro como para permitir la interacción de las dos proteínas. Sin embargo, están separados por el sitio de unión de IHF, de forma que la unión de ésta produce una torsión en el ADN que permite un contacto específico entre TraI y TraY (Byrd y Matson, 1997).

Una proteína esencial en la transferencia, que también se une específicamente al *oriT* de IncF, es TraM (Schwab *et al.*, 1991; Abo *et al.*, 1991; Di Laurenzio *et al.*, 1992; Di

Laurenzio *et al.*, 1995). TraM reconoce múltiples sitios en el origen de transferencia y se ha comprobado que estimula la reacción de corte *in vivo* (Kupelwieser *et al.*, 1998).

4.2. Origen de transferencia u *oriT*

El origen de transferencia juega un papel central en la iniciación del proceso de transferencia y replicación conjugativa. Es la única secuencia que es requerida *in cis* para la transferencia de un determinado ADN (Lanka y Wilkins, 1995). 5 grupos principales de secuencias han sido descritas gracias a la comparación de un gran número de *oriTs* (Guzmán y Espinosa, 1997; Lanka y Wilkins, 1995) (Figura Int.6). Además, un estudio detallado permite determinar secuencias consenso entre familias muy diferentes. También se ha descrito una interesante correspondencia entre los orígenes de RCR vegetativa de plásmidos y bacteriofagos de ADNss y los *oriTs* de plásmidos tipo IncP (Pansegrau y Lanka, 1996; Waters y Guiney, 1993).

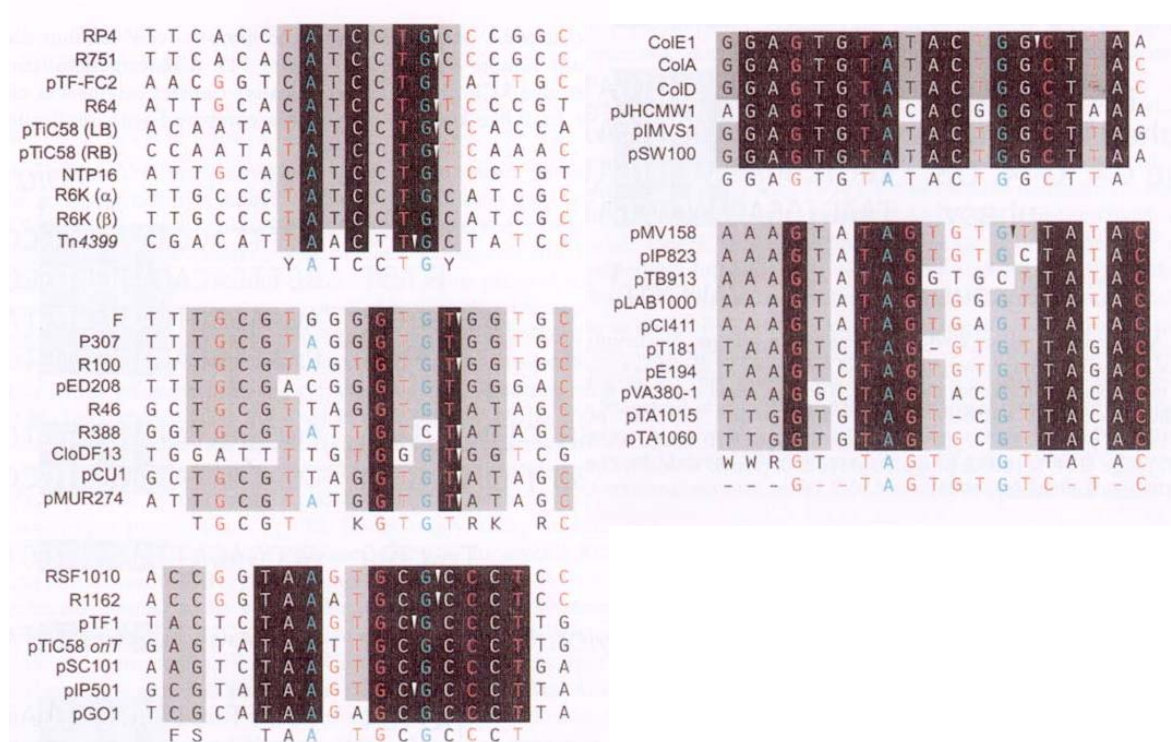


FIGURA Int.6. Alineamiento de *oriT*

En la figura se muestra un alineamiento con las secuencias de diferentes familias de *oriTs*. Fondo negro = todas las secuencias conservadas; Fondo gris = 2 nucleótidos diferentes; Mediante una flecha se indican aquellos sitios *nic* que han sido determinados experimentalmente. Azul = nucleótidos conservados en más del 80%; Rojo = en más del 40%. Figura tomada de “Conjugative-DNA transfer process” (Zechner *et al.*, 2000).

Introducción

La alta conservación mostrada por las secuencias que forman los *oriTs* de los distintos elementos conjugativos, da una idea de la esencialidad de la preservación inalterada de este tipo de secuencias para un correcto reconocimiento por la relaxasa. Se ha demostrado en numerosas ocasiones que un sólo cambio nucleotídico puede ocasionar la pérdida total de la funcionalidad del mecanismo de corte y religación por la relaxasa (Stern y Schildbach, 2001). Esto ha generado, además, un cierto fenómeno de co-evolución entre los dominios relaxasas y sus respectivos *oriTs*, de forma que un tipo de dominio relaxasa suele ir acompañado de un mismo tipo de *oriT* (Figuras Int.4A, B e Int.6).

4.3. Proteínas acopladoras

En todos los sistemas conjugativos se han encontrado análogos a proteínas acopladoras o de tipo TraG. Evidencias genéticas sugieren que estas proteínas forman un nexo que posibilitaría la unión de las funciones Dtr (relaxosoma) y complejo del poro asociado a la membrana (Mpf) (Balzer *et al.*, 1994; Cabezón *et al.*, 1997). Además de servir de nexo de unión, se ha visto que estas proteínas pueden actuar como proteínas “adaptadoras”, imprimiendo especificidad al sistema y determinando qué interacciones relaxosoma-poro son válidas y cuáles no (Cabezón *et al.*, 1994; Sastre *et al.*, 1998; Hamilton *et al.*, 2000).

Estas proteínas toman una especial relevancia en la transferencia de los plásmidos movilizables (Francia *et al.*, 2004). Éstos se caracterizan por poseer tan sólo las funciones Dtr codificadas en su secuencia lo que implica que, para una correcta movilización, su relaxosoma debe interactuar con la proteína acopladora así como con la maquinaria de transporte (Mpf) de otro sistema. La excepción la establece el plásmido movilizable CloDF13, que aparentemente codifica su propia proteína acopladora (MobB), lo que le permite ser extremadamente independiente del tipo de plásmido movilizador que aporte las funciones Mpf en *trans* (Cabezón *et al.*, 1997).

Como ejemplos de proteínas acopladoras están TraG (IncP), TraD (IncF), VirD4 y TraG (plásmido Ti), TrwB (IncW), TrsK (pGO1), la mayoría de las cuales han sido descritas como proteínas de la membrana interna asociadas a un sistema T4SS. Dichas proteínas exhiben motivos conservados en su secuencia (Balzer *et al.*, 1994; Lessl *et al.*, 1992). Dentro de estos motivos conservados destaca la presencia de los motivos NBD (de “nucleotide binding domains”), tales como los Walker A y B (Walker *et al.*, 1982). Es

posible que estas proteínas tengan actividad ATPasa (Rivas *et al.*, 1997), tal y como sugiere su similitud con varias proteínas que poseen esta misma actividad (Gomis-Rüth *et al.*, 2001; Gomis-Rüth *et al.*, 2002). Esta supuesta hidrólisis de NTP se emplearía para el movimiento activo de la molécula de ADN hacia el Mpf, donde el ADN se transferiría a la célula receptora en dos pasos (“disparo y bombeo”), según el modelo propuesto por algunos autores (Llosa *et al.*, 2002). El descubrimiento de proteínas análogas a proteínas tipo TraG tanto en archaeas como en bacterias Gram-positivas, sugiere un mecanismo análogo para este tipo de proteínas en estos grupos (She *et al.*, 1998).

Por otro lado, estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de las proteínas tipo TraG en patogénesis. Se ha demostrado, por ejemplo, que la mutación del gen que codifica VirD4 de *Bartonella tribocorum*, elimina totalmente la capacidad de esta bacteria para causar bacteriemia en ratas (Schulein y Dehio, 2002).

4.4. Formación del par conjugativo (Mpf)

En el modelo general de la conjugación bacteriana, un aspecto mecánico importante de la transferencia de ADN entre bacterias Gram-negativas es que las superficies de las células donadora y receptora tienen que estar en contacto íntimo. Los contactos intercelulares específicos necesarios para la transferencia del plásmido son promovidos por filamentos extracelulares conocidos como pili sexuales. El contacto es iniciado por la interacción del extremo del pilus con la superficie de la célula receptora. El pilus conjugativo es morfológicamente muy distinto de un sistema a otro (Ippen-Ihler y Mannewannakul, 1991). Así, mientras los plásmidos tipo F utilizan un pilus largo y flexible que les permite conjugarse en medio líquido, los plásmidos tipo IncP, IncN, IncW y el ADN-T de *A. tumefaciens* utilizan uno rígido, para conjugarse en medio sólido.

El pilus de F es una estructura dinámica, que interviene en la unión a receptores específicos en la superficie de la bacteria receptora, y que se retrae para establecer un contacto directo entre la célula donadora y la receptora. Así, estos pili probablemente intervienen en la agregación celular a través de interacciones hidrofóbicas no específicas. La retracción del pilus va a originar una asociación de las superficies celulares que, posteriormente, son estabilizadas. Más tarde se forma un puente conjugativo entre las células que va a servir como conducto por el que pasará el ADN. Éste es un modelo de

Introducción

cómo comienza el proceso, ya que no hay evidencias experimentales para confirmar todos los pasos indicados.

A excepción de los plásmidos tipo IncF (Frost *et al.*, 1994), las funciones requeridas para la formación del Mpf suelen estar en sistemas conjugativos codificados por 1 o pocos operones contiguos (Figura Int.7), que a su vez se encuentran separados de las funciones Dtr. Sin embargo, esto no quiere decir que dichos operones no tengan una estructura modular, donde algunos genes pueden sufrir cambios de posición en el curso de la evolución, o incluso haber sido adquiridos en eventos independientes. Como ejemplo, se puede ver en la Figura Int.7 cómo los genes *trbFGHI* y *trbJKL* de la región Tra3 del plásmido pTi15955 han sufrido una reorganización con respecto a los homólogos de la región Tra2 del plásmido RP4.

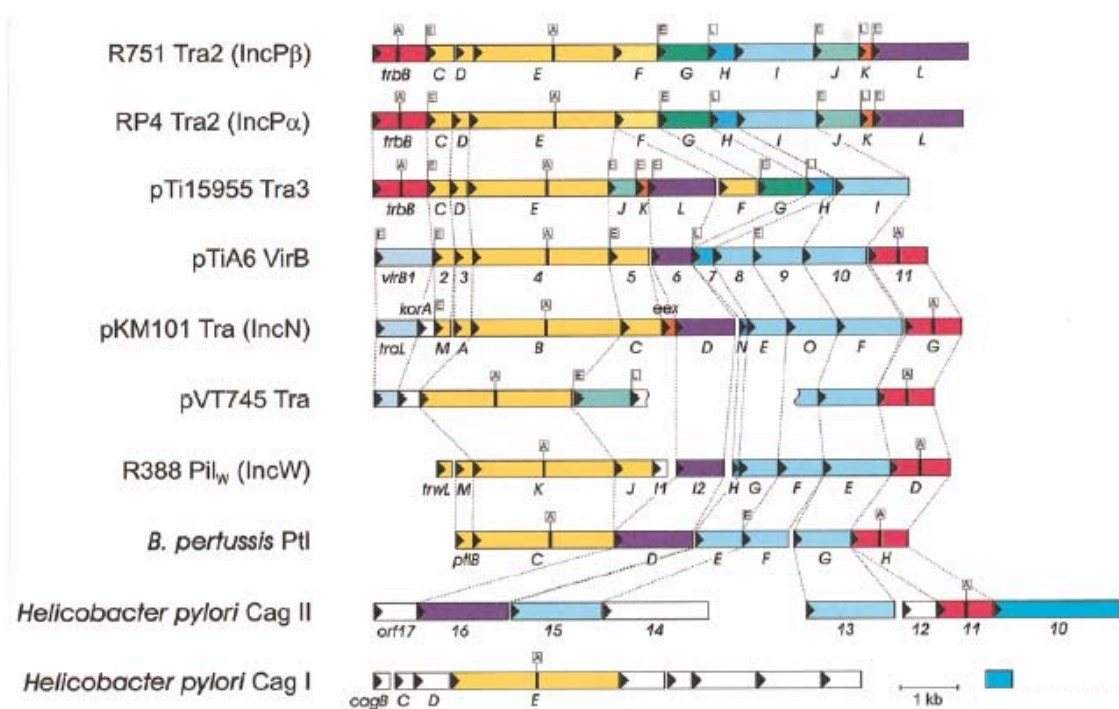


FIGURA Int.7. Conservación de la organización génica de distintos sistemas de secreción tipo IV bacterianos.

Los genes que codifican productos similares están conectados por líneas punteadas y se representan con el mismo color. Las señales marcadas: con E, representan presencia de “export signals”; con L, indica presencia de “lipoprotein signatures” en la región N-terminal de la proteína; con A, indican presencia de motivos “tipo A”. Figura tomada de Thorsted *et al.*, 1998.

Al igual que la disposición de los genes, la localización y función de los distintos componentes del Mpf de los diferentes sistemas conjugativos, aunque varían de unos sistemas a otros, presentan numerosas analogías entre ellos. Los sistemas más conocidos son los Mpf de los plásmido IncF, IncP y el sistema VirB de *A. tumefaciens* homólogo al también muy conocido Mpf del plásmido IncN pKM101 (Christie, 1997). Estos dos últimos, junto con el sistema exportador de la toxina pertúsica Ptl en *Bordetella pertussis*, fueron unos de los primeros T4SS descritos.

Los T4SS son unos sistemas de secreción muy versátiles, capaces de transportar complejos nucleoproteicos, toxinas A/B y proteínas monoméricas a una gran diversidad de células (bacterias, hongos, plantas y animales). Este tipo de sistemas de secreción está formado por la presencia de, al menos, nueve proteínas que se localizan en la membrana interna, externa, citoplasma o periplasma de la bacteria. Para el correcto funcionamiento del Mpf en la transferencia conjugativa, parecen ser necesarios dos tipos de factores adicionales, las proteínas acopladoras, de las cuales ya se ha hablado en esta introducción, y ciertas chaperonas. Como chaperonas más estudiadas se encuentran VirC1 y VirC2, necesarias para la transferencia del ADN-T (Christie, 1997; Zhu *et al.*, 2000)

El transporte de macromoléculas a través de la membrana bacteriana supone un gasto energético. En los sistemas de secreción tipo IV hay tres tipos posibles de ATPasas. El primer grupo lo integran las proteínas acopladoras tipo TraG/VirD4 (Figura Int.8). El segundo está compuesto por los homólogos de la proteína VirB4 de *A. tumefaciens* (Figura Int.8). Estas proteínas están presentes en todos los sistemas tipo IV, incluso en algunos casos en dos o más copias génicas, como en el patógeno de plantas *Xylella fastidiosa*, que tiene 3 genes que codifican proteínas VirB4, o *Helicobacter pylori* con 4. La homología entre ellas es elevada, sobre todo en el extremo C-terminal, y tienen 4 motivos altamente conservados (Rabel *et al.*, 2003). Dos de éstos son las cajas Walker A y B, características de proteínas con actividad NTPasa (Walker *et al.*, 1982). Los mutantes de VirB4 y TrbE de RP4 con defectos en el motivo Walker A no son funcionales y presentan un fenotipo dominante negativo, lo cual indica que esta ATPasa funciona como un oligómero (Dang *et al.*, 1999; Rabel *et al.*, 2003). Sin embargo, tanto TrbE como TrwK de R388 se encontraron en forma monomérica tras su purificación (Rabel *et al.*, 2003). Además, sólo en el caso de VirB4 ha sido descrita una débil actividad ATPasa (Rabel *et al.*, 2003; Shirasu *et al.*, 1994). VirB4 es una proteína transmembrana, que forma oligómeros que

Introducción

contribuyen estructuralmente a la formación del canal. En base a estas propiedades, se cree que esta familia de proteínas podría transmitir información, posiblemente mediante cambios conformacionales inducidos por ATP, a través de la membrana citoplasmática a las subunidades extracitoplasmáticas (Dang *et al.*, 1999).

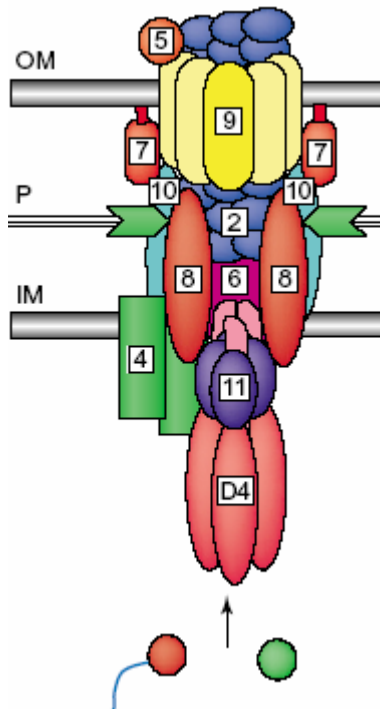


FIGURA. Int.8. Modelo Propuesto para T4SS.

En la figura se indica la hipotética localización de los distintos elementos que componen el T4SS. OM, membrana externa; IM, membrana interna; P, periplasma; círculo rojo unido a línea azul, complejo DNA-T-relaxasa; círculo verde, sustrato proteico. En la figura se indica el número de las distintas proteínas del T4SS. Figura tomada de Ding *et al.*, 2003.

La tercera familia de ATPasas está compuesta por los homólogos de las proteínas TrbB en RP4 y VirB11 en *A. tumefaciens* (Figura Int.8). Los miembros de esta familia están presentes en todos los sistemas de secreción tipo II y tipo IV estudiados hasta la fecha y poseen cuatro motivos altamente conservados (Rivas *et al.*, 1997). La actividad de hidrólisis de NTPs ha sido demostrada para VirB11 de *A. tumefaciens* (Christie *et al.*, 1989), TrwD del plásmido R388 (Rivas *et al.*, 1997), TrbB del plásmido RP4 y HP0525 de la isla de patogenicidad Cag de *H. pylori* (Krause *et al.*, 2000a; Krause *et al.*, 2000b). Estas ATPasas se asocian fuertemente, aunque de forma periférica, a la membrana interna, excepto TrbB que es predominantemente citoplasmática. Estudios genéticos y bioquímicos indican que estas ATPasas están formando homo-oligómeros. La auto-asociación de VirB11 fue inicialmente sugerida al observar la supresión de mutaciones dominantes con la expresión multicopia de *virB11* nativa (Zhou y Christie, 1997). Estudios genéticos más recientes indican que la oligomerización de VirB11 se produce a través de dos dominios localizados en el extremo N- y C-terminal. Además, la interacción a través del dominio C-

terminal solamente tiene lugar cuando el motivo Walker A está intacto, indicando que la unión de ATP es un factor crítico en la multimerización de VirB11 (Rashkova *et al.*, 2000).

Por otra parte están los integrantes del canal conjugativo, que son proteínas asociadas a la membrana citoplasmática o bien a la externa, lo cual ha dificultado mucho un estudio más detallado de su función. Para la transferencia de ADN-T, los componentes propuestos del canal son VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 y VirB10, en asociación con la proteína acopladora VirD4 y las dos ATPasas descritas anteriormente, VirB4 y VirB11 (Figura Int.8). Se cree que VirB6 atraviesa la membrana interna unas 6 veces y actualmente se piensa que es uno de los componentes del canal en la membrana citoplasmática (Figura Int.8). VirB6 estabiliza a otras dos proteínas, VirB3 y VirB5, que están implicadas en el ensamblaje del pilus (Hapfelmeier *et al.*, 2000). La lipoproteína VirB7 forma dímeros consigo misma y con VirB9, entrelazados por puentes disulfuro. Se ha postulado que el heterodímero funciona como un centro de nucleación para el reclutamiento y estabilización de otras proteínas VirB, durante el ensamblaje de la maquinaria de transferencia (Christie, 1997). Por microscopía electrónica se ha visto que VirB8, una proteína de la membrana interna, contribuye a la biogénesis del sistema de transporte (Kumar *et al.*, 2000). Se ha observado que VirB9 y VirB10 se ensamblan en sitios discretos de la superficie celular, mientras que en mutantes *virB8* estas proteínas se distribuyen uniformemente a lo largo de la superficie celular. De esta manera, se ha propuesto que VirB8 contribuye al posicionamiento de las nuevas proteínas VirB en la superficie celular (Das y Xie, 2000).

4.5. Relación del Mpf con otros sistemas de secreción

Se han descrito grandes similitudes entre los Mpf de los plásmidos conjugativos y la región *virB* del sistema de transferencia del ADN-T de *A. tumefaciens*, donde la correspondencia de cada gen *virB* con sus análogos en los plásmidos tipo IncN e IncW es particularmente alta (Figura Int.7) (Thorsted *et al.*, 1998; Pansegrau y Lanka, 1996; Alt-Mörbe *et al.*, 1996). Recientemente se ha descrito la presencia de un operón denominado *avhB*, el cual muestra una gran homología con el sistema *virB*, que ha demostrado ser necesario para la transferencia conjugativa del plásmido críptico de *A. tumefaciens* pAtC58 (Chen *et al.*, 2002). De forma análoga a *A. tumefaciens*, dentro de las bacterias conocidas como rizobios, la secuenciación de varios plásmidos simbióticos ha demostrado la

Introducción

presencia de operones responsables de la codificación de hipotéticos T4SS (González *et al.*, 2003; Galibert *et al.*, 2001; Freiberg *et al.*, 1997). Muchos de ellos, como los plásmidos simbióticos pSymA y pRetCFN42d, de *Sinorhizobium meliloti* y *R. etli*, respectivamente, también presentan grandes similitudes con los sistemas *virB* de *A. tumefaciens* (González *et al.*, 2003; Galibert *et al.*, 2001). Otros plásmidos simbióticos como el plásmido simbiótico pNGR234a, sin embargo parecen poseer un T4SS que presentan analogías con otro tipo de sistemas conjugativos, como el Mpf codificado por la región Tra2 del plásmido RP4 (Freiberg *et al.*, 1997). Al contrario que en *Agrobacterium*, la función de estos T4SS en estas bacterias permanece oscura.

Igualmente, existen numerosas similitudes entre los Mpf de los plásmidos conjugativos y diferentes sistemas de secreción T4SS de bacterias patógenas de animales, tales como el sistema Ptl de *Bordetella pertussis* (Weiss *et al.*, 1993), implicado en la exportación de las subunidades de la toxina pertussica a través de la membrana externa (Covacci y Rappuoli, 1993; Weiss *et al.*, 1993). Los genes que codifican el sistema Ptl de *Bordetella pertussis* presentan una alta correspondencia con la organización genética del sistema VirB del plásmido Ti, así como con la región Tra y Pil_W de los plásmidos tipo IncN y IncW, respectivamente (Figura Int.7) (Covacci y Rappuoli, 1993; Weiss *et al.*, 1993; Pansegrau y Lanka, 1996). En el mismo sentido, entre las funciones codificadas por la isla patogénica Cag de *Helicobacter pylori* (Censini *et al.*, 1996) se han encontrado numerosas analogías con diversos genes de transferencia (Figura Int.7) (Censini *et al.*, 1996; Covacci *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997). Otra bacteria patógena que muestra este tipo de similitudes en su T4SS es *Legionella pneumophila*, el agente causante de la neumonía del legionario, la cual gracias a la secreción de un inhibidor desconocido puede replicarse intracelularmente dentro de los macrófagos de varios animales. En esta bacteria, las funciones de la isla de patogenicidad cromosómica Dot/Icm, además de presentar analogías con proteínas de sistemas conjugativos (Vogel *et al.*, 1998; Segal y Shuman, 1998), son capaces de movilizar ADN plasmídico (Segal y Shuman, 1998; Vogel *et al.*, 1998).

Curiosamente la mayoría de los sistemas conjugativos Mpf parecen haberse especializado en la secreción proteica, como por ejemplo la secreción y ensamblaje de los componentes del pilus conjugativo, o en la exportación de proteínas Tra y Vir al citoplasma de la célula receptora. Entre estos últimos tenemos la evidencia de la

exportación de la proteína VirE2 unida al ADN-Tss (Binns *et al.*, 1995; Christie *et al.*, 1988; Gietl *et al.*, 1987) o VirF (Regensburg-Tuink y Hooykaas, 1993), así como también TraC y la primasa Sog de los plásmidos tipo IncP e Inc11, respectivamente (Merryweather *et al.*, 1986; Rees y Wilkins, 1989; Rees y Wilkins, 1990). Por tanto, parece ser que en el curso de la evolución los sistemas de transporte implicados en la conjugación se han adaptado funcionalmente para la secreción proteica o viceversa (Regensburg-Tuink y Hooykaas, 1993; Weiss *et al.*, 1993; Alt-Mörbe *et al.*, 1996). Cabría preguntarse, ¿existen verdaderas diferencias entre los Mpf y los T4SS especializados en el transporte de proteínas? Basándose en los resultados mencionados, así como en los alineamientos de la Figura Int.7, se podría concluir que todas estas regiones no codifican otra cosa que sistemas que exportan proteínas. Por lo tanto, la pregunta relevante para el modelo del sistema de transferencia conjugativa sería ¿qué funciones en el Mpf, si es que existen, están exclusivamente implicadas en la transferencia de ADN?

4.6. Establecimiento de la información genética adquirida en la célula receptora

El establecimiento del plásmido transferido a la célula receptora requiere la circularización del plásmido y la síntesis de la hebra complementaria. El proceso de circularización está mediado por la relaxasa, la cual se piensa que permanece covalentemente unida al extremo 5' del ADN transferido a la célula receptora. Se cree que el extremo 3' de esta cadena sigue extendiéndose por replicación en la célula donadora, generando un intermediario de transferencia que es más de una unidad de largo y el cual contiene uno o más de un sitio *nic* internos. La relaxasa, en la célula receptora, reconocería el sitio *nic* interno de este intermediario y catalizaría la reacción de transesterificación generando una molécula circular de ADN (Lanka y Wilkins, 1995).

La iniciación y terminación de una ronda de transferencia requiere diferentes secuencias específicas en el *oriT*. En particular, el proceso de terminación requiere unas secuencias repetidas invertidas (IR) que se suelen encontrar aguas arriba del sitio *nic* en la última porción del *oriT* que es transferido. Esta IR produce una estructura secundaria en el ADN que puede ser reconocida por la relaxasa covalentemente unida al extremo 5', lo que propiciaría su unión y posterior reacción de corte y religación (Bhattacharjee y Meyer, 1993). Experimentos de transferencia con el plásmido F indican que dicho plásmido tiene una tasa de transferencia de unos ~775 nucleótidos por segundo. Esta alta tasa junto con la

Introducción

necesidad de minimizar la vulnerabilidad del ADNss, hacen pensar que la síntesis de la hebra complementaria se produce simultáneamente a la entrada del ADN que está siendo transferido a la célula receptora. Igualmente se piensa que la síntesis de ADN, con polaridad 5'-3', se produce de forma discontinua mediante el empleo de múltiples cebadores, lo que aceleraría el proceso. La síntesis de dichos cebadores en el plásmido F parece depender de funciones codificadas por la célula receptora. Se han determinado algunas de las señales de iniciación (*ssi*) implicadas en las síntesis de la hebra complementaria (Tanaka *et al.*, 1994), tales como *ssiE* del plásmido F (Nomura *et al.*, 1991).

En otros sistemas conjugativos, la síntesis de la hebra complementaria se lleva a cabo por funciones codificadas por el plásmido. El ejemplo clásico es la familia de las ADN-primasas (Frick y Richardson, 2001). Las mejor estudiadas corresponden a las primasas codificadas por el gen *sog* del plásmido ColIb y por *traC* de los plásmidos IncP. Este tipo de proteínas parecen ser transferidas unidireccionalmente hasta el receptor por el sistema conjugativo. Estudios mutacionales han demostrado que las primasas contribuyen a la “promiscuidad” de la transferencia (Lanka y Barth, 1981; Merryweather *et al.*, 1986; Krishnapillai, 1988). El análogo a estas proteínas en el sistema de transferencia del ADN-T estaría formado por la proteína VirE2. Esta proteína puede ser transferida tanto independiente como simultáneamente con el ADN-T por el sistema VirB de *A. tumefaciens* (Christie, 1997).

4.7. Regulación de los sistemas de transferencia

Como ocurre en casi todos los procesos biológicos más o menos complejos que conllevan un gasto de energía considerable, los sistemas de transferencia conjugativa suelen presentar un sistema de regulación. Esta regulación permite minimizar el coste metabólico del hospedador, así como optimizar las ventajas adaptativas de la transferencia. Diferentes sistemas conjugativos “han optado” por sistemas de regulación distintos. El conocimiento de estos circuitos regulatorios es crucial para determinar las relaciones existentes entre las condiciones ambientales y la frecuencia de transferencia genética conjugativa. Varios de estos sistemas de regulación han sido estudiados a fondo, entre los que destacan la regulación de la transferencia de los plásmidos IncF, IncP, así como la regulación de la transferencia del ADN-T del sistema conjugativo del plásmido Ti.

Dentro de los plásmidos de Gram-positivas destaca la regulación de la transferencia por feromonas. Uno de los más estudiados es el pAD1(60Kb), pCF10 (54Kb) y pPD1(59Kb) (Dunny *et al.*, 1978; Dunny *et al.*, 1995; Clewell, 1993; Wirth, 1994). La regulación de este tipo de plásmidos se caracteriza por la secreción de múltiples feromonas sexuales por parte de bacterias que carecen de plásmidos, las cuales disparan la expresión de las funciones de transferencia en el donador, incluida la síntesis de sustancias de agregación.

4.7.1. Regulación de los plásmidos IncF

Los plásmidos IncF presentan reprimido su sistema de transferencia. De esta forma, bajo condiciones de laboratorio, las frecuencias de transferencia observadas son de 10^{-3} . Esto implica, en otras palabras, que en el 99,9% de la población de donadores la expresión de los genes de transferencia es reprimida por el sistema FinOP. De hecho se ha demostrado que un mutante *finO*, origina la expresión de las funciones de transferencia de forma constitutiva provocando unas frecuencias de transferencia del plásmido en torno a 1. La regulación de la transferencia de los plásmidos por el sistema FinOP implica un sistema complejo, donde que intervienen dos sistemas de transducción de señales del tipo de dos componentes, codificadas por el hospedador (*arcB/arcA* y *cpxA/cpxR*), así como los genes reguladores *finO*, *finP*, *traM*, *traJ* y *traY*, codificados por el plásmido (Figura Int.9B).

El sistema *arcB/arcA* parece obedecer a los niveles redox de la célula, permitiendo a la bacteria adaptarse a cambios en la concentración de O₂ del ambiente donde se encuentra (Lynch y Lin, 1996). El segundo sistema (*cpxA/cpxR*) sin embargo, parece mediar su acción regulatoria de forma indirecta, estando implicado tanto en la regulación del reciclado proteico como del plegamiento de varias proteínas (Danese y Silhavy, 1997; Pogliano *et al.*, 1997). Igualmente, aunque no se conocen los mecanismos de regulación mediados por otras condiciones, se ha demostrado que tanto la temperatura, fase de crecimiento celular, como los niveles de AMP cíclico, son factores influyentes en la expresión de los genes de transferencia de los plásmidos IncF.

El modelo de regulación propuesto implica un circuito cerrado de control positivo, donde la expresión de los genes reguladores *traM*, *traJ* y *traY*, es estimulada en serie (Figura Int.9B). Los genes de transferencia del plásmido F dependen principalmente del

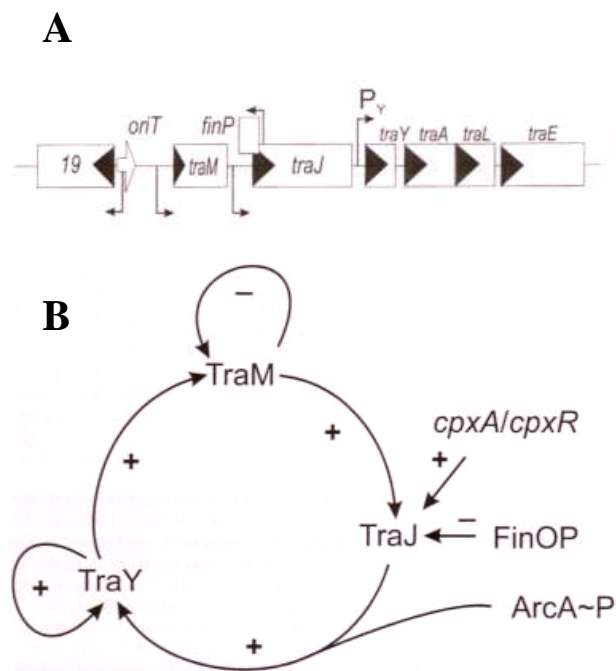


FIGURA. Int.9. Modelo propuesto para la regulación de la transferencia de plásmidos tipo IncF.

(A), Organización de los genes de transferencia de los plásmidos IncF; (B) Circuito de regulación positiva que permite al plásmido “escapar” del sistema de inhibición de la fertilidad impuesto por FinOP. (+), regulación positiva; (-), regulación negativa. Figura tomada de “Conjugative-DNA transfer process” (Zechner *et al.*, 2000).

promotor P_Y (Figura Int.9A). La activación de dicho promotor sólo ocurre en presencia de la proteína plasmídica TraJ, así como de la proteína ArcA codificada por el hospedador (Silverman *et al.*, 1991; Strohmaier *et al.*, 1998). La producción de TraJ está regulada negativamente a nivel post-trascricional por los productos de *finO* y *finP*. *finP* es un pequeño ARN anti-sentido que media su acción mediante la interacción directa con la región 5' del ARN_m de *traJ* (Frost *et al.*, 1994). Esta interacción reduce la expresión de *traJ*, probablemente interfiriendo en la traducción de su ARNm (Koraimann *et al.*, 1996). FinO por su parte es una proteína de 21kDa que estabiliza el ARN anti-sentido FinP (Koraimann *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992). Otros experimentos con los plásmidos R1 y R100 sugieren que la expresión de *traJ* también depende de la expresión de *traM*, localizado aguas arriba de aquél, sugiriendo que ambos genes forman un operón compuesto (Figura Int.9A) (Dempsey, 1994). Por otra parte, se ha visto que TraY es capaz de unirse tanto a P_Y como a la zona del *oriT* (Inamoto y Ohtsubo, 1990; Nelson *et al.*, 1993). La unión de esta proteína a sus secuencias diana estimula la transcripción desde el

promotor de *traM* y de P_Y (Penfold *et al.*, 1996; Silverman y Sholl, 1996), estimulando así la expresión de los genes de transferencia de una forma directa, e indirecta a través de *traJ*.

4.7.2. Regulación de los plásmidos IncP

Los plásmidos IncP se caracterizan por transferirse a altas frecuencias, cercana a 1 bajo condiciones óptimas. Sin embargo, las funciones implicadas en la transferencia de este tipo de plásmidos no se expresan constitutivamente. De hecho, existe un complejo sistema de regulación que implica el uso de sistemas de autorregulación locales así como sistemas de regulación globales, coordinados con otros procesos celulares como la replicación (Pansegrau *et al.*, 1994; Zatyka y Thomas, 1998). Los genes de transferencia de RP4 se establecen en dos bloques de genes, Tra1, formado a su vez por dos unidades de transcripción *traJ-traA* y *traK-traM* y Tra2, donde se establecen los genes responsables de la formación del Mpf (genes *trb*; Figura Int.10). El control es llevado a cabo por 3 reguladores globales KorA, KorB y TrbA, donde KorB y TrbA reprimen la expresión de los genes de transferencia directamente. KorA por su parte media su acción de forma indirecta, siendo necesario para la des-represión de TrbA, estableciendo una vía de disminución de la expresión de los genes *tra* y *trb* una vez que el plásmido se ha establecido en la célula receptora. Además, los genes responsables de las funciones Dtr son regulados por TraJ y TraK, las cuales se unen al *oriT* reprimiendo los promotores de esta región (Figura Int.10). KorA es un dímero que ejerce su función a través de su motivo hélice-giro-hélice (Jagura-Burdzy y Thomas, 1995; Kostelidou *et al.*, 1998). Se han encontrado hasta 7 operadores diferentes para la unión de este represor, hacia los cuales muestra diferentes niveles de preferencia de unión, hecho crucial para su función. Se ha establecido que en la transición de la fase exponencial a la estacionaria, la abundancia de KorA cae de unos 4000 a unos 600 monómeros por célula (Jagura-Burdzy y Thomas, 1995). KorB parece existir como dímero y se han encontrado hasta 12 sitios diferentes de unión, aunque sólo 6 han demostrado estar implicados en regulación génica (Balzer *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993). TrbA está codificada en la región Tra2 (Jagura-Burdzy *et al.*, 1992), su secuencia aminoacídica muestra similaridad con KorA en su extremo C-terminal y con un represor inmunitario del fago Φ 105 en su parte N-terminal.

Introducción

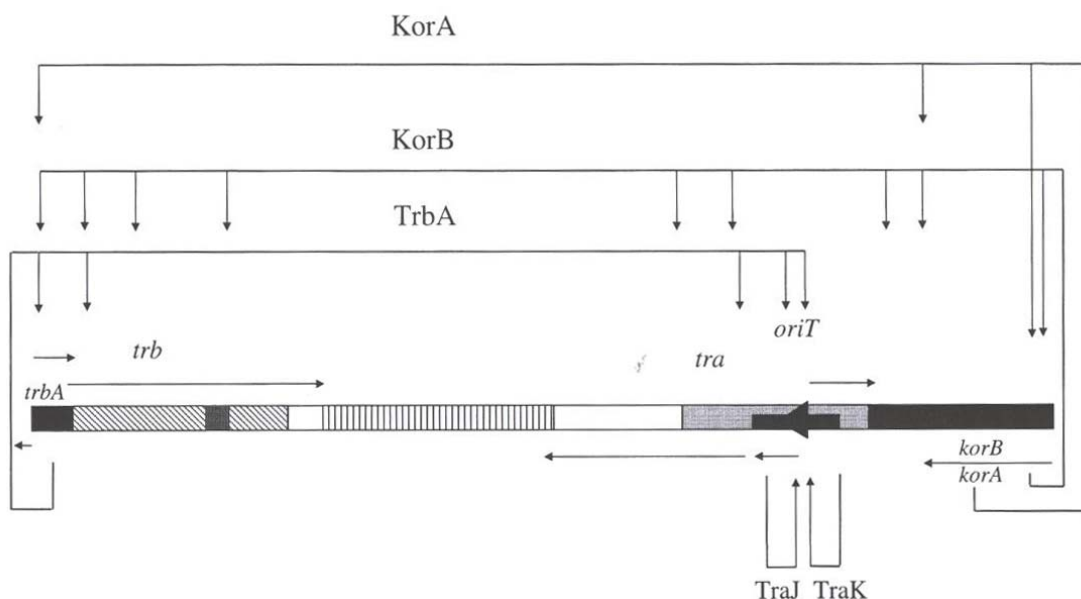


FIGURA. Int.10. Modelo de regulación de los genes de transferencia de plásmidos IncP.

La regulación se realiza a través de 3 reguladores mayoritarios KorA, KorB, y TrbA. KorB y TrbA reprimen la expresión de varios genes *tra* de forma directa (ver flechas). KorA es necesario para la desrepresión de *trbA*. Genes reguladores, negro; genes de procesamiento del ADN, gris claro; genes de exclusión superficial, gris oscuro; genes Mpf, rayas diagonales; genes no esenciales o desconocidos, en blanco; genes no relacionados con transferencia entre las dos regiones Tra (Tra1 y Tra2), rayas verticales. Figura tomada de “Conjugative-DNA transfer process” (Zechner *et al.*, 2000).

4.7.3. Regulación del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*

El plásmido Ti, tal y como ya se ha apuntado anteriormente, codifica dos sistemas de transferencia de ADN. El sistema *vir*, que transfiere el ADN-T a células vegetales (unas 20Kb del plásmido Ti) y el sistema *tra/trb*, responsable de la transferencia del plásmido Ti entre bacterias mediante un sistema conjugativo (Clewel, 1993). Dos tipos de plásmidos Ti han sido bien estudiados: el tipo nopalina/agrocinopina (por ejemplo, pTiC58) y el octopina/manitolopina (por ejemplo, pTiR10). Ambos tipos presentan sistemas de transferencia virtualmente idénticos, cuyos componentes han demostrado ser funcionalmente intercambiables (Cook y Farrand, 1992; Cook *et al.*, 1997). Otros plásmidos, como el plásmido simbiótico NGR234a de *Rhizobium* sp. NGR234 parece contener en esencia un sistema conjugativo muy similar, que podría estar regulado de la misma forma (Freiberg *et al.*, 1997; He *et al.*, 2003).

- Regulación del sistema de transferencia conjugativa: La región *tra* del pTiC58, implicada en la codificación de las funciones Dtr del plásmido, contiene 6 genes *tra* agrupados en dos unidades de transcripción diferentes: *traAFB* y *traCDG* (Farrand *et al.*, 1996), entre las cuales se localiza el *oriT* (Figura Int.11) (Cook y Farrand, 1992). Esta

Introducción

14,5Kb y 6Kb aguas arriba del ORF (Fuqua y Winans, 1996). En los plásmidos tipo nopalina/agrocinopina, AccR (de “agrocinopine catabolism regulator”) reprime los genes *tra* en ausencia de agrocinopinas (Beck von Bodman *et al.*, 1992).

TraR es un miembro de la familia LuxR, formada por activadores de la transcripción génica, que son activados por N-3(oxo[octanoyl])homoserin lactona, que en *A. tumefaciens* se conoce con el nombre de autoinductor (AAI). AAI es sintetizado por TraI, proteína que presenta homología con N-acil-homoserin lactona sintetetasas de numerosas bacterias (Hwang *et al.*, 1994; Fuqua y Winans, 1994), y cuyo gen está localizado al principio del operón *trb*. El AAI se produce constitutivamente en muy baja cantidad, de forma que la expresión de los genes de transferencia ocurre sólo en condiciones de alta densidad celular. Por lo tanto, TraR y AAI constituyen un sistema de “quorum sensing” que relaciona el fenómeno de transferencia genética del plásmido Ti con altas densidades celulares.

TraR controla al menos 5 promotores: Dos divergentes (*traA_P* y *traC_P*) adyacentes al *oriT*, que expresan funciones necesarias para el procesamiento del ADN que va a ser transferido, el promotor que expresa *traI* y *trb*, el promotor de *traM* y el promotor de *traR* (Figura Int.11) (Fuqua *et al.*, 1995; Fuqua y Winans, 1994; Hwang *et al.*, 1994). Tres de estos promotores (*traI*, *traC*, *traA*) han conservado cajas *tra* en una posición análoga, aguas arriba del punto de inicio de la transcripción, solapantes con la región -35 de cada uno de ellos (Fuqua y Winans, 1996). La localización de estas cajas sugiere que TraR es un activador transcripcional de la clase II (Ishihama, 1993).

Un elemento regulador adicional, presente tanto en los plásmidos tipo octopina como agrocinopina, es TraM (Fuqua *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1995). TraM regula negativamente la expresión de los genes *tra*, posiblemente a través de una interacción directa con TraR, impidiendo su unión al AAI. Este regulador negativo tendría como función el impedir la activación de los genes *tra* a densidades de población bajas.

Como podemos ver, el plásmido Ti aunque presenta un sistema de transferencia formado por genes muy similares a los del plásmido IncP RP4, presenta un sistema de regulación especializado muy diferente a éste, presumiblemente favorecido por las peculiares necesidades de transferencia de este plásmido. Unas condiciones ambientales parecidas son compartidas por las bacterias conocidas como rizobios, en los cuales también se han descrito numerosos plásmidos que presentan sistemas de regulación “quorum sensing” análogos al descrito, tales como: el pNGR234a, muy parecido al pTiC58 en su

sistema de transferencia, de *Rhizobium* sp. NGR234 (He *et al.*, 2003); el pRetCFN42a, plásmido críptico de la cepa CFN42 de *R. etli* (Tun-Garrido *et al.*, 2003); pRm41a, plásmido críptico de *S. meliloti* AK631 (Marketon *et al.*, 2002; Marketon y González, 2002), el pRL1JI, plásmido simbiótico de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Lithgow *et al.*, 2000; Danino *et al.*, 2003). Igualmente, en este grupo de bacterias se han identificado este tipo de sistemas “quorum sensing” no asociados a plásmidos (Marketon *et al.*, 2002; Marketon y González, 2002), así como plásmidos con sistemas de regulación aparentemente diferentes, como el pRmeGR4a (Herrera-Cervera *et al.*, 1996).

- Regulación del sistema de virulencia: La transferencia del ADN-T está mediada por unos 25 genes *vir* requeridos para la detección de los metabolitos exudados de la herida de la planta, para el procesamiento del ADN, transferencia y establecimiento nuclear. 4 operones *vir* son esenciales: *virA*, *virB*, *virD*, y *virG*. *virC* y *virE* estimulan fuertemente la formación del tumor, mientras que *virF* y *virH* se han encontrado sólo en algunas cepas, donde además no son esenciales para la transferencia en condiciones de laboratorio (Rogowsky *et al.*, 1990). Los operones *vir* constituyen un regulón (Figura Int.12) que se induce bajo el crecimiento de la bacteria en pH ácido, así como por dos clases de señales producidas por la planta: compuestos fenólicos y monosacáridos específicos (Shimoda *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1995). Estas señales de la planta son reconocidas y transducidas por los productos de los genes *virA* y *virG*, pertenecientes a la familia de proteínas reguladoras de dos componentes (Winans *et al.*, 1986).

VirA es una proteína sensora transmembrana dimérica que detecta las moléculas señal producidas por las células de la herida de la planta, lo que provoca su autofosforilación y su posterior transferencia del grupo fosfato a VirG (Pan *et al.*, 1993). De esta forma, VirA activa a VirG en presencia de altos niveles de acetosiringona. Sin embargo, la respuesta de VirA con bajos niveles de acetosiringona, requiere de la interacción directa de una proteína periplásmica de unión a glucosa/galactosa conocida como ChvE, así como a monosacáridos liberados por la herida de la planta (Shimoda *et al.*, 1993). En este sentido, se han propuesto tres estados diferentes de activación para VirA: encendido, apagado y en espera (Heath *et al.*, 1995). La unión de monosacáridos a ChvE provoca el cambio de conformación de VirA de “apagado” a “en espera”, posibilitando la respuesta bajo la presencia de acetosiringona. En ausencia de azúcares tan solo unas pocas moléculas de VirA consiguen el estado de activación “en espera”, pasando

Introducción

por tanto al estado “encendido” solamente en presencia de altas concentraciones de acetosiringona. Cuando VirG es fosforilado por VirA, se favorece su dimerización posibilitando su unión a las cajas *vir*, presentes en las regiones promotores de todos los genes *vir*, activando su expresión (Jin *et al.*, 1990b; Jin *et al.*, 1990a).

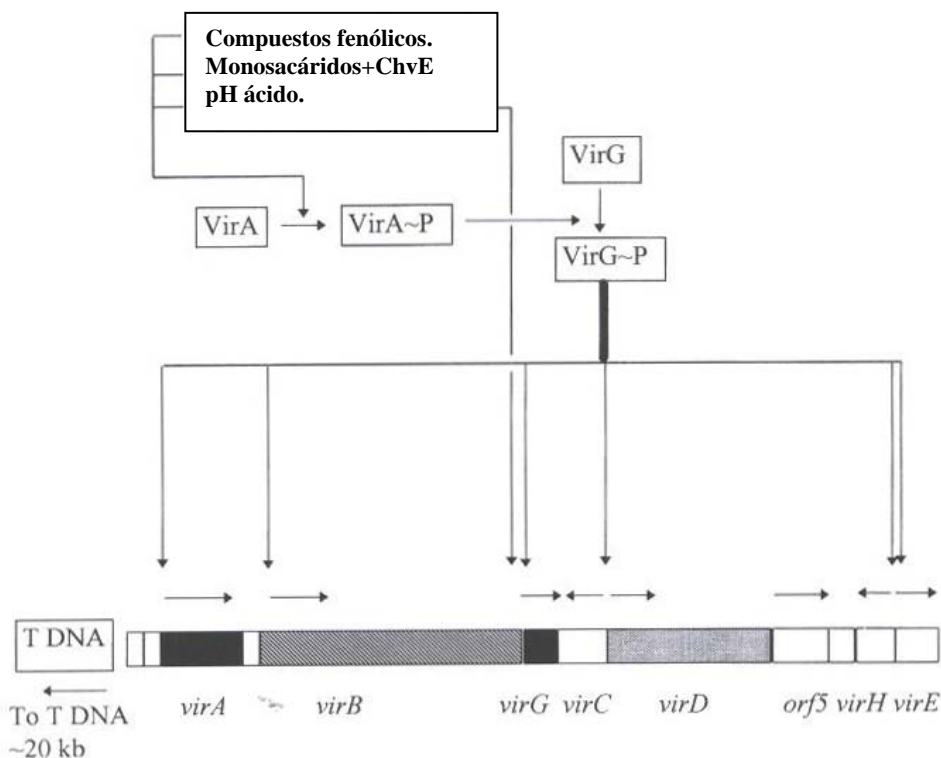


FIGURA. Int.12. Modelo de regulación de los genes *vir* del plásmido Ti

La transcripción de los genes *vir* es activada mediante la fosforilación de VirA y VirG en respuesta a condiciones y compuestos normalmente asociados a la presencia de la planta. Genes reguladores, en negro; genes de procesamiento del ADN, gris claro; genes Mpf, rayas diagonales; El DNA-T que se transfiere se localiza unas 20 Kb a la izquierda; unidades de transcripción se indican mediante flechas horizontales. Figura modificada de “Conjugative-DNA transfer process” (Zechner *et al.*, 2000).

El pH ácido, por su parte, es uno de los tres estímulos ambientales que favorecen la expresión del regulón *vir*. Puede por una parte estimular directamente la actividad de VirA, o estimular la expresión de VirG. VirG es expresado a partir de dos promotores: P1 y P2. Mientras que el promotor P1 es activado por P-VirG (Heath *et al.*, 1995), la inducción generada por la acidez a partir del promotor P2 no requiere de ninguna proteína codificada por el plásmido Ti (Mantis y Winans, 1992). Un candidato codificado por la célula hospedadora sería la proteína ChvI. Se ha demostrado que un mutante en el gen *chvI* presenta una completa deficiencia en la inducción del promotor P2 (Charles y Nester, 1993; Mantis y Winans, 1993).

5. Transferencia conjugativa en bacterias del orden Rhizobiales.

Muchos miembros del orden Rhizobiales se caracterizan por contener uno o más plásmidos. Muchos de éstos son elementos extracromosómicos de gran tamaño que poseen un papel central en la forma de vida de estas bacterias, especialmente en lo que respecta a su asociación con plantas. Diferentes estudios funcionales y estructurales han demostrado que en una especie dada, un determinado plásmido contiene regiones conservadas con plásmidos presentes en otras bacterias de la misma especie, de distintas especies del mismo género, o incluso de distintos géneros dentro esta familia. De esta forma, se han encontrado considerables similitudes de secuencias, entre ellas regiones de replicación y transferencia, entre los plásmidos simbióticos de los rizobios y los plásmidos tumorigénicos del género *Agrobacterium* (Turner y Young, 1995; Turner *et al.*, 1996). Este hecho sugiere que estos plásmidos son objeto de transferencia genética horizontal entre los miembros de esta familia y quizás con miembros de familias distantes. No obstante, los plásmidos pertenecientes a los miembros de esta familia igualmente poseen considerables divergencias que evidencian la diversidad y especialización de este tipo de elementos extracromosómicos. Estas evidencias, junto con los datos de secuencia de varios de estos plásmidos, indican que los fenómenos de transferencia y recombinación han tenido un papel crucial en la evolución y diversificación de los plásmidos en los miembros de esta familia.

El estudio de la transferencia de los plásmidos de este orden debe ser llevado a cabo con cautela. Con mucha frecuencia los plásmidos de interés co-existen con otros grandes plásmidos en una cepa dada. En muchos casos, estos plásmidos presentan fenómenos de cointegración, que han sido descritos tanto en megaplásmidos de *Agrobacterium* (Petit *et al.*, 1983) como en *Rhizobium* (Tun-Garrido *et al.*, 2003). Por lo tanto la transferencia de un plásmido dado puede producirse por autotransferencia, pero también como resultado de un fenómeno de cointegración o movilización en *trans* mediante la participación de un plásmido autoconjugativo co-residente en la cepa donadora. También debe ser tomada con cautela la ausencia de transferencia observada para un determinado plásmido o isla simbiótica. Por una parte la pérdida de uno o varios marcadores selectivos puede hacer difícil de detectar la transferencia de ciertos plásmidos que presenten una baja frecuencia de transferencia; por otra, la expresión de los sistemas de transferencia de muchos de estos plásmidos puede estar regulada. De esta forma a menos que se realicen los ensayos de

Introducción

conjugación bajo las condiciones precisas, la transferencia de un determinado elemento puede pasar inadvertida.

5.1 Transferencia en el género *Agrobacterium*

En el género *Agrobacterium* se enclava en la familia *Rhizobiaceae* dentro del orden Rhizobiales. Se han descrito plásmidos conjugativos en las especies *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* y *A. vitis*, siendo los plásmidos de virulencia y aquéllos que no siendo virulentos están implicados en el catabolismo de opinas, los que han centrado una mayor atención. Dentro de los plásmidos de virulencia hay que destacar el plásmido pRi1724 de *Agrobacterium rhizogenes* y los plásmidos Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Entre éstos últimos encontramos 2 tipos principales de plásmidos que se diferencian atendiendo a los genes implicados en la degradación de ciertos compuestos (opinas) que contienen cada uno de ellos. Así encontramos plásmidos Ti de tipo Nopalina/Agrocinopina como el pTiC58 (Figura Int.13) y plásmidos Ti tipo Octopina/Manitolopina tales como el pTi15955, pTiA6, pTiAch5, pTiB6 y pTiR10 (Figura Int.13). Además, las bacterias del género *Agrobacterium* suelen portar otra serie de plásmidos que al igual que en los rizobios han recibido el nombre de plásmidos crípticos. Así, la cepa de *A. tumefaciens* C58 porta, además del plásmido pTiC58, un plásmido denominado pAtC58 de 543 Kb, el cual parece ser autoconjugativo (Van montagu y Schell, 1979; Chen *et al.*, 2002). En dicho plásmido se ha descrito una región Mpf denominada *avhB*, la cual presenta una gran homología con la región *virB* del plásmido pTiC58 (Chen *et al.*, 2002).

Tal y como se ha apuntado anteriormente, los plásmidos Ti se caracterizan por codificar dos sistemas de transferencia diferentes. Uno implicado en la transferencia del ADN-T de la bacteria a la planta en el proceso de tumorigénesis, y otro que media la transferencia conjugativa del plásmido (Cook *et al.*, 1997). De hecho, ciertos estudios establecen un origen diferente para estos dos sistemas (Alt-Mörbe *et al.*, 1996).

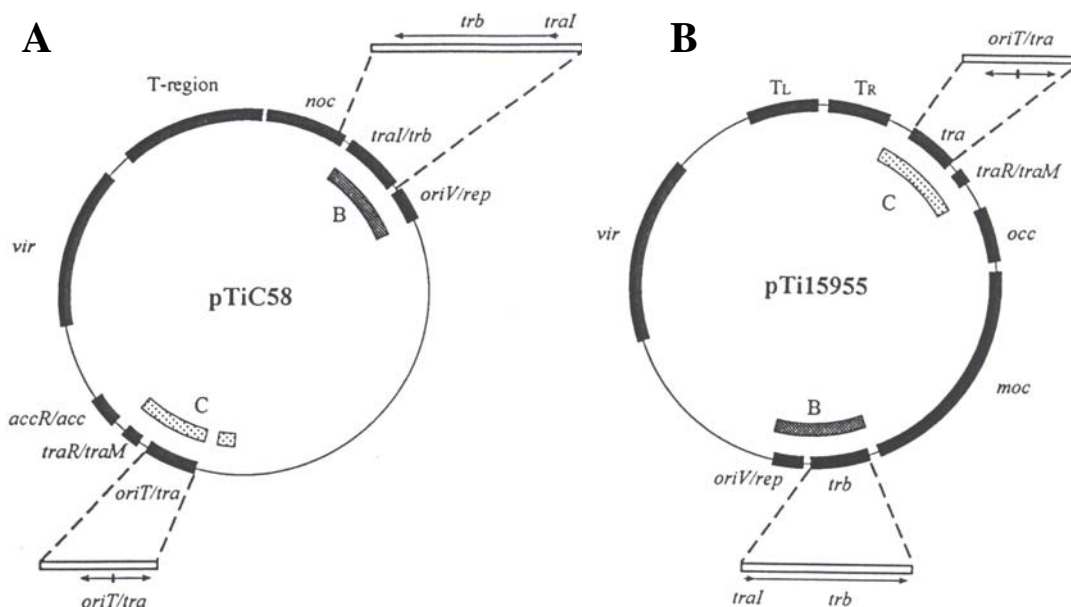


FIGURA. Int.13. Mapa genético de los dos tipos de plásmidos Ti típicos de *A. tumefaciens*.

A) pTiC58, plásmido Ti tipo nopalina/agrocinopina. B) pTi15955, plásmido Ti tipo octopina/manitil. Las regiones de función conocida se indican por líneas negras delgadas: T-region, ADN-T; T_L y T_R regiones izquierda (T_L) y derecha (T_R) del ADN-T; *occ*, genes responsables del catabolismo de octopinas; *acc*, genes responsables del catabolismo de agrocinopinas A+B; *moc*, genes responsables del catabolismo de manitil; *oriV/rep*, región de replicación; *vir*, región de virulencia; *traR/traM*, activador transcripcional del regulón *tra* y su anti-activador, respectivamente; *traI/trb*, operón *trb* del regulón *tra*; *oriT/tra*, operones divergentes *tra* flanqueando el *oriT*. Barras B y C representan 2 de las 4 regiones fuertemente relacionadas entre los dos tipos de plásmidos Ti, determinadas por los análisis de heterodúplex realizado por Angler *et al.*, 1981.

5.1.1. Transferencia conjugativa del plásmido Ti de *A. tumefaciens*

Los sistemas de transferencia conjugativa de los plásmidos Ti de tipo nopalina/agrocinopina y Ti de tipo octopina/manotilopina están muy relacionados, habiendo derivado claramente de un ancestro común. De hecho, se sabe que las funciones Dtr y Mpf de estos plásmidos son intercambiables (Cook y Farrand, 1992; Cook *et al.*, 1997). Estudios mutacionales en estos plásmidos han demostrado que los genes de transferencia se localizan en dos regiones génicas (Holsters *et al.*, 1980; De Greve *et al.*, 1981; Beck von Bodman *et al.*, 1989). Una codifica las funciones Dtr (Figura Int.14), necesarias para el procesamiento del ADN que va a ser transferido (funciones *tra*), región que se encuentra vinculada al locus que codifica las funciones responsables del catabolismo de opinas. Esta región corresponde a la región homóloga C de Engler (Engler *et al.*, 1981; Figura Int.13). La otra representa la región Mpf (Figura Int.15), que codifica las funciones necesarias para la formación del complejo del poro (funciones *trb*), la cual se

Introducción

encuentra vinculada a la región de replicación de ambos tipos de plásmidos Ti y corresponde con la región de homología de Engler (Engler *et al.*, 1981; Figura Int.13).

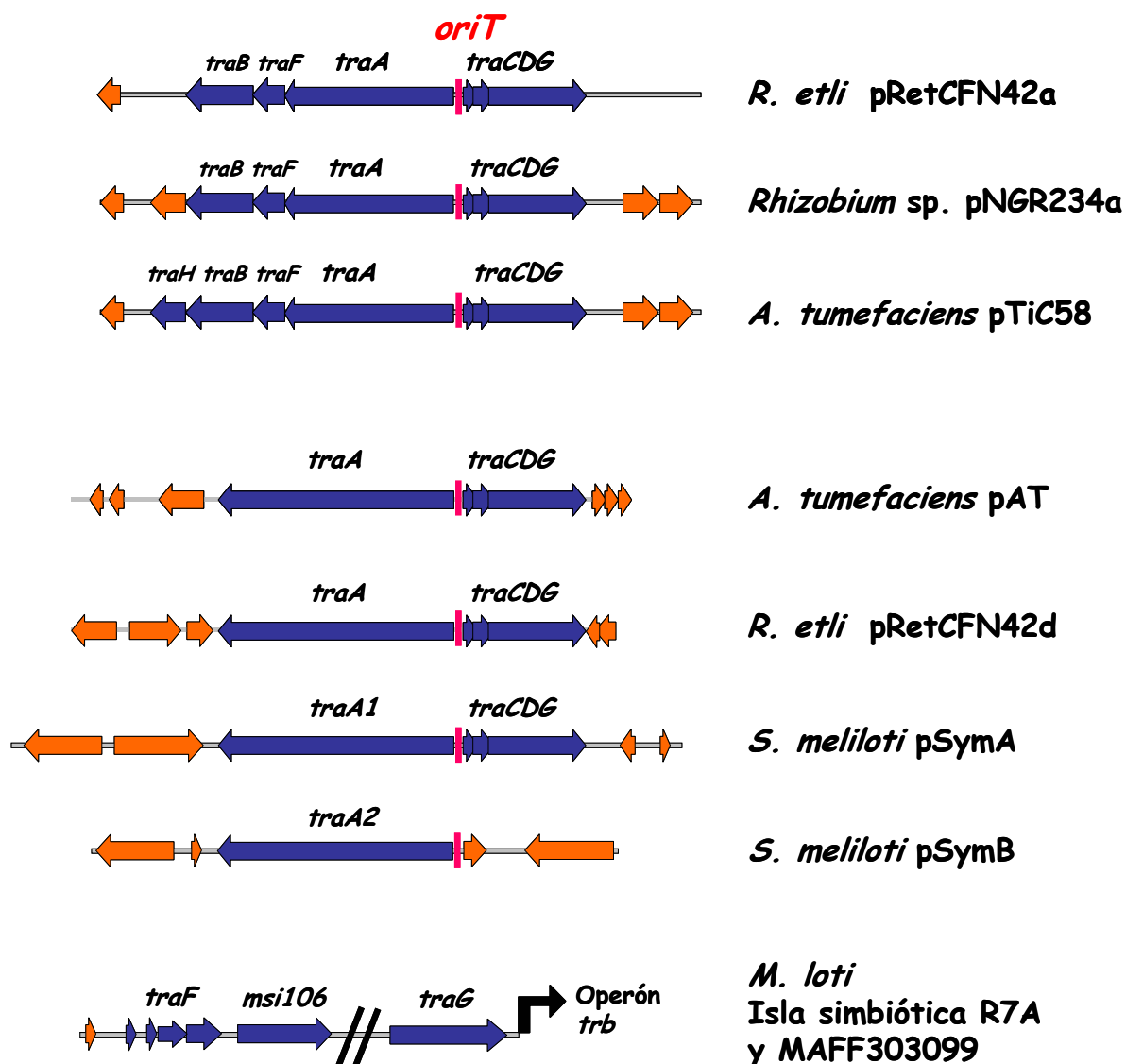


FIGURA Int.14. Regiones Dtr.

En la figura se representan en azul oscuro las hipotéticas regiones Dtr (*tra*) de plásmidos e islas simbióticas de distintas bacterias del orden Rhizobiales; igualmente se representa en azul oscuro los genes *msi106-110*, teórica región Dtr de la isla simbiótica de *M. loti* R7A. Asimismo se indica con una flecha negra el inicio del operón *trb*; en naranja se representan otros genes; *oriT*, origen de transferencia.

- Región Dtr: Está formada por dos operones, *traCDG* y *traAFB*, que se transcriben de forma divergente (Farrand *et al.*, 1996), cuya región intergénica contiene un fragmento de 65 pb que se establece como el hipotético *oriT* del plásmido (Figura Int.14) (Cook y Farrand, 1992). Dicho *oriT* contiene a su vez una región de 12 pb que es casi idéntica a la

región nic del plásmido RSF1010. Análisis genéticos así como diversas consideraciones derivadas de su secuencia, sugieren que los genes *traA*, *traF*, *traC*, *traD* y *traG* son completamente necesarios para la transferencia conjugativa del plásmido. Sin embargo, aunque *traB* es necesario para una transferencia óptima, no es esencial para el proceso (Farrand *et al.*, 1996). Los productos TraA, C, y D junto con el *oriT*, son las supuestas funciones encargadas de la formación del relaxosoma, mientras que TraF, al igual que su homólogo en RP4, parece formar parte del Mpf (Waters *et al.*, 1992). TraG, al igual que TraF no es *per se* un componente del relaxosoma, sino que es considerada la proteína acopladora del sistema conjugativo, localizándose unida a membrana ligada al sistema Mpf (Lessl *et al.*, 1993).

- **Región Mpf:** Se encuentra organizada en un único operón (operón *trb*) formado por 12 genes (Figura Int.15). El primer gen, *traI*, codifica para una acil-homoserin lactona sintetasa, que produce una molécula conocida como autoinductor, la cual interviene en la regulación por “quorum sensing” de la transferencia del plásmido. El resto de genes *trbB-trbL* presentan homología con los genes de la región Tra2 del plásmido RP4 (Alt-Mörbe *et al.*, 1996).

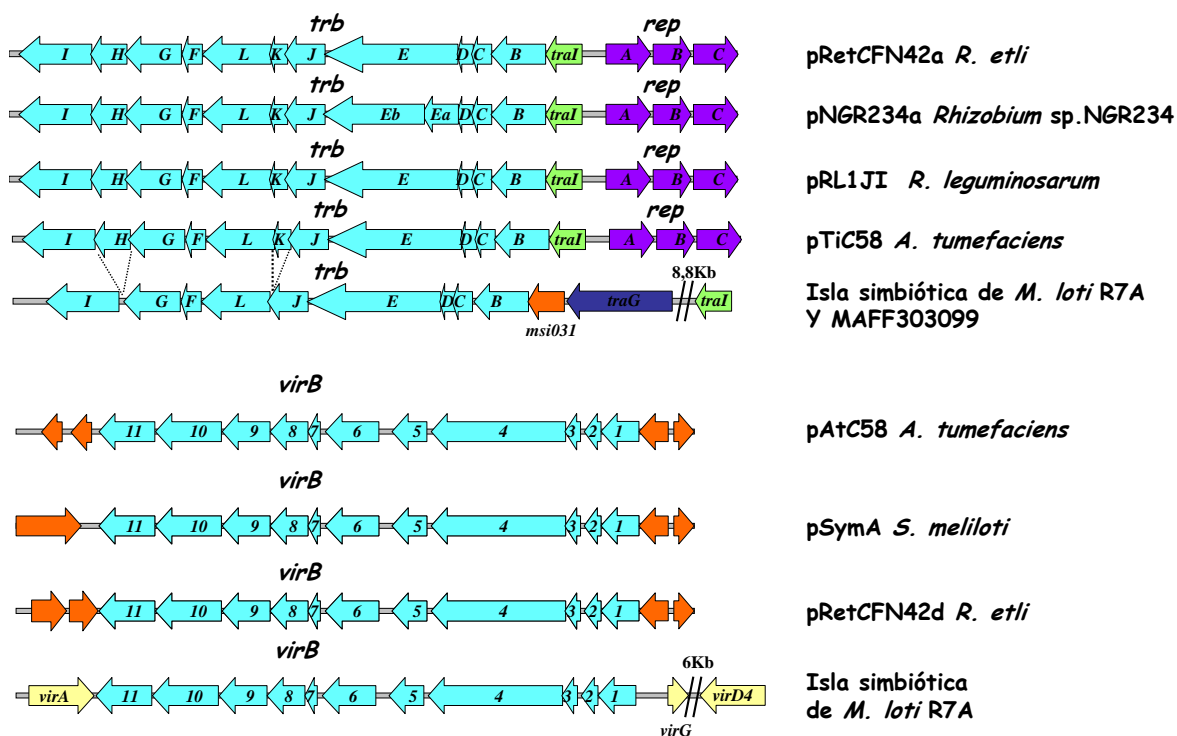


FIGURA Int.15. Regiones Mpf.

En la figura se representan en azul claro las hipotéticas regiones Mpf (*trb/virB*) de plásmidos e islas simbióticas de distintas bacterias del orden Rhizobiales. En azul oscuro se representa el gen *traG*; en verde claro se representan genes reguladores *traI*; en violeta se representan las funciones implicadas en la replicación (*rep*); en amarillo se representan otros genes *vir*; en naranja otros genes.

Introducción

La región *trb* de ambos tipos de plásmidos Ti puede ser expresada como una unidad única a partir de un promotor localizado aguas arriba del gen *traI*. Sin embargo, análisis de complementación de mutaciones insercionales con Tn5 sugieren que la región *trb* del plásmido pTiC58 está organizada en al menos dos unidades de transcripción (Beck von Bodman *et al.*, 1989). Otros estudios sostienen que mientras que no existe lugar a dudas de que la región *trb* del plásmido RP4 codifica para un pilus, este hecho está pendiente de demostración para el plásmido Ti.

5.1.2. Transferencia del ADN-T del plásmido Ti de *A. tumefaciens*

La transferencia del ADN-T desde una cepa de *A. tumefaciens* hasta las células de una planta es uno de los pocos procesos de intercambio genético entre reinos que ocurre de forma natural con alta eficiencia detectable. Este proceso puede a su vez tener un excepcionalmente amplio rango de hospedador, en la medida en que se ha demostrado que *Agrobacterium* también puede transferir el ADN-T a levaduras (Bundock *et al.*, 1995). Este mecanismo de introducción del ADN-T se caracteriza además por presentar una gran similitud con el proceso de conjugación bacteriana, donde las funciones Dtr están representadas por los genes *virD1*, *virD2*, *virD4*, *virE1* y *virE2* y las Mpf se localizan en el operón *virB1-B11*. De forma muy resumida, en dicho proceso el contacto de las dos células produce una activación de los genes *vir*. Esto provoca la excisión del ADN-T mediante la actuación de las proteínas VirD1 y VirD2 que actúan a modo de relaxasas en los bordes (RB y LB) del ADN-T, que a su vez muestran similitudes con el *oriT* de RP4 (Scheiffele *et al.*, 1995). A medida que se va desplazando la hebra monocatenaria de ADN-T, ésta se va recubriendo de la proteína VirE2 formando el complejo-T. Posteriormente, este complejo “pilotado” por VirD2, sería transportado hasta la célula de la planta mediante la actuación de la proteína VirD4, proteína acopladora del sistema, y el complejo del poro formado por los productos del operón *virB*. Estudios recientes demuestran que probablemente este sistema de secreción transporte a VirE2 (proceso en el que intervendría la chaperona VirE1) y VirD2-ADN-T de forma separada, y por tanto el complejo-T, formado por la unión de estos elementos se produciría en el citoplasma de la célula vegetal (Sundberg *et al.*, 1996). Una vez en la célula vegetal el complejo-T es transportado al nucleoplasma. Aquí el ADN-T se integra mediante un proceso de recombinación no homóloga, donde permanece estable transmitiéndose a la descendencia. Este ADN-T codifica 13 proteínas,

de las que un grupo se encarga de la síntesis de hormonas vegetales que son las responsables de la formación del tumor. Otro grupo de proteínas se encargan de la producción de opinas. Estas opinas serán captadas y catabolizadas por la bacteria para su nutrición. El proceso de transferencia está regulado por el producto de los genes VirA y VirG (ver Apartado 4.7.3.).

5.2. Transferencia conjugativa en bacterias simbiotes de leguminosas

5.2.1. Nodulación y fijación de nitrógeno por los Rizobios

La conversión del nitrógeno gaseoso (N_2) a formas reducidas, tales como el amonio, es un proceso vital dentro de la biosfera. La fijación biológica del nitrógeno constituye la mayor entrada de nitrógeno en forma reducida en los sistemas biológicos naturales. La diazotrofia (p. ej. la habilidad de fijar nitrógeno) es una propiedad restringida al mundo procariota, tanto en eubacterias como en archaeas (Martínez-Romero, 2000). Los microorganismos de vida libre llevan a cabo la fijación de nitrógeno para abastecer sus propias necesidades en ambientes donde son limitantes otras fuentes nitrogenadas. Sin embargo los microorganismos diazotrofos simbióticos, aunque son capaces de desarrollarse en vida libre, suelen fijar nitrógeno tan sólo tras el establecimiento de interacciones mutualistas con plantas, perteneciendo estas últimas principalmente a la familia *Leguminosae* (Martínez-Romero, 2000). Esta familia con aproximadamente 18000 especies es la familia de plantas más numerosa de la tierra. Este proceso simbiótico se produce principalmente con miembros de algunas familias del orden Rhizobiales (perteneciente a las α -proteobacterias). Por esta razón, las interacciones Rizobio-leguminosa tienen una enorme importancia agronómica y ecológica.

En el orden Rhizobiales encontramos varias bacterias diazotrofas entre las cuales están aquellas conocidas genéricamente como rizobios. Los diferentes géneros a los que pertenecen estas bacterias se distribuyen en varias familias. Estos géneros son: *Mesorhizobium* (perteneciente a la familia IV *Phyllobacteriaceae*), *Bradyrhizobium* (perteneciente a la familia VII *Bradyrhizoaceae*), *Azorhizobium* (perteneciente a la familia VIII, *Hyphomicrobiaceae*) y los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (ambos perteneciente a la familia I, *Rhizobiaceae*). En esta última familia, tal y como se ha apuntado anteriormente, también se incluye el género *Agrobacterium*, el cual incluye patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens* (Martínez-Romero, 2000; Van Berkum y Eardly, 1998).

Introducción

Recientemente se ha propuesto la inclusión de un sexto género en esta familia (*Allorhizobium*), así como la introducción de todas las especies pertenecientes *Allorhizobium* y *Agrobacterium* dentro del género *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001). Ambas propuestas han generado bastante controversia y están pendientes de aceptación por la comunidad científica (Farrand *et al.*, 2003). La clasificación propuesta para este grupo bacteriano en esta introducción se ha basado en el “Bergey's manual of systematic bacteriology” (Garryt, 2001). Sin embargo, la agrupación de los distintos géneros está en cambio continuo y han surgido otras clasificaciones (Sawada *et al.*, 2003).

Las interacciones de los miembros de la familia *Rhizobiaceae* con las leguminosas suelen ser muy específicas, por lo que han sido útiles en el pasado para definir diferentes especies de rizobios. Sin embargo, en ciertas ocasiones no existe un grado de especificidad tan marcado; así la planta de judía (*Phaseolus vulgaris*) establece simbiosis con al menos 5 especies de rizobio diferentes. A su vez, *Rhizobium* sp. NGR234 lleva a cabo interacciones exitosas con más de 100 especies de leguminosas diferentes (Tabla Int.1; Romero y Brom, 2004).

El establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno entre plantas leguminosas y rizobios es el resultado de un continuo y adecuado intercambio de señales entre planta y bacteria (Broughton *et al.*, 2000) que culmina con la formación del nódulo fijador. Se conocen al menos tres grupos de señales que son intercambiadas entre planta y bacteria durante el establecimiento simbiótico. Por un lado, los flavonoides exudados por la planta activan la expresión de un grupo de genes bacterianos, los genes de la nodulación (*nod*, *nol*, *noe*), que son los encargados de la biosíntesis de los denominados factores Nod (Lorkiewicz, 1997; Van de Sande y Bisseling, 1997; Broughton y Perret, 1999). Estos compuestos, que constituyen el segundo grupo de señales, son lipo-quitto-oligosacáridos que inducen en la raíz vegetal una serie de respuestas dirigidas a la formación del nódulo y a facilitar su infección por la bacteria (Bladergroen y Spaink, 1998; Schultze y Kondorosi, 1998; Debelle *et al.*, 2001). Un tercer grupo de señales son los polisacáridos de superficie de la bacteria: genes *exo* para exopolisacárido, *ndv* para glucanos, *lps* para el lipopolisacárido (Frayse *et al.*, 2003), necesarios para el desarrollo adecuado de los canales de infección por los que las bacterias alcanzan el córtex nodular, en donde serán endocitadas por las células vegetales. Las bacterias endocitadas no entran en contacto directo con el citoplasma vegetal sino que son rodeadas por una membrana vegetal

TABLA Int.1. Distribución de pSym en la familia *Rhizobiaceae*.

<i>Especies bacterianas</i>	<i>Planta hospedadora</i>	<i>Principal localización de los genes nod-nif-fix</i>	<i>Otros plásmidos</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Cromosoma	-
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycyne max</i> (soja)	Cromosoma	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>G. max</i>	Cromosoma, 410 Kb	-
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	pSymB, 930 Kb	3-4
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Cromosoma	1
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Cromosoma	1-3
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus japonicus</i>	Cromosoma, isla simbiótica (502-611 Kb)	1-3
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i> (garbanzo)	Cromosoma	1-3
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	7 especies de leguminosas	Cromosoma	1-3
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	> 100 especies de leguminosas	pSym, 536 Kb	1
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (judía)	pSym, 400-500 Kb	3-6
<i>R. etli</i> bv. <i>Mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	pSym, 600 Kb	3-6
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	pSym, > 1000 Kb	0-1
<i>Rhizobium gallicum</i> bv. <i>Phaseoli</i>	<i>P. vulgaris</i>	pSym, 400-500 Kb	2-3
<i>Rhizobium giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>P. vulgaris</i>	pSym, 400-500 Kb	2
<i>Rhizobium huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	pSym, 400 Kb	1-2
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>P. vulgaris</i>	pSym, 400 Kb	4
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> sp.	pSym, 180-500 Kb	2-8
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> (guisante)	pSym, 300-400 Kb	2-11
<i>Rhizobium sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	pSym	2
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>P. vulgaris</i> y <i>Leucaena leucocephala</i>	pSym, 410 Kb	3-4
<i>Shinorhizobium fredii</i>	<i>G. max</i>	pSym, 400 Kb	2-5
<i>Shinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	pSym, 1354 Kb	1-3
<i>Shinorhizobium morelense</i>	<i>L. leucocephala</i>	Cromosoma	2-3

Tomado de Romero y Brom (2004)

conformándose así la unidad simbiótica mínima, el simbiosoma. Esta estructura básica, constituida por un microorganismo rodeado de una membrana que lo separa de la célula hospedadora, no es única de esta simbiosis, sino que está conservada estructuralmente en muchas otras endosimbiosis. Desde que *Rhizobium* es endocitado hasta que se activa el proceso de fijación de nitrógeno ocurren una serie de cambios morfológicos y metabólicos en ambos simbiosomas, seguramente como resultado del intercambio de nuevos grupos de señales todavía desconocidas. En el caso de las bacterias, éstas deben diferenciarse en los llamados bacteroides, caracterizados por un tamaño, morfología y sobre todo un metabolismo diferentes a los de las bacterias en vida libre. En el bacteroide se expresan

Introducción

otros genes simbióticos que codifican para las proteínas necesarias para la reducción del dinitrógeno por la enzima nitrogenasa (genes *nif* y *fix*) (Fischer, 1994). En los simbiosomas, los bacteroides detienen los procesos de división celular, y todavía existen dudas de si estas formas celulares están diferenciadas de manera terminal y por tanto incapaces de desdiferenciarse y retornar a un crecimiento vegetativo tras la desintegración del nódulo.

Los bacteroides proporcionan a la planta una forma de nitrógeno asimilable, y a cambio reciben de ésta un fotosintetizado utilizable por el bacteroide como fuente de carbono. Por lo tanto, el correcto funcionamiento del proceso simbiótico garantiza a la planta una independencia de otras fuentes de nitrógeno exógenas mientras el rizobio encuentra un ambiente apropiado para fijar nitrógeno (para aspectos ecológicos más concretos ver Bever y Simms, 2000; Denison, 2000; Simms y Bever, 1998; Timmers *et al.*, 2000).

5.2.2. Plásmidos e islas simbióticas

Estudios iniciales de identificación de plásmidos en diferentes especies de rizobios revelaron desde el principio la presencia de grandes plásmidos (>150 Kb). Estudios posteriores demostraron la gran diversidad en cuanto a tamaño (de 150 a 1683 Kb) y número (de 0 a 11) de los plásmidos presentes en estas bacterias (Tabla Int.1).

Uno de los más importantes hallazgos de la biología molecular de estas bacterias fue el descubrimiento de que la mayoría de los genes necesarios para la nodulación y fijación de nitrógeno se solían localizar en un sólo plásmido denominado plásmido simbiótico o pSym. Esta denominación tomó fuerza y se extendió gracias a la realización de experimentos funcionales. En dichos estudios, la transferencia de un pSym a una cepa de *Agrobacterium* carente de plásmidos tenía como consecuencia la ganancia por parte de éste de la capacidad de nodular específicamente a una planta hospedadora concreta, e incluso de fijar nitrógeno de forma modesta en algunas ocasiones (García-de los Santos *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1987; Mercado-Blanco y Toro, 1996). Tal y como se muestra en la Tabla Int.1, la presencia de pSym es frecuente en los rizobios de “crecimiento rápido” de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, los cuales incluyen simbiosomas de plantas con gran interés agronómico.

La localización de los genes responsable del proceso simbiótico dentro de los pSyms varía en función del tipo de gen y del plásmido estudiado. Así, el plásmido simbiótico del *Rhizobium* sp. NGR234 se caracteriza por tener sus genes *nod* dispersos en 3 regiones diferentes que se extienden por una mitad del plásmido, mientras que sus genes *nif* y *fix* se encuentran en un sector continuo del mismo (Freiberg *et al.*, 1997). Aunque la fijación simbiótica de nitrógeno es un carácter complejo que requiere de la participación de al menos unos 60 genes, es evidente que el gran tamaño de estos pSym permite la codificación de otras funciones. En este sentido, se ha demostrado que en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* tan sólo 32 de las 180 Kb de su pSym son necesarias para generar nódulos fijadores (Innes *et al.*, 1988). Dentro de estas funciones no simbióticas se encuentran funciones muy diferentes. Es frecuente encontrar un sistema de replicación de tipo RepABC, diversas funciones de procesamiento del ADN implicadas en transferencia con hipotéticos *oriT*, diversos sistemas de secreción (entre los que se incluyen sistemas de secreción de tipo III y de tipo IV), funciones implicadas en el catabolismo de péptidos, de la síntesis de polisacáridos, en la captación de metales, genes implicados en la tolerancia a estrés oxidativo y osmótico e igualmente es frecuente la presencia de secuencias de inserción (IS) (Freiberg *et al.*, 1997; Barnett *et al.*, 2001).

En algunas ocasiones la participación de otros plásmidos en el proceso simbiótico de un determinado rizobio se ha considerado tan importante como para recibir la denominación de pSym. Éste es el caso de *S. meliloti*, que posee dos megaplásmidos: pSymA (1,35 Mb) y pSymB (1,68 Mb). El pSymA es el “verdadero” plásmido simbiótico de la cepa, en el sentido de que contiene la mayoría de los genes necesarios para la simbiosis. El pSymB participa en la simbiosis portando los genes responsables de la biosíntesis de exopolisacáridos (Finan *et al.*, 2001). Fenómenos similares se han observado en otros rizobios como *R. etli*, en el que sólo 1 de los 6 plásmidos recibe la denominación de pSym de la cepa, el plásmido pRetCFN42d, si bien se ha demostrado que el plásmido pRetCFN42b es igualmente necesario para el proceso simbiótico ya que porta los genes responsables de la biosíntesis de lipopolisacárido (García-de los Santos y Brom, 1997). De forma paralela los plásmidos pRetCFN42c, pRetCFN42e y pRetCFN42f influyen en gran medida en la competitividad de la cepa en la nodulación, siendo además el pRetCFN42f un plásmido necesario para la fijación de nitrógeno, dejando sólo el pRetCFN42a como único

Introducción

plásmido dispensable para una simbiosis 100% efectiva (Brom *et al.*, 2000; García-de los Santos *et al.*, 1996; Girard *et al.*, 2000).

Una característica bastante constante entre los plásmidos simbióticos es, al igual que otros plásmidos, la presencia de un contenido en G+C menor que el calculado para el resto del genoma. El pNGR234a presenta un 58,5% por un 62,2% del resto del genoma, el pSymA presenta un 60,4% por un 62,7% del resto del genoma. Igualmente, el porcentaje de secuencias mosaico e IS es más abundante en los plásmidos simbióticos que en el resto del genoma.

En contra de la presencia de pSyms en las especies de rizobios de “crecimiento rápido”, en las especies de “crecimiento intermedio” (*Azorhizobium* y *Mesorhizobium*) o “crecimiento lento” (*Bradyrhizobium*) los genes simbióticos están localizados en el cromosoma (Tabla Int 1). La única excepción es el *Mesorhizobium amorphae*, el cual porta un pSym de cerca de 1 Mb (Wang *et al.*, 1999). En *Bradyrhizobium japonicum*, los genes simbióticos están localizados en una isla simbiótica de 681 Kb que presenta una concentración anormalmente alta de IS en comparación con el resto del cromosoma (Göttfert *et al.*, 2001; Hahn y Hennecke, 1987; Kaneko *et al.*, 2002). Esta observación sugiere que este sector puede haber tenido un origen a través de un fenómeno de transferencia genética horizontal en esta cepa, pese a que no existe ninguna evidencia de movilidad de dicho sector. También en *Mesorhizobium loti* los genes simbióticos están localizados en una isla simbiótica (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998). La transferencia conjugativa de esta isla simbiótica se ha demostrado tanto en condiciones naturales como de laboratorio, comportándose como un verdadero gran transposón conjugativo específico de sitio (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998). Una vez transferida, esta isla simbiótica parece integrarse en un gen que codifica el ARN de transferencia de la fenilalanina, reconstituyendo dicho gen en el lado izquierdo de este elemento. Esta integración se produce mediante la ayuda de una integrasa específica de sitio codificada por la propia isla simbiótica (Sullivan y Ronson, 1998).

Aparte de los plásmidos e islas simbióticas, tal y como se muestra en la tabla Int.1, los rizobios se caracterizan por tener otra serie de plásmidos, los cuales en principio no portan genes indispensables para el proceso simbiótico y que frecuentemente se han denominado como plásmidos crípticos. Tal y como se ha apuntado más arriba, esta clasificación de los plásmidos de rizobios como plásmidos crípticos y simbióticos no deja

de ser controvertida debido a que gran número de estos plásmidos crípticos, aunque suelen ser prescindibles para la simbiosis, han demostrado tener influencia en la competitividad, infectividad y eficiencia de este proceso (Brom *et al.*, 2000; García-de los Santos *et al.*, 1996; Hynes y McGregor, 1990; Sanjuán y Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993; para más detalles sobre los plásmidos crípticos ver Capítulo 4).

5.2.3. Evidencias de la transferencia conjugativa de ADN

El interés del estudio de la conjugación en los rizobios apareció tras el descubrimiento de los pSym. De hecho, se han descrito varios pSyms con capacidad autoconjugativa tales como los plásmidos pRL1JI (Johnston *et al.*, 1978) y pRL5JI (Brewin *et al.*, 1980) de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, el plásmido pSym5 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hooykaas *et al.*, 1981) y pRP2JI de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Lamb *et al.*, 1982). En otros casos se ha apuntado la capacidad autotransferente de ciertos plásmidos simbióticos que presentan unas frecuencias de transferencias prácticamente indetectables (10^{-9}). Este es el caso del plásmido pNGR234a (Freiberg *et al.*, 1997; He *et al.*, 2003). Dentro de los plásmidos crípticos o no simbióticos, la demostración de la capacidad autoconjugativa de varios de ellos ha sido más frecuente: pRL8JI y pIJ1001 de *R. leguminosarum* 300 (Johnston *et al.*, 1982), pRleVF39a y pRleVF39b de *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 (Hynes *et al.*, 1988), pRme41a de *S. meliloti* Rm41 (Huguet *et al.*, 1983), pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 (Mercado-Blanco y Olivares, 1993), y el plásmido pRetCFN42a de *R. etli* CFN42 (Brom *et al.*, 2000).

Algunos de estos plásmidos autoconjugativos pueden propiciar la transferencia de otros plásmidos no conjugativos co-residentes en la misma cepa. Este es el caso del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4, el cual puede movilizar a pRmeGR4b, segundo plásmido críptico de la cepa (Mercado-Blanco y Olivares, 1993), o del plásmido pRetCFN42a de *R. etli* CFN42, al que se atribuye la co-transferencia del plásmido simbiótico de la cepa mediante un proceso de cointegración (Brom *et al.*, 2000; Tun-Garrido *et al.*, 2003).

En cuanto a las islas simbióticas, se ha detectado transferencia de la isla simbiótica de *M. loti* R7A tanto en condiciones naturales como de laboratorio (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998), tal y como se apuntó anteriormente, no habiéndose detectado la transferencia conjugativa de otros elementos tales como la isla simbiótica de *B. japonicum*

Introducción

USDA 110, de la cual se piensa que ha perdido su capacidad conjugativa (Kaneko *et al.*, 2002).

Aparte de las evidencias directas de transferencia expuestas arriba, existen otras adicionales que sugieren la transferencia de algunos de estos plásmidos e islas simbióticas en condiciones naturales. Así encontramos en algunos casos evidencias directas de transferencia para pSym en poblaciones naturales del suelo (Rao *et al.*, 1994; Schofield *et al.*, 1987). Igualmente, Sullivan y colaboradores pusieron de manifiesto la transferencia de la isla simbiótica R7A de la cepa de *M. loti* ICMP3153 a diferentes cepas presentes en un suelo con *Lotus corniculatus* en lo que ya es un experimento clásico. En el transcurso de 7 años desde la inoculación con la cepa *M. loti* ICMP3153, tan sólo un 19 % de las bacterias aisladas de los nódulos demostraron pertenecer a la cepa inoculada inicialmente, mientras el resto resultaron ser cepas autóctonas que habían captado la isla simbiótica de la cepa ICMP3153 (Sullivan *et al.*, 1995). Igualmente y mediante análisis filogenéticos, se ha podido poner de manifiesto antiguos eventos de transferencia genética horizontal en estas bacterias. Un ejemplo consiste en el pSym presente en muchos de los rizobios que nodulan la judía. La mayor diversidad de *R. etli*, simbionte de la judía, se encuentra en América central, centro de diversificación de esta leguminosa. Sin embargo, las judías son noduladas en Europa por miembros de varias especies entre las que encontramos *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Estudios genéticos poblacionales han demostrado que mientras los cromosomas del *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y el *R. etli* son diferentes, sus pSyms son similares. Estos resultados sugieren que quizás el *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* se originó mediante la transferencia del pSym de *R. etli* a un *R. leguminosarum* europeo, con la importación de la judía tras el descubrimiento de América (Segovia *et al.*, 1993). Posteriormente se han identificado otros rizobios europeos portadores de este tipo de pSym (el cual se caracteriza por poseer tres copias de *nifH*) tales como *Rhizobium gallicum* y *Rhizobium giardinii* (Herrera-Cervera *et al.*, 1999).

Nuevos estudios genéticos realizados mediante el uso de las secuencias de ADN de los cromosomas y pSyms de diferentes rizobios indican que si bien los eventos de transferencia genética horizontal son bastante frecuentes en las poblaciones de estas bacterias, estas tienden a ocurrir entre miembros de un mismo género y no entre géneros distintos (Wernegreen y Riley, 1999).

5.2.4. Sistemas de transferencia conjugativa de ADN

Dejando las evidencias filogenéticas de transferencia conjugativa a un lado, los detalles moleculares del proceso de transferencia en estas bacterias hasta la fecha están muy lejos de ser conocidos. Uno de los pSyms más estudiado en este aspecto ha sido el plásmido simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234 debido a su gran similitud con el sistema de transferencia *tra/trb* de pTiC58 de *A. tumefaciens* (Freiberg *et al.*, 1997) y pRi1724 de *Agrobacterium rhizogenes* (Nishiguchi *et al.*, 1987). El plásmido pNGR234a presenta tanto un sistema Dtr, incluido el *oriT*, como un sistema Mpf muy parecido al sistema que media la transferencia conjugativa del plásmido Ti entre bacterias (Figura Int.15), con las diferencias de que el gen *trbE* se encuentra dividido en 2 ORFs en el rizobio, *trbEa* y *trbEb* (no se sabe si esta diferencia es una diferencia como tal o un error de secuenciación), así como el hecho de que mientras que las regiones Dtr (genes *tra*) y Mpf (genes *trb*) están separadas unas 100 Kb en pTiC58, se encuentran contiguas en pNGR234a y pRi1724. Dicho plásmido presenta igualmente un sistema de regulación por “quorum sensing” análogo al de *Agrobacterium*, con la presencia de los genes *traI*, *traR* y *traM* localizados cerca de los genes *trb*. Sin embargo, aunque algunos operones tales como *traCDG* y *traI-trb*, son fuertemente activados por TraR en condiciones inductoras, no se ha detectado la activación del operón *traAFB* por esta proteína. De hecho, aunque aparentemente este plásmido es autotransferente (Freiberg *et al.*, 1997), a diferencia de pTiC58, dicha capacidad es difícil de reproducir en condiciones de laboratorio debido a su baja frecuencia (10^{-9}) (He *et al.*, 2003).

Por su parte en *R. etli* CFN42, pRetCFN42a se comporta como un plásmido autotransferente que porta un completo sistema *tra/trb* (Figura Int.14 y Int.15) con cierta homología con el de pTiC58. Así mismo presenta un sistema de regulación de la transferencia de tipo “quorum sensing”, con la presencia de los genes *traI*, *traR*, *cinR*, y *traM*. De forma resumida, la expresión de los genes *tra/trb* depende de la acción de TraR y CinR así como de la presencia de una acil homoserín lactona (3O-C₈-HSL) sintetizada por TraI (Tun-Garrido *et al.*, 2003).

La región de transferencia de las islas simbióticas de *M. loti* R7A (Sullivan *et al.*, 2002) y MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000) también presenta ciertas similitudes con la región *trb* del pTiC58. Ambas islas portan un operón *trb* prácticamente completo con la excepción de los genes implicados en el sistema de regulación de la transferencia *traI* y

Introducción

traR (los cuales se localizan en otro lugar distante en ambas islas), así como de la ausencia de *trbK* y *trbH* (Figura Int.15). *trbK* no es esencial para la transferencia de pTiC58, pero si lo es *trbH* (Li *et al.*, 1999). Ya que al menos la isla de *M. loti* R7A parece ser autoconjugativa (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998), la ausencia de *trbH* no parece ser un problema en la transferencia de dicha isla simbiótica. Por otra parte, homólogos a los genes *traI* y *traR*, como al operón *trb* (con la misma ausencia de *trbK* y *trbH*) también han sido encontrados en uno de los plásmidos crípticos de la cepa *M. loti* MAFF303099, el plásmido pMLb, plásmido del que se desconoce si es autoconjugativo (Kaneko *et al.*, 2000). Aunque el Mpf de estas islas simbióticas es similar al del plásmido pTiC58, sus regiones Dtr son muy diferentes al de éste. Ambas islas presentan un gen homólogo a *traG*, pero alejado de la hipotética región Dtr, formada en la isla de *M. loti* R7A por 5 genes (*msi106-msi110*) incluyendo *traF*. La función de la mayoría de estos genes es desconocida aunque *msi106* presenta cierta homología con VirD2, relaxasa implicada en la transferencia del ADN-T de pTiC58, por lo que ha sido propuesta como la hipotética relaxasa de esta isla simbiótica (Ronson *et al.*, comunicación personal). Por su parte *msi107* presenta alta homología con murein-transglicolasas (Sullivan *et al.*, 2002). Esta región Dtr se encuentra presente de forma análoga en pMLb y en la isla simbiótica de la cepa MAFF303099 aunque en este último caso esta región parece estar interrumpida por el gen de una transposasa (Sullivan *et al.*, 2002). Fuera de la isla simbiótica MAFF303099, se localizan genes que presentan homologías con otros genes de transferencia, tales como *traA* (*mll0964* y *mll5729*) y *traD* (*mll0965*). En pMLa, el otro plásmido críptico de la cepa de *M. loti* MAFF303099, tan sólo se ha podido identificar un operón formado por 10 genes (*mlr9249-mlr9253*, *mlr9255*, *mlr9256*, *mlr9258-mlr9260*) que presenta homologías con un sistema Mpf de tipo *virB*, no habiéndose descrito ninguna región Dtr u *oriT* (Kaneko *et al.*, 2002).

Tanto pSymA de *S. meliloti* como pRetCFN42d de *R. etli* presentan una región Dtr que contiene claros homólogos a los genes *traA* y *traCDG* así como un *nic* del mismo tipo que el presente en el plásmido pTiC58 (Figura Int.14) (Barnett *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001). Sin embargo, no se han encontrado homólogos a los genes *traB* y *traF*; *traB* no es esencial para la conjugación de pTiC58 (Farrand, 1998) y *traF* estrictamente hablando es una función Mpf y no Dtr. También está ausente en ambos plásmidos un operón tipo *trb*, siendo en principio un operón tipo *virB* (*virB1-virB11*) el único sistema Mpf posible para

estos plásmidos. Hasta el momento no se ha demostrado que estos dos plásmidos sean autoconjugativos. La transferencia de pRetCFN42d de *R. etli* se ha vinculado a una falsa movilización por cointegración con pRetCFN42a (Brom *et al.*, 2000; Tun-Garrido *et al.*, 2003), mientras que la transferencia del pSymA de *S. meliloti* sólo ha sido posible mediante la inclusión del *oriT* de RP4 y tras la posterior movilización del plásmido con un plásmido movilizador. La autotransferencia de cualquiera de estos plásmidos supondría un ejemplo de cooperación entre un sistema *tra* (*traACDG*) y un sistema *virB* (*virB1-virB11*) en la transferencia conjugativa de un plásmido. Este hecho, lejos de ser un fenómeno poco probable ha sido puesto de manifiesto recientemente para el plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens*, donde su sistema Dtr, muy similar al presente en estos plásmidos simbióticos (Figura Int.14), interacciona de forma efectiva con un sistema Mpf denominado *avhB*, el cual presenta una alta homología tanto a nivel de secuencia proteica como de ADN con sistemas de tipo *virB* (Figura Int.15; Chen *et al.*, 2002).

Por su parte, el plásmido pSymB de *S. meliloti* tan solo presenta un homólogo a *traA* así como un *oriT* adyacente a éste, sin que hayan sido identificados otros genes *tra* o algún tipo de operón tipo *trb* o *virB* en su secuencia (Finan *et al.*, 2001).

Aunque en la cepa secuenciada de *S. meliloti* 1021 tan sólo se ha podido determinar un sistema “quorum sensing” localizado en el cromosoma, 2 sistemas de este tipo se han descrito en la cepa AK631 de *S. meliloti* (Marketon *et al.*, 2002; Marketon y González, 2002). Un sistema *traR/traM* se localiza en el plásmido críptico autoconjugativo pRme41a, donde regula la transferencia conjugativa de dicho plásmido (Marketon y colaboradores, datos no publicados), mientras que aguas arriba de la región *traR/traM* se localizan homólogos a los genes *trbI* y *trbH* (Marketon y González, 2002).

En *R. leguminosarum* bv. *viciae*, existen al menos 4 genes responsables de la producción de 4 N-acil-homoserin lactonas diferentes. Uno de estos (*cinI*) presenta una localización cromosómica, 2 parecen localizarse en el plásmido simbiótico de la cepa pRL1JI (*rhlI* y *traI*), y del último se desconoce su localización (Lithgow *et al.*, 2000). *CinI* es responsable de la producción de N-(3-hidroxi-7-*cis*-tetra-decenoil)-L-homoserin lactona (3OH-C₁₄-HSL); la expresión de *cinI* esta regulada por *CinR* (Lithgow *et al.*, 2000). *CinI* y *CinR* parecen encontrarse en la zona alta del sistema regulatorio activando la producción del resto de N acil-homoserin lactonas. Se ha demostrado que la presencia del plásmido simbiótico pRL1JI reduce la expresión de *cinI*. Sin embargo, son necesarias mutaciones en

Introducción

cinI tanto en el donador como en el receptor para ocasionar una reducción drástica en la frecuencia de transferencia del plásmido simbiótico de la cepa (desde 10^{-2} a 10^{-6}) (Lithgow *et al.*, 2000). La transferencia del pRL1JI depende del operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* presente en este plásmido. Aguas abajo de este operón se localiza *bisR* así como un homólogo a *traR* (Wilkinson *et al.*, 2002) (Figura Int.16). TraI es una acil-homoserin lactona sintetasa que produce 3O-C₈-HSL; BisR y TraR son los reguladores del sistema. BisR es un represor de *cinI* reduciendo la producción de 3OH-C₁₄-HSL y relacionando ambos sistemas *cinI/cinR* y *bisR/traR*; por otra parte TraR en presencia de 3OH-C₁₄-HSL producido por TraI, activa el operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* y por tanto la transferencia conjugativa de pRL1JI (Figura Int.16) (Wilkinson *et al.*, 2002). Recientemente se ha puesto de manifiesto el papel tan importante que juega el receptor en este sistema de regulación a través de BisR. De esta forma, los potenciales receptores estarían produciendo altos niveles de 3OH-C₁₄-HSL (gracias a la ausencia de pRL1JI y por tanto de BisR, el cual inhibiendo a *cinI* disminuye los niveles de 3OH-C₁₄-HSL). Esto generaría una activación de la expresión de *traR* cuyo producto activaría el operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* y por tanto la transferencia del plásmido. Sin embargo, en ausencia de potenciales receptores, los niveles de 3OH-C₁₄-HSL en el donador son bajos, lo que en última instancia mantiene reprimida la transferencia del pRL1JI. TraM cooperaría con esta inhibición de la transferencia en ausencia de receptores adecuados, cuando existen bajos niveles de TraR, probablemente interaccionando directamente con esta proteína e impidiendo la activación del operón *traI-trbBCDEJKLFGHI* (Figura Int.16) (Danino *et al.*, 2003).

Tal y como se ha expuesto el control por “quorum sensing” de la transferencia conjugativa de los plásmidos presentes en la familia *Rhizobiaceae* parece ser mayoritario. Sin embargo, esto no significa que sea al único sistema posible de regulación de la transferencia de este grupo bacteriano. De hecho, se ha descrito la regulación de ciertos plásmidos de rizobios por medio de otros factores, tales como factores nutricionales. Un ejemplo lo tenemos en la transferencia de los plásmidos crípticos de *S. meliloti* GR4, cuya transferencia está regulada por amonio (Herrera-Cervera *et al.*, 1996) (para más detalles ver Capítulo 4). Igualmente, la existencia de plásmidos portadores de un hipotético sistema conjugativo completo y que carecen de un sistema de tipo “quorum sensing” codificado en su secuencia, tales como los plásmidos simbióticos de *S. meliloti* y *R. etli*, abre la

posibilidad de la existencia de otros sistemas regulatorios que controlen la transferencia conjugativa de algunos plásmidos pertenecientes a miembros de esta familia.

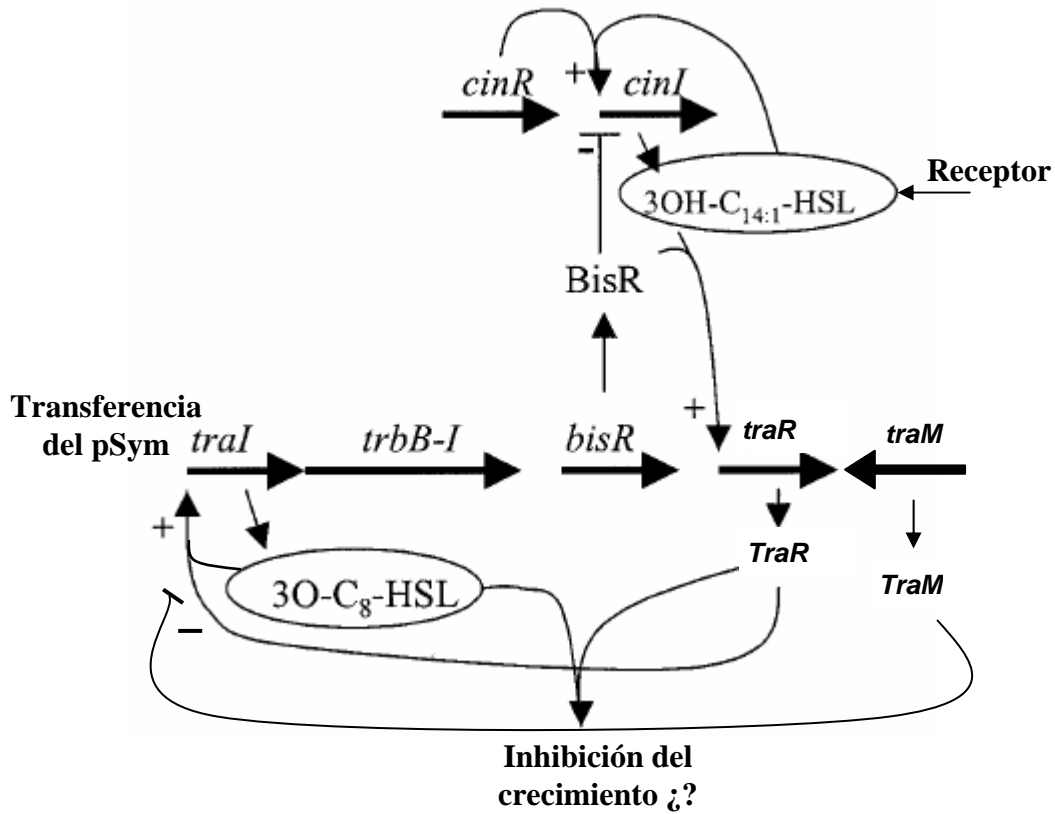


FIGURA Int. 16. Regulación de la transferencia del pRL1JI de *R. leguminosarum*
 En la figura se representa el circuito propuesto para la regulación del plásmido simbiótico pRL1JI. Para más detalles ver texto. Modificado de Wilkinson *et al.*, 2002.

OBJETIVOS

Los rizobios son bacterias Gram negativas capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas de la familia *Leguminosae*. Una de las características de los rizobios es que los genes involucrados en los procesos de nodulación y fijación suelen encontrarse localizados en grandes elementos extracromosómicos conocidos como plásmidos simbióticos, o bien en islas simbióticas de localización cromosómica.

La transferencia genética horizontal de estos elementos dentro de este grupo bacteriano tiene gran relevancia, puesto que mediante este proceso una bacteria no simbiótica puede adquirir la capacidad de nodular una o más plantas hospedadoras. A la importancia de este proceso para la evolución y diversificación de los rizobios, se le unen las posibles consecuencias negativas sobre la eficacia de inoculantes habitualmente utilizados en agricultura. La generación de nuevas cepas simbióticas implica que las cepas inoculantes deben competir con aquéllas por la ocupación de los nódulos. A diferencia de las inoculantes, las nuevas cepas simbióticas suelen estar mejor adaptadas a las condiciones edafo-climáticas locales, por lo que resultan más competitivas. Si además estas nuevas cepas presentan una menor eficiencia fijadora, se genera la situación de una menor producción vegetal debido a una menos eficiente fijación de nitrógeno.

Existen diversas evidencias de que muchos de los plásmidos de los rizobios tienen capacidad de autotransferencia y que ésta ha tenido un papel importante en su historia evolutiva. Además, el reciente conocimiento de las secuencias de los genomas de algunos de estos rizobios indica que muchos de los plásmidos e islas cromosómicas de este grupo, sino todos, codifican diversas funciones implicadas en la transferencia conjugativa, así como hipotéticos orígenes de transferencia u *oriT*. Sin embargo, los megaplásmidos e islas simbióticas de estas bacterias, salvo excepciones, no suelen presentarse como elementos autoconjugativos en condiciones de laboratorio, o su transferencia ocurre a frecuencias muy bajas.

Una posible explicación a la ausencia de transferencia de estos elementos en condiciones de laboratorio, puede radicar en la existencia de sistemas de regulación de la transferencia. En varios rizobios se han descrito sistemas de regulación de la transferencia conjugativa de alguno de sus plásmidos, siendo la regulación por “quorum sensing” uno de los mayoritarios. Sin embargo, la existencia de plásmidos que portando un hipotético sistema conjugativo completo carecen de un sistema de tipo “quorum sensing”, tales como los plásmidos simbióticos de *S. meliloti* y *R. etli*, abre la posibilidad de la existencia de

Objetivos

otros sistemas regulatorios no descritos que controlen la transferencia conjugativa de algunos plásmidos pertenecientes a miembros de esta familia.

Con estos antecedentes, los objetivos en esta tesis doctoral han sido:

- 1) Determinar la funcionalidad de los sistemas de transferencia de los pSym de *R. etli* y *S. meliloti*.
- 2) Identificar posibles reguladores de la transferencia de estos plásmidos.
- 3) Comparar estos sistemas conjugativos con los de otros plásmidos no simbióticos existentes en estas bacterias

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Técnicas microbiológicas

1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepa	Características relevantes	Referencias
<i>S. meliloti</i>		
GR4	Cepa silvestre, Nod ⁺ , Fix ⁺ en alfalfa, contiene los plásmidos pSymA, pSymB, pRmeGR4a y pRmeGR4b	(Mercado-Blanco y Olivares, 1993)
GR4KLR	Derivada de GR4 RecA ⁻ (pRmeGR4a::Sm/Spc y pRmeGR4b::Km)	(Herrera-Cervera <i>et al.</i> , 1997)
GRM10KR	Derivada GR4KLR curada de pRmeGR4a, Km ^f	(Herrera-Cervera <i>et al.</i> , 1997)
GRM8	Derivada de GR4 curada de pRmeGR4a y pRmeGR4b	(Mercado-Blanco y Olivares, 1993)
GRM8SR	Derivada GRM8, Sm ^f , Rif ^r	(Mercado-Blanco y Olivares, 1993)
1021	Derivada de 2001, cepa silvestre, Sm ^f	(Meade <i>et al.</i> , 1982)
1021RctA ⁻	Derivada de 1021 (Δ rctA::Sm/Spc)	Este trabajo
GR4RctA ⁻	Derivada de GR4 (Δ rctA::Sm/Spc)	Este trabajo
GR4C5	Derivada de GR4 (<i>nodC</i> ::Sm/Spc)	M. J. Soto (EEZ)
100TSS	Derivada de 1021 (Δ otsA::Sm/Spc)	A. Domínguez (EEZ)
GR4RctA ⁻ /p42dRctA ⁻	Derivada de GR4RctA ⁻ que porta pRetCFN42d::Tn5.1	Este trabajo
1021RctA ⁻ /p42dRctA ⁻	Derivada de 1021RctA ⁻ que porta pRetCFN42d::Tn5.1	Este trabajo
GR4RctA ⁻ /p42d::Km	Derivada de GR4RctA ⁻ que porta pRetCFN42d::Km de CFNX667 de <i>R. etli</i>	Este trabajo
1021RctA ⁻ /p42d::Km	Derivada de 1021RctA ⁻ que porta pRetCFN42d::Km de CFNX667 de <i>R. etli</i>	Este trabajo
GR4C5/p42dRctA ⁻	Derivada de GR4C5 que porta pRetCFN42d::Tn5.1	Este trabajo
100TSS/p42dRctA ⁻	Derivada de 100TSS que porta pRetCFN42d::Tn5.1	Este trabajo
GR4C5/p42d::Km	Derivada de GR4C5 que porta pRetCFN42d::Km de CFNX667 de <i>R. etli</i>	Este trabajo
100TSS/p42d::Km	Derivada de 100TSS que porta el pRetCFN42d::Km de CFNX667 de <i>R. etli</i>	Este trabajo

Material y Métodos

GR4KLORF3::Gm	Derivada de GR4KL (ORF3::Gm)	Este trabajo
R. etli		
CE3	Derivada Sm ^f de la cepa silvestre CFN42, Sm ^f	(Quinto <i>et al.</i> , 1985)
CFNX182	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42a	(Brom <i>et al.</i> , 1992)
CFNX218	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42a, b, c, d y f, (pRetCFN42e ^Δ)	(Brom <i>et al.</i> , 2000)
CFNX218Rif	Derivada de CFNX218, Rif ^f	Este trabajo
CFNX218Spc	Derivada de CFNX218, Spc ^f	Este trabajo
CFNX2001	Derivada de CFN42 Rif ^f curada de pRetCFN42a y d	(Leemans <i>et al.</i> , 1984)
CFNX667	Derivada de CFN42 RecA ⁻ curada de pRetCFN42a, (pRetCFN42d::Km)	J. Martínez (CIFN)
CFNX195	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42a, (pRetCFN42d::Km)	(Brom <i>et al.</i> , 2000)
CFNX183	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42b	(Brom <i>et al.</i> , 1992)
CFNX184	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42c	(Brom <i>et al.</i> , 1992)
CFNX185	Derivada de CE3 (pRetCFN42e ^Δ)	(Brom <i>et al.</i> , 1992)
CFNX89	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42d	(Brom <i>et al.</i> , 1992)
CFNX186	Derivada de CE3 curada de pRetCFN42f	(Brom <i>et al.</i> , 1992)
CFNX195ΔtraA::Gm	Derivada de CFNX195 (ΔtraA::Gm ^f)	Este trabajo
CFNX218Spc Tn5.1	Derivada de CFNX218Spc (pRetCFN42d::Tn5.1)	Este trabajo
CFNX218Spc Tn5.2	Derivada de CFNX218Spc (pRetCFN42d::Tn5.2)	Este trabajo
CFNX218Spc Tn5.6	Derivada de CFNX218Spc (pRetCFN42d::Tn5.6)	Este trabajo
CFNX218Spc Tn5.8	Derivada de CFNX218Spc (pRetCFN42d::Tn5.8)	Este trabajo
CFNX218Spc Tn5.13	Derivada de CFNX218Spc (pRetCFN42d::Tn5.13)	Este trabajo
A. tumefaciens		
GMI9023	Derivada de C58 curada de sus plásmidos nativos, Sm ^f , Rif ^f	(Rosenberg y Huguet, 1984)
At Tn5.1	Derivada de GMI9023 (pRetCFN42d::Tn5.1)	Este trabajo
At Tn5.2	Derivada de GMI9023 (pRetCFN42d::Tn5.2)	Este trabajo
At Tn5.6	Derivada de GMI9023 (pRetCFN42d::Tn5.6)	Este trabajo
At Tn5.8	Derivada de GMI9023 (pRetCFN42d::Tn5.8)	Este trabajo
At Tn5.13	Derivada de GMI9023 (pRetCFN42d::Tn5.13)	Este trabajo
E. coli		
S17-1	<i>Thi, pro, recA, hsdR, hsdM, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
DH5α	<i>SupE44, DlacU169, f80, LacZDM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	B.R.L.
HB101	<i>supE44, hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5mt11, Sm^f</i>	(Boyer y Roulland-Dussoix, 1969)

BL21(DE3)	Derivada de BL21 que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i>	Novagen
C41(DE3)	Derivada mutante de BL21(DE3) que se caracteriza por sobre-expresar proteínas potencialmente tóxicas para BL21(DE3)	(Miroux y Walker, 1996)
C43(DE3)	Derivada mutante de BL21(DE3) que se caracteriza por sobre-expresar proteínas potencialmente tóxicas para C41(DE3)	(Miroux y Walker, 1996)

Tabla 2. Plásmidos.

Plásmidos	Características relevantes	Referencias
pLAFR1	Cósmido IncP, Tc ^r	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
pJB3Tc19	Vector de clonación IncP, Tc ^r , Ap ^r	(Blatny <i>et al.</i> , 1997)
pRK2013	Plásmido movilizador derivado de RK2, Km ^r	(Figurski y Helinski, 1979)
pRmOR69	Cósmido derivado de pLAFR1 que porta la región <i>mob</i> de pRmeGR4a.	(Herrera-Cervera <i>et al.</i> , 1998)
pRmOR65	Cósmido derivado de pLAFR1 que porta la región <i>mob</i> de pRmeGR4b.	(Herrera-Cervera <i>et al.</i> , 1998)
pRmOR106-1042	Cósmidos derivados de pLAFR1 portadores de hipotéticas regiones <i>mob</i> de <i>S. meliloti</i> GR4	(Herrera-Cervera <i>et al.</i> , 1998)
pC13a	Cósmido derivado del pLAFR1 que porta la región de transferencia del plásmido pRetCFN42a	(Tun-Garrido <i>et al.</i> , 2003)
pC13c, d	Cósmidos solapantes con pC13a procedentes del banco de genes de CFN42	Este trabajo
pRe182R1a	Cósmido derivado del pLAFR1 que porta la región <i>mob</i> del plásmido pRetCFN42d	Este trabajo
pRe182R1b-d	Cósmidos solapantes con pRe182R1a procedentes del banco de genes de CFN42	Este trabajo
pBluescript II KS	Vector de clonación, Ap ^r	Stratagene
pRe182R1aΔHindIII	Cósmido derivado de pRe182R1a con una delección de un fragmento <i>HindIII</i> de 11 Kb	Este trabajo
pJBdp1	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento <i>HindIII</i> de 7,7 Kb de pRe182R1a	Este trabajo
pJBdp2	Derivado de pJBdp1 (pJBdp1Δ <i>Bam</i> HI)	Este trabajo
pJBdp3	Derivado de pJBdp2 (pJBdp2Δ <i>Bg</i> III)	Este trabajo
pJBdp4	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento <i>Eco</i> RI de 1,3 Kb	Este trabajo

Material y Métodos

	de pRe182R1a	
pJBdp5	Derivado de pJBdp1 (pJBdp1Δ <i>StuI</i>)	Este trabajo
pJBdp6	Derivado de pJBdp1 con el inserto <i>HindIII</i> invertido	Este trabajo
pTE3	Vector de clonación IncP que porta el promotor <i>trp</i> de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimorium, Tc ^r	(Egelhoff y Long, 1985)
pTEYp028	Derivado de pTE3 que contiene el gen <i>yp028</i> de <i>R. etli</i> delante del promotor <i>trp</i>	Este trabajo
pTEYp028R	Derivado de pTEYp028, con el gen <i>yp028</i> invertido con respecto al promotor <i>trp</i>	Este trabajo
pMS255	Plásmido derivado de pUC portador del casete de Gm	(Becker <i>et al.</i> , 1995)
pGEM-T Easy	Vector de clonación para fragmentos de PCR	Promega
pK18 <i>mobsacB</i>	Vector suicida, Mob ⁺ , <i>sacB</i> , Km ^r	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pGemTΔ <i>traA</i> ::Gm	Derivado de pGEM-T Easy con un fragmento 2,4 Kb (143900-14688 de pRetCFN42d) donde se ha sustituido un fragmento <i>EcoRV</i> interno de 673 pb por un casete de Gm	Este trabajo
pK18Δ <i>traA</i> ::Gm	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> con el inserto del pGemTΔ <i>traA</i> ::Gm	Este trabajo
pSUP202	Vector suicida; Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
pSUP2021	Derivado de pSUP202 portador de Tn5, Km ^r , Cm ^r , Ap ^r	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
pUC18	Vector de clonación, Ap ^r	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pJBRerctA	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 750 pb que contiene el gen <i>rctA</i> de <i>R. etli</i>	Este trabajo
pTERerctA	Derivado de pTE3 con el gen <i>rctA</i> de <i>R. etli</i> delante del promotor <i>trp</i>	Este trabajo
pTESmrctA	Derivado de pTE3 con el gen <i>rctA</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 delante del promotor <i>trp</i>	Este trabajo
pTEAtrctA	Derivado de pTE3 con el gen <i>rctA</i> de <i>A. tumefaciens</i> delante del promotor <i>trp</i>	Este trabajo
pHP45Ω	Plásmido portador de un casete de Sm/Spc; Sm ^r , Spc ^r , Ap ^r	(Prentki y Krisch, 1984)
pGemSmrctA-L	Derivado de pGEM-T Easy con el fragmento SmrctA-L de 525 pb (720816-721341 del pSymA) de <i>S. meliloti</i> 1021	Este trabajo
pUCSmrctA-L	Derivado de pUC18 con el fragmento SmrctA-L	Este trabajo
pGemSmrctA-R	Derivado de pGEM-T Easy con el fragmento SmrctA-R de 913 pb (721810-722723 del pSymA) de <i>S. meliloti</i> 1021	Este trabajo
pUCSmrctA-LCR	Derivado de pUCSmrctA-L con el casete de Sm/Spc y el fragmento SmrctA-R clonado.	Este trabajo
pSUPSmrctA-LCR	Derivado del pSUP202 con el inserto <i>EcoRI</i> del pUCSmrctA-LCR	Este trabajo

Material y Métodos

p53Gus	Derivado de pBBR1MCS5 con el gen <i>gus</i> de pWM5 (pBBR1MCS5:: <i>uidA</i>)	L. Girard (CIFN)
p53SmtraA:: <i>gus</i>	Fusión <i>traA</i> :: <i>gus</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en p53Gus	Este trabajo
p53SmtraC:: <i>gus</i>	Fusión <i>traC</i> :: <i>gus</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en p53Gus	Este trabajo
p53Sm1322:: <i>gus</i>	Fusión <i>1322</i> :: <i>gus</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en p53Gus	Este trabajo
p53SmrctA:: <i>gus</i>	Fusión <i>rctA</i> :: <i>gus</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en p53Gus	Este trabajo
pETBlue-1 AccepTor TM	Vector de expresión derivado de pETBlue-1 portador del promotor T7, linearizado con <i>EcoRV</i> con 3'-dU en los extremos para clonación directa de productos de PCR	Novagen
pET-3a	Vector de expresión derivado de pBR322 portador del promotor T7, Ap ^r	Novagen
pET-29c	Vector de expresión para proteínas de fusión a colas de Histidinas derivado de pBR322 portador del promotor T7, Km ^r	Novagen
pETtraAp42d	Derivado de pETBlue-1 AccepTor TM con el gen <i>traA</i> de pRetCFN42d delante del promotor T7	Este trabajo
pETN265traA	Derivado de pET-3a con las 795 pb iniciales del gen <i>traA</i> de pRetCFN42d delante del promotor T7	Este trabajo
pETN265TraAHis	Derivado de pET-29c con las 795 pb iniciales del gen <i>traA</i> de pRetCFN42d delante del promotor T7	Este trabajo
pJB3oriTp42d	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 300 pb (150 a ambos lados del sitio <i>nic</i>) de pRetCFN42d de <i>R. etli</i>	Este trabajo
pJB3oriTpSymA	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 300 pb (150 a ambos lados del sitio <i>nic</i>) de pSymA de <i>S. meliloti</i> 1021	Este trabajo
pJB3oriTpSymB	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 300 pb (150 a ambos lados del sitio <i>nic</i>) de pSymB de <i>S. meliloti</i> 1021	Este trabajo
pJB3oriTpTiC58	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 300 pb (150 a ambos lados del sitio <i>nic</i>) de pTiC58 de <i>A. tumefaciens</i>	Este trabajo
pJB3oriTpNGR234a	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 300 pb (150 a ambos lados del sitio <i>nic</i>) del pNG234a de <i>Rhizobium</i> Sp. NGR234	Este trabajo
pJB3Rec	Derivado de pJB3Tc19 con un fragmento interno <i>SacI/EcoRI</i> de 398 pb de <i>traA</i> de pRetCFN42d de <i>R. etli</i>	Este trabajo
pBS69E2	Derivado de pBluescript II KS con un fragmento <i>EcoRI</i> de 6 Kb portador de la región <i>mob</i> del pRmeGR4a	Este trabajo
pBS69E2RB	Derivado de pBluescript II KS con un fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> 3,5 kb del pBS69E2	Este trabajo
pBSPst3	Derivado de pBluescript II KS con un fragmento <i>PstI</i> de 4,2	Este trabajo

Material y Métodos

	Kb solapante con el pRmOR69	
pUC18ΔB	Derivado de pUC18 que carece de la diana <i>Bam</i> HI	Este trabajo
pUC18ΔB69E2	Fragmento <i>Eco</i> RI de 6 Kb con la región <i>mob</i> del pRmeGR4a clonado en pUC18ΔB	Este trabajo
pUC18ΔB69E2::Gm	Derivado del pUC18ΔB69E2 que porta un casete de Gm en el sitio <i>Bam</i> HI del gen ORF 3	Este trabajo
pSUP69E2::Gm	Derivado de pSUP202 con el inserto <i>Eco</i> RI de pUC18ΔB69E2::Gm	Este trabajo

1.2. Medios de cultivo para *E. coli* y *A. tumefaciens*.

Las cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* se cultivaron de forma rutinaria en medio de Luria-Bertani, LB (Miller, 1972):

NaCl.....	5 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agar (para medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 120° durante 20 min.

Alternativamente, cuando se ha querido seleccionar *E. coli* frente a *Rhizobium* o *Agrobacterium*, se ha empleado ENDO AGAR, un medio selectivo para coliformes donde no crecen ni *Rhizobium* ni *Agrobacterium* y cuya preparación se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (DIFCO): se resuspenden 41,5 gramos del preparado en un litro de agua destilada o desionizada y se hierve hasta su completa disolución. A continuación se esteriliza durante 15 minutos a 121° C. Este medio se preparó siempre justo antes de su utilización.

1.3. Medios de cultivo para rizobios.

Las cepas de *R. etli* y *S. meliloti* fueron crecidas rutinariamente a 28-30°C en medio TY (Beringer, 1974):

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,9 g

Agar (medio sólido)..... 15 g
Agua desionizada.....1000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 120° durante 20 min.

Como medio mínimo (MM) se ha empleado el medio Robertsen *et al.*, (1981) modificado:

K₂HPO₄.....0,3 g
KH₂PO₄.....0,3 g
MgSO₄.7H₂O.....0,15 g
CaCl₂.2H₂O.....0,05 g
FeCl₃.....0,006 g
NaCl.....0,05 g
Glutamato sódico.....1,1 g
Manitol.....10 g
Solución de vitaminas*1 ml
Agar purificado (medio sólido).....13 g
Agua desionizada.....1000 ml

Se ajustó a un pH de 6,8-7,2, y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

*La solución concentrada de vitaminas (1000x) consta de:

Biotina..... 0,2 g
HCl de tiamina..... 0,1g
Pantotenato sódico.....0,1g
Agua desionizada.....1000 ml

Se esterilizó por filtración y se adicionó se adicionó 1 ml/litro al medio mínimo autoclavado.

Material y Métodos

1.4. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se utilizaron criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Los criotubos fueron almacenados a -80°C.

1.5. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2µm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina y de cloranfenicol no fue necesaria la esterilización por filtración ya que se empleó alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolverlos. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Antibióticos

Antibiótico	Concentración (µg/ml)			
	<i>S. meliloti</i>	<i>R. etli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>
Espectinomicina (Spc)	150	100	100	25
Sulfato de estreptomycin (Sm)	150	100	100	25
Tetraciclina* (Tc)	10	2,5	5	10
Sulfato de kanamicina (Km)	200	50	50	25
Ampicilina (Ap)	-	-	-	200
Cloranfenicol** (Cm)	-	-	-	50
Gentamicina (Gm)	30	10	30	10
Carbamicilina (Cb)	-	-	100	-
Rifampicina (Rif)	-	20	50	-
Nalidixico (Nx)	-	20	-	20

* La solución concentrada de Tc se preparó en metanol:agua (1:1) o metanol dependiendo de la concentración de la misma.

**Para la solución concentrada de Cm se utilizó etanol.

1.6. Transferencia conjugativa en condiciones de laboratorio

1.6.1. Conjugaciones biparentales

Se realizaron mediante mezcla de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento ($DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,1 y 0,2) del donador con otro en fase exponencial tardía del receptor, en la proporción 1:1. Donador y receptor se centrifugaron en un tubo de microfuga y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) con el fin de eliminar los restos de antibióticos. Finalmente la mezcla se resuspendió en un pequeño volumen (50 μ l) que fue depositada sobre un filtro Millipore estéril (0,45 μ m de poro y 2,5 cm de diámetro), previamente colocado sobre una placa de medio sólido (LB, MM o TY, según cada caso) y se incubó durante 16-20 h. a 30°C. Transcurrido este tiempo la mezcla de conjugación se resuspendió en medio líquido estéril, y se prepararon diluciones seriadas que se sembraron sobre placas de medio selectivo.

Para calcular las frecuencias de transferencia se realizaron recuentos de los receptores, transconjugantes y donadores. Además también se llevaron a cabo cruces control, que contenían únicamente el receptor o el donador, para determinar las frecuencias de resistencia espontánea a los antibióticos selectivos en cada caso. En todos los casos las frecuencias de conjugación se calcularon como el número de transconjugantes dividido por el número total de células receptoras.

1.6.2. Conjugaciones triparentales

La transferencia de plásmidos no autotransmisibles desde cepas no movilizadoras de *E. coli* a *Rhizobium* se realizó según el modelo de cruce tripartito, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979). La metodología seguida fue idéntica a la de los cruces simples, pero en estos casos se prepararon mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones 1:1:1.

2. Técnicas analíticas

2.1. Determinación de actividad β -glucuronidasa

La actividad β -glucuronidasa se determinó siguiendo la metodología que se describe a continuación:

1. Inocular las cepas objeto de estudio y dejar crecer hasta fase exponencial con los antibióticos correspondientes. Posteriormente realizar una dilución (1/10-1/15) y

Material y Métodos

dejar crecer los cultivos hasta una fase estacionaria temprana (densidad óptica de 0,8-1,0). Posteriormente volver a diluir (1/200-1/500) incluyendo únicamente el antibiótico Gm²⁰ (resistencia codificada por el vector que porta el gen reportero) y dejar crecer toda la noche hasta que el cultivo alcance 0,4-0,6 de densidad óptica.

2. Tomar 1,5 ml de cultivo y lavar 2-3 veces con agua destilada para la eliminación del medio de cultivo. Resuspender finalmente en 1,5 ml de tampón de ensayo.
3. Tomar 2 x 200µl del cultivo lavado, destinando unos a la determinación de la actividad β-glucuronidasa, congelando los otros a la espera de la cuantificación de proteínas.
4. Adicionar a las muestras 740µl de tampón de ensayo.
5. Añadir 50µl de SDS 0,1% y 100µl de cloroformo.
6. Agitar las muestras mediante vórtex 2 x 15 segundos.
7. Incubar a 37°C durante 10 minutos.
8. Añadir a cada una de las muestras 10µl de PNPG (100mM) precalentado a 37°C y anotar el tiempo transcurrido hasta apreciar un color amarillo.
9. Detener la reacción con 200µl de carbonato sódico 1M y centrifugar 5 minutos a 12000 r.p.m.
10. Tomar la fase superior de cada muestra y medir la absorbancia a una longitud de 405 nm.

La actividad específica se calculó según la formula $R=S/(0,02 \times V \times \text{mg proteína/ml})$ y se expresó como nmol de producto formado/min/mg de proteína.

V = volumen ensayado S = Unidades A_{405} por minuto.

SOLUCIONES:

- **Tampón de ensayo:**
 - Tampón fosfato sódico 50 mM
 - DTT 5mM
 - EDTA 1mM

3. Técnicas de biología molecular

3.1. Aislamiento de ADN plasmídico

Se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) que se describe a continuación:

- 1.- Inocular 1,5-3 ml de medio suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37°C en el caso de *E. coli* o 28-30°C en el caso *S. meliloti*, durante 12-15 h.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 r.p.m., 3 minutos). Retirar el sobrenadante. Eliminar los restos de sobrenadante mediante el empleo de micropuntas.
- 3.- En el caso de *S. meliloti*, *R. etli* o *A. tumefaciens*, resuspender el sedimento en 200 µl de Sarcosil 0,1% en TE, para eliminar restos de polisacáridos. Centrifugar las células (12.000 r.p.m., 3 minutos). Eliminar los restos de sobrenadante.
- 4.- Resuspender el sedimento en 100 µl de solución I. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 200 µl de solución II. Mezclar por inversión manual los tubos. Dejar 5 minutos en hielo.
- 6.- Adicionar 150 µl de solución III. Mezclar suavemente por inversión manual varias veces. Dejar en hielo 10 minutos y centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos).
- 7.- Recoger el sobrenadante y adicionar 1 volumen de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1). Agitar con vórtex y centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos).
- 8.- Recoger en un nuevo tubo la fase superior acuosa que contiene el ADN.
- 9.- Adicionar 2,5 volúmenes de etanol al 100% preenfriado a -20°C. Dejar 30 minutos a -70°C. Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos).
- 10.- Eliminar el sobrenadante. Adicionar 200 µl de etanol al 70% y centrifugar (12.000 r.p.m., 3 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 11.- Secar el precipitado al vacío.
- 12.- Resuspender el precipitado en 20 µl de tampón TE o H₂O bidestilada.

SOLUCIONES:

- **Solución I:**
 - Glucosa 50 mM
 - EDTA 10 mM
 - Tris-HCl 25 mM pH 8
 - Lisozima, 4mg/ml
- **Solución II:**
 - NaOH 0,2 M
 - SDS 1%

Material y Métodos

- **Solución III:**
Acetato potásico 5 M (60 ml)
Ácido acético glacial (11,5 ml)
H₂O (28,5 ml); pH 4,5
- **Tampón TE:**
Tris 10 mM
EDTA 1 mM, pH 8,0
- **Mezcla fenol:cloroformo (1:1):** El cloroformo es una mezcla de alcohol isoamílico: cloroformo (1:24). El fenol contiene fenol al 100% (1:1), 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0).

Alternativamente cuando se requería una mayor pureza de ADN plasmídico (Ej. secuenciación) se utilizó el producto comercial Qiaprep[®] Spin Plasmid (Qiagen Inc.) de la manera que se indica a continuación:

- 1.- Inocular 1,5-3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37°C durante 12-15 h.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 r.p.m., 3 minutos). Retirar el sobrenadante. Eliminar los restos de sobrenadante mediante el empleo de micropuntas.
- 3.- Resuspender el sedimento en 250 µl de solución P1.
- 4.- Adicionar 250 µl de solución P2.
- 5.- Adicionar 350 µl de solución N3. Mezclar por inversión manual varias veces y centrifugar (12.000 r.p.m., 10 minutos).
- 6.- Recoger el sobrenadante y aplicarlo a una columna Qiaprep. Centrifugar (12.000 r.p.m., 1 minuto) para retener el ADN plasmídico. Eliminar el eluido.
- 7.- Lavar con 500 µl de tampón PB. Centrifugar (12.000 r.p.m., 1 minuto). Eliminar el eluido.
- 8.- Adicionar 750 µl de tampón PE a la columna. Centrifugar (12.000 r.p.m., 1 minuto). Repetir esta operación una vez más para eliminar el exceso de tampón.
- 9.- Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml, adicionar 50 µl de agua bidestilada estéril. Esperar 1 minuto y centrifugar (12.000 r.p.m., 1 minuto) para recuperar el ADN.

SOLUCIONES:

- **P1:**

Tris-HCl, 50 Mm

EDTA, 10 mM

100 µg/ml RNAsa; pH 8,0

- **P2:**

NaOH 0,2M;

SDS 1%

- **N3:**

Acetato potásico 3 M; pH 5,5

3.2. Aislamiento de ADN genómico total

Para la obtención del ADN genómico total se empleó la siguiente metodología:

- 1.- Inocular un cultivo de 3-5 ml en TY, y dejar crecer hasta que se alcance la fase exponencial tardía.
- 2.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 3 minutos) en tubos eppendorf de 1,5 ml.
- 3.- Lavar con 200 µl de Sarcosyl 0,1% en TE.
- 4.- Resuspender en 300 µl de TE.
- 5.- Adicionar 100 µl de pronasa.
- 6.- Adicionar 100 µl de SDS 5% en TE. Mezclar por inversión suavemente e incubar durante 1 hora a 37°C.
- 7.- Adicionar 125 µl de NaCl 5M en TE. Mezclar nuevamente por inversión e incubar en hielo durante 30 minutos. Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 8.- Adicionar 1 volumen igual de fenol. Mezclar por vórtex intenso durante 1 minuto. Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Repetir este paso una vez más.
- 9.- Extraer con la mezcla fenol:cloroformo descrita en el apartado anterior. Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 10.- Extraer con cloroformo. Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 11.- Añadir 2,5 volúmenes de etanol al 100%. Mezclar por inversión suave e incubar a -70°C durante 30 minutos. Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Retirar el sobrenadante y lavar con etanol al 70%. Secar las muestras al vacío.

Material y Métodos

12.- Resuspender el ADN en 20-25 µl de TE o agua bidestilada.

SOLUCIONES:

- **Pronasa:**

2,5 mg/ml en TE

Alternativamente para la extracción de ADN genómico total se empleó el sistema Quantum Prep[®] AquaPure Genomic DNA Kit siguiendo las instrucciones de los fabricantes (QIAGEN):

- 1.- Partir de un cultivo de 3-5 ml en TY de células de *S. meliloti* en fase exponencial tardía
- 2.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 3 minutos) en tubos eppendorf de 1,5 ml. Retirar el sobrenadante con ayuda de micropunta.
- 3.- Resuspender en 300 µl de Solución Lisis e incubar la muestra a 80°C durante 5 minutos.
- 4.- Adicionar 1,5 µl de solución de RNasa A. Mezclar la muestra por inversión e incubar a 37°C durante 1 h.
- 5.- Adicionar 100 µl de solución de precipitación de proteína. Agitar vigorosamente durante 1 minuto y centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 6.- Adicionar 300 µl de isopropanol al 100%. Mezclar por inversión suave y centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Retirar el sobrenadante y lavar con 300 µl de etanol al 70%. Secar las muestras al aire durante 15 minutos.
- 7.- Adicionar 50 µl de tampón de hidratación. Incubar la muestra a 65°C durante 5 minutos.
- 8.- Almacenar el ADN a 4°C hasta su uso.

3.3. Determinación de la concentración de ADN

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.* (1989). La absorbancia (A_{260} y A_{280}) de las soluciones de ADN en agua o en TE se determinaron utilizando como blanco agua o TE, respectivamente. La concentración se calcula respecto a los valores estándar de $DO_{260}=1$ para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble. La relación DO_{260}/DO_{280} se usa para estimar la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de

comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook *et al.* (1989).

3.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por el proveedor (Roche[®], Alemania).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo primero la digestión con una enzima. A continuación, se añadió agua bidestilada estéril hasta un volumen mínimo de 300 µl y un volumen de mezcla fenol/cloroformo (1:1). Se continuó con los pasos 7 a 11 del apartado 3.1 de esta misma sección, con la diferencia de que una vez realizada la fenolización se adicionó un 10% (v/v) de una solución de CILi 4M al sobrenadante para favorecer la precipitación del ADN. Se resuspendió en un volumen adecuado de agua bidestilada (10-20 µl) y a continuación se llevó a cabo la digestión con la segunda enzima.

3.5. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa

3.5.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparada en TBE (Tris 50 mM; EDTA-Na₂ 2,5 mM; BO₃H₂ 50 mM; pH 8,2). Como tampón de electroforesis también se utilizó TBE. La concentración de agarosa estándar fue del 0,8%, elevándose la concentración de ésta en los casos en los que la presencia de fragmentos pequeños de ADN lo requería. El voltaje usual de trabajo fue 80 V en cubetas de electroforesis de tamaño mediano y de 60 V en cubetas de electroforesis de tamaño pequeño. Como tampón de carga se utilizó una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua destilada.

Material y Métodos

3.5.2. Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los mismos en una solución que contenía 4-5 gotas de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) en 500 ml de agua destilada, durante 15-20 minutos. Posteriormente se observaron bajo luz UV (260 nm) en un transiluminador.

Para la visualización e impresión se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509) y el analizador de imágenes Quantity One de BioRad®.

3.5.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se efectuó teniendo en cuenta la relación logarítmica entre el tamaño molecular relativo (M_r) de las moléculas de ADN y la movilidad relativa (R_f) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron los fragmentos de restricción del ADN del fago λ resultantes de la digestión con endonucleasa *HindIII* (Marcador II) o *EcoRI/HindIII* (Marcador III).

3.6. Separación de megaplásmidos mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa

Los plásmidos de alto peso molecular se visualizaron mediante separación por electroforesis en geles horizontales de agarosa siguiendo el método de Eckhardt (1978), modificado por Hynes y McGregor (1990). Los cultivos bacterianos se llevaron a una fase de crecimiento logarítmico (DO_{600nm} entre 0,3 y 0,5 para *Rhizobium*). Se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó 5 minutos a 14.000 x g. El sedimento se resuspendió en 1 ml de agua preenfriada en hielo y se transfirieron 100 μ l a un nuevo tubo de microfuga también preenfriado. A continuación se añadieron 500 μ l de solución de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0.3% en TBE fría y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 x g y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 μ l de solución de lisis (sacarosa al 10% en TBE con RNasa (10 μ g/ml) que se encontraba preenfriada y a la que se añadió lisozima (4 mg/ml) justo antes de su utilización). Las muestras así preparadas se cargaron en los pocillos de un gel de agarosa al 0,8% y SDS 1% en TBE.

La electroforesis transcurrió a 5V durante 30 minutos para permitir la lisis celular y luego a 90V durante 15 horas o más para permitir la separación de los plásmidos. Para evitar un recalentamiento excesivo del gel es necesario dejar la tapa abierta durante el transcurso de la electroforesis.

El revelado y fotografiado de geles se realizó como se indica en el apartado 3.5.2

3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se ha utilizado el método Qiaex-II[®] (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA):

- 1.- Extraer la banda correspondiente del gel de agarosa y colocarla en un tubo de microcentrífuga. Pesar la muestra para determinar el volumen de agarosa.
- 2.- Adicionar 3 volúmenes de tampón QX1[®], que contiene altas concentraciones de agentes caotrópicos.
- 3.- Adicionar 5 μ l de la resina Qiaex II[®] por cada μ g de ADN e incubar a 50°C hasta conseguir la disolución de la agarosa (aprox. 10 minutos), agitando el tubo por inversión manual cada 2 minutos.
- 4.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 30 segundos). Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado, que contiene el ADN adherido a la matriz, en 0,5 ml de tampón QX1[®].
- 5.- Lavar dos veces el precipitado con 0,5 ml de tampón PE[®] que contiene etanol para eliminar los agentes caotrópicos. Secar a temperatura ambiente, evitando una desecación excesiva.
- 6.- Resuspender el precipitado en 20 μ l de agua destilada o tampón TE precalentado a 50°C.
- 7.- Eliminar la resina mediante centrifugación (12.000 r.p.m., 30 segundos). Recoger el sobrenadante con cuidado y pasarlo a un nuevo tubo eppendorf. Esta última operación se puede repetir una segunda vez para eluir el ADN restante que pudiera quedar retenido en la resina.

Material y Métodos

3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

La ligación entre un fragmento de ADN y un vector de clonación adecuado se realizó usando una relación molar de al menos 1:3 vector:inserto, independientemente de que los extremos a ligar fuesen romos o cohesivos. El protocolo seguido fue el siguiente:

1.- En un tubo eppendorf, adicionar:

- x μ l de AND vector*
- y μ l de AND inserto*
- 1 μ l de DNA ligasa del fago T4 (1 unidad/ μ l)
- 2 μ l de tampón de la ligasa (concentrado 10x)
- H₂O bidestilada, completar hasta 20 μ l.

2.- Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 3 horas ó a 12-16°C durante toda la noche**.

-* Se ha de mantener la proporción vector:inserto en relación (molar) 1:3. La cantidad x+y debe ser de unos 200 ng.

-** Alternativamente (aunque requiere mayor cantidad de ADN), para favorecer la eficiencia del proceso de ligación de extremos romos, se puede adicionar a la mezcla anterior 2 μ l de PEG 8000 (40%), esterilizado a 115°C/30 minutos, dejando incubar durante 12-24 h a 20°C.

3.9. Transformación celular

3.9.1. Preparación de células competentes de *E. coli* con CaCl₂/MgCl₂

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (Lederberg y Cohen, 1974).

A partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1 ml cultivo/100 ml de medio) y se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0.3-0.6. Tras dejar enfriar en hielo durante 10 minutos, las células se centrifugaron (12.000xg, 5 minutos, 4°C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgCl₂ 0.1 M preenfriada a 4°C, y se centrifugaron de nuevo (3.000xg, 5 minutos, 4°C).

A continuación, las células se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución de CaCl₂ 0,1 M preenfriada a 4°C. Tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 minutos, se

centrifugaron (3.000xg, 5 minutos, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 volumen de una solución de CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4°C.

Las células así preparadas se repartieron en alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf preenfriados a 4°C, que se conservaron a -80°C hasta su uso. La competencia de las células se mantuvo de esta forma durante varios meses.

3.9.2. Preparación de células electrocompetentes

La preparación de células electrocompetentes de *Rhizobium* y *Agrobacterium* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Hattermann y Stacey (1990). A partir de un precultivo de la cepa a transformar se inoculó un matraz de 100 ml del medio y antibióticos apropiados y se incubó en agitación a 28°C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,4-0,6. Tras dejar enfriar en hielo durante 15 minutos, las células se centrifugaron (9820xg, 10 minutos, 4°C) y se resuspendieron en 1 volumen de H₂O estéril preenfriada. Se repitieron rondas de centrifugación y resuspensión en H₂O preenfriada con los siguientes volúmenes: 1 vez x 1 volumen, 2 veces x 0,5 volúmenes, 1 vez x 0,02 volúmenes; terminando por resuspender en 0,003 volúmenes de glicerol al 10% (esterilizado por filtración). Las células fueron almacenadas en tubos eppendorfs preenfriados a 4°C en alícuotas de 60 µl que se conservaron a -80°C hasta su uso.

3.9.3. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait, 1983, modificada como se indica a continuación:

- 1.- Descongelar las alícuotas de 200 µl de células competentes guardadas a -70°C manteniéndolas en hielo (15-20 minutos).
- 2.- Adicionar 50-100 ng del ADN que se pretenda emplear para transformar. Mezclar mediante agitación suave e incubar en hielo durante 45 minutos.
- 3.- Calentar (choque térmico) a 42°C durante 2 minutos. Dejar en hielo de 2 a 5 minutos.
- 4.- Adicionar medio LB hasta 1 ml. Incubar a 37°C durante 1 h, agitando suavemente cada 20 minutos.
- 5.- Sembrar en medio LB con los correspondientes antibióticos*. Incubar a 37°C durante una noche.

Material y Métodos

*Si se lleva a cabo una selección por color se puede adicionar al medio 40 µl de una solución de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal), (20 mg/ml en dimetilformamida) y 4 µl de una solución de 1-Isopropil-β-D-1-galactopiranosido (IPTG), 200 mg/ml.

3.9.4. Electroporación

Las transformaciones de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium etli* fueron llevadas a cabo mediante electroporación, la cual se realizó mezclando una alícuota de 60 µl de células electrocompetentes descongeladas en hielo con 1 µl (aproximadamente 20 ng) de ADN resuspendido en H₂O. Esta mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm Gene Pulser[®] (BioRad Laboratories), manteniendo todo a 4°C y evitando el contacto directo de las cubetas con el hielo. Se utilizó un electroporador ELECTRO CELL MANIPULATOR[®] 600 en las siguientes condiciones:

Choose mode:	T	2,5KV/Resistance High voltage (HV).
Set capacitance:	C	No usada en modo HV.
Set resistance:	R	R5 (129 ohm).
Set charging voltage:	S	1,3-1,5 KV.
Pulse length:	t	5-6 msec.

Tras el pulso, se añadió inmediatamente 1 ml de medio estéril y se incubó a 28°C en agitación durante 4-20 horas. Tras este tiempo se sembraron alícuotas de 10 a 100 µl en medio selectivo.

3.10. Experimentos de hibridación ADN-ADN

3.10.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Southern (Southern, 1975). Para ello:

- 1.- Realizar una electroforesis en agarosa al 0,8%. La concentración de agarosa puede variar según el tamaño de los fragmentos que se quieran separar. El voltaje depende del tamaño de la cubeta. Es conveniente emplear un voltaje bajo cuando se quiera transferir ADN total digerido con alguna enzima de restricción.
- 2.- Tinción del gel con bromuro de etidio y fotografía del mismo.

3.- Depurinación ácida del ADN: sumergir el gel en HCl 0,25N hasta viraje del azul de bromofenol a amarillo (10 minutos). Repetir este paso una vez más. Lavar con agua destilada.

4.- Desnaturalización alcalina del ADN: sumergir el gel durante 15 minutos en una solución NaOH 0,5 N, 1,5 M NaCl. Repetir el proceso. Lavar el gel con agua destilada.

5.- Neutralización del ADN: sumergir el gel en una solución Tris-HCl 0,5 M, 1,5 M NaCl (pH 7,4) durante 20 minutos. Lavar con agua destilada.

6.- Humedecer una membrana de nylon (Roche[®]), cargada positivamente, en SSC 20x durante al menos 5 minutos. El tamaño de la membrana debe ser igual al del gel. Recortar también dos piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño y otra de mayor tamaño que el gel, y saturarlas en tampón SSC 20x.

7.- Sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, construir una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por una pieza de papel Whatman 3MM, cuyos extremos, a modo de mecha se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia SSC 10x, el gel, el filtro de nylon y las dos piezas restantes de papel Whatman 3MM. Colocar un marco de plástico que borde todo el sistema y, a continuación, cubrir con papel absorbente. Sobre todo el conjunto se coloca una placa de vidrio y sobre ésta un peso de aprox. 0,5-1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. Comprobar que el sistema está perfectamente horizontal, y dejar la transferencia toda la noche. Finalizado el proceso, lavar la membrana con SSC 2x durante 5 minutos. Finalmente, fijar el ADN a la membrana mediante calentamiento en vacío a 120°C durante 30 minutos.

SOLUCIONES:

- **SSC 20x:**

175,3 g de NaCl

8,2 g de citrato sódico

800 ml de H₂O destilada

Ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro.

3.10.2. Marcaje de sondas de ADN no radioactivas

El marcaje de sondas de ADN se ha realizado empleando el sistema no radioactivo comercializado por Roche[®], siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica

Material y Métodos

consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza al ADN molde desnaturalizado por calor (100°C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante 2 minutos, una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante reacción inmunológica específica de la manera que se describe en el apartado 3.10.3.

La cantidad de ADN molde que se empleó fue de entre 100-1000 ng, en un volumen final de 20 µl, preferiblemente linearizado mediante la digestión con una enzima de restricción. El tiempo de incubación fue de unas 20 horas, y la temperatura de 37°C.

3.10.3. Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactivas

El proceso de hibridación cuando se utilizó ADN homólogo como sonda se efectuó de la manera que se describe a continuación:

- 1.- Prehibridación: mantener la membrana de nylon inmersa en 20 ml de solución de prehibridación durante al menos 1 hora, a 42°C.
- 2.- Hibridación: tras eliminar la solución de prehibridación, adicionar nueva solución de prehibridación con el ADN sonda previamente desnaturalizado por calor (100°C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante otros 2 minutos. Incubar durante al menos 6 h.
- 3.- Tras la hibridación se realizaron los siguientes lavados:
 - 2 x 5 minutos en 100ml de SSC 2x; SDS 0,1%, a temperatura ambiente.
 - 2 x 15 minutos en 100ml de SSC 0,1x; SDS 0,1%, a 68°C.
- 4.- Lavar 1-5 minutos en tampón I.
- 5.- Incubar 30 minutos en tampón II.
- 6.- Detección inmunológica: incubar durante 30 minutos con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina diluïdos 1:10.000 en tampón II.
- 7.- Lavar (2 x 15 minutos) con tampón de lavado, formado por tampón I + Tween 20 0,1%.
- 8.- Introducir la membrana en una bolsa de plástico de tamaño ligeramente superior, e incubar 5 minutos con tampón III.
- 9.- Vaciar el contenido de la bolsa. Adicionar 10 ml de CSPD^{®*} (1:100 en tampón III) e incubar 5 minutos en la oscuridad. Posteriormente incubar de 10 a 15 minutos a 37°C.

10.- Dejar escurrir la membrana sin que se seque, sellar la bolsa y exponer la membrana a una película autorradiográfica (Kodak X-Omat[®]). El tiempo de exposición (30 minutos a 6 h) varía en función de la concentración de ADN, el % de homología entre los ADNs sonda y problema y la eficiencia del marcaje.

11.- Para el revelado de las películas se emplearon el revelador y el fijador de TETENAL[®] a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

SOLUCIONES:

- **Solución de prehibridación:**

SSC 5x, formamida 50%

Reactivo de bloqueo 2% (p/v)

N-lauryl-sarcosina 0,1%

SDS 0,02%

- **Tampón I:**

Tris-HCl 100 mM (pH 7,5)

NaCl 150 mM

- **Tampón II:**

Tampón I

Reactivo de bloqueo 1%

- **Tampón III:**

Tris-HCl 100 mM (pH 9,5)

NaCl 100 mM

*CSPD[®]: 3-(4-metoxipiro(1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo(3.3.1.1)decan)-4-il) fenil fosfato disódico.

3.11. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó ADN total, ADN plasmídico (0,05-1 µg) o ADN de suspensiones celulares. La muestra de ADN a partir de una suspensión celular, se puede obtener directamente por recogida de células de una placa ó directamente a partir de un cultivo

Material y Métodos

líquido. A continuación, las células se centrifugan a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos y se resuspenden en 20 μ l de agua bidestilada estéril. De la suspensión celular obtenida se emplean 3 μ l para la mezcla de reacción de PCR.

La mezcla de reacción que se empleó consistió de:

- ADN molde
- 5 μ l de tampón PCR (10x)
- 50 pmoles de cada cebador
- 5 μ l de $MgCl_2$ (15mM)
- 6 μ l dNTPs (2,5mM)
- 0,4 μ l Biotherm polimerasa
- 0,04 μ l Accutherm polimerasa
- H₂O bidestilada hasta 50 μ l

3.12. Secuenciación de ADN

3.12.1. Secuenciación de ADN de doble cadena

Las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS, por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (300-600 ng) se le adicionó el cebador específico (1,6-3,2 picomoles) y agua bidestilada hasta un volumen final de 6 μ l.

En la mayoría de los casos se han secuenciado las dos cadenas de ADN. Los cebadores empleados han sido los denominados universal y reverso, correspondientes a las secuencias del fago M13 (-40) 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' y (-20) 5'-AACAGCTATGACCATG-3' respectivamente, presentes en los vectores de tipo pUC18 y pBS(KS+). Para determinar la secuencia de ADN adyacente a Tn5 en diversos mutantes, se empleó el cebador 5'-AAAGGTTCCGTTTCAGGACGC-3', complementario a la secuencia de los extremos del Tn5.

Tanto en caso de encontrarse inespecificidades en la secuencia, como en ausencia de solapamiento entre el ADN de clones consecutivos de secuenciación, se diseñaron cebadores específicos para cubrir las discontinuidades en la secuencia. La síntesis de

oligonucleótidos la ha llevado a cabo el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, utilizando un aparato Oligo 1000 DNA Synthesizer.

La secuenciación de fragmentos de gran tamaño fue realizada por la empresa Sistemas Genómicos S.L. (Valencia).

3.12.2. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado con los siguientes programas y paquetes informáticos: el programa Vector NTI[®], los programas Fasta, Blast, Bestfit, Pileup, Clustal W, Motifs, Repeat, Stemloop y Peptidestructure del servidor EMBNET del Centro Nacional de Biotecnología. Los bancos de datos consultados fueron EMBL, Genbank a través del servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), la base de datos del genoma de *S. meliloti* 1021 (<http://sequence.toulouse.inra.fr/>) y la Rhizobase de KAZUSA DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>).

Los análisis filogenéticos fueron realizados con el programa MEGA 2.1 (<http://www.megasoftware.net/>).

3.13. Purificación y análisis de proteínas

3.13.1. Tampones y disoluciones

Para la purificación y análisis del dominio relaxasa de TraA del plásmido pRetCFN42d de *R. etli* se emplearon las siguientes disoluciones:

3.13.1.1. Purificación

- **TES:**
 - Tris-HCl 50 mM
 - EDTA 1 mM
 - 10 % sacarosa (p/v)
 - pH 8,0
- **Tampón de lisis:**
 - 100 mM NaH₂PO₄
 - 10 mM Tris-HCl

Material y Métodos

8 M de urea

pH 8 ajustado con HCl

- **Tampón de lavado:**

100 mM NaH₂PO₄

10 mM Tris-Cl

8 M de Urea

pH 6,3 ajustado con HCl

- **Tampón de renaturalización A**

Tris 20mM

200 mM de NaCl

20% glicerol (p/v)

8 M de urea

pH 7,6

- **Tampón de renaturalización B**

Tris 20mM

200 mM de NaCl

20% glicerol

pH 7,6

- **Tampón de elución**

Tris 20mM

200 mM de NaCl

20% glicerol

500 mM de imidazol

pH 7,6

- **Tampón de almacenamiento**

Tris 20mM

200 mM de NaCl

20% glicerol

pH 7,6

3.13.1.2. Geles SDS-PAGE

- SAB (2x): Tris-HCl 100 mM, SDS 4 % (p/v), glicerol 12 % (p/v), azul de bromofenol 0,2 % (p/v), DTT 200 mM, pH 6,8.
- Tinción de geles de poliacrilamida: Azul Comassie R-250 0,1 % (p/v), metanol 50 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v).
- Eliminación de la tinción de geles de poliacrilamida: metanol 10 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v)
- Gel separador.

	8%	10%	12%	15%
H₂O	5,33	4,83	4,33	3,58
1,5 Tris-HCl pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5
Acrilamida 29:1 40%	2	2,5	3	3,75
SDS 10% (p/v)	0,1	0,1	0,1	0,1
PSA 10% (p/v)	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,02	0,02	0,02	0,02

Volúmenes expresados en ml.

- Gel concentrador.

H₂O	2,8
1,5 Tris-HCl pH 6,8	1,3
Acrilamida 29:1 40%	0,85
SDS 10% (p/v)	0,05
PSA 10% (p/v)	0,028
TEMED	0,008

Volúmenes expresados en ml.

3.13.2. Metodología**3.13.2.1. Sobre-expresión de proteínas**

Para la sobre-expresión de la proteína N265TraA se empleó el sistema NOVAGENE[®], en el cual el gen a expresar se encuentra bajo la influencia del promotor T7-*lac*. Dicho sistema permite la expresión inducible de genes mediante la adición de IPTG, obteniendo finalmente gran cantidad del producto proteico. De entre los diferentes vectores disponibles de este sistema, se optó por el pTE-29c, que genera una proteína de

Material y Métodos

fusión a una cola de 6 histidinas que facilitan la purificación de la proteína de fusión mediante el empleo de una resina de níquel. La cepa de *E. coli* utilizada para la expresión de la proteína de fusión fue la cepa *E. coli* C41 (Miroux y Walker, 1996). Las células con la construcción correspondiente se cultivaron en 1 litro de LB con Km a 37°C en agitación. Cuando el cultivo llegó a una DO₆₀₀ 0,6-0,8, se llevó a cabo la inducción con IPTG hasta concentración final de 0,5 mM, y se incubó a 37°C en agitación durante 4,5 horas para permitir la expresión de la proteína. Las células se recogieron por centrifugación a 4000xg durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 12 ml de TES, siendo almacenadas a -80°C. El nivel de expresión fue monitorizado mediante la comparación en geles SDS-PAGE de las muestras a t=0 y t=4,5 horas.

3.13.2.2. Purificación de proteínas

Las células fueron descongeladas y se centrifugaron a 4000xg durante 10 minutos a 4°C para la eliminación del TES, quedando un peso húmedo de unos 4 gramos. Para la purificación de la proteína N265TraA se empleó la resina Ni-NTA, siguiendo las recomendaciones del fabricante QIAGEN®. La lisis se realizó en condiciones desnaturizantes mediante la resuspensión de las células en 35 ml de tampón de lisis. La mezcla de lisis se mantuvo en agitación 1,5 horas, tras lo cual se centrifugó a 10000xg durante 30 minutos. Al sobrenadante se le adicionaron 8 ml de resina Ni-NTA preequilibrada con el tampón de lisis y se dejó en agitación 1 hora a T^a ambiente, tras lo cual se vertió la mezcla en una columna vacía. El proceso de lavado, renaturalización y elución de la N265TraA se llevó a cabo mediante la utilización de un Automated Econo System® a 4°C. La resina se lavó mediante el paso de 10 ml del tampón de lavado, tras lo que se hicieron pasar 10 ml del tampón de renaturalización A. La renaturalización se realizó con la proteína inmovilizada en la columna mediante un gradiente entre los tampones de renaturalización A y B en 120 pasos y 2 horas de duración, en los que mecánicamente, el tampón de renaturalización A fue gradualmente sustituido por el B en su paso a través de la columna. La proteína se recogió mediante la adición de 10 ml de tampón de elución, en 20 alícuotas de 0,5 ml que fueron analizadas mediante electroforesis de proteínas en SDS-PAGE para determinar en que fracción/es exactamente se encontraba la proteína. Para conseguir un mayor grado de pureza de la misma, la proteína purificada

fue sometida a otra ronda de purificación con la resina Ni-NTA en iguales condiciones a las descritas anteriormente.

3.13.2.3. Dialización de proteínas

La eliminación del imidazol se realizó mediante la dialización de la proteína. Para ello se cortó la membrana a utilizar y se hirvió durante 10 minutos sobre un mechero en una disolución de bicarbonato sódico al 2% (p/v) y EDTA pH 8,0. Tras introducir la membrana en H₂O destilada y aclarar varias veces, se introdujo en el tampón de dialisis (tampón de almacenamiento), que fue aproximadamente 100 x V_{muestra}. Tras lavar con tampón el interior de la membrana, esta se cerró con una pinza por la parte inferior y se introdujo la muestra a dializar en el interior cerrando con otra pinza por la parte superior, evitando la formación de burbujas. Se dejó dializar la muestra de 15-20 horas a 4°C con agitación suave.

3.13.2.4. Electroforesis de Proteínas

Para las electroforesis se utilizó el método descrito por Laemmli y colaboradores (Laemmli, 1970), con geles de SDS-poliacrilamida al 10% y 12%. Las muestras se prepararon con tampón de carga compuesto de Tris-HCl 50 mM, SDS 4 % (p/v), glicerol 4 % (p/v), azul de bromofenol 0,02 % (p/v), DTT 100 mM, pH=6,8, en relación 1:1. Éstas fueron hervidas durante 5 minutos a 100° C, antes de ser cargadas en el gel. Como marcador de peso molecular se utilizó el Low Range de BioRad[®] laboratories. Los geles se corrieron en un tampón Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS 1% (p/v), pH 8,3 (TG). La tinción de los mismos se llevó a cabo con una solución que contenía Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1 % (p/v), metanol 50 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v) durante dos horas a temperatura ambiente (Meyer y Lamberts, 1965). A continuación se eliminaron los restos de tinción mediante cambios sucesivos con una solución que contenía metanol 10 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v). Los geles fueron escaneados con un Fluor-S[™] MultiImager (BioRad[®] Laboratories).

3.13.2.5. Medida de concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas fue llevada a cabo mediante el método descrito por Bradford (Bradford, 1976), para lo cual se preparó una recta patrón con seroalbúmina

Material y Métodos

bovina (BSA, Sigma), entre 0 y 5 µg, disuelta en el mismo tampón en el que se encuentra la muestra problema. Sobre cada tubo con patrón o muestra (50 µl) se añadió 1 ml de BioRad Protein Assay (BioRad[®] Laboratories). Se agitaron los tubos y tras 15 minutos, se midió la absorbancia a 595 nm, en un espectrofómeto DU640 Spectrophotometer de Beckman.

3.13.2.6. Marcaje de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintetizados por la empresa MWG[®] (Alemania) fueron marcados en el extremo 5' mediante la proteína polinucleotido kinasa de T4 en la siguiente mezcla de reacción:

- 5 µl de oligo a 10pmol/µl
- 3 µl [γ -³²P]-ATP 10µCi/µl (30µCi)
- 1 µl polinucleotido kinasa de T4 10U/µl (10U)
- 5 µl tampón 10x
- 36 µl H₂O destilada

Dicha mezcla se dejó 30 minutos a 37°C, tras lo que se inactivó la enzima incubando la reacción 5 minutos a 90°C. La marca no incorporada se eliminó mediante una cromatografía de filtración con columnas Sephadex G-25[®] (Pharmacia).

3.13.2.7. Ensayos de unión a ADN de cadena sencilla

Para la determinación de la especificidad de unión de la proteína N265TraAp42d a los distintos oligonucleótidos se realizaron ensayos de retardo en geles nativos de acrilamida al 12% en TB en mini geles Bio Rad[®] (0,75 mm x 6,5 cm)

Acrilamida 29:1 40%	3
TB 10x	1
H₂O*	6
PSA 10% (p/v)	0,07
TEMED	0,007

*desgasificar antes de añadir el PSA y TEMED.

Volúmenes expresados en ml.

Los ensayos se llevaron a cabo mediante la incubación de concentraciones crecientes de proteína N265TraAp42d (entre 0 y 1µM) con los oligonucleótidos específicos marcados en 5' con P³² a una concentración final fija de 1nM y 10nM, junto con oligo inespecífico sin marcar a una concentración final de 1µM. Se incubó la mezcla proteína-oligo en Tris 10mM, NaCl 100mM, EDTA 50 µM y 5% glicerol, 20 minutos a 25°C tras lo cual se cargaron en el gel.

Las condiciones de electroforesis se establecieron en 60 minutos a 100 mV en tampón Tris-Borato pH 8,2, tras lo cual los geles fueron secados a 80°C durante 1 hora al vacío y expuestos en un Molecular Imager FX System de Bio-Rad[®]. Se cuantifico la cantidad de oligonucleótido libre y retardado en cada calle mediante el programa de Bio-Rad[®] Quantity One. El cálculo de las constantes de unión de la proteína N265TraAp42d a los diferentes oligonucleótidos se realizó con el programa Prism.

3.13.2.8. Ensayos de corte y transferencia sobre ADN de cadena sencilla

3.13.2.8.1. Oligonucleótidos ensayados

- **Oligonucleótidos del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*:**

12+8: ACGTATATTGCG/CCCTCAAA

20+8: CGACAGCGACGTATATTGCG/CCCTCAAA

25+9: CGTCGCGACAGCGACGTATATTGCG/CCCTCAAAC

17+15: CAGCGACGTATATTGCG/CCCTCAAACAGATCG

12+8 com: TTTGAGGGCGCAATATACGT

- **Oligonucleótido de los plásmidos pSymA y pSymB de *S. meliloti*:**

20+8: CGCCAGCGACGTATATTGCG/CCCTCAAA

- **Oligonucleótido de los plásmidos pNGR234a de *Rhizobium* sp. NG234 y pTiC58 *A. tumefaciens* C58:**

13+8: ACGTATAATTGCG/CCCTTGGA

- **Oligonucleótido de los plásmidos pSB102 y pIPO2T:**

12+8: TAGCCTATCCTG/CAATAGAC

- **Oligonucleótido del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4:**

12+8: TTCCGTATCCTG/CCCCTCCA

- **Oligonucleótido del plásmido RSF1010:**

Material y Métodos

12+8: CCGGTAAGTGCG/CCCTCCCC

- **Oligonucleótido del plásmido pXF51 de *Xylella fastidiosa* 9a5c:**

12+8: AAACCTATCCTG/CCCTAGAT

3.13.2.8.2. Metodología

Para llevar a cabo los ensayos de corte se utilizaron oligonucleótidos de diferentes tamaños que contienen la secuencia del hipotético sitio *nic* de diferentes plásmidos a una concentración final de 10nM. Para estos ensayos los oligonucleótidos se marcaron radiactivamente en su extremo 5' con la enzima polinucleótido kinasa de T4, como se ha descrito anteriormente, y se incubaron con la proteína a una concentración final de 12,5µM y MgCl₂ como cofactor a una concentración final de 5mM. Como marcador se adicionó a la reacción de corte anterior una mezcla de dATP y ddATP (10:1) a una concentración final de 500µM más una unidad de nucleotidil transferasa terminal (Tdt), mientras que como control se preparó una reacción en idénticas condiciones incubando la proteína N265TraAp42d con el oligonucleótido p42d (12+8) rev-com, de secuencia reverso complementaria al teórico sitio *nic* (12+8) del plásmido simbiótico de *R. etli*. Para el ensayo de transferencia de cadena la proteína N265TraAp42d, además del oligonucleótido pRetCFN42d (12+8), fue incubada con el oligonucleótido p42d (17+15) sin marcar a una concentración final de 100nM. Las reacciones se incubaron a 28°C durante 3,5 horas; transcurrido este tiempo se trataron con 1 µl de SDS al 1% (p/v) y 1 µl de proteinasa K (13.6 mg/ml). Finalmente, se incubaron durante otros 20 minutos a 37°C trascurridos los cuales se añadieron 1 µl de tampon de carga (95% formamida, 20mM EDTA, 0,05% (p/v) de azul de bromofenol, 0,05% (p/v) de azul de xylano cyanol) a las mezclas de reacción y se sometieron a electroforesis (4 h a 2200 V en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 18 % y urea 8 M). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se secaron al vacío a 80°C durante 1 hora. Los resultados de las reacciones fueron visualizados mediante el uso de un molecular imager Fx de Bio-Rad®.

4. Ensayos con plantas

4.1. Esterilización y germinación de semillas de alfalfa

El proceso de germinación de semillas de alfalfa se realizó como se indica a continuación:

- 1.- Sumergir las semillas de alfalfa, (*Medicago sativa* L, cultivar Aragón) en HgCl₂ al 2,5% durante 10 minutos.
- 2.- Lavar 5-6 veces con abundante agua destilada estéril. Dejar en imbibición durante 2 h.
- 3.- Lavar 2-3-veces con abundante agua destilada estéril. Colocarlas en placas de Petri que contienen papel de filtro humedecido con agua destilada estéril.
- 4.- Germinar en oscuridad a 28°C durante 24-48 h.
- 5.- Controlar el grado de humedad diariamente.

4.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas

Se ha empleado una solución mineral derivada de la descrita por Rigaud y Puppo (Rigaud y Puppo, 1975), cuya composición se describe a continuación:

- **Macroelementos (por litro de agua):**

KH₂PO₄, 68 mg

K₂HPO₄, 44 mg

SO₄Mg.7H₂O 123 mg

K₂SO₄, 174 mg

SO₄Ca, 173 mg

EDTA Férrico (Secuestrene), 50 mg

- **Microelementos (por litro de agua):**

MoO₄Na₂.2H₂O, 0,11 mg

BO₃H₃, 2,85 mg

SO₄Mn.4H₂O, 0,37 mg

SO₄Zn.7H₂O, 0,55 mg

SO₄Cu.5H₂O, 0,2 mg.

El pH de la solución se ajustó a 7,5. La solución se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Material y Métodos

4.3. Cultivo de plantas

4.3.1. Cultivo axénico en tubos

El cultivo axénico de plantas de alfalfa se realizó según la técnica descrita por Olivares y colaboradores (Olivares *et al.*, 1980). Cuando las plántulas de alfalfa recién germinadas alcanzaron 1-2 cm de longitud, se colocaron en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm conteniendo 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Se dejaron los tubos con las plantas en oscuridad durante dos días. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas, mantenida en las siguientes condiciones: $500 \mu\text{einsteins}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (longitud de onda: 400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 23/17°C de temperatura día/noche y 50% de humedad relativa.

4.3.2 Medida del grado de infectividad

Cuando las plantas de alfalfa tenían entre 9 y 10 días, se inocularon con 1 ml de una suspensión celular de aprox. 10^6 células/ml de la cepa en estudio. Al menos 12 plantas individuales (1 planta/tubo) se inocularon con cada cepa. Tras la inoculación se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta. Se consideró que una planta estaba nodulada cuando en sus raíces existía al menos un nódulo visible. El seguimiento de la nodulación se continuó hasta que todas las plantas estaban noduladas. La infectividad de la cepa se considera en función del tiempo de nodulación y del número de nódulos que forma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

1. LOCALIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ORÍGENES DE TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN EL GENOMA DE *S. meliloti* Y *R. etli*.

Algunas de las bacterias agrupadas en las familias *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* y *Hyphomicrobiaceae* son conocidas comúnmente como rizobios, y se caracterizan por establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas. Muchos de estos microorganismos presentan su material genético distribuido en varios replicones autónomos e independientes de un cromosoma principal, cuyos tamaños oscilan entre las 100 Kilobases (Kb) y más de 2 megabases (Mb). Esta distribución genética ha favorecido probablemente que el intercambio genético haya sido relativamente frecuente entre los miembros de dichas familias (Sullivan *et al.*, 1995; Schofield *et al.*, 1987; Laguerre *et al.*, 1993; Deng *et al.*, 1995; Herrera-Cervera *et al.*, 1999).

Dentro de estos elementos extracromosómicos o plásmidos podemos destacar la existencia de dos tipos generales: los denominados pSym o plásmidos simbióticos, donde residen muchos de los genes responsables de la asociación simbiótica de la bacteria con su leguminosa hospedadora, y los plásmidos crípticos o no simbióticos sin un papel crucial en los procesos de nodulación o fijación de nitrógeno. En otras ocasiones los genes responsables de la asociación simbiótica se encuentran agrupados en islas simbióticas de localización cromosómica, que son también susceptibles de sufrir eventos de transferencia conjugativa (Sullivan *et al.*, 1995).

A pesar de que los fenómenos de transferencia genética horizontal suponen probablemente un proceso clave en el desarrollo evolutivo de este grupo bacteriano, la detección de dicha transferencia en condiciones naturales no siempre ha sido posible y ello ha repercutido en el escaso conocimiento de los procesos implicados en el intercambio genético. Son varias las razones que han hecho difícil la evaluación y el estudio de las tasas de transferencia genética horizontal en estas bacterias:

1. La dificultad de determinar la transferencia conjugativa en suelo. Es necesario que el ADN transferido sea capaz de mantenerse estable y que además confiera a las bacterias receptoras un fenotipo fácilmente detectable. La falta de marcadores adecuados dificulta la cuantificación de dicha transferencia.

Capítulo I

2. El gran tamaño de los plásmidos de estas bacterias (hasta 2 megabases) hace difícil su manipulación y estudio en el laboratorio.

3. La baja o incluso nula tasa de transferencia conjugativa de estos plásmidos en condiciones de laboratorio.

Los estudios realizados hasta el momento señalan a la conjugación bacteriana como uno de los principales mecanismos de transferencia genética horizontal entre las poblaciones de rizobios (Farrand, 1998). Partiendo de esta premisa, el estudio, la caracterización y cuantificación de los procesos conjugativos que tienen lugar entre los distintos rizobios podrían ser unos buenos indicadores de la tasa de intercambio genético horizontal que soportan estas bacterias en su hábitat natural.

El origen de transferencia, u *oriT*, es la única función que se requiere en *cis* para la transferencia conjugativa de un determinado ADN (Lanka y Wilkins, 1995), y por tanto la mínima estructura funcional que necesita un fragmento de ADN para ser transferido por conjugación. Esto hace que la identificación de los *oriTs* en el genoma de un rizobio sea uno de los puntos clave en la evaluación de la transferencia conjugativa. La presencia de un *oriT* funcional en un determinado ADN puede ser puesta de manifiesto por la capacidad de convertir un vector no transmisible en un plásmido movilizable. Aprovechando esta propiedad, se ha utilizado la estrategia descrita previamente por Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998) para la identificación de *oriTs* presentes en los genomas de *S. meliloti* y *R. etli*, aunque con ciertas modificaciones, tal y como se describe más adelante.

1.1. Antecedentes

Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998) describieron la identificación de 11 regiones *mob* susceptibles de contener un *oriT* en el genoma de *S. meliloti* GR4, mediante el uso de un banco de genes de *S. meliloti* GR4 construido en el vector pLAFR1 con un tamaño medio de inserto de 25 Kb. Este cósmido es un derivado de RK2 que codifica resistencia a tetraciclina y aunque contiene el *oriT* de RK2 carece de la mayoría de las funciones *tra* necesarias para su propia movilización (Friedman *et al.*, 1982). pLAFR1 puede ser movilizado en *trans* por plásmidos portadores de funciones *tra* específicas de RK2 pero no puede ser movilizado desde el fondo genético de un rizobio en ausencia de un plásmido movilizador adecuado.

Para la identificación de las 11 regiones *mob* se utilizaron 3 poblaciones merodiploides deficientes en recombinación homóloga (*RecA*⁻) derivadas de las cepas GR4KL, GRM6LR y GM10KR de *S. meliloti*. Tales poblaciones merodiploides, donde cada célula individual era teóricamente portadora de un cósmido híbrido, fueron obtenidas tras la movilización del banco de genes desde *E. coli* HB101 mediante cruces triparentales usando pRK2013 como plásmido movilizador. Posteriormente fueron seleccionados los clones positivos, susceptibles de portar un *oriT*, mediante cruces biparentales usando como donador en masa cada una de las poblaciones merodiploides generadas y como receptores la cepa GRM8SR de *S. meliloti* o HB101 de *E. coli* (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Teóricamente, la transferencia de la resistencia a tetraciclina, codificada por pLAFR1, a la cepa receptora ocurriría sólo en caso de que los cósmidos portadores de ADN de *S. meliloti* contuviesen un origen de transferencia funcional y que su transferencia a la célula receptora fuese mediada por las funciones del propio ADN adyacente al *oriT* (*cis*), o bien por la funciones aportadas desde el genoma de la célula donadora (*trans*).

Esta estrategia permitió identificar y caracterizar posteriormente la región *mob* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 en un fragmento de 2,5 Kb que incluye un *oriT* con un posible sitio *nic* y una organización característica de regiones *mob* plasmídicas (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Asimismo se pudo identificar el cósmido pRmOR65 portador de la región *mob* del plásmido críptico pRmeGR4b, plásmido que puede ser movilizado en *trans* por el pRmeGR4a (Herrera-Cervera *et al.*, 1996). Las 9 regiones *mob* restantes fueron asignadas a distintos replicones de *S. meliloti* GR4: 4 al pSymA, 1 al pSymB y 4 más de supuesta localización cromosómica.

1.2. Análisis de 9 de las regiones identificadas como *mob* en el genoma de *S. meliloti*

Del análisis de las 9 hipotéticas regiones *mob* restantes resultó que todos y cada uno de estos cósmidos presentaba una frecuencia de transferencia sorprendentemente alta (10^{-2}), con independencia del fondo genético empleado como donador, tanto desde *S. meliloti* como desde *E. coli*. Estos resultados sugerían que los 9 cósmidos no sólo parecían portar un *oriT* (carácter *Mob*⁺), sino que además parecían poseer todas las funciones *tra* necesarias para su transferencia autoconjugativa (*Tra*⁺). Contrariamente, los resultados obtenidos con los cósmidos que portaban la región *mob* de los plásmidos crípticos pRmeGR4a y pRmeGR4b, indicaban que su transferencia era dependiente de la presencia

Capítulo I

del plásmido pRmeGR4a en la célula donadora, mostrando por tanto un fenotipo Mob⁺ Tra⁻.

La inédita capacidad autotransferente de estos 9 cósmidos exigió una caracterización más detallada. Los intentos de generación de construcciones Mob⁺ Tra⁻, tras el subclonaje de fragmentos de cada uno de estos 9 cósmidos en el vector pJB3Tc19, fueron infructuosos. Por ello, se llevó a cabo una delección total del inserto de ADN que portaba cada uno de estos cósmidos mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* y una posterior religación, regenerando así el vector cosmídico pLAFR1. De esta manera se aseguró la completa ausencia de ADN de *S. meliloti* en las construcciones resultantes.

Tras la completa eliminación del inserto de dichos cósmidos, se pudo observar que los 9 cósmidos vacíos aún mantenían su capacidad de autotransferencia (10^{-2}), tanto desde *E. coli* como desde *S. meliloti*. Estos resultados sugerían la falta de influencia del ADN de *S. meliloti* que portaban estos cósmidos sobre la capacidad de transferencia conjugativa mostrada por estas construcciones. La ausencia de transferencia conjugativa del cósmido pLAFR1 original, sobre el que se construyó la genoteca, en ensayos de conjugación paralelos a los realizados con los cósmidos “vacíos” *EcoRI*, mostraba claramente la existencia de una modificación de los cósmidos Mob⁺ Tra⁺ durante el proceso de su identificación. A lo largo del proceso de identificación de las regiones *mob*, estos 9 cósmidos debieron sufrir una modificación en su secuencia que implicaría la ganancia de las funciones de transferencia conjugativa necesarias para su conversión en vectores Mob⁺Tra⁺, con independencia del ADN de *S. meliloti* que portaban.

Para tratar de esclarecer las modificaciones sufridas por estos cósmidos, se realizó un perfil de restricción con la enzima *Eco47III* de los vectores de los 11 cósmidos identificados, del cósmido pLAFR1 original y del plásmido movilizador pRK2013.

Atendiendo a estos perfiles de restricción mostrados en la Figura 1.1, tan sólo el vector de los cósmidos pRmOR69 y pRmOR65 presentó un perfil idéntico al del cósmido pLAFR1 original, mientras que el resto compartía entre 4 y 10 fragmentos *Eco47III* con el plásmido pRK2013, mostrando un origen quimérico causado probablemente por una recombinación entre pLAFR1 y el plásmido movilizador pRK2013. La incorporación de una determinada región del plásmido movilizador pRK2013 por parte del vector pLAFR1, la cual no implicó la adquisición del gen de resistencia a la Km (los transconjugantes

portadores de las construcciones eran Km sensibles), habría supuesto la ganancia de las funciones de transferencia necesarias para la conversión de estos vectores en autotransferentes (paso de Mob⁺Tra⁻ a Mob⁺Tra⁺). Es conveniente hacer constar que para la construcción de las poblaciones merodiploides se usaron cepas deficientes en recombinación (RecA⁻), por lo que los fenómenos de recombinación ocurridos entre los cósmidos y el plásmido movilizador pRK2013 debieron haber sido eventos de recombinación independientes a esta proteína. La incorporación de las funciones de transferencia del pRK2013 por parte de 9 de los cósmidos identificados como susceptibles de portar un *oriT*, consolida tan solo a los cósmidos pRmOR69 y pRmOR65 como portadores de auténticas regiones *mob* de *S. meliloti* GR4 de entre los 11 identificados por Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998).

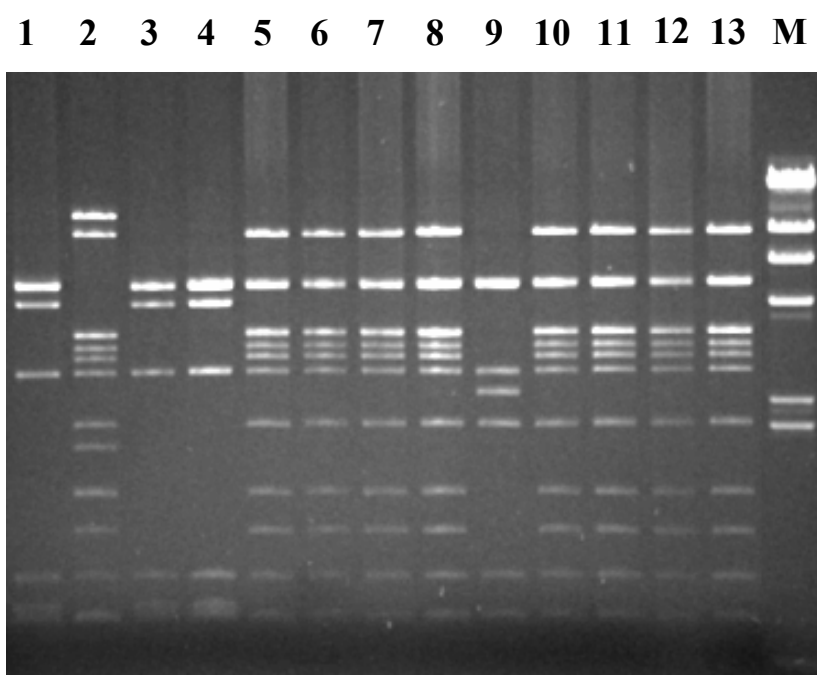


FIGURA 1.1. Perfiles de restricción *Eco47III* del plásmido pRK2013, el vector pLAFR1 y de los cósmidos tipo pLAFR1 derivados de teóricos clones Mob⁺ identificados en *S. meliloti*.

Carriles: 1, pLAFR1 original; 2, pRK2013; 3-13 vectores vacíos obtenidos mediante una delección completa del ADN de *S. meliloti*: pRmOR65 (3), pRmOR69 (4), pRmOR106 (5), pRmOR1012 (6), pRmOR1026 (7), pRmOR1030 (8), pRmOR1033 (9), pRmOR1034 (10), pRmOR1035 (11), pRmOR1041 (12), pRmOR1042 (13); M, Marcador de peso molecular.

1.3. Modificación de la estrategia de identificación de regiones *mob*

Con objeto de minimizar en la medida de lo posible la aparición de falsos positivos durante el proceso de identificación de regiones *mob*, se llevó a cabo una sencilla modificación consistente en la eliminación del uso de plásmidos movilizadores, con el fin de evitar posibles recombinaciones con el cósmido pLAFR1 en el proceso de transferencia de la genoteca. Siempre que fue posible se evitó el uso de sistema de movilización “*en trans*”, utilizando la electroporación para la transferencia del banco de genes a los rizobios para la obtención de las poblaciones merodiploides.

1.4. Identificación de regiones *mob* en el genoma de *S. meliloti* GR4

En el caso de *S. meliloti* la baja eficiencia de electroporación obligó al uso de cepas movilizadoras tales como la cepa *E. coli* S17.1 para la construcción de las poblaciones merodiploides. La cepa S17.1 posee las funciones de RK2 integradas en el cromosoma, lo cual, a priori, minimiza las posibilidades de recombinación con el pLAFR1. El ADN del banco de genes fue extraído de HB101 e introducido mediante electroporación en la cepa S17.1. Posteriormente, utilizando todo el conjunto de electrotransformantes de S17.1 como donadores, se introdujo el banco de genes de *S. meliloti* en las cepas GR4KLR y GRM10KR (pRmeGR4a⁻), mediante conjugaciones biparentales, para la obtención de las poblaciones merodiploides. Cuando la población merodiploide de GRM10KR, obtenida de la manera anteriormente descrita, fue utilizada como donador en conjugaciones biparentales con las cepas GRM8SR de *S. meliloti* y HB101 de *E. coli*, no se obtuvieron transconjugantes, a diferencia de los 10^{-5} transconjugantes por receptor obtenidos por Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando se utilizó la población merodiploide de GR4KL como donador, sí aparecieron transconjugantes a una frecuencia similar a la descrita por Herrera-Cervera y colaboradores (10^{-7}) (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Tras el análisis de restricción *EcoRI* de 24 transconjugantes de este último cruce se pudo determinar que todos ellos correspondían al cósmido pRmOR69, que ya había sido identificado como portador de la región *mob* del plásmido pRmeGR4a (Herrera-Cervera *et al.*, 1998).

1.5. Identificación de regiones *mob* en el genoma de *R. etli*

La optimización de la estrategia de identificación de regiones *mob* fue puesta de nuevo a prueba con la cepa CFN42 de *R. etli*. Esta cepa se caracteriza por la capacidad de establecer relaciones simbióticas con judía. Posee un genoma muy fragmentado compuesto por 1 cromosoma y 6 plásmidos cuyo tamaño varía entre las 180 Kb y las 630 Kb. Hasta la fecha, tan sólo el plásmido pRetCFN42a ha demostrado ser autoconjugativo (Tun-Garrido *et al.*, 2003), estando la transferencia del plásmido simbiótico de la cepa (pRetCFN42d) directamente vinculado a aquél. A pesar de que se ha puesto de manifiesto la existencia de una hipotética región *mob* en el plásmido simbiótico pRetCFN42d mediante el análisis *in silico* de su secuencia (González *et al.*, 2003), el mecanismo de transferencia del plásmido pRetCFN42d en condiciones de laboratorio depende de fenómenos de cointegración con el plásmido pRetCFN42a (Brom *et al.*, 2000; Tun-Garrido *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo la identificación de las regiones *mob* se contó con un banco de genes de la cepa tipo CFN42 construida en pLAFR1 (Huerta-Zepeda *et al.*, 1997). Se construyeron dos poblaciones merodiploides diferentes, mediante la introducción directa del banco de genes, por electroporación, en las cepas CE3 (derivada Sm^f de la cepa tipo CFN42) y CFNX182 (derivada de CE3 curada del plásmido pRetCFN42a). Cada una de estas poblaciones merodiploides fueron utilizadas como donadores en masa en sendas conjugaciones con las cepas receptoras CFNX218Rif de *R. etli* y HB101 de *E. coli*. Cuando se usó la población merodiploide derivada de la cepa CFNX182 como donadora, aparecieron transconjugates HB101 a una frecuencia de $1,6 \times 10^{-4}$ (Tabla 1.1). El análisis del perfil de restricción *EcoRI* de los cósmidos en 20 de estos transconjugantes, reveló un patrón semejante, con al menos 5 fragmentos *EcoRI* en común, indicando que todos ellos contenían una misma región de ADN. Además, uno de estos cósmidos (pC13b) mostró un perfil de restricción *EcoRI* idéntico al cósmido pC-13, el cual ha sido recientemente caracterizado por Tun-Garrido y colaboradores (Tun-Garrido *et al.*, 2003) y que contiene el *oriT* y la región de transferencia del plásmido críptico pRetCFN42a de *R. etli*. Para mantener la nomenclatura expuesta por Tun-Garrido y colaboradores (Tun-Garrido *et al.*, 2003) se han nombrado a los dos tipos de cósmidos solapantes encontrados como pC13a y pC13b (Figura 1.2). El aislamiento de la región *mob* del plásmido pRetCFN42a demostraba la validez de la estrategia para la identificación de regiones *mob* empleada en *R. etli*.

Capítulo I

Cuando se empleó la cepa CFNX218Rif de *R. etli* como receptora, aparecieron transconjugantes Tc^r a una frecuencia de 10⁻⁵ (Tabla 1.1). De igual forma, 32 transconjugantes fueron seleccionados al azar y el ADN de los correspondientes cósmidos

TABLA 1.1. Identificación de cósmidos Mob⁺ en la genoteca de *R. etli* CFN42.

Donador merodiploide	Receptor	Frecuencia de transconjugantes	No. de transconjugantes analizados	Tipo de cósmido (ocurrencia)	No. de cósmidos no solapantes
CFNX182	<i>E. coli</i> HB101	1.6 x 10 ⁻⁴	20	pC13a (18) pC13b (2)	1
	<i>R. etli</i> CFNX218Rif	3 x 10 ⁻⁵	32	pC13a (11) pC13b (12) pC13c (4) pRe182R1b (2) pRe182R1c (1) pRe182R1d (2)	2
CE3	<i>E. coli</i> HB101	7.68 x 10 ⁻⁶	32	pC13a (18) pC13b (5) pC13c (3) pRe182R1a (4) pRe182R1b (2)	2
	<i>R. etli</i> CFNX218Rif	1.17 x 10 ⁻⁴	20	pC13a (18) pRe182R1a (1) pRe182R1d (1)	2

fue aislado y digerido con *EcoRI*. 27 de ellos mostraron un perfil de restricción similar a alguno de los miembros de la familia pC13 descrita anteriormente (pC13a, pC13b), o a un nuevo miembro solapante denominado pC13c (Figura 1.2), mientras que los 5 cósmidos restantes analizados (nombrados como pRe182R1b, pRe182R1c, pRe182R1d) presentaban perfiles *EcoRI* solapantes entre ellos, pero a la vez totalmente diferentes a la familia pC13, lo que sugería que estábamos ante una nueva región *mob* (Figura 1.3).

M 1 2 3

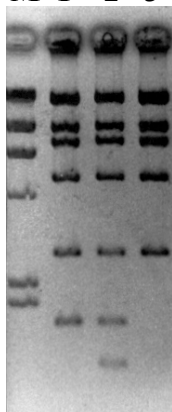


FIGURA 1.2. Perfil de restricción *EcoRI* de los cósmidos Mob⁺ pertenecientes a la familia pC13.

Carril 1, pC13a; 2, pC13b; 3, pC13c; M, marcador de peso molecular.

Mediante el empleo de la población merodiploide derivada de CE3 como donador, se obtuvieron transconjugantes Tc^r a frecuencias de $7,68 \times 10^{-6}$ y $1,17 \times 10^{-4}$ en conjugaciones con las cepas receptoras HB101 y CFNX218Rif, respectivamente. Todos los cósmidos analizados de entre los transconjugantes de ambas conjugaciones pertenecían a una de las dos familias descritas con anterioridad (Tabla 1.1), con la aparición en este caso de un nuevo miembro de la familia pRe182R1, al que se denominó como pRe182R1a (Figura 1.3). Puesto que el *oriT* del plásmido pRetCFN42a presente en la familia de cósmidos pC13, ya había sido descrito por Tun-Garrido y colaboradores (Tun-Garrido *et al.*, 2003), se realizó la caracterización de la región de ADN clonada en la familia de cósmidos pRe182R1.

M 1 2 3 4 M

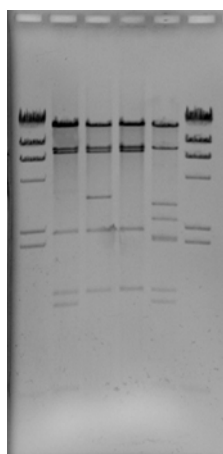


FIGURA 1.3. Perfil de restricción *EcoRI* de los cósmidos Mob^+ pertenecientes a la familia pRe182R1.

Carril 1, pRe182R1a; 2, pRe182R1b; 3, pRe182R1c; 4, pRe182R1d; M, marcador de peso molecular.

1.6. Localización genómica y caracterización de la familia de cósmidos pRe182R1 de *R. etli*

Con el fin de determinar a cuál de los replicones presentes en *R. etli* CE3 pertenecía la región de ADN clonada en la familia de cósmidos pRe182R1, se realizaron hibridaciones frente a ADN genómico (Figura 1.4A) o frente a plásmidos intactos (Figura 1.4B) de diferentes cepas derivadas de *R. etli* CE3, cada una de ellas caracterizada por la ausencia de uno o más plásmidos. Como sonda se utilizó el cósmido pRe182R1a. Como puede observarse en las figuras 1.4A y 1.4B, la ausencia de señal de hibridación solamente en aquellas cepas que carecían del plásmido pRetCFN42d, indicaron inequívocamente que la familia de cósmidos pRe182R1 contenía ADN perteneciente al plásmido pRetCFN42d, plásmido simbiótico de la cepa CFN42 de *R. etli*.

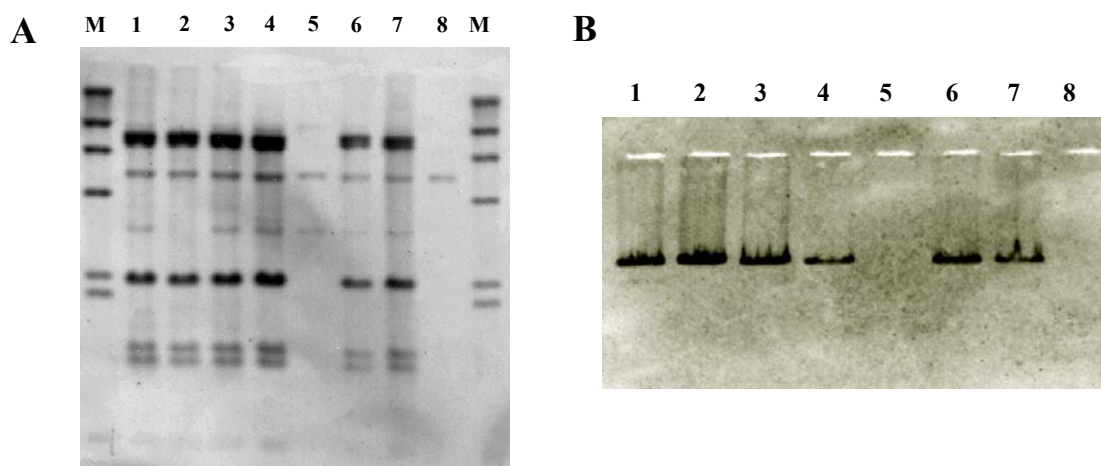


FIGURA 1.4. Localización del ADN clonado en el cósmido pRe182R1a en el genoma de *R. etli*.

Hibridación del cósmido pRe182R1a usado como sonda, frente a distintos ADN genómicos digeridos con *Eco*RI (A) y frente diferentes perfiles de plásmidos intactos (B). Carriles: M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1, *R. etli* CE3 (Cepa silvestre); 2, *R. etli* CFNX182 (pRetCFN42a⁻); 3, *R. etli* CFNX183 (pRetCFN42b⁻); 4, *R. etli* CFNX184 (pRetCFN42c⁻); 5, *R. etli* CFNX89 (pRetCFN42d⁻); 6 *R. etli* CFNX185 (pRetCFN42e^Δ); 7, *R. etli* CFNX186 (pRetCFN42f⁻); 8, *R. etli* CFNX218 (pRetCFN42a⁻, b⁻, c⁻, d⁻, e^Δ y f⁻).

Para confirmar la capacidad de transferencia de la familia pRe182R1 y cuantificarla, los diferentes miembros de la familia fueron introducidos individualmente en la cepa CFNX182. Las correspondientes cepas generadas se conjugaron de forma independiente con la cepa receptora CFNX218Rif. Todos y cada uno de los miembros de esta familia de cósmidos mostraron frecuencias similares de transferencia (10^{-4} transconjugantes por célula receptora). Puesto que la familia pRe182R1 había sido aislada de transconjugantes provenientes de la cepa CFNX182, que portaba el plásmido simbiótico, se evaluó si la presencia de éste en la célula donadora era necesaria para la transferencia conjugativa de los mencionados cósmidos. Para ello se eligió de nuevo al cósmido pRe182R1a como representante de la familia, y se introdujo mediante electroporación en la cepa CFNX2001 (curada de los plásmidos pRetCFN42a y pRetCFN42d). La cepa resultante se usó como donadora en conjugaciones con la cepa CFNX218Rif de *R. etli* o con la cepa HB101 de *E. coli* como receptoras. La ausencia total de transconjugantes indicó que los cósmidos de esta familia presentaban un fenotipo Mob⁺Tra⁻, siendo necesaria la presencia del plásmido pRetCFN42d para su movilización. Para determinar qué región del plásmido pRetCFN42d se encontraba presente en los distintos cósmidos de la familia pRe182R1, se subclonaron varios de los fragmentos *Eco*RI presentes en pRe182R1a en el vector pBluescript y se secuenciaron sus extremos. La

comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia del plásmido pRetCFN42d (González *et al.*, 2003) permitió establecer el contenido exacto de ADN de cada uno de los miembros de la familia de cósmidos pRe182R1 (Figura 1.5). Todos ellos eran portadores de los operones *traA* y *traCDG*, entre ambos operones se situaría el hipotético *oriT* del plásmido simbiótico pRetCFN42d (González *et al.*, 2003).

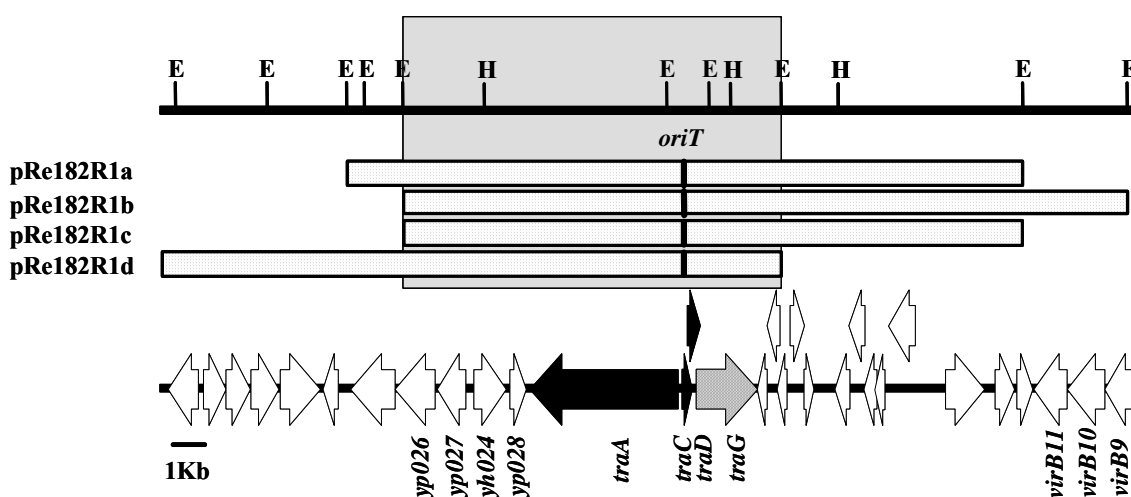


FIGURA 1.5 Mapa físico de la familia de cósmidos pRe182R1 en relación a la región *mob* del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*.

Las flechas indican la dirección de transcripción de los distintos genes de la región *mob* del plásmido pRetCFN42d según González y colaboradores (González *et al.*, 2003). La hipotética región Dtr (DNA transfer and replication) está marcada en negro. El gen que codifica la hipotética proteína acopladora se indica con una flecha a rayas. El ADN clonado en cada miembro de la familia pReOR182R1 se indica mediante barras punteadas. Bajo fondo gris se establece la región común a todos los cósmidos de la familia pReOR182R1. E, *EcoRI*; H, *HindIII*; *OriT*, origen de transferencia.

1.7. Transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pRetCFN42d de *R. etli*

La identificación de la familia de cósmidos pRe182R1 sugería que la región *mob* del plásmido pRetCFN42d es funcional y que requiere de la presencia del plásmido del que proviene, en la célula donadora, para su movilización. Sin embargo la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli* ha sido descrita como un fenómeno dependiente de la cointegración con el plásmido pRetCFN42a (Tun-Garrido *et al.*, 2003; Brom *et al.*, 2000), no habiéndose detectado en ningún caso autotransferencia de aquél. Esta aparente paradoja podría ser explicada si el hecho de poseer su propia región *mob* en multicopia en la célula donadora implicara un cambio en la regulación de la transferencia del plásmido pRetCFN42d. En tal caso, la presencia de la región *mob* en multicopia, además de promover su propia movilización (cósmido pRe182R1a) también promovería la

Capítulo I

autotransferencia del plásmido pRetCFN42d. Para comprobar esta posibilidad se introdujo el cósmido pRe182R1a en la cepa CFNX667, cepa que posee el plásmido pRetCFN42d marcado con un casete de Km y está curada del plásmido pRetCFN42a. Esta cepa se conjugó con las cepas CFNX218Rif de *R. etli* y GMI9023 de *A. tumefaciens* como receptoras (Tabla 1.2). Los resultados demostraron que efectivamente la presencia del cósmido pRe182R1a promovía la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*. Todos los cósmidos pertenecientes a la familia pRe182R1a, identificados y descritos en este capítulo, presentaban un fragmento solapante común a todos ellos (Figura 1.5). Parecía probable, por lo tanto que fuese este fragmento el responsable de la promoción de la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d. Para comprobar si esta región era necesaria para la transferencia del pSym de *R. etli*, se llevó a cabo una deleción *HindIII* en el cósmido pRe182R1a que eliminaba la mayor parte de la región solapante de la familia de cósmidos pRe182R1 (Figura 1.5). Este cósmido delecionado (pRe182R1a Δ *HindIII*) se introdujo por electroporación en la cepa CFNX667. La cepa originada se conjugó con las cepas receptoras CFNX218Rif de *R. etli* y GMI9023 de *A. tumefaciens* y se determinó la frecuencia de transferencia del plásmido simbiótico. Dicha transferencia fue indetectable, demostrando claramente que la presencia en multicopia del ADN contenido en los fragmentos *HindIII* delecionados del cósmido pRe182R1a eran necesarios para promover la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico en las condiciones ensayadas.

TABLA 1.2. Transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*.

Donador	Frecuencia de transferencia por receptor ^a	
	<i>A. tumefaciens</i> GMI9023	<i>R. etli</i> CFNX218Rif
CFNX667 (p42d::Tn5)	n.d.	n.d.
CFNX667 (pReOR182R1a)	1.38x10 ⁻⁵	2.56x10 ⁻³
CFNX667 (pReOR182R1a Δ <i>HindIII</i>)	n.d.	n.d.

Frecuencias de transferencia del plásmido pReCFN42d promovidas por la presencia de su región *mob* en multicopia (fragmento *HindIII* 7,7Kb).^a n.d., Transferencia <10⁻⁸. Las frecuencias indicadas son el resultado de la media de al menos dos experimentos.

1.8. La sobre-expresión del gen *yp028* promueve la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*

Puesto que el fragmento que está presente en todos los miembros de la familia de cósmidos pRe182R1 era necesario para la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* en condiciones de laboratorio (ver Tabla 1.2), parecía lógico pensar que el efecto promotor de la transferencia se debía a uno o varios genes contenidos en este fragmento. Como primera aproximación, se realizó una construcción que llevaba clonado el fragmento *HindIII* de 7,7 Kb del cósmido pRe182R1a en el vector pJB3Tc19 (pJBdp1, Figura 1.6), realizándose posteriormente diversos subclonajes de diferentes regiones del mismo (Figura 1.6), introduciéndose todas ellas de forma independiente en la cepa de *R. etli* CFNX667 para evaluar su efecto sobre la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d (Tabla 1.3).

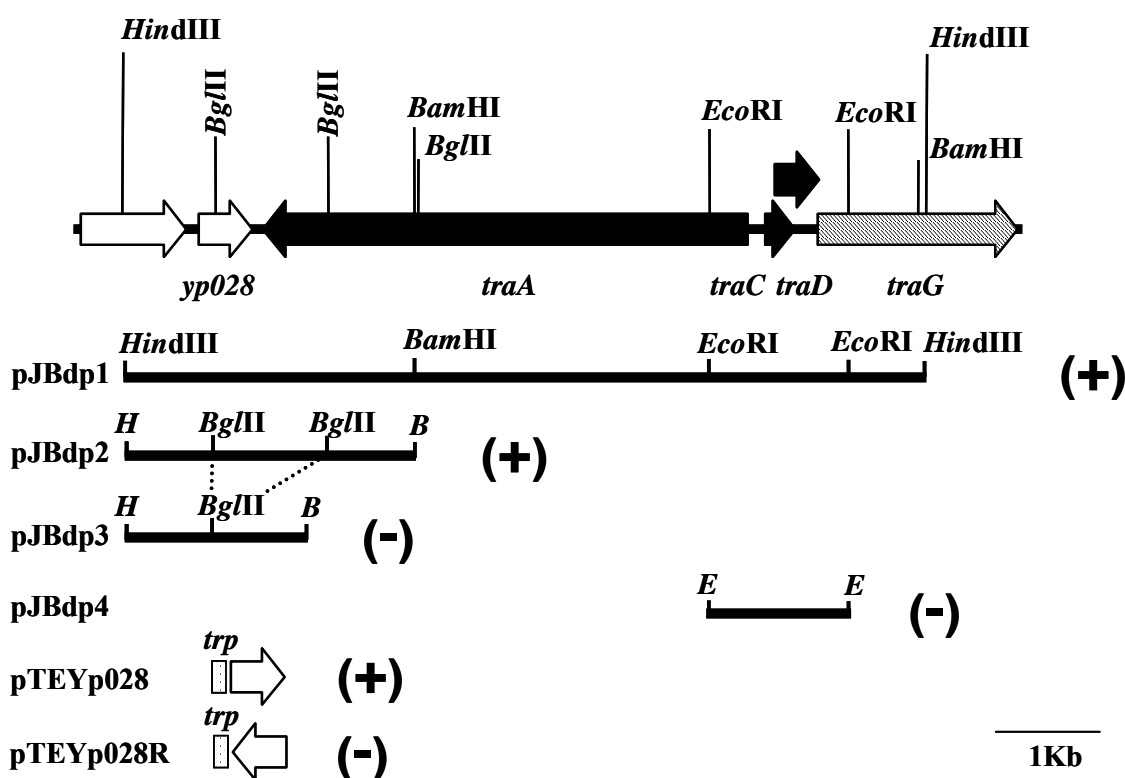


FIGURA 1.6. Efecto de diferentes zonas de la región *mob* sobre la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d.

Efecto de la presencia en multicopia de distintos fragmentos de la región *mob* del plásmido simbiótico en la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d. Los símbolos (+) y (-) indican dicho efecto desde la cepa CFNX667 de *R. etli*.

Capítulo I

La frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d promovida por la construcción pJBdp1, indicaba que el fragmento *Hind*III de 7,7 Kb del cósmido pRe182R1a era suficiente además de necesario para la promoción de la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli* (Tabla 1.3).

TABLA 1.3. Frecuencias de transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pRetCFN42d de *R. etli*.

<i>Donador</i>	<i>Frecuencia de transferencia del p42d^a</i>
CFNX667 (pJBdp1)	2.3×10^{-5}
CFNX667 (pJBdp2)	1.36×10^{-5}
CFNX667 (pJBdp3)	n.d.
CFNX667 (pJBdp4)	n.d.
CFNX667 (pTE)	n.d.
CFNX667 (pTEYp028)	2.63×10^{-5}
CFNX195 (pTEYp028)	1.8×10^{-5}
CFNX667 (pTEYp028R)	n.d.
CFNX195ΔtraAGm (pTEYp028)	n.d.

Frecuencias de transferencia del plásmido pRetCFN42d desde la cepa CFNX667 de *R. etli* con diferentes construcciones a la cepa receptora *A. tumefaciens* GMI9023. ^an.d., Transferencia $<10^{-8}$. Las frecuencias indicadas son el resultado de la media de tres experimentos.

Igualmente, se determinó la influencia ejercida por la construcción pJBdp4, la cual contenía el hipotético *oriT*, obteniendo un resultado negativo en la promoción de la transferencia del pRetCFN42d (Tabla 1.3). La transferencia conjugativa del plásmido simbiótico desde la cepa que poseía la construcción pJBdp2 promovía la transferencia del plásmido pRetCFN42d (Tabla 1.3), sin embargo, dicha transferencia quedaba totalmente anulada cuando se delecionaba el fragmento *Bgl*III (pJBdp3) que contenía gran parte del gen *yp028* (Tabla 1.3). Estos datos indicaban la posible implicación de este gen en el efecto de promoción de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico. Para profundizar en los mecanismos de acción de *yp028* sobre la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico se decidió abordar el estudio de la sobre-expresión de dicho gen. Para ello se amplificó la región codificante del gen *yp028* (ver Anexo 1.1) y se clonó en el vector pTE3 quedando dicho ORF bajo el promotor heterólogo del tritófano (*trp*) presente en el vector, permitiendo así una expresión relativamente fuerte del mismo. Igualmente se realizó la clonación de este fragmento amplificado con el ORF en sentido contrario al promotor del *trp*, como control negativo (ver Anexo 1.1). Tras la introducción

de ambas construcciones en la cepa CFNX667 de *R. etli*, sólo con la copia orientada del gen (pTEYp028) se pudo detectar la transferencia del plásmido pRetCFN42d a una frecuencia de 1.8×10^{-5} hasta la cepa de *A. tumefaciens* GMI9023 utilizada como receptora (Tabla 1.3). Igualmente, el análisis del perfil plasmídico de varios transconjugantes de *R. etli* CFNX218Rif aparecidos con la utilización de la cepa CFNX195(pTEYp028) de *R. etli* como donadora, permitió determinar que todos los transconjugantes habían adquirido el plásmido pRetCFN42d (Figura 1.7, carril 2 y 3). Además algunos de ellos (2 de 6 transconjugantes analizados) habían adquirido también el plásmido pRetCFN42b (Figura 1.7, carril 2). Ya han sido descritos cointegrados entre los plásmidos pRetCFN42d y pRetCFN42b con anterioridad (Brom *et al.*, 1991) por lo que estos dos plásmidos podrían haberse transferido como un cointegrado pRetCFN42d-pRetCFN42b que posteriormente se habría resuelto en la célula receptora.

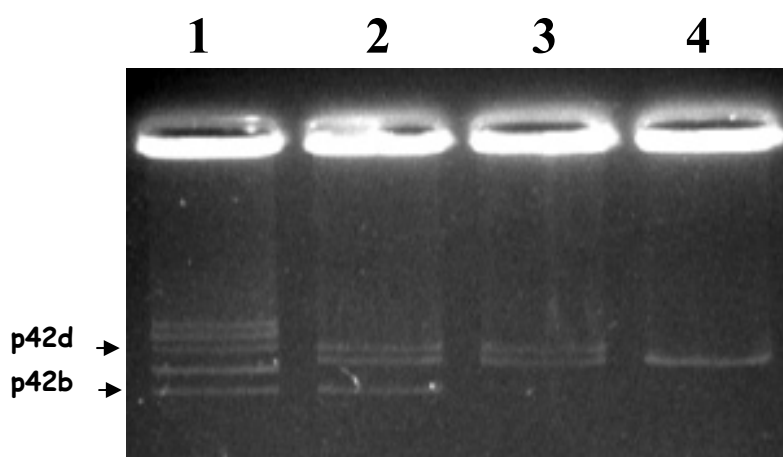


FIGURA 1.7. Evidencia de la transferencia de pRetCFN42d mediada por el gen *yp028*.

Se muestra el perfil plasmídico de los dos tipos diferentes de transconjugantes aparecidos en la conjugación CFNX195 (pTEYp028) x CFNX218Rif. Carriles: 1, CFNX195 (pTEYp028); 2, transcojugantes tipo I; 3, transconjugantes tipo II; 4, CFNX218Rif. Las bandas correspondientes a los plásmidos pRetCFN42d (p42d) y pRetCFN42b (p42b) están indicadas.

Estos resultados parecían indicar que la presencia de múltiples copias de *yp028*, y como consecuencia una elevación de la expresión del mismo, se traduciría en la transferencia conjugativa del pSym pRetCFN42d a una relativamente alta frecuencia en condiciones de laboratorio. Este gen se localiza adyacente al gen *traA* y codifica una proteína de 171 aminoácidos que no presenta homologías de secuencia con proteínas de

Capítulo I

función conocida descritas en los bancos de datos. Yp028 presenta cierta homología en secuencia (menos de 30% de identidad y 47% de similitud) con dos ORFs de función desconocida, el SMA0974 (1235562) del plásmido simbiótico pSymA de *S. meliloti* y el Atu5116 (1136889) del plásmido críptico pAtC58 de *A. tumefaciens*.

1.9. La transferencia del plásmido pRetCFN42d mediada por el gen *yp028* es dependiente de *traA*

Para determinar si la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*, mediada por el gen *yp028*, dependía de la actuación de los genes de transferencia *tra*, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida sobre el gen *traA*, que codifica la hipotética relaxasa del plásmido pRetCFN42d. La mutación del gen *traA* se realizó mediante una delección y posterior inserción de un casete de gentamicina (Gm; ver Anexo 1.2 y Figura 1.8). La inserción del gen de resistencia a Gm fue comprobada mediante la correspondiente hibridación de ADN total de los hipotéticos mutantes digeridos con *Bam*HI frente a una sonda específica (plásmido pGemTΔTraAGm linearizado con *Bam*HI y marcado con digoxigenina; Figura 1.9). Una vez construido el mutante CFNX195ΔTraAGm, éste y la cepa parental CFNX195 fueron electroporadas con la construcción pTEYp028. Las cepas generadas se conjugaron de forma independiente con la cepa *A. tumefaciens* GMI9023 (Tabla 1.2) seleccionándose para transferencia del plásmido pRetCFN42d. No se detectó ningún transconjugante proveniente de la conjugación de la cepa mutante, lo que indicaba la necesidad de una copia intacta del gen *traA* para la transferencia del plásmido pRetCFN42d dependiente de *yp028*.

1.10. La sobre-expresión del gen *yp028* eleva la expresión de los genes *tra* del plásmido simbiótico de *R. etli*

Según los resultados obtenidos, el efecto promotor de la transferencia mediado por la sobre-expresión del gen *yp028* es dependiente de la existencia de una copia intacta del gen *traA*, hipotética relaxasa del plásmido simbiótico. Para comprobar si este efecto promotor de *yp028* sobre la transferencia del pRetCFN42d está mediado por un incremento en la expresión de las hipotéticas funciones de transferencia implicadas en el procesamiento del plásmido, se llevó a cabo un estudio de expresión del gen *traA* y del hipotético operón *traCDG*, mediante fusiones al gen reportero *gus* (las construcciones y

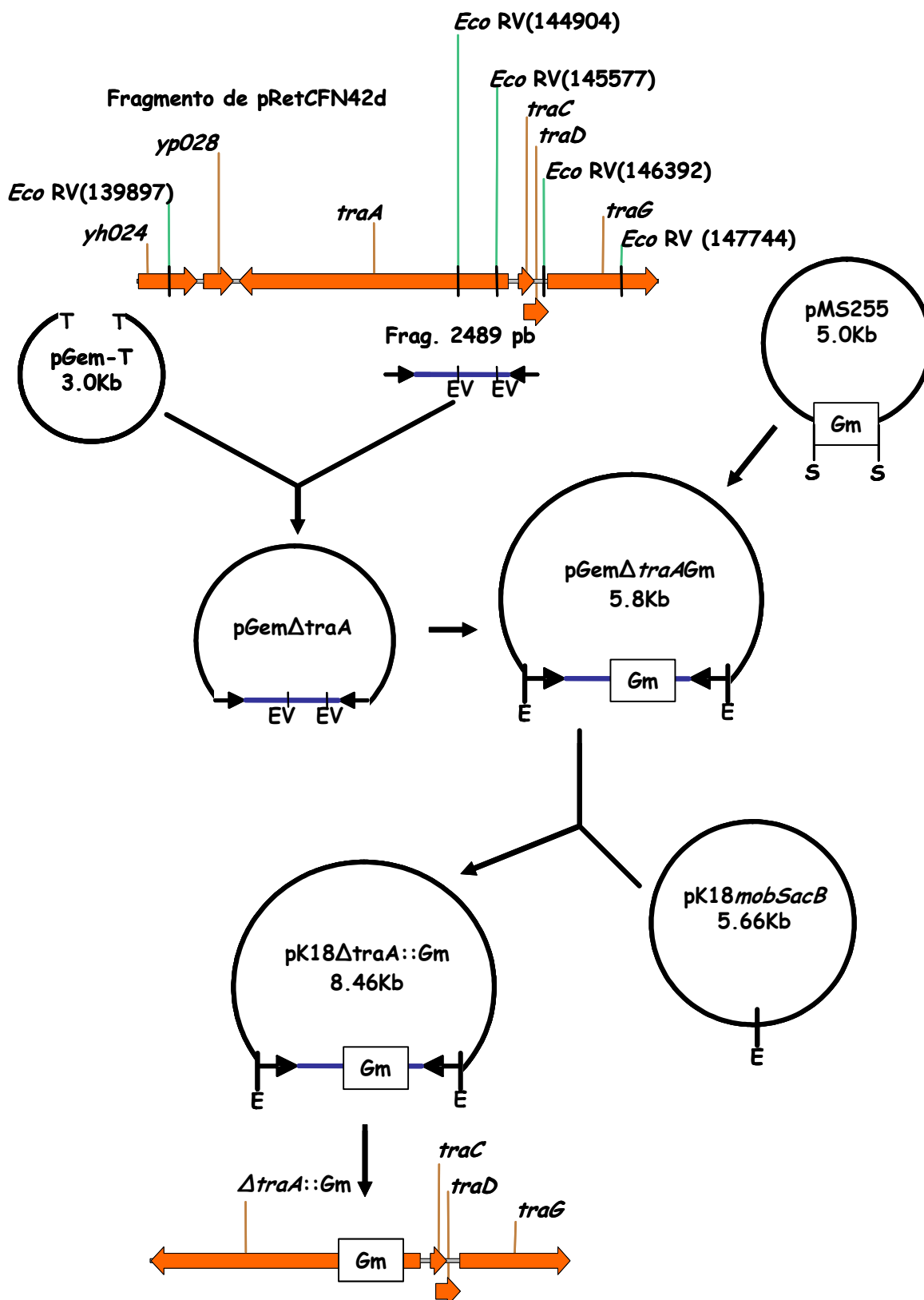


FIGURA 1.8. Construcción del mutante *traA* del plásmido pRetCFN42d.
 Construcción del mutante en la hipotética relaxasa *traA* del plásmido simbiótico de *R. etli* mediante deleción e inserción del gen de resistencia Gm. E, *EcoRI*; S, *SmaI*; EV, *EcoRV*.

Capítulo I

los ensayos de expresión fueron realizados por el grupo de Susana Brom (CIFN, Cuernavaca, México). Estos estudios de expresión se realizaron bajo un fondo genético silvestre (CFNX667) en comparación con este mismo fondo genético donde se establecía la sobre-expresión del gen *yp028* mediante la presencia de la construcción pTEYp028.

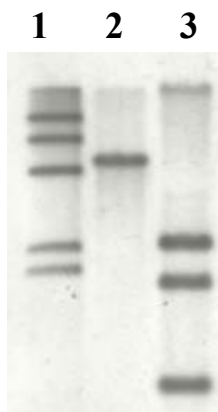


FIGURA 1.9. Comprobación de la cepa mutante CFNX195Δ *traA*::Gm.

Hibridación de la sonda pGemTΔ*traA*::Gm frente al ADN total digerido *Bam*HI de la cepa silvestre y mutante; carriles: 1, marcador molecular marcado con digoxigenina; 2, CFNX195; 3, CFNX195Δ*traA*::Gm.

Los resultados mostrados en la Figura 1.10 reflejan una clara inducción de los genes *tra* en presencia del gen *yp028* sobre-expresado. Los genes *traA* y *traCDG* parecen no estar expresándose en el fondo silvestre, sufriendo un incremento de expresión entre 4 y 5 veces cuando el gen *yp028* está sobre-expresado.

Estos resultados, de nuevo, apuntan a la intervención de las funciones *tra* (*traA* y *traCDG*) descritas en el pRetCFN42d (González *et al.*, 2003) en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* mediada por la sobre-expresión del gen *yp028*.

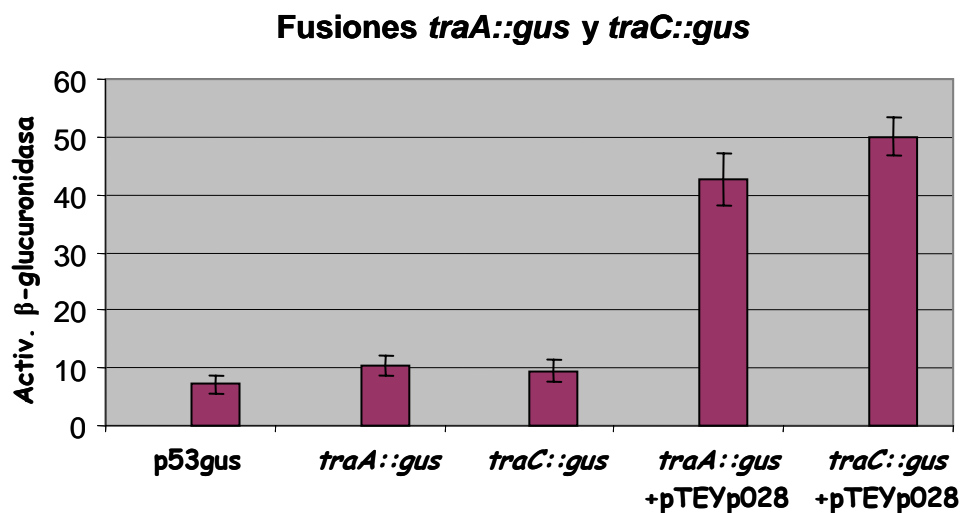


FIGURA 1.10. Efecto del gen *yp028* en la expresión de las funciones *tra* del pRetCFN42d.

La expresión se indica como actividad β-glucuronidasa específica (nmol/min/mg) del gen reportero *gus* en la cepa CFNX667 de *R. etli*. Se indica así mismo el error estándar de cada fusión generado tras tres repeticiones.

1.11. Discusión

El origen de transferencia (*oriT* o *mob*) de un elemento autoconjugativo o movilizable, es la única función en *cis* requerida para su transferencia conjugativa (Lanka y Wilkins, 1995). Su presencia en un plásmido o transposón normalmente indica la capacidad autoconjugativa o movilizable de dicho elemento. Dentro del orden Rhizobiales es frecuente la presencia de plásmidos, simbióticos o no, así como la presencia de islas cromosómicas con capacidad conjugativa (Mercado-Blanco y Toro, 1996; Galibert *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2002). El reciente conocimiento de las secuencias de algunos de sus genomas indican que muchos de los plásmidos e islas cromosómicas de este grupo, sino todos, contienen un hipotético *oriT*, incluyendo los plásmidos e islas simbióticas que portan los genes necesarios para la asociación simbiótica con la planta hospedadora (Galibert *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2002; Freiberg *et al.*, 1997). En otros casos, la presencia de *oriTs* se ha mostrado mediante amplificaciones por PCR de regiones intergénicas *traC-traA* conservadas (Turner *et al.*, 2002). Sin embargo, no se han desarrollado estudios que determinen si las regiones *mob* identificadas son realmente funcionales en el fondo genético donde se encuentran. Los datos de secuencia de estos plásmidos e islas simbióticas indican que poseen genes que codifican sistemas de transferencia conjugativa completos, lo que sugiere su capacidad de movilización o autotransferencia. Por otro lado existen evidencias de que se han producido eventos de transferencia genética horizontal de algunos de estos elementos bajo condiciones naturales (Sullivan y Ronson, 1998; Vlassak y Vanderleyden, 1997). A pesar de estos datos, hay pocas evidencias de plásmidos simbióticos que muestren una alta frecuencia conjugativa en condiciones de laboratorio (Danino *et al.*, 2003; He *et al.*, 2003). Se abre, por lo tanto, la posibilidad de la existencia de sistemas reguladores de la transferencia conjugativa de estos plásmidos. Estas especulaciones permiten el diseño de experimentos encaminados a la determinación de la funcionalidad de los orígenes de transferencia presentes en un determinado plásmido.

Basados en estas premisas, Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998) diseñaron una estrategia para el aislamiento de secuencias de ADN capaces de ser reconocidas como *oriT*. Se identificaron 11 regiones capaces de ser movilizadas en el genoma de *S. meliloti* GR4. Entre ellas estaban las regiones *mob* de los 2 plásmidos

Capítulo I

crípticos de esta cepa, pRmeGR4a y pRmeGR4b. Sin embargo, tal y como muestran los resultados aquí presentados, las 9 regiones *mob* restantes, que putativamente contenían un *oriT*, han resultado ser falsos positivos de la estrategia de identificación. La movilización y selección de estos 9 cósmidos se debió supuestamente a un evento de recombinación, independiente de la proteína RecA, entre el vector utilizado para la construcción de la librería de genes empleada (pLAFR1) y el plásmido movilizador utilizado para transferir esta librería (pRK2013) desde *E. coli* a *S. meliloti*, durante la construcción de las poblaciones merodiploides. Este evento de recombinación generó construcciones quiméricas Mob⁺ Tra⁺ (característica del plásmido pRK2013) capaces de replicarse en el fondo genético de *S. meliloti* (característica del pLAFR1). La posterior presión de selección empleada en la estrategia para la identificación de regiones Mob⁺ convirtió un evento probablemente raro en un fenómeno seleccionable y seleccionado con bastante frecuencia.

Para evitar en la medida de lo posible la aparición de falsos positivos sin restar eficacia a la identificación de regiones *mob* de una bacteria determinada, se realizó una simple modificación en la forma de obtención de las poblaciones merodiploides. Esta modificación consistió en la eliminación del empleo de plásmidos movilizadores en la transferencia de la librería genómica, durante la generación de poblaciones merodiploides donadoras.

Cuando se realizaron nuevamente cruces biparentales con las nuevas poblaciones merodiploides de *S. meliloti* GR4KL y GRM10KR donadoras, no sólo no se encontraron falsos positivos entre los cósmidos Mob⁺ aislados, sino que además se volvió a aislar e identificar de nuevo la región *mob* del plásmido pRmeGR4a descrita anteriormente por Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Estos resultados ponen de manifiesto que, por un lado, la estrategia de identificación de regiones que contienen un *oriT* es válida, y por otro, que la modificación realizada a dicha estrategia evita eficazmente la aparición de falsos positivos. La no identificación de cósmidos portadores de la región *mob* del plásmido pRmeGR4b, anteriormente identificada por Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998), puede explicarse por el hecho de que la transferencia conjugativa de este plásmido presenta una frecuencia 100 veces más baja que pRmeGR4a, lo que hace poco probable su aparición entre 24 transconjugantes analizados, además de que dicho cósmido se identificó mediante el empleo de una población

merodiploide derivada de la cepa GRM6LR, que no ha sido utilizada en los nuevos experimentos. A tenor de estos resultados, y para la realización de futuros experimentos de identificación de regiones *mob*, no se recomienda el uso de plásmidos movilizadores cuando se requiera obtener poblaciones merodiploides de una determinada bacteria. De manera similar a la utilizada para la identificación de *oriTs* en *S. meliloti*, se procedió en el caso de *R. etli*. En esta bacteria, además de la ausencia total de falsos positivos entre los transconjugantes analizados, se pudo poner de manifiesto la existencia de al menos dos regiones *mob* funcionales. Una de ellas corresponde a la previamente caracterizada región *mob* del plásmido críptico pRetCFN42a (Tun-Garrido *et al.*, 2003), lo que afianza la credibilidad de la estrategia. La segunda ha sido identificada como la región *mob* del plásmido pRetCFN42d, portadora de la región *traA-traCDG* en donde hipotéticamente se localiza el *oriT* del plásmido simbiótico de *R. etli* (González *et al.*, 2003). Este resultado no deja de ser sorprendente ya que, aunque la transferencia del plásmido pRetCFN42d ha sido detectada con anterioridad en condiciones de laboratorio, dicha transferencia se mostró siempre dependiente de un fenómeno de cointegración (falsa movilización) con el plásmido críptico pRetCFN42a (Brom *et al.*, 2000; Tun-Garrido *et al.*, 2003). Sin embargo, varios miembros de la familia de cósmidos pRe182R1 se aislaron a partir de cruces donde el donador carecía del plásmido críptico pRetCFN42a (ver Tabla 1.1), lo que demuestra una independencia total de este plásmido para su transferencia conjugativa. Por otro lado la total dependencia de la presencia del plásmido pRetCFN42d en el donador para la transferencia de los cósmidos de la familia pRe182R1 identificados sugiere que las funciones de transferencia necesarias para la movilización de estos cósmidos están siendo aportadas *in trans* por el propio plásmido simbiótico pRetCFN42d. Esta aparente paradoja se resolvió con la identificación de *yp028*, un pequeño gen adyacente a *traA*, hipotética relaxasa del plásmido pRetCFN42d. Cuando *yp028* está en multicopia es capaz de promover la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*. Se establece así, la primera evidencia de la capacidad autoconjugativa de este plásmido simbiótico en condiciones de laboratorio. Por otra parte, el papel del gen *yp028* en la promoción de la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli* ha demostrado estar vinculado a las funciones básicas de transferencia de dicho plásmido, como es la indispensable presencia de una copia intacta del gen *traA*, hipotética relaxasa del pRetCFN42d. Igualmente, mediante el uso de fusiones al gen reportero *gus* se ha podido comprobar que la sobreexpresión del gen *yp028*

Capítulo I

incrementa la expresión de los genes *tra*, que supuestamente intervienen en el procesamiento del ADN en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*, como son los operones de la región Dtr *traA* y *traCDG*. Estas evidencias nos han llevado a 4 conclusiones: (i) la región *mob* del plásmido simbiótico de *R. etli*, previamente publicada (González *et al.*, 2003), es funcional. (ii) la transferencia conjugativa de este plásmido simbiótico puede ser promovida por la sobre-expresión del gen *yp028* bajo condiciones de laboratorio. (iii) la sobreexpresión del gen *yp028* eleva la expresión de genes relacionados con la transferencia. (iv) todo parece indicar que el plásmido simbiótico porta todas las funciones necesarias para su transferencia conjugativa, y por tanto puede ser considerado como un plásmido auto-conjugativo.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la presencia de genes relacionados con la transferencia en megaplásmidos e islas simbióticas, probablemente indican que estos elementos presentan capacidades conjugativas. El hecho de que estos elementos muestren frecuencias de transferencia muy bajas o indetectables en condiciones de laboratorio, por tanto, no contradice su potencial conjugativo en condiciones naturales, sino que probablemente apuntan a la existencia de una regulación estricta de los sistemas de transferencia.

Basados en estos resultados, se planteó la hipótesis de que las funciones de transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli* están reprimidas bajo condiciones de laboratorio y que la transferencia de este megaplásmido puede ser activada mediante una señal del ambiente que directa o indirectamente implicaría una subida en la expresión del gen *yp028*, lo que conllevaría una elevación de la expresión de los genes de transferencia del plásmido y su transferencia conjugativa en presencia del receptor adecuado.

ANEXO CAPÍTULO I

Anexo 1.1. Construcción del clon pTEyp028 y pTEyp028R

Para la construcción de este clon se amplificó la región codificante del gen *yp028* mediante el uso de los cebadores específicos

Yp028F GGATCCTCCATCACGTTGAGCAGC

Yp028R GGATCCGGCATCAACCTCTGAGAC

correspondientes a las posiciones 140473-140490 y 141118-141135 respectivamente de la secuencia del plásmido pRetCFN42d (González *et al.*, 2003). El fragmento amplificado se clonó en el vector pTE3 gracias a las dianas *Bam*HI (subrayadas en la secuencia) de los extremos de los cebadores empleados en la reacción de PCR, generando las construcciones pTEYp028R y pTEYp028 según la orientación del inserto con respecto al vector. En esta última construcción (pTEYp028) el ORF del gen *yp028* queda bajo control del promotor *trp* de *E. coli*. En pTEYp028R, la zona codificante de *yp028* queda clonada en orientación inversa. En esta construcción *yp028* carece de promotor conocido.

Anexo 1.2. Construcción del mutante relaxasa (CFNX195ΔtraA::Gm) del plásmido pRetCFN42d

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa CE3 de *R. etli*, un fragmento de 2489 pb (desde la posición 143900 hasta 146388 del plásmido, numero de acceso NC_004041; (González *et al.*, 2003)) mediante el uso de los cebadores

RetraAΔF TCGTTGGTGTGGGCGAGCA

RetraAΔR GCGCAGCCGCCGATGCTCA

El producto de PCR generado se clonó en el vector pGem[®]-T Easy cloning vector (pGemΔtraA). Posteriormente un fragmento *Eco*RV de 673 pb interno al gen *traA* fue eliminado y sustituido por un gen de resistencia a Gm proveniente de la digestión *Sma*I del plásmido pMS255. La construcción resultante se denominó pGemΔtraAGm. El fragmento *Eco*RI de esta construcción fue escindido y clonado en el vector pK18*mobSacB* dando como resultado el plásmido pK18ΔtraA::Gm. Dicha construcción fue introducida en la

Anexo Capítulo I

cepa movilizadora S17.1 y transferida a la cepa CFNX195 de *R. etli* mediante un cruce biparental. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar el intercambio alélico y, por tanto, la obtención de mutantes mediante la selección de transconjugantes resistentes a Gm y sensibles a sacarosa, como dobles recombinantes portadores de la mutación en el gen *traA*.

CAPÍTULO II

2. REGULACIÓN DE LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS pRetCFN42d DE *R. etli* Y pSymA DE *S. meliloti*

2.1. Regulación de la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*

La publicación de la secuencia del plásmido simbiótico pRetCFN42d (González *et al.*, 2003) ha permitido determinar que se trata de una molécula circular de 371.255 pb con un contenido en GC del 58,1%. Posee un sistema de replicación de tipo *repABC* (Ramírez-Romero *et al.*, 1997) y contiene 359 secuencias codificantes, de las cuales el 63% poseen una función asignada. Los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, que intervienen directamente en la asociación simbiótica, se encuentran agrupados en una región de 125 Kb y se han encontrado numerosos elementos (hasta un 10% del total de secuencia) relacionados con secuencias de inserción (ERIS) pertenecientes a 12 familias diferentes. Se ha podido establecer también la existencia de varios hipotéticos genes *tra*: los operones *traA* y *traCDG* (Figura 2.1) entre los que se situaría un hipotético *oriT*. El gen *traA* (4659 pb) codifica la hipotética relaxasa del plásmido (1552 aminoácidos), que al igual que el producto de los genes *traC* y *traD* formaría parte del relaxosoma.

La proteína TraG, hipotética proteína acopladora del plásmido, conectaría el complejo ADN-relaxasa con el T4SS, hipotéticamente codificado por un operón tipo *virB*, implicado en el transporte a la célula receptora. Además existe un gen *traI* truncado localizado cerca de los genes implicados en la replicación del plásmido. Puesto que hasta el momento no se ha podido detectar la autotransferencia de este plásmido en condiciones de laboratorio, se ha sugerido que estos genes podrían ser elementos residuales, indicativos de la pérdida de la capacidad autoconjugativa del megaplásmido (González *et al.*, 2003). El análisis *in silico* ha permitido también poner de manifiesto la existencia de distintos tipos de sistemas transportadores los cuales suponen hasta el 10% de los marcos abiertos de lectura (ORFs) totales del plásmido. Entre ellos se incluyen transportadores de azúcares tipo ABC, un sistema de secreción tipo III (T3SS) y un T4SS. Los T4SS consisten en un canal de membrana especializado en el transporte de ADN y proteínas. En el caso de bacterias patógenas el T4SS está involucrado en el transporte de factores de virulencia hasta las células eucariotas (Christie y Vogel, 2000). En otros casos el T4SS está relacionado con la transferencia del complejo ADN-proteína que ocurre en los procesos de conjugación (ver introducción). El T4SS presente en el plásmido pRetCFN42d está

Capítulo II

codificado por genes *virB* similares a los genes *virB* de *A. tumefaciens*. Este tipo de sistema de secreción ha sido descrito en varias α -proteobacterias tanto patógenas como simbióticas de plantas (Christie, 2001) y comprende desde el gen *virB1* hasta *virB11*, todos ellos presentes en este plásmido simbiótico (Figura 2.2).

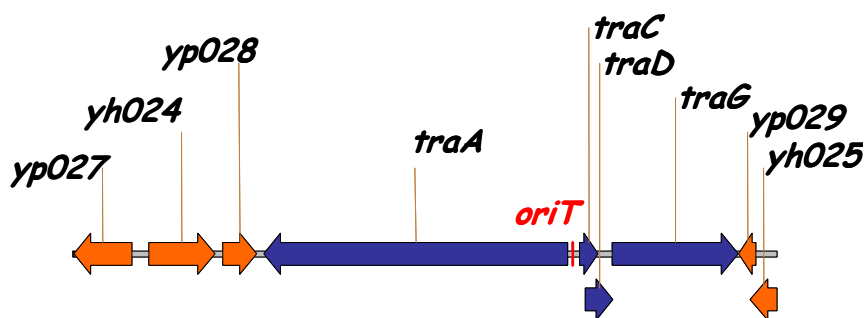


FIGURA 2.1. Región *mob* del plásmido pRetCFN42d. Región comprendida entre los nucleótidos 138228 y 148971 del plásmido simbiótico de *R. etli* donde se localizan los genes con función Dtr (DNA transfer and replication) y el hipotético *oriT* (González *et al.*,2003)

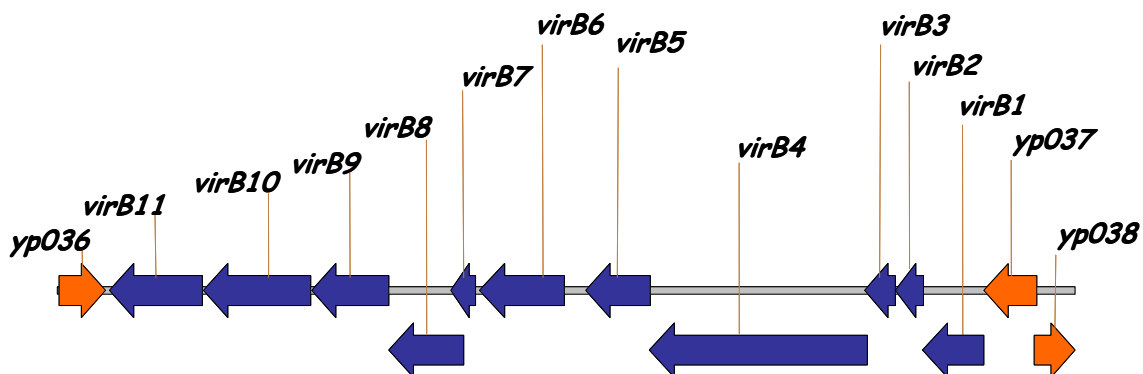


FIGURA 2.2. Teórica región T4SS del plásmido pRetCFN42d. Región comprendida entre los nucleótidos 156395 y 167555 del plásmido simbiótico de *R. etli* donde se localizan los genes *virB* (González *et al.*,2003).

2.1.1. Estrategia de identificación de genes implicados en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*

La demostración de la capacidad autoconjugativa y el descubrimiento del gen *yp028* como elemento implicado en la regulación de la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*, permitió especular sobre la existencia de un sistema regulador de la transferencia conjugativa de este plásmido. Los sistemas de regulación de la transferencia conjugativa de distintos plásmidos conocidos, suelen ser sistemas relativamente complejos

donde actúan diferentes elementos o efectores (Strohmaier *et al.*, 1998; Zatyka y Thomas, 1998). Esta idea llevó a desarrollar una estrategia para la identificación de distintos elementos reguladores que podían estar desempeñando un papel, junto con el gen *yp028*, en la regulación de la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*. Concretamente, se intentó poner de manifiesto la existencia de un represor de la transferencia conjugativa de este plásmido.

Para ello se realizó una mutagénesis al azar con Tn5 en la cepa CFNX182 (curada del plásmido pRetCFN42a) de *R. etli* mediante el empleo del vector suicida pSUP2021. Por movilización desde la cepa S17.1 de *E. coli*, se consiguieron 2.2×10^6 transposantes mediante la realización de 10 cruces paralelos, donde cada uno de los transconjugantes supuestamente portaba una inserción única del transposón Tn5 (Figura 2.3). La eliminación de las células de *E. coli* se llevó a cabo mediante el crecimiento sucesivo de los transconjugantes en un medio mínimo donde *E. coli* S17.1 no puede crecer (ver Material y Métodos). La ausencia de células de *E. coli* se comprobó tras la siembra de 100µl de la mezcla de transposantes en Endo-Agar (medio para el crecimiento exclusivo de coliformes, en el que *R. etli* no puede crecer; ver Material y Métodos).

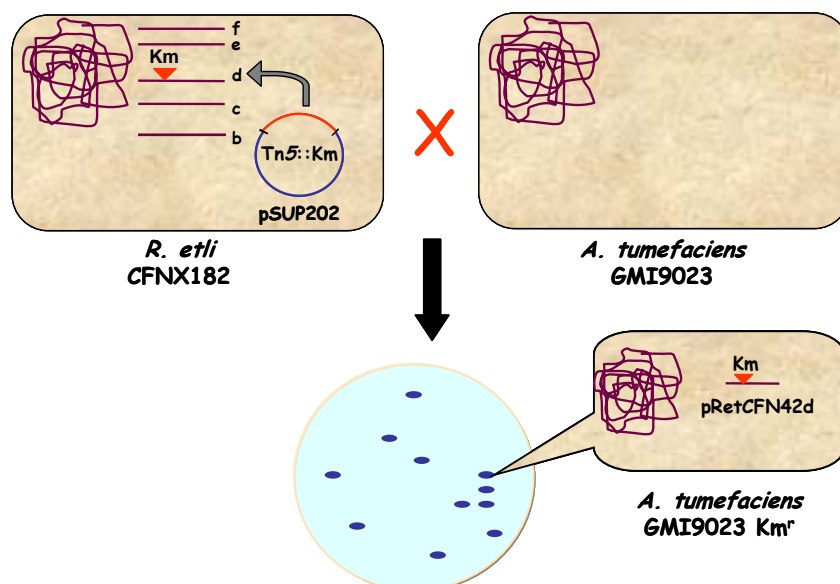


FIGURA 2.3. Estrategia de identificación de genes implicados en regulación de la transferencia conjugativa en el genoma de CFNX182 de *R. etli*.

La población de transposantes Tn5 de CFNX182 fue conjugada en masa con la cepa receptora GMI9023 de *A. tumefaciens*. La aparición de transconjugantes resistentes a Km implica probablemente la adquisición de un plásmido.

Capítulo II

La selección de las inserciones de interés se llevó a cabo mediante el uso del total de los transposantes CFNX182 Km^R como donadores en masa en conjugación con la cepa de *A. tumefaciens* GMI9023 (Figura 2.3). Mediante este proceso se esperaba seleccionar entre las diferentes inserciones del genoma de CFNX182 aquellas que hubieran provocado la desregulación de la transferencia de alguno de los plásmidos de la cepa. Debido a que la mayoría de elementos reguladores de la transferencia conjugativa de un determinado plásmido suelen localizarse dentro del mismo, era previsible que los transconjugantes de *A. tumefaciens* GMI9023 Km^R obtenidos hubieran adquirido el plásmido pRetCFN42d o alguno de los otros plásmidos que posee la cepa CFNX182 de *R. etli* (pRetCFN42b, c, e, o f; Figura 2.3). La frecuencia de aparición de transconjugantes de *A. tumefaciens* GMI9023 Km^R fue de 4×10^{-8} . El análisis de 11 de estos transconjugantes se realizó mediante digestiones *Eco*RI y *Bam*HI de su ADN genómico y posterior hibridación frente al transposón Tn5 usado como sonda. La hibridación de los ADN digeridos con *Eco*RI reveló que todas ellas poseían una única copia del transposón Tn5 insertado en el genoma (Figura 2.4). Además, el análisis de la hibridación de los ADN digeridos con *Bam*HI indicó la presencia de 5 tipos diferentes de inserciones (Figura 2.4). Estas inserciones fueron denominadas como: Tn5.1, Tn5.2, Tn5.6, Tn5.8, Tn5.13 (correspondientes a los carriles 2, 3, 7, 9, 12 de la Figura 2.4, respectivamente). De éstas, las inserciones Tn5.1 y Tn5.2, aunque con un perfil *Bam*HI diferente, presentaron un perfil *Eco*RI similar, lo que sugería la cercanía de ambas inserciones de Tn5.

Una vez confirmada la presencia del transposón Tn5 en los transconjugantes de *A. tumefaciens*, se procedió a realizarles un perfil plasmídico, para determinar qué plásmido habían captado. Como puede observarse en la Figura 2.5 todos los transconjugantes de *A. tumefaciens* analizados parecían haber adquirido un plásmido de tamaño similar al pRetCFN42d de la cepa CFNX182.

2.1.2. Localización de genes implicados en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*

Tras la confirmación de la presencia de plásmido pRetCFN42d (Figura 2.5), el cual supuestamente contenía la inserción de un transposón (Figura 2.4), los diferentes *A. tumefaciens* transconjugantes se conjugaron individualmente con la cepa CFNX218Spc. Con ello se pretendía comprobar: (i) si la resistencia a Km codificada por el transposón que

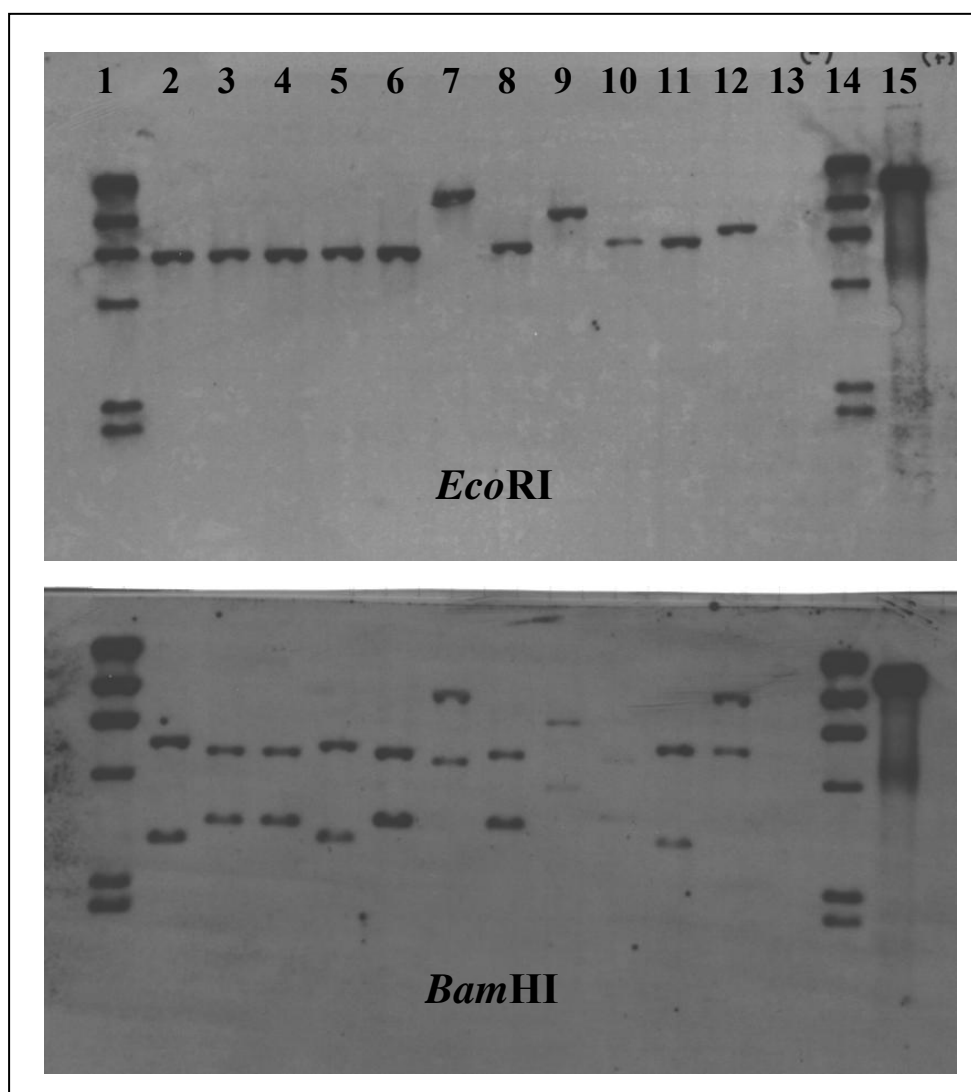


FIGURA 2.4. Hibridación de ADN total digerido con *EcoRI* y *BamHI* de 11 transconjugantes *A. tumefaciens* Km^r, usando como sonda el plásmido pUP2021. Carriles: 1 y 14, marcadores moleculares marcados con digoxigenina; 2 a 13, ADN digerido procedente de transconjugantes *A. tumefaciens* portadores de una inserción del transposón Tn5; 13, ADN digerido de *A. tumefaciens* GMI9023; ADN del plásmido pSUP2021 linealizado.

hipotéticamente se localizaba en el plásmido pRetCFN42d tenía efectivamente un efecto promotor de la transferencia conjugativa de este plásmido, (ii) comprobar si esta transferencia dependía de algún otro plásmido de la cepa CFNX182 de *R. etli*, (iii) determinar las frecuencias conjugativas de los plásmidos mutantes derivados de pRetCFN42d. Los resultados indicaban que todas las inserciones promovían la autotransferencia del plásmido pRetCFN42d (Tabla 2.1). Las frecuencias observadas

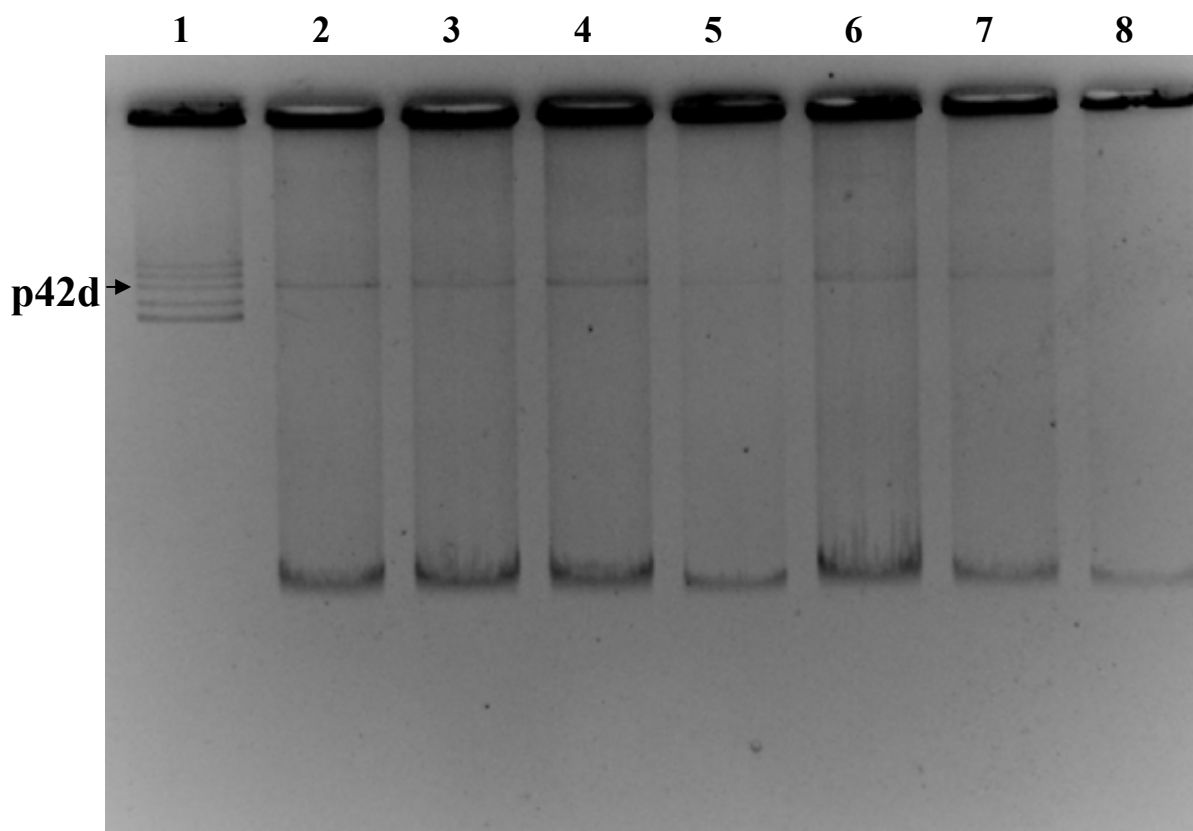


Figura 2.5. Perfil plasmídico de los diferentes transconjugantes seleccionados.

Perfil plasmídico de los diferentes *A. tumefaciens* Km^r analizados. Carriles: 1, *R. etli* CE3; 2, *A. tumefaciens* con el plásmido pRetCFN42d; 3 a 7 *A. tumefaciens* transconjugantes Km resistentes con las inserciones Tn5.1 (3), Tn5.2 (4), Tn5.6 (5), Tn5.8 (6), Tn5.13(7); 8, *A. tumefaciens* GMI9023 utilizado como receptor. La banda correspondiente al plásmido pRetCFN42d (p42d) se indica con una flecha.

agrupaban, sin embargo, a las 5 inserciones en 3 grupos diferentes: las inserciones Tn5.1 y Tn5.2 presentaban una frecuencia similar y relativamente alta (10^{-3}), la inserción Tn5.6 presentaba una frecuencia aproximadamente 9 veces más baja que las dos anteriores, y las inserciones Tn5.8 y Tn5.13 presentaban frecuencias similares entre ellas pero hasta 1000 veces inferiores con respecto a la inserción Tn5.6 (Tabla 2.1).

TABLA 2.1. Frecuencias de transferencia de los mutantes Tn5 del plásmido pRetCFN42d usando la cepa *A. tumefaciens* GMI9023 como donadora.

<i>A. tumefaciens</i> GMI9023	Frecuencias ^a
pRetCFN42d::Tn5.1	$1,48 \times 10^{-3}$
pRetCFN42d::Tn5.2	$1,94 \times 10^{-3}$
pRetCFN42d::Tn5.6	$3,14 \times 10^{-4}$
pRetCFN42d::Tn5.8	$3,81 \times 10^{-7}$
pRetCFN42d::Tn5.13	$2,13 \times 10^{-7}$

^a Se ha utilizado la cepa CFNX218Spc de *R. etli* como receptora. Las frecuencias indicadas son la media de al menos dos experimentos.

Una vez obtenidos los transconjugantes CFNX218Spc Km^R con cada uno de los mutantes derivados del plásmido pRetCFN42d, se seleccionó una colonia representativa de cada una de las diferentes inserciones y se conjugaron nuevamente con la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* como receptora. Las frecuencias de transferencia de los plásmidos pRetCFN42d con las diferentes inserciones, se mostraron bastante similares en el fondo genético de *R. etli* CFNX218Spc en relación al de *A. tumefaciens*, con una bajada en la frecuencia de las cepas portadoras de las inserciones Tn5.6, Tn5.8 y Tn5.13 (Tabla 2.2), pero en cualquier caso, manteniendo todas ellas su capacidad autoconjugativa.

TABLA 2.2. Frecuencias de transferencia de los mutantes Tn5 del plásmido pRetCFN42d usando la cepa *R. etli* CFNX218Spc como donadora.

<i>R. etli</i> CFNX218Spc	Frecuencias ^a
pRetCFN42d::Tn5.1	3,75 x 10 ⁻³
pRetCFN42d::Tn5.2	3,28 x 10 ⁻³
pRetCFN42d::Tn5.6	1,04 x 10 ⁻⁵
pRetCFN42d::Tn5.8	1,39 x 10 ⁻⁸
pRetCFN42d::Tn5.13	1,53 x 10 ⁻⁸

^a Se ha utilizado la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* como receptora. Las frecuencias indicadas son la media de al menos dos experimentos.

Una vez cuantificadas las frecuencias de transferencia de las diferentes inserciones se llevó a cabo la caracterización de cada una de ellas. Para ello se procedió a la extracción del ADN genómico de cada una de las 5 cepas de *A. tumefaciens* portadoras de cada plásmido mutante pRetCFN42d::Tn5. Posteriormente se digirieron los ADN genómicos con la enzima *EcoRI* y se ligaron con el vector pUC18 linearizado con la misma enzima. Tras transformar la cepa de *E. coli* DH5 α con las diferentes ligaciones se seleccionaron los transformantes portadores del plásmido pUC18 con los fragmentos *EcoRI* que contenían las diferentes inserciones, mediante selección en LB suplementado con Ap, Km y Xgal. Se verificó la presencia del Tn5 en cada uno de los clones obtenidos. Posteriormente, se subclonaron por separado ambos brazos del transposón Tn5 a partir de cada inserción, junto a la secuencia adyacente de ADN de *R. etli*, nuevamente en el vector pUC18. Se secuenció cada uno de ellos usando cebadores específicos de la secuencia del transpón Tn5 (cebadores específicos de las secuencias de inserción (IS) de los extremos del Tn5),

Capítulo II

determinándose así la localización exacta, dentro de la secuencia del plásmido pRetCFN42d (González *et al.*, 2003), de cada una de las mutaciones secuenciadas (Figura 2.6).

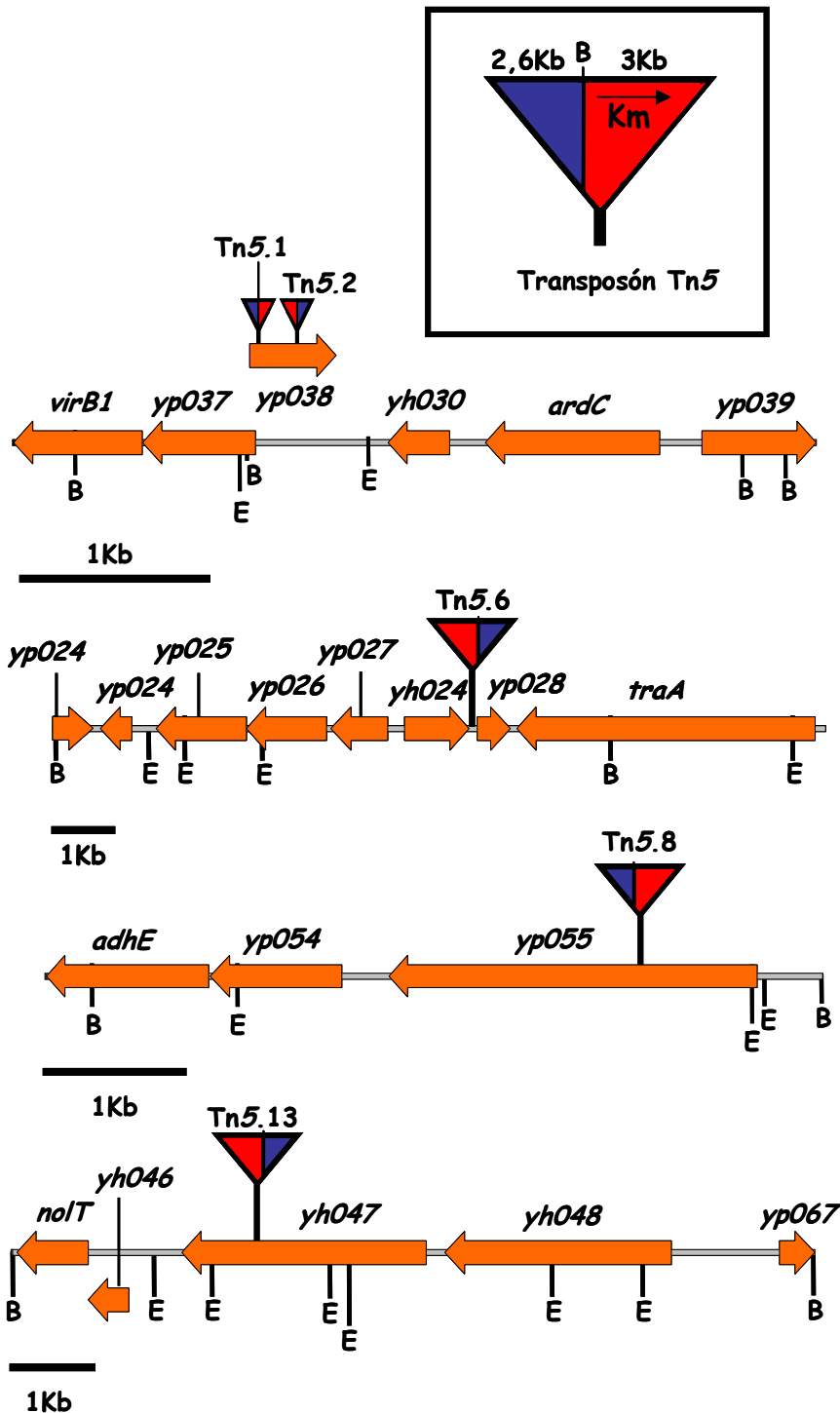


FIGURA 2.6. Localización de las diferentes inserciones de Tn5 identificadas en el plásmido pRetCFN42d

En la figura se muestran las diferentes inserciones del transposón Tn5 en el cual se indica en rojo el fragmento de 3,08 Kb que contiene el gen de resistencia a Km. E, *EcoRI*; B, *BamHI*.

Como muestra la Figura 2.6, las inserciones Tn5.1 y Tn5.2 se localizaron sobre el ORF *yp038*, separadas entre sí por 67 pb. El gen *yp038* (1005110) es de función desconocida, codifica una hipotética proteína de 149 aminoácidos y presenta genes homólogos situados en el plásmido simbiótico de *S. meliloti* pSymA (*Sma1323*, 1235757) y el plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens* (*Atu5160*, 1136933) con similitudes de entre el 70% y el 75%. En los tres plásmidos, este ORF tiene una localización similar adyacente a un operón *virB*. Dichos ORFs son de función desconocida, si bien el hipotético producto proteico presenta analogía estructural con la súper familia “winged helix DNA binding protein” las cuales tienen un dominio típico de unión a ADN. Esta súper familia incluye diversas familias de proteínas activadoras y represoras de la transcripción génica (Lai *et al.*, 1993).

La inserción Tn5.6, se localizó aguas arriba de la región codificante del gen *yp028* (1005089) (González *et al.*, 2003). Este gen, como se muestra en el apartado 1.8 de esta tesis, ha resultado estar implicado en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*, promoviendo su transferencia cuando se encuentra en multicopia en la célula donadora (Tabla 1.3). Esto sugiere la hipótesis de que la inserción Tn5.6 pueda estar provocando un incremento en la expresión del gen *yp028*, promoviendo de esta forma la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d.

La inserción Tn5.8 se localizó en el ORF *yp055*, gen de función desconocida que codifica una proteína de 852 aminoácidos con homología de secuencia y estructural con proteínas sensoras pertenecientes a sistemas reguladores de dos componentes. En concreto presenta un 76% de similitud con el gen *yp040* (1005113) que se localiza también en el plásmido pRetCFN42d, el cual se ha descrito como un hipotético regulador transcripcional que contiene un motivo sensor tipo “box/GGDEF”.

La inserción Tn5.13 se localizó en el ORF *yh047* (1005169) el cual codifica una hipotética proteína de 947 aminoácidos que no presenta homologías con ningún tipo de proteínas previamente descritas.

Tal y como indican los resultados de la Tabla 2.1 y 2.2, las inserciones de Tn5 que promovían la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* a una mayor frecuencia fueron aquellas que se localizaron en el gen *yp038* (Tn5.1 y Tn5.2), seguidas por la inserción Tn5.6, la cual, como sugieren los resultados presentados en el capítulo 1, podría inducir la transferencia conjugativa de este plásmido mediante un incremento de

Capítulo II

expresión del gen *yp028*. Por esto, centramos nuestro estudio en estos dos genes, *yp038* y *yp028*, a los cuales hemos denominado *rctA* y *rctB* respectivamente (de las siglas Regulation of Conjugal Transfer).

2.1.3. Caracterización de los mutantes en el gen *rctA* del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*

Para intentar alcanzar un mayor conocimiento del papel que desempeña el gen *rctA* en la regulación de la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*, se realizaron diversos estudios de complementación, funcionalidad y expresión de diversos genes supuestamente implicados en la transferencia de pRetCFN42d.

2.1.3.1. Complementación genética de los mutantes Tn5.1 y Tn5.2 del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*

Las frecuencias de transferencia (10^{-3}) de los plásmidos pRetCFN42d mutantes en el gen *rctA* ocasionados por las inserciones Tn5.1 y Tn5.2, sugerían que este gen podría actuar como un hipotético represor de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*. Se realizó un estudio de complementación de los mutantes pRetCFN42d Tn5.1 y Tn5.2 bajo los fondos genéticos de *R. etli* y *A. tumefaciens* para verificar el papel del gen *rctA* como regulador negativo de la transferencia. Para ello, se clonó el gen *rctA* del plásmido simbiótico de *R. etli* en el vector pJB3Tc19 y se introdujo en cada uno de los mutantes *rctA* del plásmido pRetCFN42d (Tn5.1 y Tn5.2; ver Anexo 2.1). Las cepas de *R. etli* complementadas se conjugaron con la cepa de *A. tumefaciens* GMI9023 como receptora, determinándose la frecuencia de transferencia del plásmido simbiótico desde la cepa complementada, así como desde el correspondiente control (Tabla 2.3). De forma paralela, las cepas de *A. tumefaciens* complementadas con el gen *rctA* en *trans*, así como el control, se conjugaron con la cepa CFNX218Spc de *R. etli* como receptora, determinándose igualmente la frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d (Tabla 2.4).

Las frecuencias mostradas en la Tabla 2.3 indican de manera clara que la complementación de las mutaciones de *rctA* en *trans*, reduce hasta frecuencias no detectables la transferencia del plásmido simbiótico, esto es, restaura la situación silvestre. Este resultado confirma al gen *rctA* como un represor de la transferencia conjugativa del

plásmido simbiótico de *R. etli*, indicando que la presencia de una o varias copias intactas de este gen en la célula donadora origina la ausencia de transferencia del megaplásmido en las condiciones ensayadas. Los resultados obtenidos indicaban, además, unas frecuencias de transferencia muy similares entre los mutantes Tn5.1 y Tn5.2 en ambos fondos genéticos, como era de esperar por la localización de estas 2 inserciones.

TABLA 2.3. Complementación genética de las mutaciones Tn5.1 y Tn5.2 del plásmido pRetCFN42d desde la cepa de *R. etli* CFNX218Spc complementadas con *rctA*, usando la cepa *A. tumefaciens* GMI9023 como receptora.

<i>CFNX218Spc</i>	Frecuencias ^a
p42d::Tn5.1	3,75 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.1 pJB3Tc19	1,03 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.1 pJBRerctA	n.d.
p42d::Tn5.2	3,28 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.2 pJB3Tc19	1,2 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.2 pJBRerctA	n.d.

^a las frecuencias indicadas son el resultado de la media de al menos dos experimentos. p42d, pRetCFN42d. n.d. transferencia no detectada.

Este efecto inhibitorio de la transferencia del plásmido simbiótico ocasionado por una copia de *rctA* en *trans*, sin embargo, no fue total cuando las complementaciones genéticas fueron realizadas en un fondo de *A. tumefaciens*. Como puede observarse en la Tabla 2.4, la transferencia de los plásmidos pRetCFN42d::Tn5.1 y Tn5.2 fue sólo unas 100 veces inferior a las frecuencias observadas en los controles.

TABLA 2.4. Frecuencias de transferencia del plásmido pRetCFN42d con las inserciones Tn5.1 y Tn5.2 desde la cepa *A. tumefaciens* GMI9023 complementadas con *rctA*, usando la cepa *R. etli* CFNX218Spc como receptora.

<i>GMI9023</i>	Frecuencias ^a
p42d::Tn5.1	1,48 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.1 pJB3Tc19	2,56 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.1 pJBRerctA	1,67 x 10 ⁻⁵
p42d::Tn5.2	1,94 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.2 pJB3Tc19	2,97 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.2 pJBRerctA	3,02 x 10 ⁻⁵

^a las frecuencias indicadas son el resultado de la media de al menos dos experimentos. p42d, pRetCFN42d. n.d. transferencia no detectada.

Capítulo II

Esta ausencia de complementación total podría ser debida a un problema de expresión del gen *rctA* en el fondo genético de *A. tumefaciens*. Para comprobar esta posibilidad se realizó una nueva construcción (pTERerctA) en la que el Orf del gen *rctA* se colocó bajo control del promotor del triptófano (*trp*), un promotor que se comporta como constitutivo y de fuerte expresión en los rizobios. La construcción pTERerctA y el vector vacío pTE3, como control, se introdujeron mediante electroporación en las cepas mutantes en el gen *rctA* de *R. etli* y *A. tumefaciens*. Las cepas obtenidas se conjugaron de forma análoga a las complementaciones realizadas con las construcciones derivadas del pJB3Tc19 (Tabla 2.5).

TABLA 2.5. Frecuencias de transferencia del plásmido pRetCFN42d::Tn5.1 desde la cepa *A. tumefaciens* GMI9023 y *R. etli* CFNX218Spc complementadas con construcciones derivadas del vector pTE3.

Donador	Receptor	Frecuencias ^a
CFNX218Spc p42d::Tn5.1	<i>A. tumefaciens</i> GMI9023	2,37 x 10 ⁻³
CFNX218Spc p42d::Tn5.1 pTE3	<i>A. tumefaciens</i> GMI9023	1,35 x 10 ⁻³
CFNX218Spc p42d::Tn5.1 pTERerctA	<i>A. tumefaciens</i> GMI9023	n.d.
GMI9023 p42d::Tn5.1	<i>R. etli</i> CFNX218Spc	1,42 x 10 ⁻³
GMI9023 p42d::Tn5.1 pTE3	<i>R. etli</i> CFNX218Spc	2,87 x 10 ⁻³
GMI9023 p42d::Tn5.1 pTERerctA	<i>R. etli</i> CFNX218Spc	2,04 x 10 ⁻⁶

^a las frecuencias indicadas son la media de al menos dos experimentos. El plásmido pRetCFN42d se ha abreviado como p42d.

Usando la nueva construcción, bajo el fondo de *A. tumefaciens*, se consiguió aumentar el efecto inhibitorio de *rctA* sobre la transferencia de los plásmidos mutantes, aunque todavía fue posible detectar su transferencia (Tabla 2.4 y 2.5). De estos resultados se concluye que la falta de complementación total con una copia en *trans* del gen *rctA* en *Agrobacterium*, y en consecuencia la transferencia del plásmido pRetCFN42d, no parece deberse exclusivamente a una expresión insuficiente de la copia de *rctA* dispuesta en *trans* en este fondo genético.

2.1.3.2. Funcionalidad de los genes homólogos a *rctA* en la familia *Rhizobiaceae*

Tal y como se indica en el apartado 2.1.2 de este capítulo, existen homólogos al gen *rctA* del plásmido simbiótico de *R. etli* en otros megaplásmidos del orden Rhizobiales. Para intentar establecer la funcionalidad de estos genes, *SMa1323* (1235757) presente en el plásmido pSymA de *S. meliloti* y *Atu5160* (17743578) localizado en el plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens*, se diseñaron experimentos de complementación de la mutación Tn5.1

con los genes *rctA* heterólogos, bajo el fondo genético de *R. etli*. Para esto se realizaron las construcciones pTESmrctA y pTEAtrctA (ver Anexo 2.4). Cada una de estas construcciones fue introducida en la cepa CFNX218Spc::Tn5.1 de *R. etli* por electroporación. Las cepas obtenidas se conjugaron con la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* como cepa receptora (Tabla 2.6). Como puede observarse en la Tabla 2.6 no se pudo detectar transferencia alguna del plásmido pRetCFN42d::Tn5.1 cuando se complementó la mutación con los genes homologos a *rctA* homólogos de *S. meliloti* o *A. tumefaciens*, y si en los controles utilizados, lo cual indicaba que ambos genes eran funcionalmente equivalentes al gen *rctA* de *R. etli*.

TABLA 2.6. Frecuencias de transferencia del plásmido pRetCFN42d::Tn5.1 desde la cepa de *R. etli* CFNX218Spc complementada con genes *rctA* heterólogos, usando la cepa *A. tumefaciens* GMI9023 como receptora.

<i>CFNX218Spc</i>	Frecuencias ^a
p42d::Tn5.1	2,5 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.1 pTE3	2,8 x 10 ⁻³
p42d::Tn5.1 pTEAtrctA	n.d.
P42d::Tn5.1 pTESmrctA	n.d.

^a las frecuencias indicadas son el resultado de la media de al menos dos experimentos. p42d, pRetCFN42d.

2.1.3.3. Influencia de *rctA* en la expresión de genes implicados en la transferencia conjugativa en el plásmido simbiótico de *R. etli*

De forma análoga a los estudios de expresión realizados sobre los genes *tra* del plásmido pRetCFN42d bajo la influencia de la sobre-expresión del gen *rctB* (Apartado 1.10), se llevaron a cabo ensayos de expresión de distintos genes supuestamente implicados en la transferencia conjugativa del megaplásmido, en fondos genéticos de *R. etli* portadores de pRetCFN42d silvestres o mutantes *rctA*. En estos ensayos, se estudió la expresión de los genes *traA*, *traC*, gen que hipotéticamente se co-transcribe con *traD* y *traG* (ver Figura 2.1), del propio *rctA*, así como de *yp037*, gen que hipotéticamente se co-transcribe con el operón *virB* (ver Figura 2.2). Estos ensayos se realizaron mediante el empleo de fusiones de los promotores de dichos genes al gen reportero *gus* del plásmido p53Gus (Estos experimentos fueron realizados en su totalidad por Edgardo Sepúlveda y

Capítulo II

Victoria Pando, del grupo de los doctores D. Romero y S. Brom del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (CIFN) en Cuernavaca, México).

Los resultados indicaron que en ausencia de *rctA*, la expresión del gen *yp037* es más de 4,5 veces superior a la del plásmido pRetCFN42d silvestre (Figura 2.7). Por tanto, en mutantes *rctA* se produce un aumento de expresión del hipotético operón *virB*, que supuestamente estaría implicado en la formación del Mpf para la transferencia del plásmido pRetCFN42d a la célula receptora. La reconstitución de los valores de expresión similares a los silvestres cuando se complementa el mutante con un gen *rctA* en multicopia (pJB3RerctA; *rctA^m*, Figura 2.7), afianza la validez de estos resultados de expresión y sugiere que el gen *rctA* actuaría como un represor del operón *virB*.

Igualmente la expresión de los genes cuyos productos supuestamente estarían implicados en el procesamiento del ADN conjugativo (que va a ser transferido a la célula receptora; gen *traA* y el operón *traCDG*), se expresan entre 2,5 y 5 veces más en presencia del plásmido mutante *rctA* que con el pRetCFN42d silvestre (Figura 2.7). Estos resultados sugieren de igual forma que el gen *rctA*, además de ser un represor del hipotético operón *virB*, estaría implicado en la represión de los genes *tra* (Figura 2.7).

Al contrario de lo que ocurrió con los genes *tra*, la expresión del gen *rctA* disminuye 5 veces en el plásmido mutante pRetCFN42d::Tn5.1 con respecto al pRetCFN42d silvestre (Figura 2.7). Este resultado sugiere un fenómeno de auto-inducción del gen *rctA*. Este efecto de retroalimentación positiva de *rctA* en plásmido pRetCFN42d silvestre, mantendría unos niveles relativamente altos del producto de este gen en las condiciones ensayadas. La represión por RctA de las hipotéticas funciones de transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d (*tra* y *virB*), conllevaría la ausencia de transferencia del megaplásmido en estas condiciones.

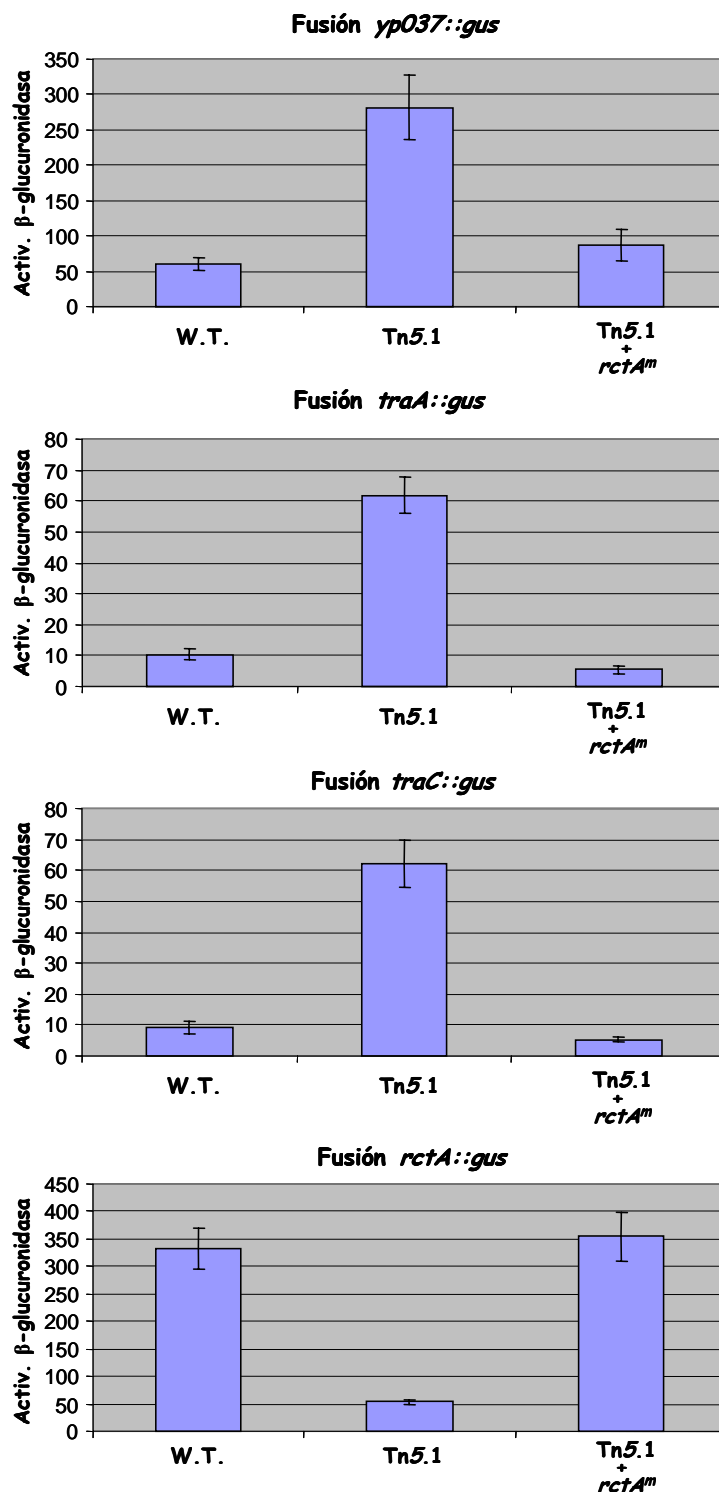


FIGURA 2.7. Influencia del gen *rctA* en la expresión de los genes *rctA*, *yp037*, *traC* y *traA* del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*.

La expresión se indica como actividad β-glucuronidasa específica (nmol/min/mg de proteína) en la cepa CFNX218Spc *R. etli*: WT, pRetCFN42d::Km; Tn5.1, pRetCFN42d::Tn5.1; *rctA^m*, gen *rctA* en multicopia (pJB3RerctA). Los datos son la media de 3 repeticiones. Las barras verticales indican el error Standard.

Capítulo II

2.1.4. Caracterización de la inserción Tn5.6

A diferencia de las 2 inserciones localizadas en el gen *rctA* (Tn5.1 y Tn5.2), la inserción Tn5.6 no se localiza interrumpiendo un marco abierto de lectura, sino que tal y como se apunta en el apartado 2.1.2, esta inserción se sitúa en región no codificante del gen *yp028* (González *et al.*, 2003), denominado como *rctB* en esta tesis doctoral. El promotor de *rctB*, ha sido anotado como un hipotético promotor del tipo σ^{54} (González *et al.*, 2003), lo que implicaría una posible activación de este gen por la unión de un regulador transcripcional aguas arriba de este promotor. Por otra parte, los datos sobre *rctB* obtenidos y descritos en el capítulo 1 de esta tesis, establecen a este gen como un elemento promotor de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*, cuando se eleva su expresión en la célula donadora. Este efecto sobre la transferencia, como consecuencia de la sobre-expresión de *rctB*, se traducía en un incremento de la frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d desde valores indetectables hasta frecuencias en torno a 10^{-5} transconjugantes por receptor (Tabla 1.3, Capítulo 1). Estas frecuencias son similares a las descritas para la transferencia del plásmido mutante pRetCFN42d::Tn5.6 (Tabla 2.2). Estos datos apuntan a que probablemente la inserción Tn5.6 está provocando la sobre-expresión de *rctB* con respecto a la expresión que presenta este gen en un pRetCFN42d silvestre. Para verificar esta hipótesis, así como para estudiar el efecto de la inserción Tn5.6 sobre los hipotéticos genes implicados en la transferencia conjugativa de *R. etli* se llevaron a cabo estudios de expresión génica mediante distintas fusiones al gen reportero *gus* (estos experimentos fueron realizados en su totalidad por Edgardo Sepúlveda y Victoria Pando, del grupo de los doctores D. Romero y S. Brom del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (CIFN) en Cuernavaca, México).

2.1.4.1. Papel del gen *rctB* en la expresión de genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d

En el capítulo 1 (Apartado 1.10; Figura 1.10) ya se apuntó la influencia que ejercía una sobre-expresión del gen *rctB* sobre la expresión de los genes *traA* y *traC,D,G* del plásmido pRetCFN42d. Estos estudios se llevaron a cabo mediante el uso de fusiones de los respectivos promotores al gen reportero *gus* del plásmido p53Gus. Tras estos ensayos se demostró que la sobre-expresión de *rctB* tenía un efecto activador de los genes *tra* del plásmido pRetCFN42d. Para completar los ensayos de expresión se utilizaron las fusiones

a los promotores de los genes *tra* empleadas en el capítulo 1 (*traA* y *traC*) y la fusión al gen *yp037* (teórico promotor del operón *virB*). Todas estas fusiones fueron ensayadas individualmente y de forma paralela tanto en el fondo silvestre, como en presencia de un gen *rctB* sobre-expresado (pTEYp028), como en el fondo mutante Tn5.6 (Figura 2.8). El conjunto de los resultados obtenidos indican que el efecto generado por la inserción Tn5.6 es análogo al efecto producido por la sobre-expresión del gen *rctB* (pTEYp028; *rctB^c*, Figura 2.8): un incremento de los niveles de expresión de los genes *traA*, *traC*, *yp037* y una reducción de la expresión de *rctA*.

La expresión del hipotético operón *virB* (expresión del gen *yp037*) se incrementa 4,7 y 6,1 veces por la presencia de la inserción Tn5.6 y de la construcción pTEYp028, respectivamente (Figura 2.8). De la misma forma, la expresión de los genes *tra*, se ve incrementada entre 3,3 y 5,2 veces para el caso del hipotético operón *traCDG*, y 4,2 veces para el caso del gen de la hipotética relaxasa del plásmido simbiótico *traA* (Figura 2.8).

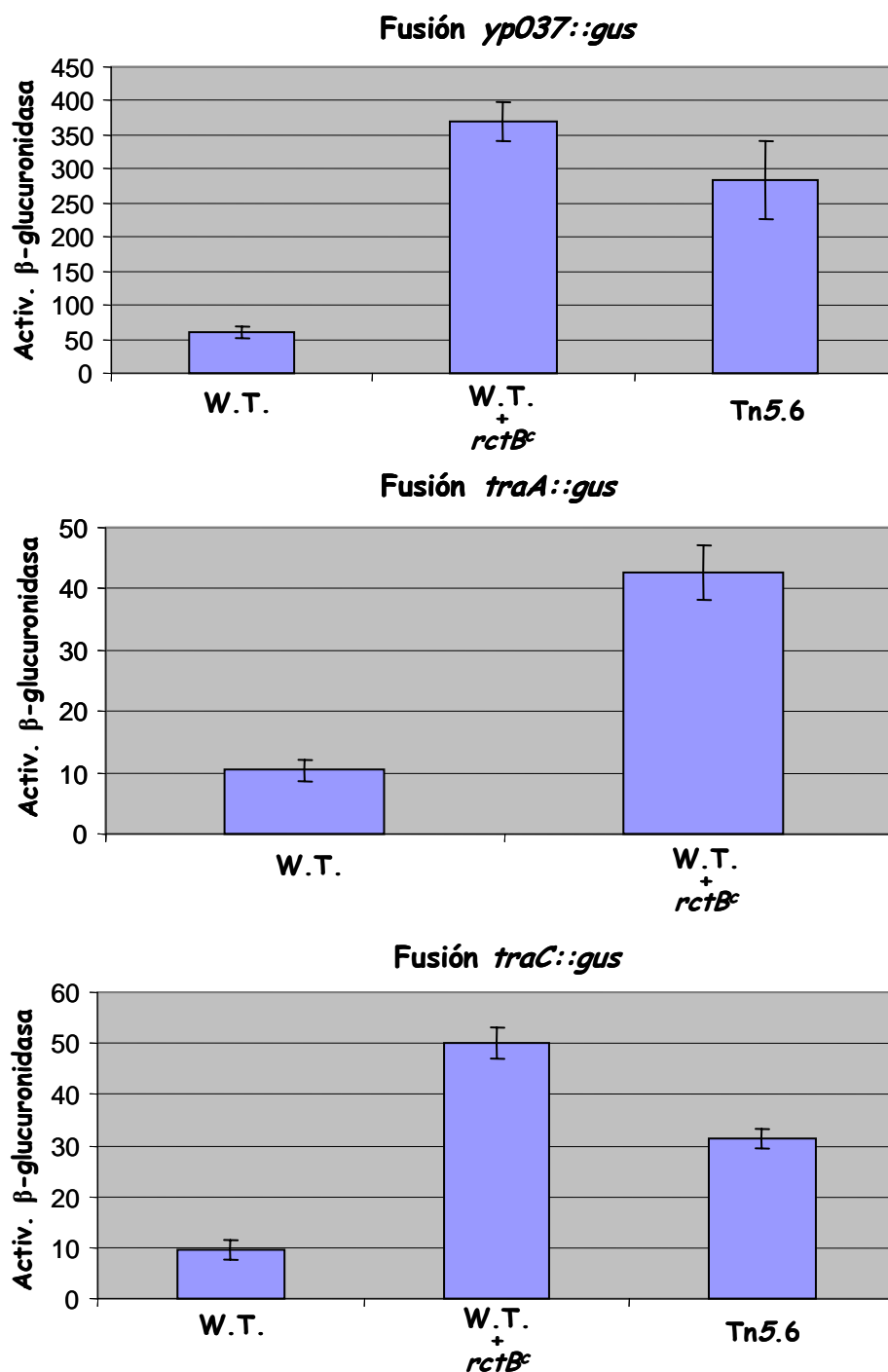


FIGURA 2.8. Influencia del gen *rctB* en la expresión de los genes *yp037*, *traC* y *traA* del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*.

La expresión se indica como actividad β-glucuronidasa específica (nmol/min/mg de proteína) en la cepa CFNX218Spc *R. etli*: WT, pRetCFN42d::Km; *rctB^c*, gen *rctB* bajo el promotor del triptófano (pTEyp028); Tn5.6, pRetCFN42d::Tn5.6;. Los datos son la media de 3 repeticiones. Las barras verticales indican el error Standard.

2.1.4.2. La actuación de los genes *rctB* y *rctA* está relacionada

Como se expone en el apartado anterior, la sobre-expresión de *rctB* origina un aumento de la expresión de los principales operones que supuestamente están implicados en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* (*tra* y *virB*). A priori, este efecto activador de los genes de transferencia podría estar mediado de forma directa, por la unión del producto de este gen a una zona operadora de los genes de transferencia, o de forma indirecta, mediante una disminución de la actividad del represor RctA, lo que tendría como consecuencia la des-represión de estos genes y en última instancia la transferencia del megaplásmido.

Para intentar verificar esta hipótesis, se estudió la influencia de la sobre-expresión del gen *rctB* sobre la expresión de *rctA* mediante el empleo de una fusión realizada a este gen. Como se observa en la Figura 2.9, tanto el establecimiento del gen *rctB* en multicopia como por la inserción Tn5.6 conllevan una disminución de la expresión de *rctA*.

Estos resultados indican que el papel del gen *rctB* sobre la activación de los genes de transferencia y en última instancia sobre la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*, parece estar mediada por un control de la expresión de *rctA*.

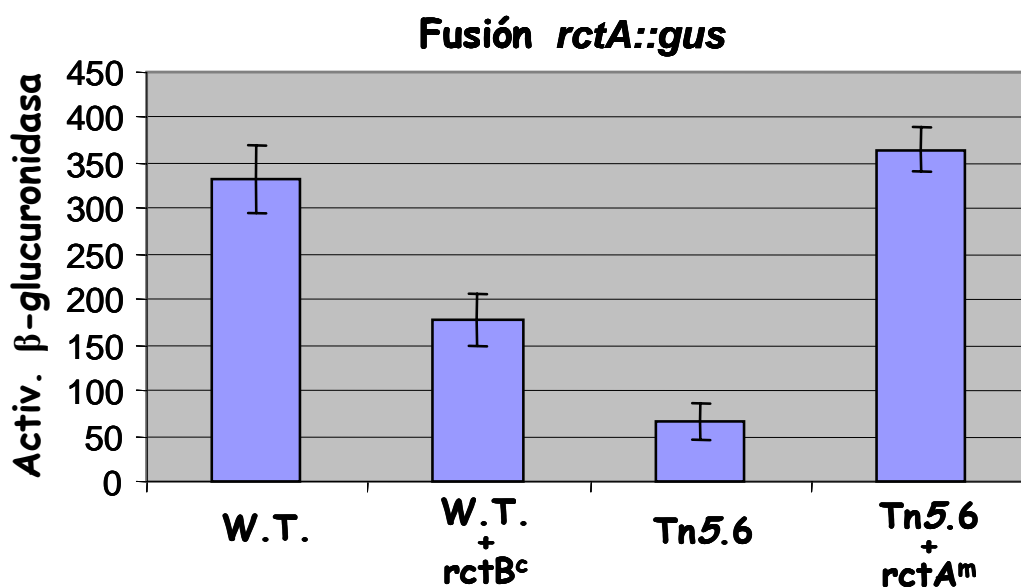


Figura 2.9. Influencia del gen *rctB* en la expresión del gen *rctA*.

La expresión se indica como actividad β -glucuronidasa específica (nmol/min/mg de proteína) en la cepa CFNX218Spc *R. etli*: WT, pRetCFN42d::Km; *rctB^c*, gen *rctB* bajo el promotor del triptófano (pTEyp028); Tn5.6, pRetCFN42d::Tn5.6; *rctA^m*, gen *rctA* en multicopia (pJBRerctA). Los datos son la media de 3 repeticiones. Las barras verticales indican el error Standard.

2.2. Regulación de la transferencia del plásmido simbiótico pSymA de *S. meliloti*

S. meliloti es una bacteria Gram negativa del orden Rhizobiales, que se caracteriza por establecer asociaciones simbióticas con alfalfa. La cepa cuyo genoma ha sido secuenciado completamente y anotado es 1021 (Galibert *et al.*, 2001). Dicho genoma se encuentra dividido en tres replicones: el cromosoma (3,65Mb), el pSymA (1,35Mb) y pSymB (1,68Mb).

El plásmido pSymA se considera como uno de los plásmidos simbióticos de la cepa, ya que en él se localizan los genes responsables de la síntesis y exportación de los factores Nod, así como la mayoría de los genes *nif* y *fix*, necesarios para la fijación de N₂ dentro del nódulo (Galibert *et al.*, 2001). Este plásmido presenta 1293 ORFs de los cuales el 56,5% tienen función asignada, con una longitud media de 871 pb (Galibert *et al.*, 2001). El contenido en GC es del 60,4%, con una diferencia considerable con respecto a los otros dos replicones presentes en la cepa (62,7% y 62,4% para el cromosoma y el pSymB, respectivamente), lo que junto con su no esencialidad para la supervivencia de la cepa (Oresnik *et al.*, 2000) sugiere que el pSymA en *S. meliloti* 1021 podría haber tenido un origen mediado por un fenómeno de transferencia genética horizontal, en un pasado relativamente cercano (Galibert *et al.*, 2001).

Se ha podido determinar también la existencia de varios genes *tra* en el pSymA: los operones *traA1* y *traCDG* (Figura 2.10, A) entre los que se situaría un hipotético *oriT*. El gen *traA1* (4620 pb) codificaría la hipotética relaxasa del plásmido (1539 aminoácidos) que junto con el producto de los genes *traC* y *traD* formaría parte del relaxosoma. La proteína TraG, sería la hipotética proteína acopladora del plásmido. Por el contrario tan sólo se ha podido identificar un gen *tra* en el pSymB, el gen *traA2*, muy parecido al gen *traA1* (97,1% de identidad, 98% similitud), el cual codificaría una hipotética relaxasa, situada adyacente al hipotético *oriT* del plásmido (Figura 2.10, B).

En el pSymA se localiza el único T4SS descrito en la cepa, el cual es de tipo *virB* y comprende desde el gen *virB1* hasta *virB11* (Figura 2.11) similares a los genes *virB* de *A. tumefaciens* y *R. etli*, y que podría desempeñar el papel de Mpf en la transferencia conjugativa del megaplásmido. En una localización cercana al operón *virB* se localiza el gen *SMA1323* el cual, tal y como se ha descrito (Apartado 2.2.1), correspondería a un ortólogo del gen *rctA* (*yp038*) del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*. Por analogía con el gen *yp038* de *R. etli*, se ha renombrado a este gen como *rctA* en este trabajo.

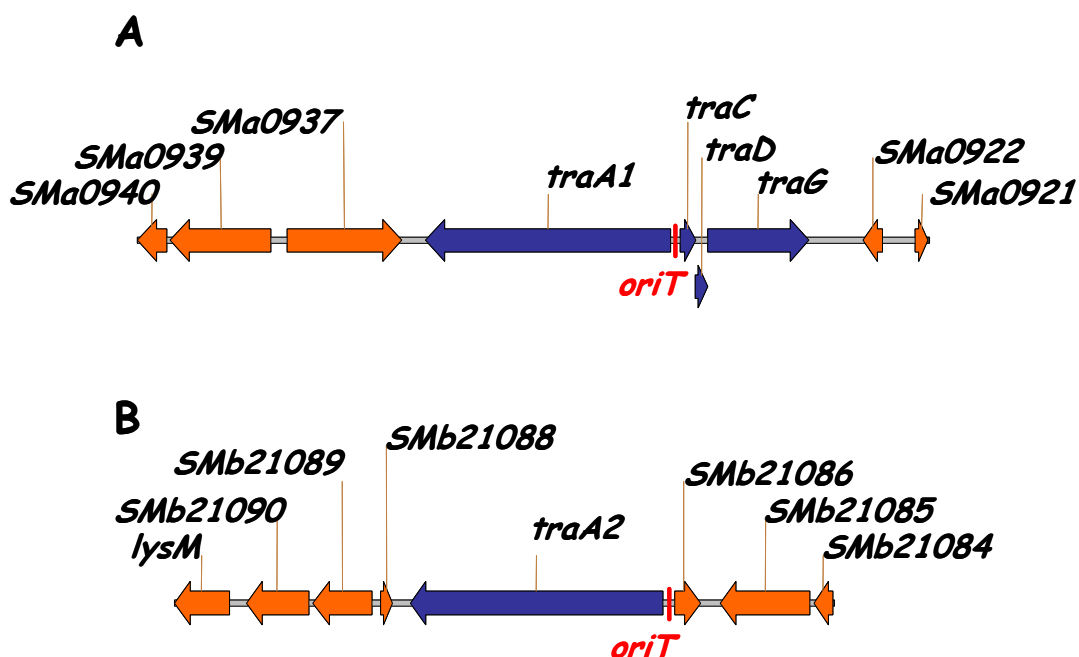


FIGURA 2.10. Región *mob* del plásmido pSymA y pSymB de *S. meliloti*. Regiones de *S. meliloti* donde se localizan los genes Dtr (DNA transfer and replication) y el hipotético *oriT* (Galibert *et al.*, 2001) del pSymA (A) y del pSymB (B).

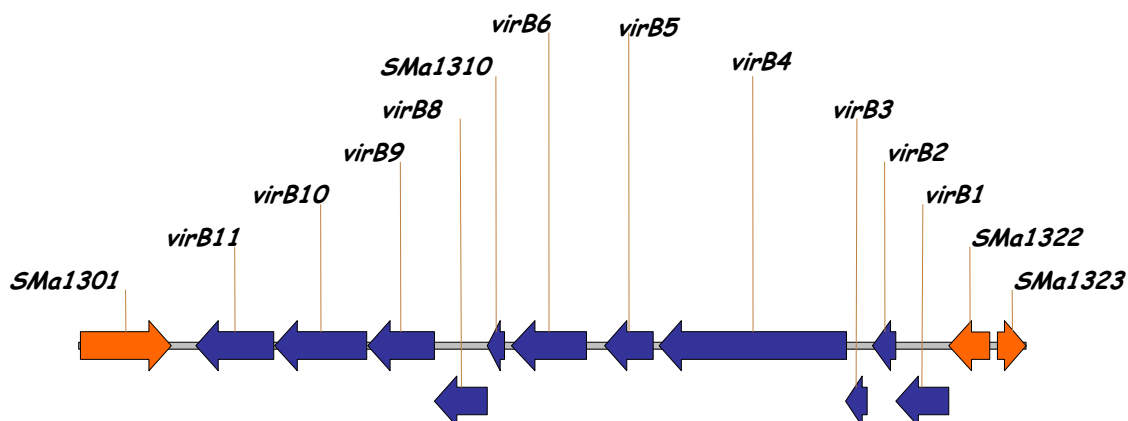


FIGURA 2.11. Región T4SS del plásmido pSymA. Región del plásmido simbiótico de *S. meliloti* donde se localizan los genes *virB* del T4SS (Galibert *et al.*, 2001) así como el gen *rctA* (*SMa1323*) adyacente al operón.

Hasta la fecha no se ha podido poner de manifiesto la transferencia conjugativa de ninguno de los plásmidos de la cepa 1021, sin la ayuda de sistemas de transferencia heterólogos (p.e., *Tn5mob*). No obstante, la distribución de los genes *tra* y *virB* en los replicones pSymA y pSymB de *S. meliloti* es muy similar a la de otros como el plásmido pRetCFN42d, lo que permite hipotetizar sobre la capacidad autoconjugativa del plásmido pSymA y sobre la posible co-transferencia del plásmido pSymB por movilización en *trans*. Esta capacidad conjugativa en *S. meliloti* podría no ponerse manifiesto en el laboratorio

Capítulo II

debido a la existencia de sistemas de regulación, de forma análoga a lo observado en el pSym de *R. etli*. Para intentar evaluar la capacidad conjugativa de estos replicones, así como la existencia o no de un sistema de regulación se llevaron a cabo diferentes experimentos.

2.2.1. Mutagénesis con Tn5 de las cepas GRM8 y 1021 de *S. meliloti*

De forma similar a la estrategia seguida para la identificación de los genes implicados en la regulación de la transferencia del plásmido simbiótico pRetCFN42d en *R. etli* (Apartado 2.1.1), se procedió a realizar una mutagénesis aleatoria con el transposón Tn5 de las cepas 1021 y GRM8 (derivada de GR4, curada de los plásmidos crípticos) de *S. meliloti*, utilizando el plásmido suicida pSUP2021. Con la cepa 1021 se llevaron a cabo 30 cruces de forma paralela para la obtención final de $2,2 \times 10^5$ transposantes. Con la cepa GRM8 se llevaron a cabo 15 cruces de forma paralela obteniéndose finalmente un total de 7×10^5 transposantes. Cada uno de los transposantes obtenidos supuestamente portaba una inserción única del transposón Tn5 en alguna parte del genoma. La eliminación de las bacterias de *E. coli* donadoras se llevó a cabo mediante el crecimiento sucesivo de los transconjugantes obtenidos en un medio mínimo donde *E. coli* no puede crecer suplementado con Km. La ausencia de *E. coli* se comprobó mediante la siembra de 100 μ l de la mezcla de transconjugantes en Endo-Agar (ver material y métodos).

Sendas poblaciones de transconjugantes de *S. meliloti* Km^R (derivadas de 1021 y GRM8) se conjugaron con la cepas GMI9023 de *A. tumefaciens* y CFNX218Spc de *R. etli*. No se obtuvieron transconjugantes en ninguna de las 4 conjugaciones realizadas.

2.2.2. Mutagénesis dirigida a *rctA* de *S. meliloti*

Según lo descrito en el apartado 2.1.2 de este mismo capítulo, el gen *rctA* de *R. etli* presenta un gen ortólogo situado en el plásmido simbiótico pSymA de *S. meliloti* (*Sm1323*, 1235757; Figura 2.11). Pese a la incapacidad de identificar este gen mediante la realización mutagénesis aleatoria con el transposón Tn5::Km (Apartado 2.2.1), se decidió realizar una mutagénesis dirigida sobre este gen, denominado en este trabajo como *rctA*, en las cepas 1021 y GR4 de *S. meliloti* mediante la delección e interposición de un casete de Sm/Spc (Anexo 2.5 y Figura 2.12).

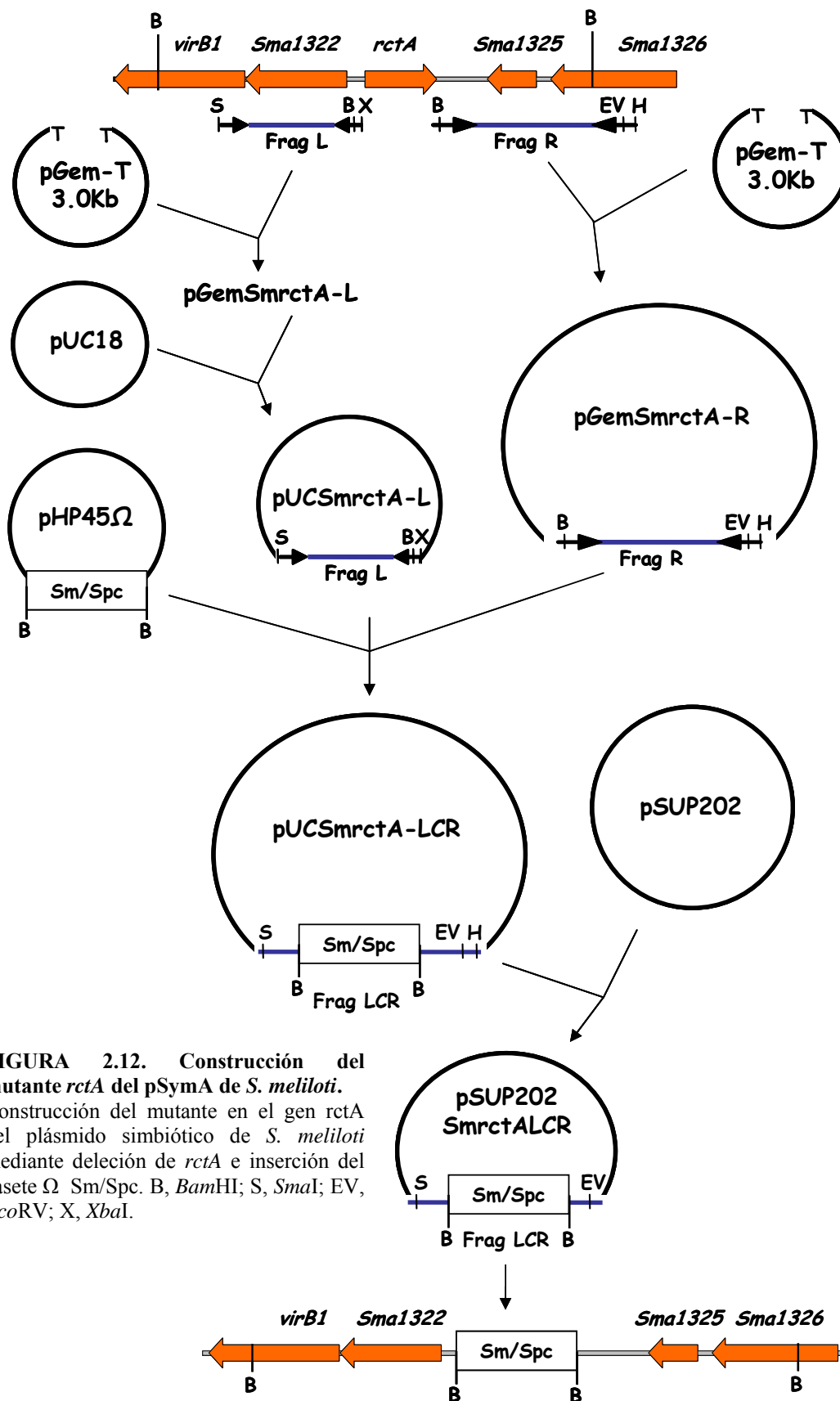


FIGURA 2.12. Construcción del mutante *rctA* del *pSymA* de *S. meliloti*. Construcción del mutante en el gen *rctA* del plásmido simbiótico de *S. meliloti* mediante deleción de *rctA* e inserción del casete Ω *Sm/Spc*. B, *Bam*HI; S, *Sma*I; EV, *Eco*RV; X, *Xba*I.

Capítulo II

Los mutantes *rctA* de sendas cepas de *S. meliloti* se comprobaron por PCR e hibridación (Figura 2.13). Dichos mutantes se conjugaron con la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* y A818 de *S. meliloti* (1021 curada del plásmido pSymA) con el resultado de una ausencia total de transconjugantes, lo que implicaba una clara diferencia en la regulación de la transferencia del plásmido pSymA con respecto a pRetCFN42d.

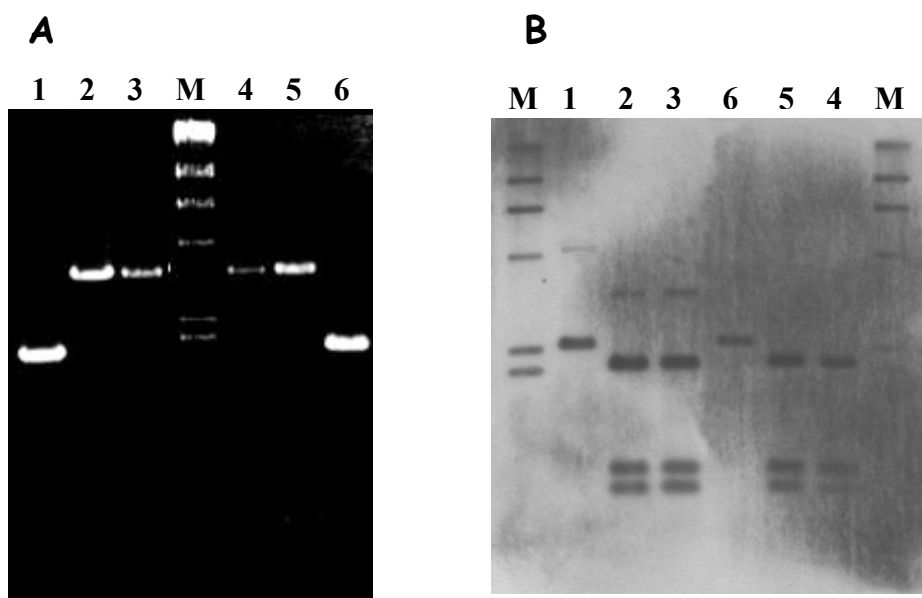


FIGURA 2.13. Comprobación de los mutantes *RctA*⁻ de 1021 y GR4 *S. meliloti*. Carriles: 1, 1021; 6, GR4; 2 y 3, 1021 *RctA*⁻; 4 y 5, GR4 *RctA*⁻. A) Amplificación por PCR de un fragmento 1,9 Kb del plásmido pSymA que porta el gen *rctA* de *S. meliloti* (carriles 1 y 6) o de un fragmento de 3,4 Kb en los mutantes *RctA*⁻ (carriles del 2, 3, 4 y 5). B) Hibridación de pUCSmrctA-LCR usado como sonda, frente ADN genómicos silvestres o mutantes digeridos con *Bam*HI.

Las leguminosas secretan sustancias quimiotácticas conocidas como flavonoides que atraen al rizobio hasta los pelos radicales e inducen algunos genes esenciales para el proceso de nodulación (genes *nod*, ver introducción). La luteolina es uno de los flavonoides secretados por las raíces de alfalfa (*Medicago sativa*), planta hospedadora habitual de *S. meliloti*. La rizosfera podría ser, a priori, un ambiente adecuado para la transferencia conjugativa gracias a la mayor concentración bacteriana encontrada en ella, originada en parte por la secreción de estas sustancias quimiotácticas por parte de la planta. Por este motivo, se repitieron los cruces anteriormente mencionados, en presencia de luteolina en el medio de conjugación, a una concentración final de 5 μ M. La presencia de luteolina tampoco tuvo efecto alguno sobre la transferencia conjugativa del plásmido pSymA de las cepas GR4 y 1021 de *S. meliloti*, tanto en su versión silvestre como mutante *rctA*.

2.2.3. Expresión de los genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pSymA y pSymB de *S. meliloti*

Los resultados del apartado anterior apuntaban a una clara diferencia entre la regulación de la transferencia del plásmido pSymA y pRetCFN42d. Mutaciones en el gen *rctA* del plásmido pRetCFN42d implican la transferencia del megaplásmido a una alta frecuencia (Tabla 2.1) paralelamente a una elevación en la expresión de los genes *tra* y *virB* (Apartado 2.1.5, Figura 2.7), mientras que mutantes *rctA* en *S. meliloti* no parecían promover la transferencia del plásmido pSymA. Esta diferencia puede obedecer en principio a (i) una pérdida de la capacidad de transferencia de plásmido pSymA, (ii) o a la presencia de un sistema de regulación de la transferencia conjugativa diferente a la del plásmido pRetCFN42d. Para comprobar que la ausencia de *rctA*, pese a no promover la conjugación, originaba cambios en la expresión de los genes de transferencia (*tra* y *virB*), se construyeron fusiones al gen reportero *gus* de las regiones promotoras de los genes *traA*, *traC*, *rctA* y *SMa1322* (operón *virB*) del plásmido pSymA de las cepas 1021 y GR4 de *S. meliloti* (Anexo 2.6 y 2.7).

Los experimentos realizados demostraron un comportamiento similar en 1021 y GR4 y análogo a lo observado en el plásmido pRetCFN42d de *R. etli* (comparar Figuras 2.7 y 2.14). En mutantes $RctA^-$ de *S. meliloti* se observa un aumento de expresión de los genes *tra*, de más de 2 veces en el caso de *traA* y de hasta 4 veces en la expresión de *traC*, con respecto a las cepas silvestres $RctA^+$ (Figura 2.14). Igualmente una mutación en *rctA* provoca un aumento de unas 4 veces en la expresión del gene *yp037* (Figura 2.14), y por tanto del hipotético operón *virB* que supuestamente se co-transcribe con dicho gen. De forma análoga a lo que ocurre en el gen *rctA* del plásmido pRetCFN42d, el gen *rctA* del plásmido pSymA parece encontrarse bajo un sistema de auto-inducción ya que una mutación en este gen provoca una bajada de casi 2 veces en su propia expresión con respecto a la situación silvestre (Figura 2.14).

Tal y como se ha apuntado anteriormente en el pSymB tan solo se ha descrito un gen *tra*, el gen *traA2* (Galibert *et al.*, 2001; Finan *et al.*, 2001). Este gen codifica una hipotética relaxasa y además presenta un hipotético *oriT* en la región intergénica *traA2-Smb21086* (Figura 2.10B). El hecho de no haberse descrito ningún gen *tra* adicional a *traA2*, así como ningún T4SS que pueda funcionar como Mpf hace pensar que este plásmido o es movilizado por funciones adicionales o no es transferible conjugativamente.

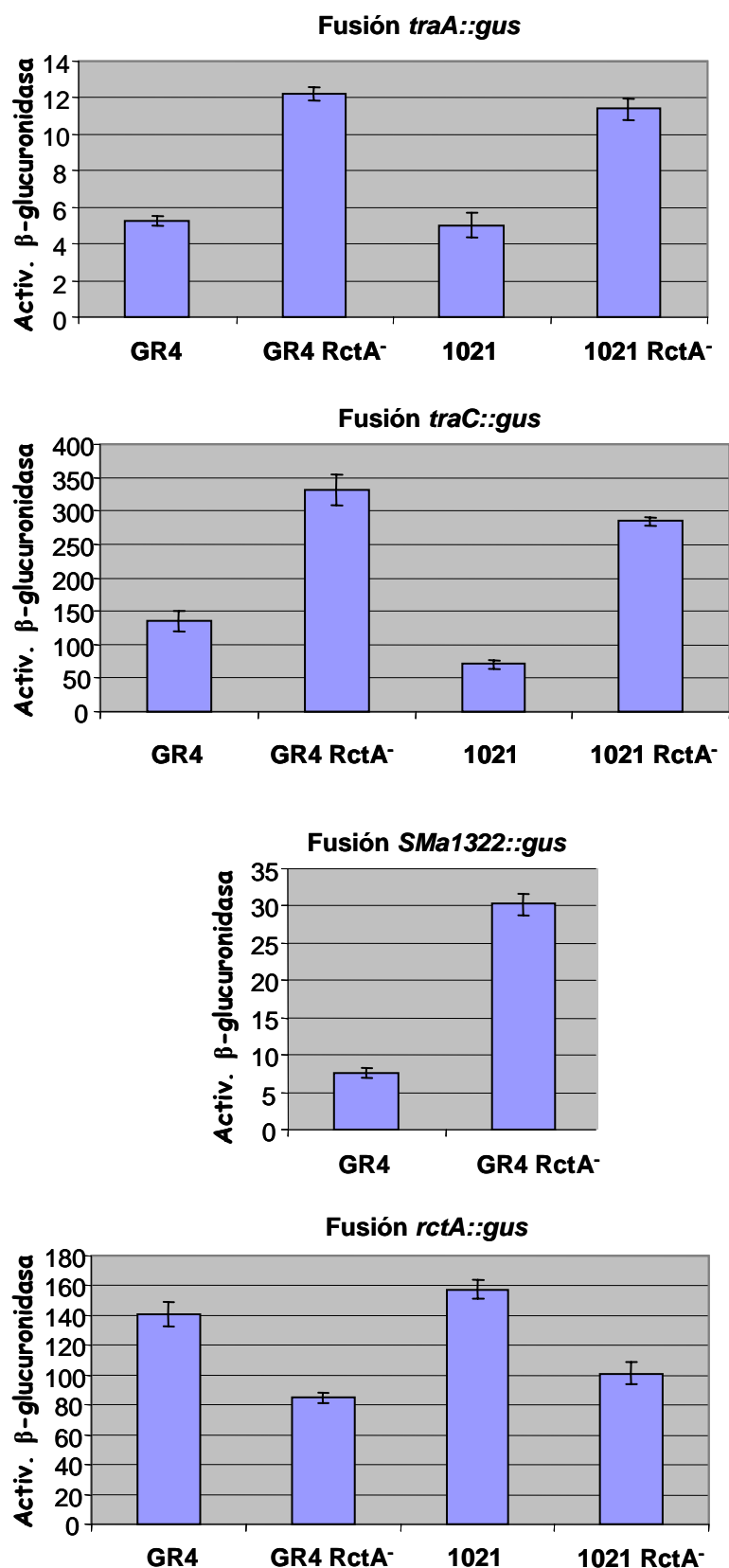


FIGURA 2.14. Influencia del gen *rctA* en la expresión de los genes *rctA*, *SMa1322*, *traC* y *traA1* de pSymA de *S. meliloti*. La expresión se indica como actividad β -glucuronidasa específica (nmol/min/mg de proteína). Las barras verticales indican el error Standard.

En el supuesto caso de que este plásmido sea movilizado, esta movilización en principio implicaría la intervención funciones de transferencia adicionales en *trans*, o la falsa movilización por cointegración con otro replicón autoconjugativo de la cepa. En la cepa 1021 de *S. meliloti*, a priori, tan sólo el pSymA podría establecerse como plásmido movilizador conjugativo del plásmido pSymB. Por tanto para comprobar si existe un vínculo entre el sistema regulador de las funciones de transferencia del plásmido pSymA y el gen *traA2* del plásmido pSymB se realizó una fusión transcripcional del gen *traA2* del plásmido pSymB de *S. meliloti* al gen reportero *gus* del plásmido pFus1. Dicha fusión se ensayó de forma comparativa en los fondos genéticos silvestre de 1021 y GR4 en relación con sus respectivos mutantes en el gen *rctA*, 1021 RctA⁻ y GR4 RctA⁻, respectivamente. Los resultados han demostrado que, de forma análoga a lo observado con el gen *traA1*, el gen *traA2* se expresa entre 2 y 3 veces más en un fondo RctA⁻ que en el fondo silvestre (Figura 2.15).

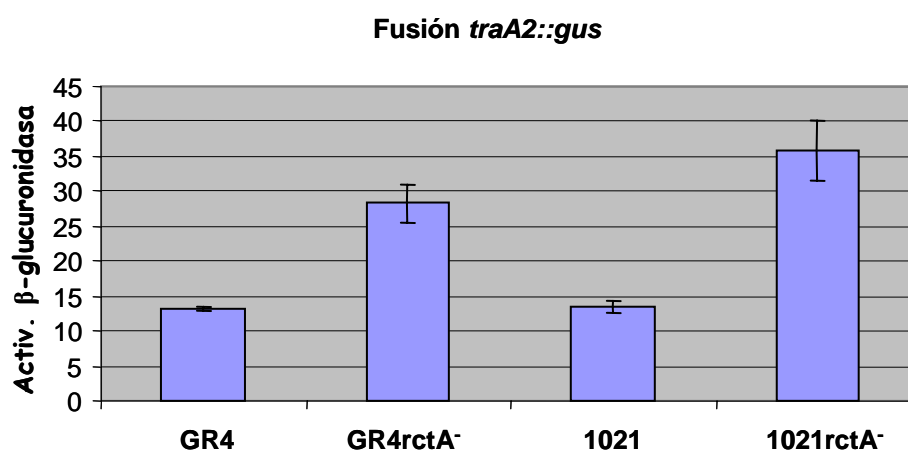


FIGURA 2.15. Influencia del gen *rctA* en la expresión de *traA2* del plásmido pSymB de *S. meliloti*.

La expresión se indica como actividad β-glucuronidasa específica (nmol/min/mg de proteína). Las barras verticales indican el error Standard.

2.2.4. Efecto de los mutantes pSymA RctA⁻ de las cepas GR4 y 1021 en la simbiosis con alfalfa

Como se ha descrito en el apartado anterior una mutación en el gen *rctA* de *S. meliloti* provoca un incremento de la expresión del operón *virB*, T4SS del plásmido pSymA, con respecto a la cepa silvestre. Los T4SS consisten en un canal de membrana especializado en el transporte de ADN y proteínas que, además de su función en la transferencia conjugativa, en el caso de bacterias patógenas está involucrado en el

Capítulo II

transporte de los factores de virulencia hasta las células eucariotas (Christie y Vogel, 2000). Igualmente, este tipo de sistema de secreción T4SS ha sido descrito en varias α -proteobacterias simbióticas de plantas (Christie, 2001), donde su papel en simbiosis es desconocido. Por esta razón, se realizó un ensayo de cinética de nodulación de alfalfa con los mutantes 1021 $RctA^-$ y GR4 $RctA^-$ para comparar su capacidad de nodulación con respecto a las cepas silvestres (Figura 2.16). De estos ensayos se concluye que la mutación en el gen *rctA* no altera significativamente la capacidad de nodulación de alfalfa por *S. meliloti*.

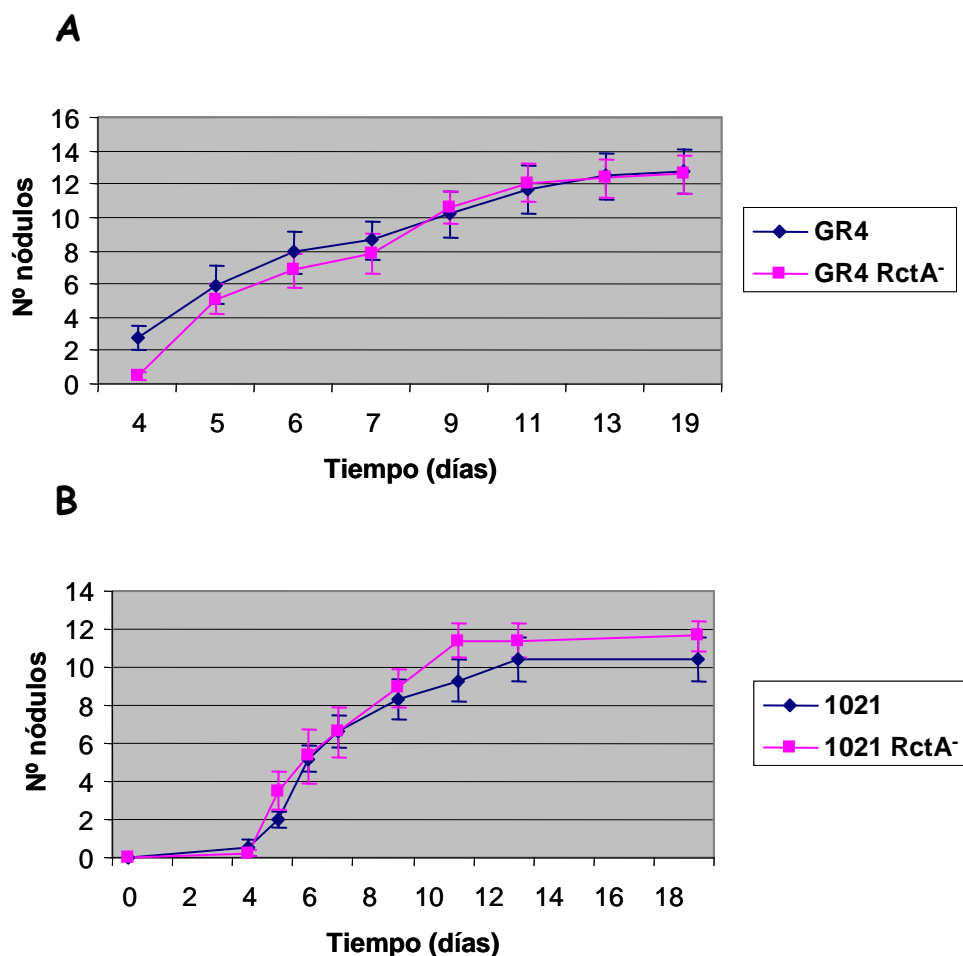


FIGURA 2.16. Cinéticas de nodulación de las cepas GR4 $RctA^-$ y 1021 $RctA^-$ de *S. meliloti*.

2.2.5. Mutagénesis aleatoria de las cepas 1021 $RctA^-$ y GR4 $RctA^-$ de *S. meliloti* con el transposón Tn5

Similar a *R. etli*, el gen *rctA* de *S. meliloti* parecía tener efecto represor de varios de los hipotéticos operones implicados en la transferencia conjugativa de los plásmidos pSymA (*tra* y *virB*) y pSymB (*tra*). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *R. etli*, la

inactivación de dicho gen no parecía suficiente para promover la transferencia conjugativa del plásmido pSymA de *S. meliloti*. Esto implica una clara diferencia entre los sistemas de regulación de la transferencia de estos dos plásmidos. Una hipótesis plausible, ya apuntada en el apartado 2.2.3, consistiría en la existencia de sistemas de represión adicionales sobre la transferencia del plásmido pSymA de *S. meliloti*. La existencia de un sistema de regulación formado por la actuación de varios represores podría explicar por una parte, la ausencia de transferencia de un pSymA RctA⁻ (Apartado 2.2.2), y por otra, la dificultad de identificar mutaciones en genes represores de la transferencia conjugativa del plásmido pSymA mediante la realización de una mutagénesis al azar con el transposón Tn5 (Apartado 2.2.1). Por esta razón, se procedió a realizar una mutagénesis al azar con Tn5, sobre los mutantes *rctA* de las cepas 1021 y GR4 de *S. meliloti*.

Para la mutagénesis de las cepas 1021 RctA⁻ y GR4 RctA⁻ de *S. meliloti* se utilizó el plásmido suicida pSUP2021, tal y como se ha descrito anteriormente en esta tesis. Se llevaron a cabo 20 cruces de forma paralela en sendas cepas para la obtención final de $3,1 \times 10^6$ y $3,3 \times 10^5$ transposantes de GR4 RctA⁻ y 1021 RctA⁻, respectivamente. Cada uno de los transconjugantes obtenidos supuestamente portaba una inserción única del transposón Tn5. La eliminación de las bacterias de *E. coli* (cepa S17.1 pSUP2021 usada como donador) se realizó mediante el crecimiento sucesivo de los transconjugantes obtenidos en un medio mínimo donde *E. coli* no puede crecer (ver material y métodos) suplementado con Km. La ausencia de *E. coli* se comprobó mediante la siembra de 100 μ l de la mezcla de transconjugantes en Endo-Agar (medio para el crecimiento exclusivo de coliformes, ver material y métodos).

Una vez obtenidas las poblaciones de transposantes Km resistentes derivadas GR4 RctA⁻ y 1021 RctA⁻, se conjugaron en masa con las cepas GMI9023 y A818 de *A. tumefaciens* y *S. meliloti*, respectivamente. Se llevó a cabo la selección de los transconjugantes para la transferencia de plásmido simbiótico pSymA RctA⁻ de cada una de las cepas (transconjugantes resistentes a Sm y Spc). Tan solo se obtuvieron transconjugantes en las conjugaciones en las que se había utilizado la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* como receptora, con unas frecuencias de $1,32 \times 10^{-7}$ y $1,42 \times 10^{-7}$ cuando se utilizaron como donadores las poblaciones mutagenizadas con Tn5 derivadas de GR4 RctA⁻ y 1021 RctA⁻, respectivamente.

Capítulo II

Seis colonias elegidas al azar de entre los transconjugantes de *A. tumefaciens* Sm/Spc resistentes aparecidos en cada uno de los cruces, fueron sometidas a tres ensayos diferentes: (i) Capacidad de crecer en medio suplementado con Km, (ii) perfil plasmídico, (iii) capacidad de transferencia del hipotético pSymA desde los transconjugantes de *A. tumefaciens* a la cepa A818Gm^r de *S. meliloti*. Ninguno de los 12 transconjugantes analizados demostró capacidad de crecer en Km, lo que sugería que no portaba el transposón Tn5. Mediante la técnica de Eckhardt se visualizó el perfil plasmídico de cada uno de los transconjugantes de *A. tumefaciens* Sm/Spc resistentes, advirtiéndose la presencia en todos ellos de un plásmido que coincidía en tamaño con el pSymA y de una segunda banda de mayor tamaño que podría corresponder con el cromosoma circular de *A. tumefaciens* (Figura 2.17). No se obtuvo ningún transconjugante A818Gm^r resistente a Sm y Spc de las conjugaciones con ninguno de los transconjugantes de *A. tumefaciens* empleados como donadores.

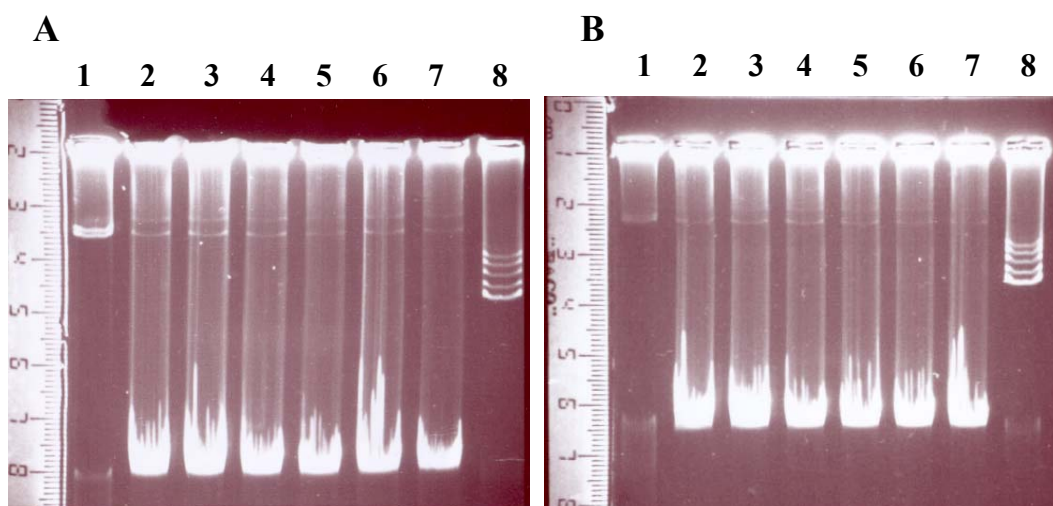


FIGURA 2.17. Perfil plasmídico de los transconjugantes de *A. tumefaciens* portadores del pSymA *rctA*⁻.

A) Carriles: 1, 1021; 2 a 7, transconjugantes elegidos al azar de la conjugación de 1021 RctA⁻ x GMI9023; 8, CE3 de *R. etli*. B) Carriles: 1, 1021; 2 a 7, transconjugantes de la conjugación de GR4 RctA⁻ x GMI9023; 8, CE3 de *R. etli*.

El conjunto de resultados parecía indicar que alguna o algunas de las inserciones del transposón Tn5 en las cepas GR4 RctA⁻ y 1021 RctA⁻ había ocasionado la promoción de la transferencia del plásmido pSymA (Figura 2.17), pero que dichas inserciones no se localizaban en el plásmido simbiótico pSymA (transconjugantes de *A. tumefaciens* Km sensibles), sino en algún otro lugar del genoma de *S. meliloti*. El hecho de haberse originado una inserción del Tn5 en *trans* con respecto al pSymA-RctA⁻ imposibilitaba la

posterior transferencia de este plásmido a la cepa A818Gm^r, además de dificultar la localización de dicha inserción.

2.2.6. Efecto del plásmido pRetCFN42d sobre la transferencia del plásmido pSymA de *S. meliloti*

Los resultados expuestos en este capítulo 2 indican que existen similitudes y diferencias entre los plásmidos simbióticos pSymA de *S. meliloti* y pRetCFN42d de *R. etli*. Ambos presentan genes de transferencia muy parecidos, y un gen *rctA* implicado en la represión de genes *tra* y *virB*. Sin embargo, mutaciones en *rctA* promueven la transferencia de pRetCFN42d, pero no del plásmido pSymA de *S. meliloti* (ver Apartado 2.2.2).

Además de la posible presencia de otros elementos represores de la transferencia aún no identificados en *S. meliloti* (Apartado 2.2.5), cabe la posibilidad de que en el plásmido pRetCFN42d desregulado (bien sea por la mutación del gen *rctA* o por la sobre-expresión del gen *rctB*) esté presente algún elemento que se encuentre ausente en el pSymA de *S. meliloti*. Para estudiar esta posibilidad se crearon varias combinaciones de versiones silvestres y/o RctA⁻ de los plásmidos pSymA y pRetCFN42d, conjuntamente en el fondo genético de *S. meliloti* de 1021 y GR4, generándose las siguientes combinaciones:

- pSymA (marcado Sm/Spc) + pRetCFN42d (marcado Km)
- pSymA RctA⁻ (Sm/Spc) + pRetCFN42d (marcado Km)
- pSymA (marcado Sm/Spc) + pRetCFN42d RctA⁻ (Km)
- pSymA RctA⁻ (Sm/Spc) + pRetCFN42d RctA⁻ (Km)

Estas cepas se conjugaron con la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* como receptora, seleccionándose por resistencia a Km la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli* (tanto silvestre como RctA⁻) y mediante Spc^R la transferencia del plásmido pSymA (tanto silvestre como RctA⁻). Igualmente se realizó la selección en Km + Spc para determinar la co-transferencia de ambos plásmidos en cada una de las diferentes conjugaciones realizadas. Los resultados no demostraron diferencias significativas en las frecuencias de transferencia de los diferentes megaplásmidos entre el uso de las cepas 1021 o GR4 de *S. meliloti*, por lo que los datos mostrados se generalizan como *S. meliloti*.

Los resultados indicaron que mientras que el plásmido pRetCFN42d silvestre era incapaz de transferirse, tanto en presencia de un pSymA silvestre como de un pSymA RctA⁻, el pRetCFN42d RctA⁻ se transfería hasta *A. tumefaciens* con independencia de que

Capítulo II

el pSymA presente en la cepa donadora tuviera o no una copia del gen *rctA* (Tabla 2.7). No obstante, la frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d RctA⁻ de *R. etli* baja casi 10 veces cuando se encuentra en presencia de un pSymA silvestre en el donador, con respecto a cuando lo hace en presencia de un pSymA RctA⁻ (Tabla 2.7). Como se ha demostrado en el apartado 2.1.3.2 de este capítulo, la sobre-expresión del gen *rctA* (SMa1323) del plásmido pSymA de *S. meliloti*, es capaz de complementar un mutante *rctA* del plásmido pRetCFN42d, indicando la funcionalidad cruzada de este represor. Por otra parte, los datos de expresión demuestran una mayor expresión del gen *rctA* del plásmido pSymA, en el plásmido silvestre con respecto al mutante pSymA RctA⁻. Por tanto, esta bajada en la frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d RctA⁻ puede deberse a una complementación parcial del gen *rctA* del plásmido pRetCFN42d por parte del gen *rctA* del plásmido pSymA silvestre.

TABLA 2.7. Frecuencia de transferencia de los plásmidos pRetCFN42d (silvestre y RctA⁻) y pSymA (silvestre y RctA⁻) desde cepas de *S. meliloti* donde coexisten ambos plásmidos simbióticos.

		pRetCFN42d	
		RctA ⁺	RctA ⁻
pSymA	RctA ⁺	0	1,4 x 10 ⁻⁶
	RctA ⁻	0	1,2 x 10 ⁻⁵

Transferencia del pRetCFN42d

		pSymA	
		RctA ⁺	RctA ⁻
pRetCFN42d	RctA ⁺	0	0
	RctA ⁻	1 x 10 ⁻⁷	1,1 x 10 ⁻⁵

Transferencia del pSymA

Por su parte, el pSymA, como se describe en el apartado 2.2.2, había demostrado previamente una ausencia de transferencia conjugativa desde *S. meliloti*, tanto en su forma silvestre como en su mutante en el gen *rctA*. Esta misma situación ocurrió cuando en la célula donadora co-existía una copia silvestre del plásmido pRetCFN42d. Sin embargo, la presencia del plásmido pRetCFN42d RctA⁻ promovía la transferencia del plásmido pSymA silvestre y del plásmido pSymA RctA⁻, a frecuencias de 1 x 10⁻⁷ y 1,1 x 10⁻⁵, respectivamente.

Por otra parte, la co-transferencia de ambos plásmidos fue completamente nula en todas las conjugaciones con la excepción de la combinación de los mutantes *rctA* de ambos

plásmidos (pSymA RctA⁻ + pRetCFN42d RctA⁻), donde la frecuencia de co-transferencia fue de $1,21 \times 10^{-8}$.

Varios transconjugantes de las distintas conjugaciones fueron elegidos al azar para la obtención de sus perfiles plasmídicos, con lo que pudo corroborarse la transferencia de los diferentes megaplásmidos (Figura 2.18).

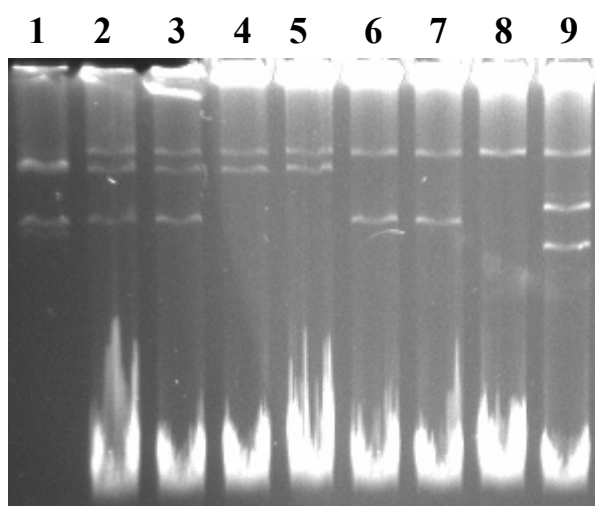


FIGURA 2.18. Perfiles plasmídicos de diferentes transconjugantes de *A. tumefaciens* GMI9023.

Carriles: 1, cepa donadora (1021 pSymA RctA⁻ con el pRetCFN42d RctA⁻; 2 y 3 transconjugantes Km^r y Spc^r; 4 y 5, transconjugantes Spc^r; 6 y 7, transconjugantes Km^r; 8, cepa receptora (*A. tumefaciens* GMI9023), 9, *A. tumefaciens* C58.

2.3. Discusión

Como se ha descrito con anterioridad, los megaplásmidos e islas simbióticas de las bacterias pertenecientes al orden Rhizobiales, salvo excepciones, no suelen presentarse como elementos autotransferentes en condiciones de laboratorio (Danino *et al.*, 2003; He *et al.*, 2003). No obstante, tras la secuenciación de muchos de estos replicones se ha demostrado la presencia de numerosos elementos y funciones que, por analogía con otros plásmidos autotransferentes, podrían formar sistemas conjugativos completos. Elementos tales como un *oriT*, funciones de procesamiento del ADN (funciones Dtr), un T4SS, proteínas acopladoras, etc (Galibert *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003; Freiberg *et al.*, 1997; Kaneko *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2002). Por otro lado, existen numerosas evidencias de que los plásmidos e islas simbióticas de estas poblaciones bacterianas han estado sujetas a procesos de transferencia genética horizontal en el medio ambiente donde viven (Danino *et al.*, 2003; Sullivan y Ronson, 1998; Vlassak y Vanderleyden, 1997).

En el caso concreto de *R. etli*, y hasta la fecha, tan sólo se ha descrito la capacidad autoconjugativa de uno de los 6 plásmidos que contiene la cepa tipo CFN42, la del

Capítulo II

plásmido críptico pRetCFN42a (Brom *et al.*, 2000). La transferencia del plásmido simbiótico de la cepa (pRetCFN42d), por el contrario, tan sólo ha sido observada como un fenómeno de movilización por cointegración con el plásmido pRetCFN42a (Brom *et al.*, 2000; Tun-Garrido *et al.*, 2003). Debido a esto, algunos autores le han adjudicado a las funciones de transferencia presentes en este plásmido un papel residual, originarias de un ancestro que con el paso del tiempo habría perdido su capacidad autoconjugativa (González *et al.*, 2003). En apoyo de esta teoría encontramos la presencia de algún pseudogen *tra* (como el gen truncado *traI*; González *et al.*, 2003), el cual podría haber desempeñado un papel en regulación de la transferencia conjugativa del plásmido en el pasado.

El papel del gen *rctB* en la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*, descrita en el Capítulo 1, ha demostrado la capacidad conjugativa del plásmido pRetCFN42d en ausencia del pRetCFN42a, así como ha sugerido la existencia de un sistema de regulación de la transferencia en este plásmido.

La identificación de otros genes implicados en la regulación del plásmido simbiótico de *R. etli* apunta a la existencia de un sistema complejo de regulación, donde varios elementos parecen funcionar tanto en la represión, como es el caso del gen *rctA*, como en la activación o des-represión (gen *rctB*) de la transferencia conjugativa de dicho plásmido. Las homologías a genes de función desconocida en los bancos de datos, hace difícil la adjudicación de funciones concretas a cada uno de los genes identificados. Sin embargo, el efecto tan acusado de mutaciones en *rctA* sobre la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d, por una parte y el parecido, a nivel de estructura terciaria, de RctA con proteínas con un motivo típico de unión a ADN, por otra, hacen de este gen un fiel candidato a ser un represor de las funciones de transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*.

Este papel represor ha sido demostrado mediante experimentos de expresión génica. De estos experimentos se concluye que el gen *rctA*, en condiciones de laboratorio, presenta una expresión relativamente alta y se encuentra reprimiendo la expresión de los principales operones implicados en la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d (operones *tra* y *virB*). Una mutación en este gen provoca por una parte, la subida de la expresión de estos operones implicados en la conjugación del plásmido, y por otra, una bajada de su propia expresión, lo que apunta a algún fenómeno de regulación por auto-

inducción de *rctA*. Los datos de expresión génica observados, junto con las analogías estructurales de RctA, hacen pensar que este elemento podría estar ejerciendo su represión directamente mediante la unión al ADN de unas hipotéticas zonas operadoras presentes aguas arriba de los operones implicados en la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d (*tra* y *virB*).

Lejos de ser un tipo de gen exclusivo del plásmido simbiótico de *R. etli*, se ha demostrado en este trabajo la presencia de genes ortólogos al gen *rctA* de *R. etli* en otros megaplásmidos de la familia *Rhizobiaceae*, como el pSymA de *S. meliloti* y el plásmido críptico pAtC58 de *A. tumefaciens*. Estos genes además parecen ser funcionales, siendo capaces de remplazar, en su acción represora, a *rctA* de *R. etli*. Estos resultados hacen de este gen un serio candidato a tener un papel central en la regulación de la conjugación de varios megaplásmidos de esta familia.

Igualmente, la identificación de la inserción Tn5.6 en la región 5' no codificante del gen *rctB* (González *et al.*, 2003), afianza el protagonismo de dicho gen en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*. La localización de esta inserción junto con el paralelismo fenotípico encontrado en las frecuencias de transferencia, entre la inserción Tn5.6 y la sobre-expresión del gen *rctB* nos ha permitido postular que dicha inserción provoca una sobre-expresión del gen *rctB*, con respecto a un pRetCFN42d silvestre. Los experimentos de expresión afianzan esta hipótesis donde tanto la inserción Tn5.6, por una parte, como la sobre-expresión del gen *rctB* bajo control de un promotor constitutivo (*rctB^c*), provocan un fenotipo común consistente en un aumento de la expresión de los genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli* (*tra* y *virB*), así como la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico del plásmido pRetCFN42d a frecuencias relativamente elevadas.

Además, se ha puesto de manifiesto la bajada en la expresión del gen represor *rctA*, cuando se produce un aumento de expresión del gen *rctB* (mediado por la inserción Tn5.6 ó *rctB^c*). Estos resultados establecen a los productos de los genes *rctA* y *rctB* como elementos antagónicos en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*. Esto permite elaborar un modelo de actuación conjunta. En dicho modelo, en condiciones ambientales poco favorables para la transferencia, habría una ausencia del producto del gen *rctB*, lo que implica una fuerte expresión del gen *rctA*, el

Capítulo II

cual se encontraría reprimiendo los operones que median la transferencia conjugativa del plásmido.

En unas condiciones ambientales idóneas para la transferencia, y mediante un mecanismo aún desconocido, se produciría un incremento de la expresión del gen *rctB*. El producto de este gen mediaría su papel activador de los genes *tra* y *virB* de forma indirecta mediante una bajada en la expresión del represor RctA y por tanto mediante una des-represión de la transferencia del megaplásmido. La expresión del represor RctA, y por tanto, la transferencia del plásmido pRetCFN42d, dependería del equilibrio entre las diferentes cantidades del producto de los genes *rctA* y *rctB* dentro de la célula donadora en un momento determinado. La posibilidad de que el promotor de *rctB* sea del tipo σ -54 (González *et al.*, 2003), sugiere su activación por otros elementos aún desconocidos bajo condiciones ambientales todavía por identificar. Un esquema de este modelo se presenta en la Figura 2.19.

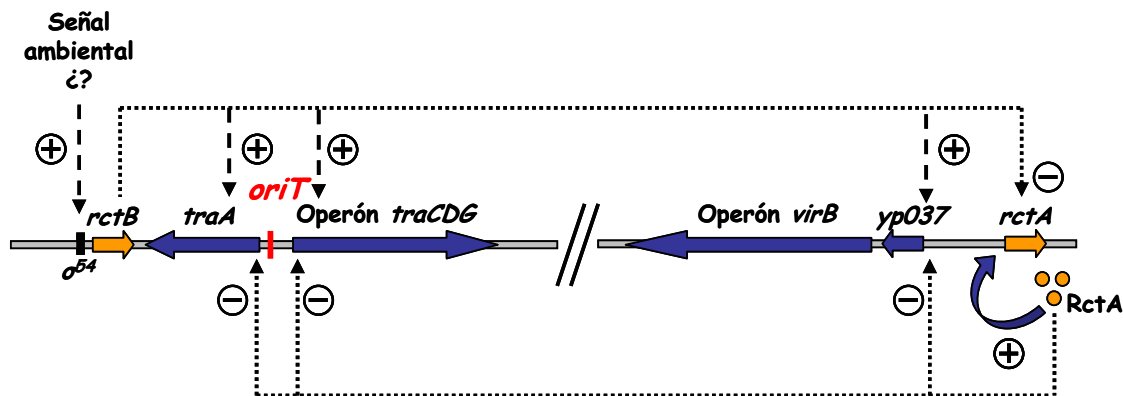


FIGURA 2.19. Modelo propuesto para la regulación de la transferencia.

(+), Activación génica; (-), Represión génica; σ^{54} , hipotético promotor sigma-54. En azul se representan los hipotéticos operones implicados en la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d, en naranja, los genes y proteínas reguladores.

La ausencia de motivos típicos de unión a ADN en el producto del gen *rctB*, hacen pensar que el efecto sobre la represión del gen *rctA* podría ser indirecto a través de otros elementos aún desconocidos, o mediante una interacción proteína-proteína RctB-RctA, donde la formación de este heterodímero impediría tanto la auto-inducción de *rctA*, como la represión por parte de RctA de las funciones de transferencia del plásmido, produciéndose en última instancia la transferencia conjugativa de éste.

Se han identificado otras inserciones con menos repercusión en la frecuencia de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*, como la Tn5.8 localizada en el

gen *yp055*, el cual presenta homología de secuencia y estructura con proteínas sensoras pertenecientes a sistemas reguladores de dos componentes. La identificación de este gen podría implicar el descubrimiento de elementos relacionados con la transducción de señales ambientales a la bacteria. Dichas señales podrían estar relacionadas directa o indirectamente con la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico.

La identificación de todas estas inserciones en el plásmido pRetCFN42d, capaces de promover su transferencia conjugativa, incluso desde cepas carentes de otros plásmidos (desde *R. etli* CFNX218Spc a GMI9023 de *A. tumefaciens* y viceversa), despeja cualquier sombra de duda sobre la capacidad autoconjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*, evidenciando que la ausencia de conjugación de estos plásmidos, en condiciones de laboratorio, se debe a estrictos fenómenos de regulación y no a una incapacidad de los mismos para transferirse.

El análisis *in silico* comparativo de los plásmidos pSymA y pRetCFN42d a nivel de los genes de transferencia, indica un alto nivel de similitud, tanto en la secuencia como en la sintenia de dichos genes. Ambos presentan los genes *tra*, supuestamente implicados en el procesamiento del ADN que va a ser transferido, en dos operones *traA* y *traCDG* entre los cuales se sitúa el hipotético *oriT*. Igualmente, presentan sendos T4SS de tipo *virB* (desde *virB1* hasta *virB11*) los cuales se piensa que podrían formar el sistema Mpf necesario para la transferencia del ADN hasta la célula receptora. Este operón *virB*, está en ambos plásmidos precedido por un gen que hipotéticamente se co-transcribe con dicho operón, el *yp037* y *SMa1322* en pRetCFN42d y pSymA, respectivamente. Aguas arriba de este operón se localizarían los genes *rctA* de estos plásmidos, los cuales se transcriben en dirección contraria a los respectivos operones *virB*. En ambos casos se ha demostrado el efecto represor de RctA sobre la expresión de los genes *tra* y *virB*.

Sin embargo, entre estos dos plásmidos existen también notables diferencias, sobre todo a nivel del sistema de regulación. Por una parte el plásmido pSymA carece de un gen con clara homología a *rctB* que presente una localización similar a la que presenta en el pRetCFN42d (adyacente a *traA*). Tampoco se ha podido identificar un gen promotor de la transferencia en el pSymA de *S. meliloti*. Igualmente, los intentos de identificar genes reguladores de la transferencia localizados en el pSymA, mediante la realización de mutagénesis al azar, fueron infructuosos. En este sentido, la mutagénesis al azar realizada sobre el mutante RctA⁻ ha sugerido la posible existencia de genes reguladores adicionales

Capítulo II

en el genoma de *S. meliloti*, que no se encontrarían en el propio pSymA, lo que dificulta en gran medida su localización mediante el tipo de selección utilizada.

Como se ha apuntado en esta tesis, la mutación en el gen *rctA* del plásmido pSymA, pese a provocar un aumento en la expresión de los genes de transferencia, no se traduce en la transferencia detectable de este megaplásmido desde el fondo genético de *S. meliloti*, al contrario de lo que ocurre con mutantes en el gen *rctA* del plásmido simbiótico de *R. etli*. La transferencia del plásmido pSymA, bajo el fondo genético de *S. meliloti*, cuando se encuentra presente el pRetCFN42d RctA⁻, abre la posibilidad de que en el plásmido pRetCFN42d RctA⁻ esté presente algún elemento o elementos que se encuentren ausentes en el pSymA o que estén presentes pero hayan perdido su funcionalidad en este plásmido, o bien estén regulados de forma diferente. Igualmente, la condición indispensable de que el plásmido simbiótico de *R. etli* presente una mutación en el gen *rctA* para promover la transferencia del plásmido pSymA, implica que la función o funciones que aporta el plásmido simbiótico de *R. etli* para la promoción de la transferencia del plásmido pSymA no son de tipo constitutivo, si no que están reguladas directa o indirectamente por *rctA*.

Los resultados obtenidos indican, por otra parte, que la transferencia del plásmido pSymA promovida por pRetCFN42d RctA⁻ no parece estar mediada por un fenómeno de cointegración, como lo ha demostrado la ausencia de co-transferencia de marcadores. Descartada la cointegración, y debido a la gran similitud de las funciones de transferencia presente entre estos dos plásmidos, el paso del plásmido pSymA a la célula receptora podría estar produciéndose por una movilización mediada por las funciones del plásmido pRetCFN42d RctA⁻. Sin embargo, la transferencia del plásmido pSymA RctA⁻ promovida por el plásmido simbiótico de *R. etli* es hasta 100 veces mayor que la del plásmido pSymA silvestre. Este resultado sugiere la implicación de las funciones de transferencia propias del plásmido pSymA RctA⁻ en la transferencia del megaplásmido de *S. meliloti*, dejando sólo probablemente en una menor medida (1×10^{-7}) la movilización por el pRetCFN42d RctA⁻, sin la actuación de dichas funciones.

Por otra parte, el otro representante del gen *rctA* presente en el plásmido críptico de *A. tumefaciens* pAtC58, codifica un hipotético represor que, al igual que el del plásmido pSymA, presenta una conservación en secuencia bastante alta con el RctA de *R. etli* (Figura 2.20). De igual manera, también es capaz de complementar un mutante *rctA* de pRetCFN42d bajo el fondo genético de *R. etli* (Tabla 2.6). Sin embargo, en este plásmido

este gen parece tener un “comportamiento” diferente al de los plásmidos pRetCFN42d y pSymA, ya que el pAtC58 parece tener capacidad autoconjugativa en condiciones de laboratorio (Rosenberg y Huguet, 1984; Chen *et al.*, 2002), a pesar de contar con un gen *rctA* funcional. La falta de complementación total de un mutante pRetCFN42d RctA⁻ con diferentes construcciones portadoras de dicho gen en *trans* (pJBRerctA y pTERerctA) bajo el fondo genético de *A. tumefaciens*, podría implicar la existencia de otros elementos de regulación en este fondo genético que interfirieran con RctA.

Recientemente, se ha presentado la secuencia parcial del genoma de una bacteria denominada *Mesorhizobium* sp. BNC1 (NZ_AAED00000000), formada por 23 “contigs” que conforman un total de 4922255 pb anotadas como secuencia cromosómica, donde se ha localizado un gen (MBNC02003764) cuyo hipotético producto presenta homología con las proteínas RctAs anteriormente descritas (Figura 2.20). Dicho gen, también se encuentra adyacente a un hipotético operón *virB* (genes del MBNC02003751 al MBNC02003762).

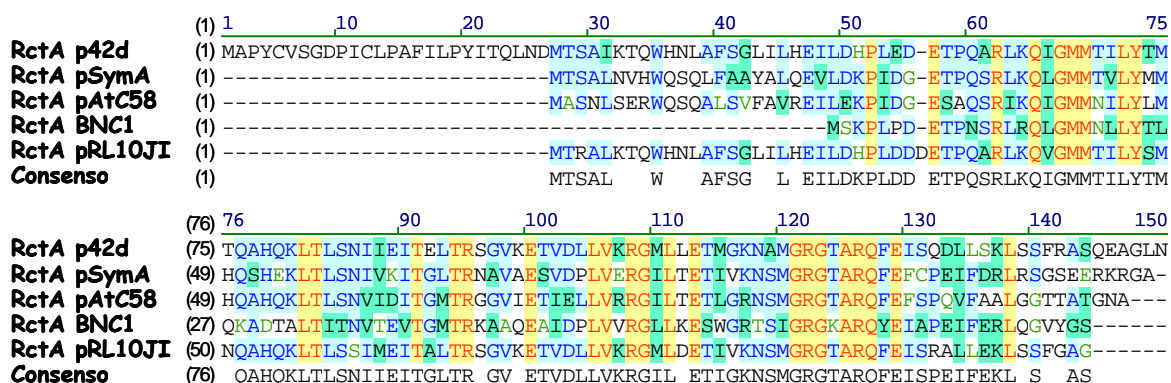


FIGURA 2.20. Alineamiento de los distintos RctAs encontrados en Rhizobiaceas.

En la figura se muestra el alineamiento de distintas proteínas que presentan altas similitudes con RctA de *R. etli*, entre paréntesis se indica la posición del residuo de partida. Rojo sobre amarillo = aminoácidos invariantes; azul sobre azul = fuertemente conservados; negro sobre verde = similares; verde sobre blanco = poco similares; Negro sobre blanco = no conservados. p42d, pRetCFN42d; BNC1, *Mesorhizobium* sp. BNC1; pRL10JI, plásmido simbiótico de *Rhizobium leguminosarum* 3841.

Igualmente se ha podido identificar un gen homólogo a *rctA* en el genoma de la cepa 3841 de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (Figura 2.20). La cepa 3841 es una cepa resistente a estreptomycin derivada de la cepa 300 de *R. leguminosarum*, cuyo genoma se encuentra en proceso de secuenciación y anotación en la actualidad. Presenta un cromosoma circular y 6 plásmidos cuyos tamaños varían en un rango de 140 a 870 Kb, aproximadamente (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Diferentes replicones de la cepa 3841 de *R. leguminosarum*.

Replicón	Tamaño en pb	%AT	contig
Cromosoma	5057142	38.9	>rhiz582d11.q1n
pRL12JI	870021	39.0	>rhiz132f09.p1k
pRL11JI	684202	39.0	>rhiz151g11.p1k
pRL10JI	488135	40.4	>rhiz137b04.p1k
pRL9JI	352782	39.0	>rhiz786b06.q1ka
pRL8JI	147463	41.3	>rhiz125e11.q1k
pRL7JI	-	-	-

El ensamblaje de la secuencia del plásmido de menor tamaño pRL7JI no se ha terminado.

El enfrentamiento de la secuencia del gen *rctA* a la base de datos provisional generada a partir de los “contigs” disponibles de esta cepa, ha permitido localizar un homólogo a este gen en el plásmido pRL10JI (Figura 2.20). Este plásmido ha sido anotado como el plásmido simbiótico de la cepa por portar los genes *nod* y *fix*. Sin embargo a diferencia de homólogos de *rctA* situados en otros plásmidos simbióticos del orden Rhizobiales, tales como el pSymA de *S. meliloti* y pRetCFN42d de *R. etli*, esta copia de *rctA* no parece localizarse adyacente a genes que codifican un T4SS. Estudios preliminares establecen a pRL10JI como un plásmido muy diferente de pRL1JI en cuanto a tamaño, grupo de incompatibilidad, genes implicados en el sistema de transferencia, y a otros genes no simbióticos se refiere. El pRL1JI es un plásmido simbiótico que fue aislado a partir otra cepa de *R. leguminosarum* biovar *viciae* diferente a la 3841, al cual se le ha asignado un sistema de transferencia regulado por “quorum sensing” (Wilkinson *et al.*, 2002; Danino, *et al.*, 2003). La ausencia de homólogos claros en pRL10JI a distintos genes implicados en el sistema de regulación por “quorum sensing”, junto con la presencia de un homólogo *rctA*, sugiere la existencia de sistemas de regulación de los genes de transferencia diferentes en estos dos plásmidos.

Por tanto, dentro de las bacterias del orden Rhizobiales, encontramos sistemas de regulación de las funciones de transferencia conjugativa adicionales a sistemas de regulación tipo “quorum sensing”, entre los que encontramos aquéllos en los que están implicados genes de la familia *rctA*. Estos sistemas noveles de regulación se caracterizan por su heterogeneidad, en cuanto su ubicación se refiere, localizándose homólogos *rctA* tanto en plásmidos simbióticos (como pSymA, pRetCFN42d,...), como no simbióticos

(como pAtC58) o incluso en localizaciones cromosómicas (*Mesorhizobium* sp. BNC1). Igualmente no parecen encontrarse restringidos a un pequeño grupo bacteriano, habiéndose encontrado homólogos a este gen en bacterias de distintos hábitat: en bacterias simbióticas (en los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*), patogénicas (como *Agrobacterium*) y bacterias implicadas en la degradación de compuestos xenobióticos como EDTA, NTA, DTPA (*Mesorhizobium* sp. BNC1), mostrando para este sistema regulatorio un cierto éxito evolutivo. Ni tampoco vinculado a un tipo de sistema conjugativo, ya que se han encontrado en plásmidos autotransferentes, como pRetCFN42d, y en plásmidos no autotransferentes, como el pRL10JI, el cual parece carecer de un T4SS codificado en su secuencia.

Igualmente, pese a su reciente descripción en esta tesis, el sistema de regulación de la transferencia del pRetCFN42d de *R. etli* en el que interviene el represor RctA, se muestra como un sistema de regulación de la transferencia conjugativa con entidad propia, con elementos diferentes a los sistemas regulatorios descritos con anterioridad. Este sistema presenta diferencias significativas con el sistema de regulación tipo “quorum sensing” ya que no parece depender de la densidad celular. Además, en el sistema de regulación “quorum sensing” el elemento activador (TraR) es el que activa la expresión de los genes de transferencia de forma directa, uniéndose a regiones de ADN específicas; actuando el represor (TraM) de forma indirecta sobre la expresión de dichas funciones mediante una interacción con TraR proteína-proteína en condiciones de baja densidad celular. En el sistema descrito para la regulación de la transferencia del plásmido simbiótico de *R. etli*, la situación parece ser la contraria, siendo el represor RctA el encargado de reprimir de forma directa las funciones de transferencia del plásmido, mientras que el activador RctB produce un incremento de la expresión de dichas funciones de forma indirecta, tal vez mediante una interacción proteína-proteína con RctA.

Al igual que en otros sistemas de regulación de la transferencia basados en elementos represores, tales como el del plásmido F y RP4, el sistema de regulación en el que se encuentra implicado *rctA* debe estar asociado a un sistema transductor de señales que permita optimizar las ventajas adaptativas de la transferencia, así como minimizar el coste metabólico del hospedador. Debido a heterogeneidad de localización demostrada por los sistemas reguladores en los que se encuentra implicado RctA, probablemente este sistema de regulación puede funcionar con distintos sistemas de transducción, sensibles a

Capítulo II

señales ambientales diferentes que optimicen la transferencia del plásmido en cuestión. En las bacterias simbiontes de leguminosas, es posible que estas señales provengan de la planta hospedadora, aunque no deben descartarse otras señales indicadoras del entorno rizosférico.

El hecho de que la mayoría de elementos simbióticos de rizobios (pSyms o islas simbióticas) presenten una nula o baja frecuencia de transferencia en condiciones de laboratorio, y la existencia, en al menos algunos de ellos, de sistemas represores de dicha transferencia, sugieren la importancia que para estas bacterias puede tener la donación de estos elementos. Debe tenerse en cuenta, que la adquisición de estos pSyms o islas simbióticas por otras bacterias, significa la generación de nuevas bacterias simbióticas, que desde el punto de vista del donador, suponen nuevos competidores por la nodulación y el establecimiento en simbiosis con una misma planta hospedadora.

ANEXO CAPÍTULO II

Anexo 2.1. Construcción del clon pJBRerctA

Para la construcción del clon, se diseñaron 2 cebadores específicos que amplificaban el Orf de *rctA* y su zona promotora a partir de ADN genómico de la cepa CE3 (desde la posición 166815 hasta 167565 del plásmido simbiótico, número de acceso NC_004041; González *et al.*, 2003):

pJBRerctA-F TTATCTAGACCCGCATCGCAATAATAGG

pJBRetrctA-R TTATCTAGACGAAAATCAGTCAGTTT

El fragmento amplificado de 750pb se clonó gracias a las dianas *XbaI* (subrayadas en la secuencia) en el vector pJB3Tc19 previamente linearizado con la misma enzima.

Anexo 2.2. Construcción del clon pTERerctA

Para la construcción de este clon se partió del amplificado de 750pb obtenido con los cebadores pJBRerctA-F y pJBRetrctA-R (ver Anexo 2.1), el cual se clonó directamente con extremos romos en el vector pUC18 linearizado con *SmaI* dando lugar al plásmido pUC18RerctA. El Orf del gen *rctA* se extrajo digiriendo la construcción obtenida con la enzima *BamHI*, aprovechando una diana existente 10 pb antes del codon ATG (inicio de la traducción) de *rctA* y la diana del *BamHI* del vector pUC18. El fragmento generado se clonó en el vector pTE3 previamente linearizado con la enzima *BamHI*, dando lugar al plásmido pTERerctA que contenía el gen *rctA* en sentido orientado con respecto al promotor del *trp* del vector.

Anexo 2.3. Construcción del clon pTEAtrctA

Para la construcción de este clon se llevó a cabo el diseño de cebadores específicos para su amplificación. Mediante el uso de los cebadores:

AtrctA-F CTGCAGCGACTCAGCACAATTATT

AtrctA-R GGATCCGTCCACATTGAATACTGT

Se realizó la amplificación del gen *Atu5160* (17743578) de *A. tumefaciens* (desde la posición 159831 hasta 159381 del plásmido pAtC58; número de acceso AE008687). La

Anexo Capítulo II

clonación del gen se llevó a cabo de forma dirigida en el vector pTE3 digerido como *PstI/BamHI*, gracias a la dianas para las enzimas *PstI* (subrayadas en las secuencia del cebador AtrctA-F) y *BamHI* (subrayadas en las secuencia del cebador AtrctA-R)

Anexo 2.4. Construcción del clon pTESmrctA

Para la construcción de este clon se llevó a cabo el diseño de cebadores específicos para su amplificación. Mediante el uso de los cebadores:

SmrctA-F CTGCAGCGACTCGTTTTACAATCAT

SmrctA-R GGATCCGGTTTAGTATGGCAACGC

se llevo a cabo la amplificación del gen *SMA1323* (1235757) de *S. meliloti* (desde la posición 721397 hasta 721827 del plásmido pSymA, número de acceso NC_003037. La clonación del gen se realizó de forma dirigida en el vector pTE3 digerido como *PstI/BamHI*, gracias a la dianas para las enzimas *PstI* (subrayadas en las secuencia del cebador SmrctA-F) y *BamHI* (subrayadas en las secuencia de el cebador SmrctA-R).

Anexo 2.5. Construcción del mutante *rctA* de *S. meliloti*

Para la mutagénesis del gen *rctA* del pSymA de *S. meliloti* se diseñaron 4 cebadores específicos (ver Figura 2.12):

SmrctA-1 TTACCCGGGGATGGCTCAGTACCACACC
SmaI

SmrctA-2 TTATCTAGACATGGATCCTCATGAACACGTCTCTC
XbaI *BamHI*

SmrctA-3 TTAGGATCCGCGTTGCCATACTAAAC
BamHI

SmrctA-4 TTAAAGCTTCATGATATCCGTCTTCGTCCTCACAAA
HindIII *EcoRV*

Mediante el uso de la pareja de cebadores SmrctA-1 y SmrctA-2 se amplificó un fragmento de 525 pb (desde la posición 720816 hasta 721341 del plásmido pSymA, (NC_003037; (Galibert *et al.*, 2001) denominado fragmento L-SmrctA. Dicho fragmento

se clonó en pGem-T, y posteriormente fue escindido mediante la digestión *XbaI/SmaI* y clonado en el vector pUC18, generando la construcción pUCSmrctA-L. De forma paralela, mediante el uso de la pareja de cebadores SmrctA-3 y SmrctA-4 se amplificó un fragmento de 913 pb (desde la posición 721810 hasta 722723 del plásmido pSymA, (NC_003037; (Galibert *et al.*, 2001) denominado fragmento R-SmrctA. Dicho fragmento se clonó en pGem-T, y posteriormente fue escindido mediante la digestión *HindIII/BamHI* y purificado. Posteriormente se llevó a cabo una ligación triple con los fragmentos: R-SmrctA (digerido *HindIII/BamHI*) + casete Sm/Spc (digerido *BamHI*) + la construcción pUCSmrctA-L (digerida con *BamHI/HindIII*). Se transformaron células competentes DH5 α seleccionando en medio LB adicionado con Ap (resistencia del vector), Sm y Spc (ambas resistencias proporcionadas por el casete). Varios transformantes fueron verificados mediante perfiles de restricción *BamHI/HindIII*. Una vez comprobada la construcción (pUCSmrctA-LCR), el inserto de dicha construcción (SmrctA-LCR) se escindió mediante una digestión *SmaI/EcoRV* y se clonó en el vector pSUP202 con extremos *EcoRI* rellenos (ver material y métodos). La construcción resultante pSUPSmrctA-LCR se introdujo en la cepa movilizadora S17.1 de *E. coli* y se conjugó con las cepas 1021 y GR4 de *S. meliloti*, seleccionándose en medio TY Sm^R/Spc^R. Las bacterias que portaban recombinaciones dobles, y por tanto mutantes en el gen *rctA*, se diferenciaron de las que portaban simples integraciones del plásmido pSupSmrctA-LCR (con una copia mutante y otra silvestre del gen *rctA*) por la incapacidad de aquéllas para crecer en medio suplementado con Tc. Varios de estos mutantes de GR4 y 1021 de *S. meliloti* fueron comprobados tanto por PCR, con el empleo de los cebadores SmrctA-1 y SmrctA-4, como por hibridación (ver Figura 2.13).

Anexo 2.6. Construcción de fusiones *traA::gus* y *traC::gus* de *S. meliloti*

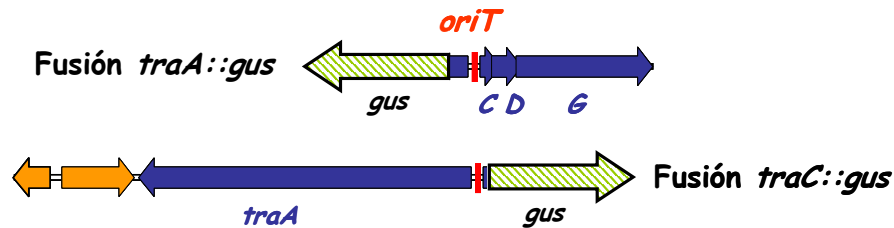
Para llevar a cabo el estudio de expresión de los genes *traA* y *traC* se empleó el gen reportero *gus* del plásmido p53Gus. Para ello se diseñaron 2 cebadores específicos para la amplificación de la región intergénica *traA-traC* de 481 pb (del 515367 al 515848 de la secuencia del pSymA, Galibert *et al.*, 2001) que contiene los teóricos promotores para dichos genes:

SmTra-1 TCTAGA GTCGACCTCCTCAGTGATCTCCA
 XbaI *SalI*

Anexo Capítulo II

SmTra-2 GAATTCTCATGCACCAGTTCGGA
 EcoRI

El fragmento amplificado por PCR fue clonado directamente en el vector pGemT. Posteriormente dicho fragmento fue escindido mediante las digestiones *XbaI/EcoRI* y *SalI/EcoRI*, lo que permitió la clonación independiente de este fragmento en las dos orientaciones en el plásmido p53gus. De esta manera se generaron dos clones en cada uno de los cuales el gen reportero *gus* quedaba bajo la influencia de un promotor diferente (*traA* o *traC*).



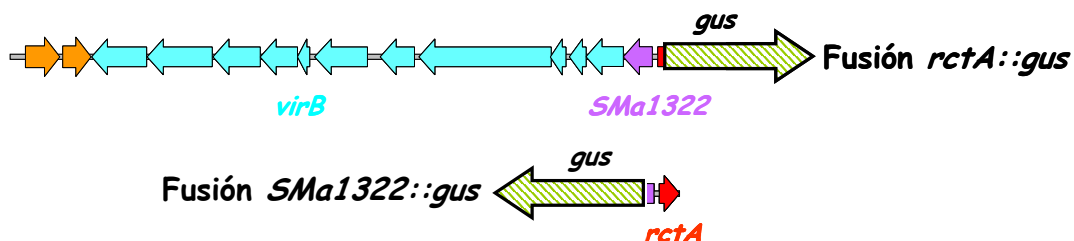
Anexo 2.7. Construcción de las fusiones *SMa1322::gus* y *rctA::gus* de *S. meliloti*

Se diseñaron 2 cebadores específicos para la amplificación de la región intergénica *SMa1322-rctA* de 378 pb (del 721227 al 721605 de la secuencia del pSymA, (Galibert *et al.*, 2001) que contienen los teóricos promotores para dichos genes:

SmVirB-1 TCTAGA GTCGACACAGGATAACCTGGCAT
 XbaI *SalI*

SmVirB-2 GAATTCAGCGTTAGCTTTTCGTGAC
 EcoRI

El fragmento amplificado por PCR fue clonado directamente en el vector pGemT. Posteriormente dicho fragmento fue escindido mediante las digestiones *XbaI/EcoRI* y *SalI/EcoRI*, lo que permitió la clonación independiente de este fragmento en las dos orientaciones en el plásmido p53gus. De esta manera se generaron dos clones en cada uno de los cuales el gen reportero *gus* quedaba bajo la influencia de un promotor diferente (*SMa1322* o *rctA*).



CAPÍTULO III

3. RELAXASA DEL PLÁSMIDO SIMBIÓTICO DE *R. etli*: IMPLICACIONES EVOLUTIVAS EN PLÁSMIDOS DEL ORDEN RHIZOBIALES

La relaxasa es la proteína clave que forma parte del complejo nucleoproteico conocido como relaxosoma, que está directamente implicada en el reconocimiento, corte y transferencia conjugativa de un determinado ADN entre dos células. La relaxasa, junto con otras proteínas accesorias, reconoce una secuencia específica en el ADN que va a ser transferido, que es conocida como origen de transferencia (*oriT*), siendo ésta la única función en *cis* necesaria para la transferencia conjugativa de un determinado ADN (Lanka y Wilkins, 1995). Dentro de este *oriT* se encuentra el punto de inicio de la transferencia o sitio *nic*, punto exacto donde se va a producir la rotura del enlace fosfodiéster de la hebra de ADN que será transferida, covalentemente unida a la relaxasa, hasta la célula receptora.

La secuenciación del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* pRetCFN42d (González *et al.*, 2003) ha revelado la existencia una región *mob* compuesta por los genes *traA* y *traCDG* que se transcriben de forma divergente y entre los cuales se situaría un hipotético *oriT* (véase Figura 2.1). El gen *traA* codificaría la hipotética relaxasa del plásmido (1552 aminoácidos) que junto con el producto de los genes *traC* y *traD* formarían parte del relaxosoma. La proteína TraG, hipotética proteína acopladora del plásmido, conectaría el complejo ADN-relaxasa con el sistema T4SS implicado en el transporte a la célula receptora.

Este mismo esquema de la región Dtr (genes *traA* y *traCDG*) se encuentra en otros plásmidos del orden Rhizobiales como pSymA y pAtC58 de *S. meliloti* y *A. tumefaciens*, respectivamente. Los tres plásmidos presentan sendos genes *traA*, con un nivel de conservación de secuencia superior al 70% (Tabla 3.1). Igualmente, como se muestra en el capítulo 2, existen genes reguladores conservados en estos tres plásmidos, como *rctA*, que son funcionalmente activos en la represión de la transferencia del plásmido pRetCFN42d (Tabla 2.6, Capítulo 2). Estos resultados sugieren una similitud entre los sistemas de transferencia de los plásmidos pRetCFN42d, pSymA y pAtC58.

Capítulo III

TABLA 3.1. Conservación de secuencias entre TraA de pRetCFN42d y otras proteínas en las bases de datos.

<i>Cepa</i>	<i>Proteína</i>	<i>Tamaño proteína</i>	<i>Gen</i>	<i>Plásmido</i>	<i>N° de Aas sobre los que se expresan los datos de similitud</i>	<i>S(%)</i>	<i>I(%)</i>
<i>S. meliloti</i>	TraA2	1539	traA2	pSymB	1552	86	75
<i>S. meliloti</i>	TraA1	1539	traA1	pSymA	1550	85	75
<i>A. tumefaciens</i>	TraA	1609	traA	pAtC58	1552	83	71
<i>A. tumefaciens</i>	TraA	1194	tiorf109	pTi-Sakura	1278	54	39
<i>R. etli</i>	TraA	1103	traA	pRetCFN42a	788	62	46
<i>A. rhizogenes</i>	TraA	1108	riorf112	pRi1724	796	62	45
<i>A. tumefaciens</i>	TraA	1100	traA	pTiC58	786	61	46
<i>Rhizobium sp</i>	TraA	1102	traA	pNGR234a	786	61	45
<i>P. aeruginosa</i>	TraA	1173	traA	pKLC102	979	50	37
<i>M. loti</i>	TraA	1015	mll5729	Cromosoma	811	52	37
<i>M. loti</i>	TraA	1015	mll0964	Cromosoma	819	52	36

La conservación de secuencia entre diferentes hipotéticas relaxasas bacterianas con la relaxasa TraA del plásmido simbiótico de *R. etli* se indica en % de similitud e identidad. *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *M. loti*, *Mesorhizobium loti*; Aas, aminoácidos; S, similitud; I, identidad.

3.1. Caracterización de la proteína TraA del plásmido simbiótico de *R. etli*

Los resultados de la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína TraA del plásmido simbiótico de *R. etli* con la secuencias de otras proteínas depositadas en las bases de datos se muestran en la Tabla 3.1. Las mayores similitudes (superiores al 50%) se establecen entre las hipotéticas relaxasas de bacterias del orden Rhizobiales. A diferencia de relaxasas más estudiadas de plásmidos de otros grupos como RP4, F, R388, RSF1010 o ColE1, la actividad relaxasa que interviene en la transferencia conjugativa de los megaplásmidos simbióticos o tumorigénicos de bacterias del orden Rhizobiales ha sido muy poco estudiada. Los pocos datos existentes se centran en la hipotética relaxasa TraA del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, proteína implicada en la transferencia conjugativa del plásmido Ti entre bacterias. Basado en el análisis de su secuencia esta proteína se ha descrito como una proteína quimérica, en términos evolutivos, entre relaxasas tipo MobA y tipo TraI de los plásmidos RSF1010 (IncQ) y F (IncF), respectivamente (Farrand *et al.*, 1996). Esto se debe a que esta proteína presenta alta homología en su región amino terminal (N-terminal, primeros 350 aminoácidos) con el dominio relaxasa de la proteína MobA (RSF1010), presentando, sin embargo, una alta homología con el dominio helicasa

de TraI (F) en el segmento comprendido entre los 380 y 900 aminoácidos de la secuencia proteica (Farrand *et al.*, 1996). La co-evolución existente entre los dominios relaxasa de estas proteínas y los respectivos sitios *nic* sobre los que actúan, es consecuente con el hecho de que se haya descrito la existencia de una alta homología entre el hipotético *oriT* del plásmido Ti de *A. tumefaciens* y el del plásmido RSF1010 (Cook y Farrand, 1992).

Teniendo en cuenta los precedentes existentes que situaban al dominio relaxasa de la proteína TraA del plásmido pTiC58 en el extremo N-terminal, y a la vista de la alta homología entre esta proteína y TraA del plásmido pRetCFN42d, se llevó a cabo un alineamiento entre las secuencias del extremo N-terminal (300 aas) de las proteínas MobA (RSF1010), de TraA (pRetCFN42d) junto con las proteínas de la tabla 3.1 (Figura 3.1). Los motivos localizados en la parte N-terminal de la proteína TraA del plásmido pRetCFN42d, presentan un alto grado de conservación con dominios relaxasa de otras proteínas que han demostrado tener actividad relaxasa (p.e., MobA del plásmido RSF1010). Este alineamiento sugiere que dicha actividad reside dentro de los 300 aminoácidos N-terminales de TraA.

Al igual que la proteína TraA del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Farrand *et al.*, 1996), la proteína TraA del plásmido pRetCFN42d, presenta en su parte central (entre los aminoácidos 300 y 800 de su secuencia proteica) motivos conservados con los dominios helicasa de varias relaxasas como TraI (relaxasa del plásmido F) y TrwC (relaxasa del plásmido R388). Se han encontrado hasta 5 motivos diferentes descritos como motivos típicos de proteínas que presentan actividad helicasa (Caruthers y McKay, 2002) en la secuencia aminoacídica de TraA del plásmido pRetCFN42d, entre los cuales se encuentran los motivos de unión a NTPs (Walker A y Walker B, Walker *et al.*, 1982), característicos de proteínas que hidrolizan ATP y frecuentes en helicasas (Figura 3.2).

La región carboxilo terminal de la proteína TraA (del aminoácido 800 al 1553), si bien presenta cierta homología con varias proteínas con actividad primasa (p.e. hipotética primasa del plásmido CTX-M3, NP_775016), no se han podido determinar en ella los motivos específicos descritos para este tipo de proteínas (Strack *et al.*, 1992; Frick y Richardson, 2001). Esta región C-terminal con cierta homología con primasas está ausente en la proteína TraA del plásmido Ti y otras teóricas relaxasas de la familia *Rhizobiaceae*. Tan sólo las hipotéticas relaxasas (TraA1 y TraA2) de los plásmidos simbióticos de *S.*

Capítulo III

meliloti y del plásmido críptico pAtC58 de *A. tumefaciens* parecen tener conservado este fragmento C-terminal presente en TraA del plásmido pRetCFN42d.

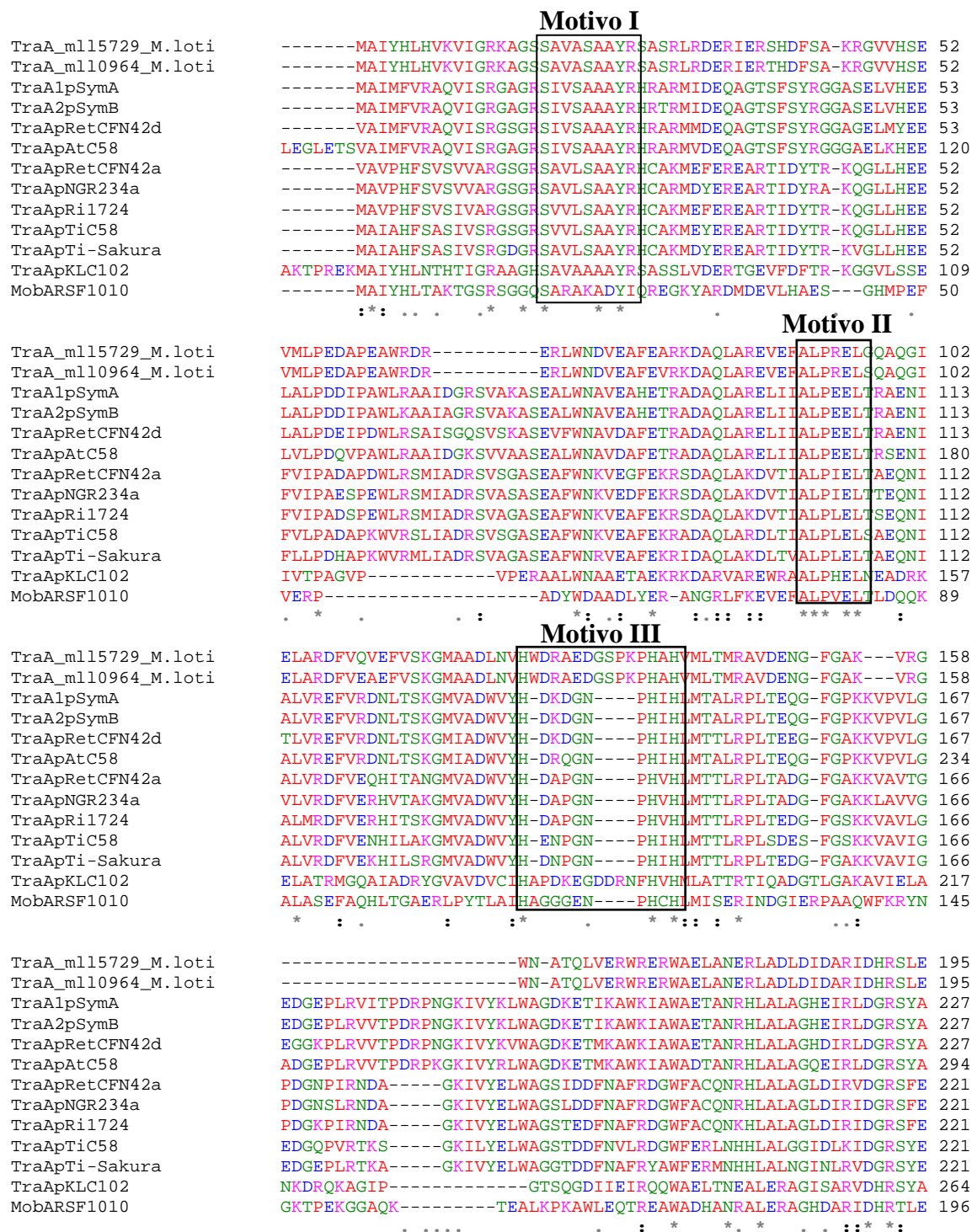


FIGURA 3.1. Alineamiento de dominios relaxasa.

En la figura se muestra un fragmento del alineamiento realizado entre los 300 aminoácidos N-terminales de la proteína TraA del plásmido pRetCFN42d, de la relaxasa MobA del plásmido RSF1010 y las hipotéticas relaxasas de la Tabla 3.1. Se muestran los 3 motivos del dominio relaxasa descrito en estas proteínas (Francia *et al.*, 2004). El alineamiento fue realizado con el programa ClustalW.

	Walker A		Walker B	
TraA (pRetCFN42d)	(412)	AIVGLAGAGKSTL	(425)	(482) DVLVIDEAGM (491)
TrwC (R388)	(493)	GVQGFAGTGKSHM	(505)	(564) TVLVIDEAGV (573)
Tral (F)	(989)	VVQGYAGVGKTTQ	(1001)	(1065) TLFLLDESSM (1074)
Consenso		AVQGFAG GKSTL		TVLVIDEAGM

FIGURA 3.2. Motivos de unión a NTPs.

En la figura se muestran los motivos Walker A y Walker B presentes en los dominios helicasa de las relaxasas TrwC, Tral y TraA de pRetCFN42d.

Para intentar establecer relaciones filogenéticas entre los sistemas de transferencia conjugativa de los megaplásmidos de bacterias del orden Rhizobiales, se llevó a cabo un breve análisis filogenético molecular mediante el empleo del programa Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Como se ha dicho anteriormente, la relaxasa es una de las proteínas clave en el proceso de transferencia conjugativa de un determinado ADN, la cual está presente en todos los sistemas de transferencia mediados por conjugación. Se trata por tanto de la proteína ideal para establecer relaciones filogenéticas entre distintos sistemas conjugativos. Debido al papel crucial que presenta el dominio relaxasa para el reconocimiento del sitio *nic* dentro de este tipo de proteínas, se obtuvieron dos árboles filogenéticos diferentes. Uno mediante el uso de la totalidad de las secuencias aminoacídicas de cada una de las relaxasas (Figura 3.3), y el segundo mediante el empleo de los 300 aminoácidos N-terminales, donde aparentemente se localizan los dominios relaxasa de estas proteínas (Figura 3.4).

En estos árboles filogenéticos podemos diferenciar las relaxasas de 5 grupos de plásmidos: de los grupos de incompatibilidad IncF e IncP, los más alejados filogenéticamente a la relaxasa de estudio, del grupo IncQ, cuyo representante es el plásmido movilizable RSF1010, y de los plásmidos del orden Rhizobiales, formado por dos subgrupos a su vez bien diferenciados: por una parte están los plásmidos crípticos como el pRmeGR4a o pMLa de *S. meliloti* y *Mesorhizobium loti*, respectivamente, o los recientemente identificados plásmidos crípticos aislados de la rizosfera de leguminosas como pIPO2 y pSB102, muchos de los cuales han demostrado tener relaxasas y *oriTs* con semejanzas con el plásmido RP4 (Schneiker *et al.*, 2001; Tauch *et al.*, 2002; Herrera-Cervera *et al.*, 1998), y por otra parte están los plásmidos simbióticos, tumorigénicos, pertenecientes a islas simbióticas y algún plásmido críptico presente en Rhizobiaceas. Dentro de esta segunda rama se establece un subgrupo formado por la relaxasa TraA del

plásmido simbiótico de *R. etli*, las relaxasas TraA1 y TraA2 de los plásmidos simbióticos de *S. meliloti* y la relaxasa del plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens*.

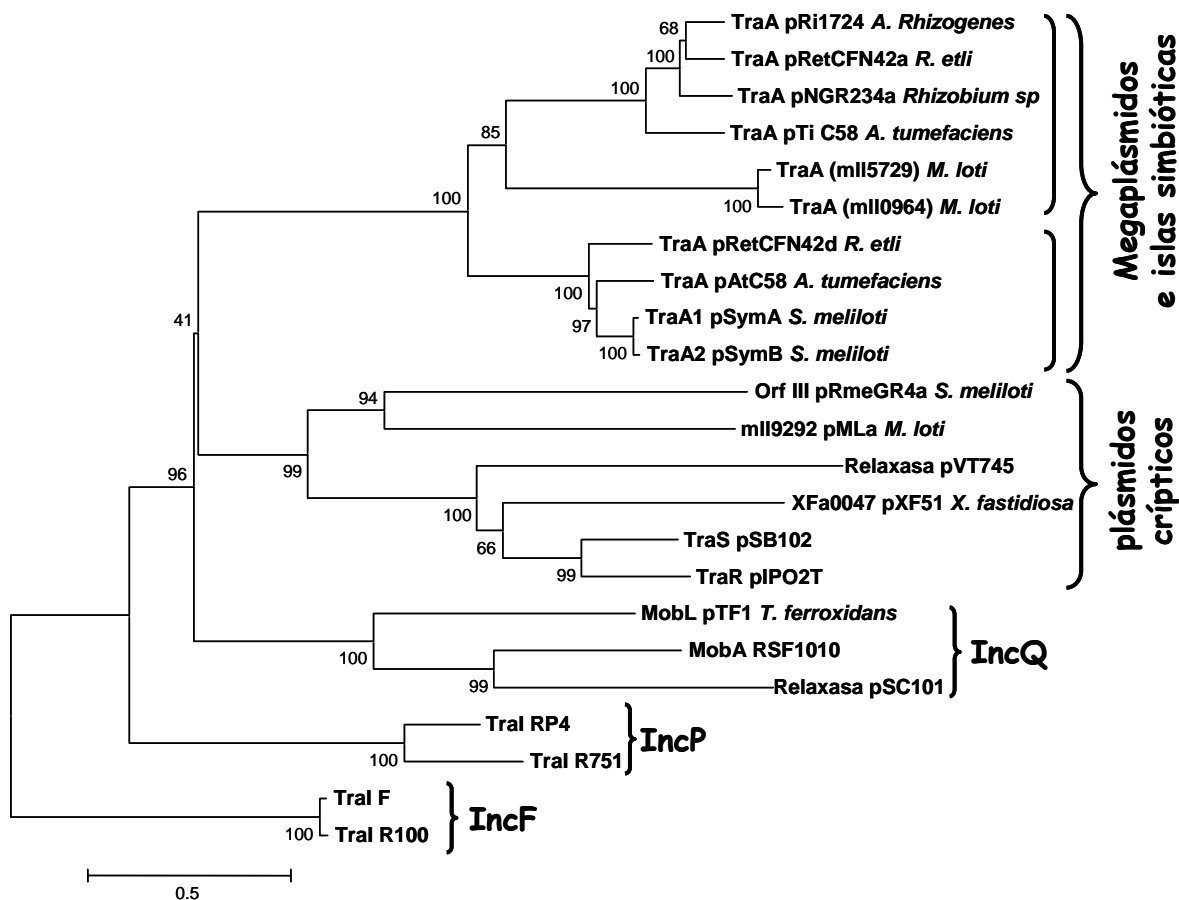


FIGURA 3.3. Árbol filogenético de relaxasas.

En la figura se muestra el árbol filogenético obtenido tras el alineamiento de la totalidad de las secuencias de aminoácidos de diferentes relaxasas. Realizado mediante Neighbor-joining utilizando como método de distancia la corrección de Poisson y un número de 2000 repeticiones (Bootstrap). Se indican los grupos de incompatibilidad (Inc) y/o el tipo de los diferentes plásmidos a los que pertenecen las relaxasas.

Cuando se utilizan solamente las secuencias de los dominios relaxasa para la construcción del árbol, existe un acercamiento del grupo de relaxasas pertenecientes a los plásmidos IncQ con respecto al grupo de relaxasas de los megaplásmidos del orden Rhizobiales, tal y como muestran los 2 árboles filogenéticos generados. Este acercamiento origina además, una subida del valor de bootstrap (del 41% al 100%) existente entre las ramas “IncQ” y los plásmidos del orden Rhizobiales (comparar Figura 3.3 con Figura 3.4), mostrando la gran similitud existente entre los dominios N-terminales de las relaxasas de estos dos grupos de plásmidos.

Para profundizar en un mayor conocimiento sobre las relaxasas presentes en los megaplásmidos del orden Rhizobiales y el sitio *nic* sobre el que actúan, se realizó un estudio *in vivo* e *in vitro* de la actividad de la proteína TraA del plásmido simbiótico de *R. etli*.

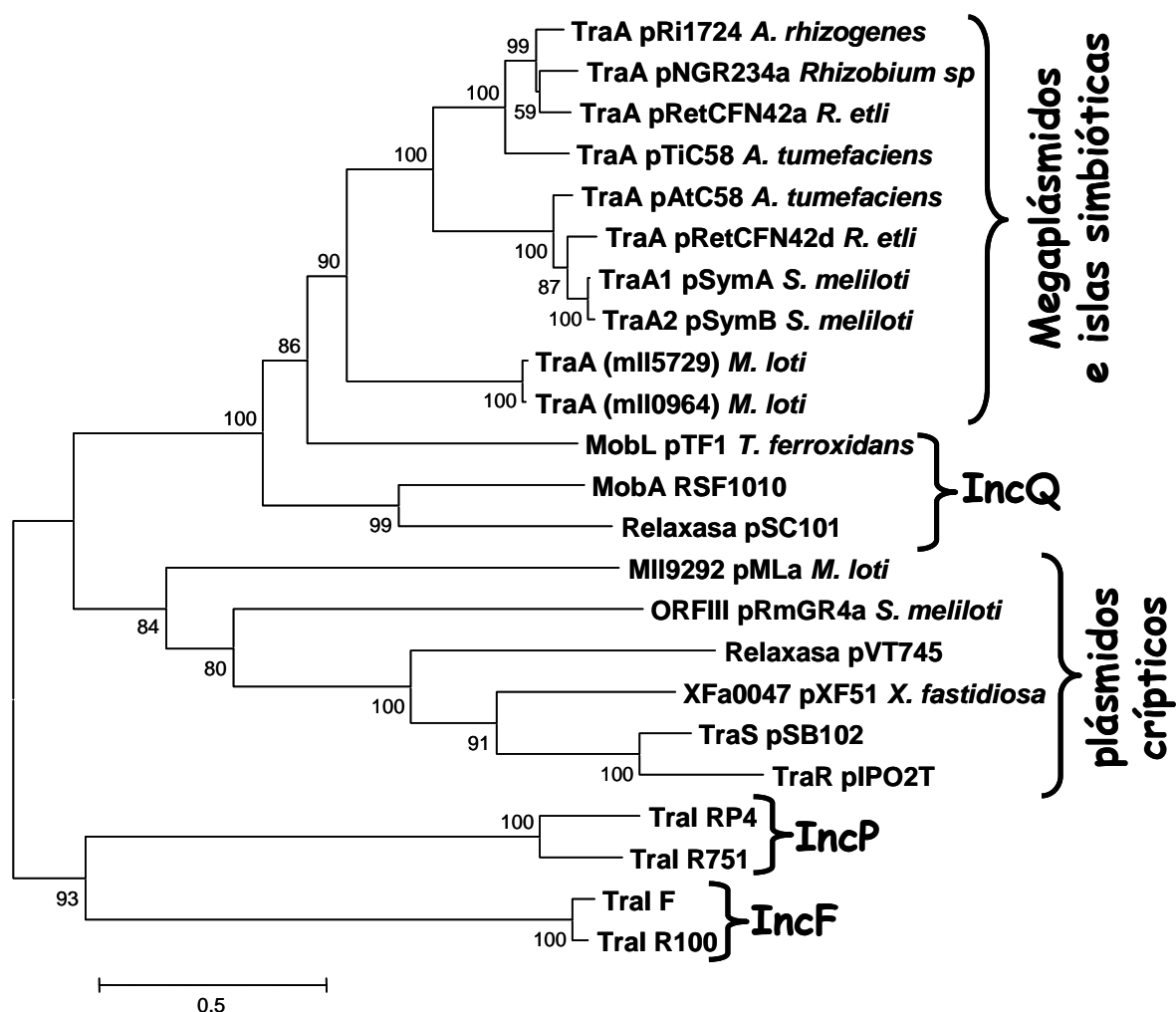


FIGURA 3.4. Árbol filogenético de los dominios relaxasa.

En la figura se muestra el árbol filogenético obtenido tras el alineamiento de los 300 aminoácidos N-terminales de la secuencia de diferentes relaxasas. Realizado mediante Neighbor-joining utilizando como método de distancia la corrección de Poisson y un número de 2000 repeticiones (Bootstrap). Se indican los grupos de incompatibilidad (Inc) y/o el tipo de los diferentes plásmidos donde se localizan las relaxasas.

3.2. Estudio *in vitro*

3.2.1. Purificación del dominio relaxasa de la proteína TraA

Para la sobre-expresión de *traA* del plásmido pRetCFN42d, se optó por el sistema comercial de vectores de expresión Novagen®. Este sistema consiste en un grupo de vectores de expresión en los cuales el gen problema se establece bajo un promotor que es

Capítulo III

reconocido específicamente por la RNA polimerasa del fago T7. Por tanto, dichos genes problema se encuentran virtualmente reprimidos en cepas carentes de esta polimerasa específica, evitando la inestabilidad plasmídica originada por la producción de proteínas potencialmente tóxicas para la bacteria hospedadora. Una vez establecida la construcción del vector con el gen a sobre-expresar, esta construcción es transferida a una cepa de expresión, que se caracteriza por poseer una copia cromosómica de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG. Alternativamente, la RNA polimerasa del fago T7 puede ser suministrada tras la infección de la cepa hospedadora con el fago λ CE6. Con dicho sistema, el producto del gen clonado puede llegar a representar más del 50% de la proteína celular total.

Para la sobre-expresión del gen *traA* del plásmido pRetCFN42d de *R. etli* se realizó la construcción pETtraAp42d en la que el gen *traA* fue clonado bajo el control de un promotor reconocido específicamente por la polimerasa T7 (ver Anexo 3.1). Posteriormente se introdujo esta construcción en distintas cepas de expresión de *E. coli* C41(DE3), C43(DE3) y BL21(DE3) pLacI, todas ellas portadoras de la RNA polimerasa del fago T7. Las cepas C41(DE3) y C43(DE3) son cepas mutantes derivadas de BL21(DE3) seleccionadas por su capacidad de sobre-expresar proteínas potencialmente tóxicas para la cepa de la que derivan (Miroux y Walker, 1996). De todas las cepas empleadas, tan sólo se obtuvieron transformantes de la cepa BL21(DE3)pLacI (Novogene[®]). Esta cepa se caracteriza por tener minimizada la expresión del gen diana en ausencia del inductor específico (IPTG), dado que tiene incrementada la producción del represor LacI que opera sobre el sistema inducible. El hecho de que sólo se obtuvieran transformantes cuando se usó esta cepa hacía pensar que la expresión del gen *traA*, incluso a niveles basales, podía estar provocando algún fenómeno de toxicidad. Para esclarecer este punto, varios transformantes BL21(DE3)pLacI portadores de la construcción pTEtraAp42d fueron inducidos con IPTG llevándose a cabo el análisis de expresión proteica en medio líquido, mediante geles SDS-PAGE. Ninguno de los intentos llevados a cabo mediante modificaciones en diferentes factores implicados en la sobre-expresión, como son la densidad óptica del cultivo en el momento de la inducción, el tiempo de sobre-expresión, la velocidad de crecimiento del cultivo o diferentes cantidades del inductor, tuvieron como resultado la detección de la expresión de la proteína TraA en la cepa BL21(DE3)pLacI.

En la literatura existen precedentes que describen al dominio relaxasa (en concreto, los 243 aminoácidos N-terminales) de la relaxasa MobA de RSF1010 como un dominio activo separado del resto de la proteína (Scherzinger *et al.*, 1992). Con estos antecedentes, y debido a la incapacidad de sobre-expresar la totalidad de la proteína, se procedió a intentar la purificación de los 265 aminoácidos N-terminales de la proteína TraA del plásmido pRetCFN42d de *R. etli*. Dicho fragmento contiene los motivos típicos de un dominio relaxasa (Figura 3.1). Para la purificación de este fragmento se construyeron dos clones, pETN265TraA y pETN265TraAHis (ver Anexos 3.2 y 3.3). En este último se conseguía una proteína de fusión con 6 histidinas en el extremo C-terminal que facilitaría su purificación mediante una columna de níquel (Figura 3.5 en Anexo 3.3, ver Material y Métodos apartado 3.13.2.2.). Se obtuvieron así dos construcciones para sobre-expresar el producto proteico codificado por los 795 nucleótidos iniciales del gen *traA*. Una vez conseguidas las construcciones se secuenciaron completamente sus insertos mediante cebadores específicos del vector, comprobando así que ambas construcciones eran correctas. Posteriormente se introdujeron en las cepas de expresión de *E. coli* C41(DE3), C43(DE3) y BL21(DE3)pLacI. Varios transformantes de cada una de las cepas fueron inducidos con IPTG, llevándose a cabo el análisis de expresión proteica en medio líquido y posterior electroforesis en geles SDS-PAGE. En todas las cepas se observó la sobre-expresión de un polipéptido de unos 30 kilodaltons (kDa) (Figura 3.6) que se correspondía con el tamaño estimado.

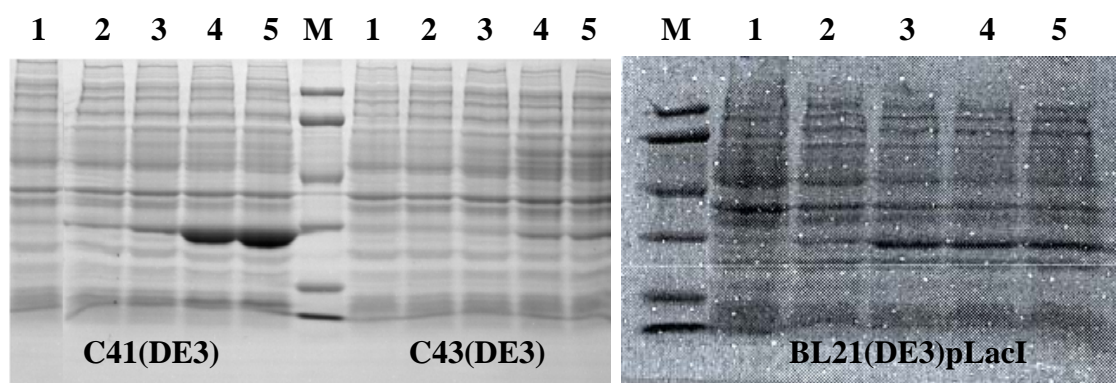


FIGURA 3.6. Sobre-expresión de la construcción pTEN265TraA en distintas cepas de *E. coli*
 Carriles: 1, cepa con el vector pET3a; 2-5, cepa con la construcción pETN265TraA; 2, justo antes de la adición del inductor (IPTG); 3, 1 hora después de la inducción; 4, 3 horas después de la inducción; 5, 4 horas después de la inducción; M, Marcador de bajo peso molecular (BioRad®).

Tanto con la construcción pETN265TraA (Figura 3.6) como con la construcción pET265TraAHis (datos no mostrados), la cepa C41(DE3) mostró una mayor sobre-

Capítulo III

expresión y por tanto se eligió ésta para el proceso de purificación del dominio relaxasa de la proteína TraA de *R. etli*. Los mejores resultados de sobre-expresión de esta cepa se establecieron con crecimiento en LB a 37° C, inducción con IPTG a una concentración final de 0,5 mM, cuando el cultivo se encuentra a una densidad óptica a 600nm de 0,6, recogiendo el cultivo 4 horas después de la inducción. Una vez optimizados los parámetros de la sobre-expresión de la proteína, se llevó a cabo una prueba de solubilidad para determinar si los polipéptidos N265TraA y N265TraAHis se encontraban en la fracción soluble. El ensayo se realizó con diferentes concentraciones de NaCl para intentar maximizar la solubilización de los polipéptidos sobre-expresados. La fracción soluble de la cantidad total de N265TraA (Figura 3.7) y N265TraAHis (datos no mostrados) demostró ser mínima, lo que sugería que la mayor parte de la proteína precipitaba.

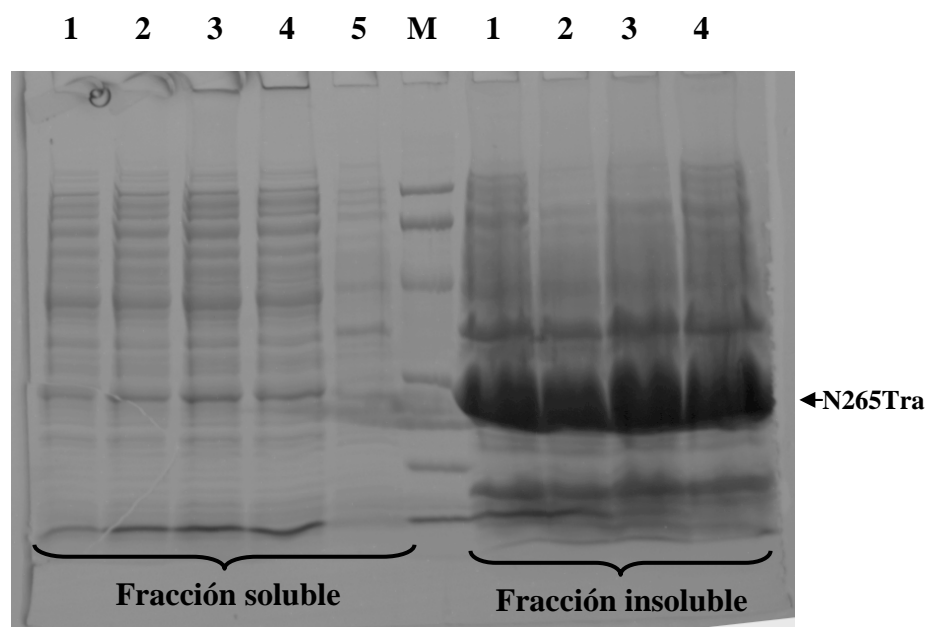


FIGURA 3.7. Prueba de solubilidad de N265TraA.
Carriles 1, 0 M NaCl; 2, 0,5 M de NaCl; 3, 1M de NaCl; 4, 2 M de NaCl; 5, Control (C41pET3a); M, Marcador de bajo peso molecular (BioRad®).

Pese a modificar diferentes factores, como fueron la densidad óptica del cultivo en el momento de la inducción, tiempos de sobre-expresión más cortos, menor velocidad de crecimiento del cultivo mediante bajada de T^a (23, 25 ó 28° C), o diferentes concentraciones del inductor, no se obtuvo incremento alguno de la fracción soluble de la proteína N265TraA o N265TraAHis. Debido a que la cantidad en solución de cualquiera de los dos polipéptidos sobre-expresados era insuficiente para un proceso de purificación,

se optó por purificar la proteína en condiciones desnaturalizantes en presencia de urea. La urea a altas concentraciones produce la desnaturalización proteica, provocando la pérdida de la estructura terciaria de las proteínas, e incrementando así su solubilidad. Los objetivos marcados implicaban la consecución de la purificación del dominio relaxasa activo, lo que forzaba una correcta renaturalización posterior de la proteína. Para facilitar que el proceso de renaturalización fuera adecuado, se decidió utilizar el polipéptido N265TraAHis, el cual gracias a su cola de histidinas permitía una renaturalización unida a sustrato, lo cual, a priori, podría mejorar el plegamiento de la misma.

Se llevó a cabo la solubilización de N265TraAHis de la cepa C41(DE3) con urea a una concentración 8M y su posterior purificación mediante cromatografía usando una resina de níquel (Ni-NTA de Quiagen®) según lo descrito en Material y Métodos. La renaturalización se llevó a cabo mediante un gradiente decreciente de urea (desde 6M hasta 0M, ver Material y Métodos) con la proteína inmovilizada en la columna (Figura 3.8).

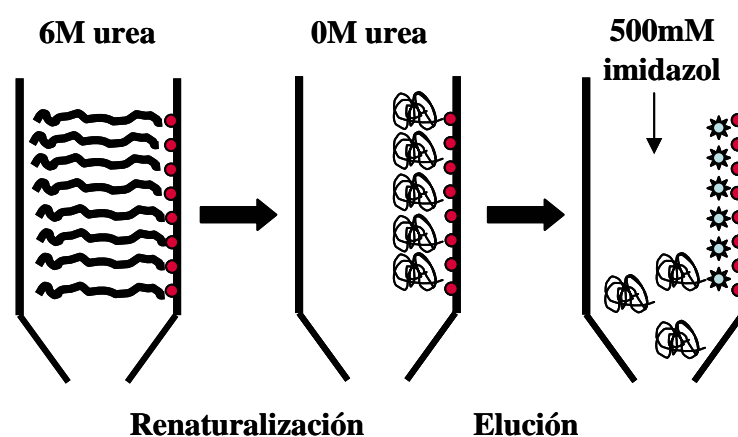


FIGURA 3.8. Proceso de renaturalización de N265TraAHis.
En la figura se representa esquematizado el proceso seguido para la purificación de la proteína N265TraAHis.

La proteína se eluyó mediante la adición de imidazol, por competencia de éste por el níquel de la resina presente en la columna, en condiciones de: 500mM de imidazol, 0M de urea, 20mM Tris (pH 7,6), 200mM NaCl, 20% glicerol. El producto obtenido se pasó de nuevo por una columna de Ni-NTA en una segunda ronda de purificación, con el fin de aumentar la pureza de la muestra, siendo posteriormente dializada para la completa eliminación del imidazol. Como puede apreciarse en la Figura 3.9, tras el proceso de

Capítulo III

purificación realizado la pureza de N265TraAHis conseguida parecía lo suficientemente alta como para poder abordar estudios de funcionalidad proteica.

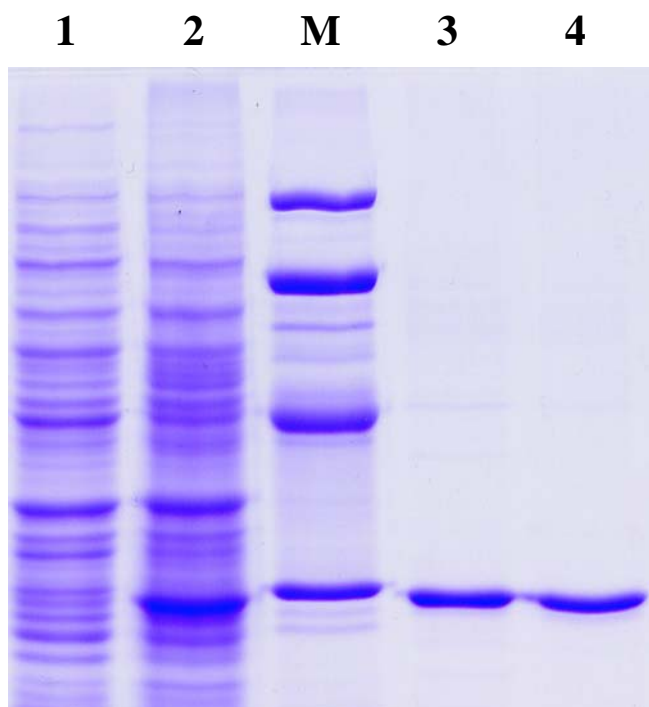


FIGURA 3.9. Purificación de la proteína N265TraAHis.

Carriles 1, C41pET29c; 2, C41N265TraAHis (tras 4 horas de inducción); 3, 0,6µgr de N265TraAHis (primera purificación); 4, 0,6µgr de N265TraAHis (segunda purificación); M, Marcador de bajo peso molecular (BioRad®).

3.2.2. Estudio del reconocimiento y unión de la proteína N265TraAHis a distintos sitios *nic*

Previamente al estudio de la capacidad de unión de la proteína N265TraAHis a ADN se realizó un análisis de varios sitios *nic* relacionados con el del plásmido simbiótico de *R. etli* (Figura 3.10A), para poder apreciar la alta conservación existente entre las secuencias de los diferentes plásmidos a nivel del teórico sitio *nic*. Sin embargo, hay que distinguir la presencia de 4 grupos principales atendiendo a la similitud entre la región *nic* del plásmido pRetCFN42d y los del resto de plásmidos: (i) los pSymA y pSymB, en los cuales la primera diferencia con la secuencia del plásmido pRetCFN42d se encuentra a 18 y 10 nucleótidos antes y después del teórico *nic*, respectivamente. (ii) los plásmidos pTiC58 y pNGR234a muy parecidos entre ellos, en los cuales la primera diferencia con la

secuencia del plásmido pRetCFN42d se encuentra a 6 y 5 nucleótidos antes y después del *nic*, respectivamente, y conservando unas IR muy parecidas a las presentes en la región *nic* de este plásmido. (iii) el RSF1010, en el que la primera diferencia con la secuencia del plásmido pRetCFN42d se encuentra a 5 y 6 nucleótidos antes y después del *nic*, respectivamente, pero con unas IR totalmente diferentes a las presentes en el plásmido simbiótico de *R. etli*. (iv) Los plásmidos pRmeGR4a, pSB102 y pXF51 que prácticamente sólo comparten con la secuencia del plásmido pRetCFN42d el par de bases GC entre los que teóricamente se lleva a cabo el corte por la relaxasa.

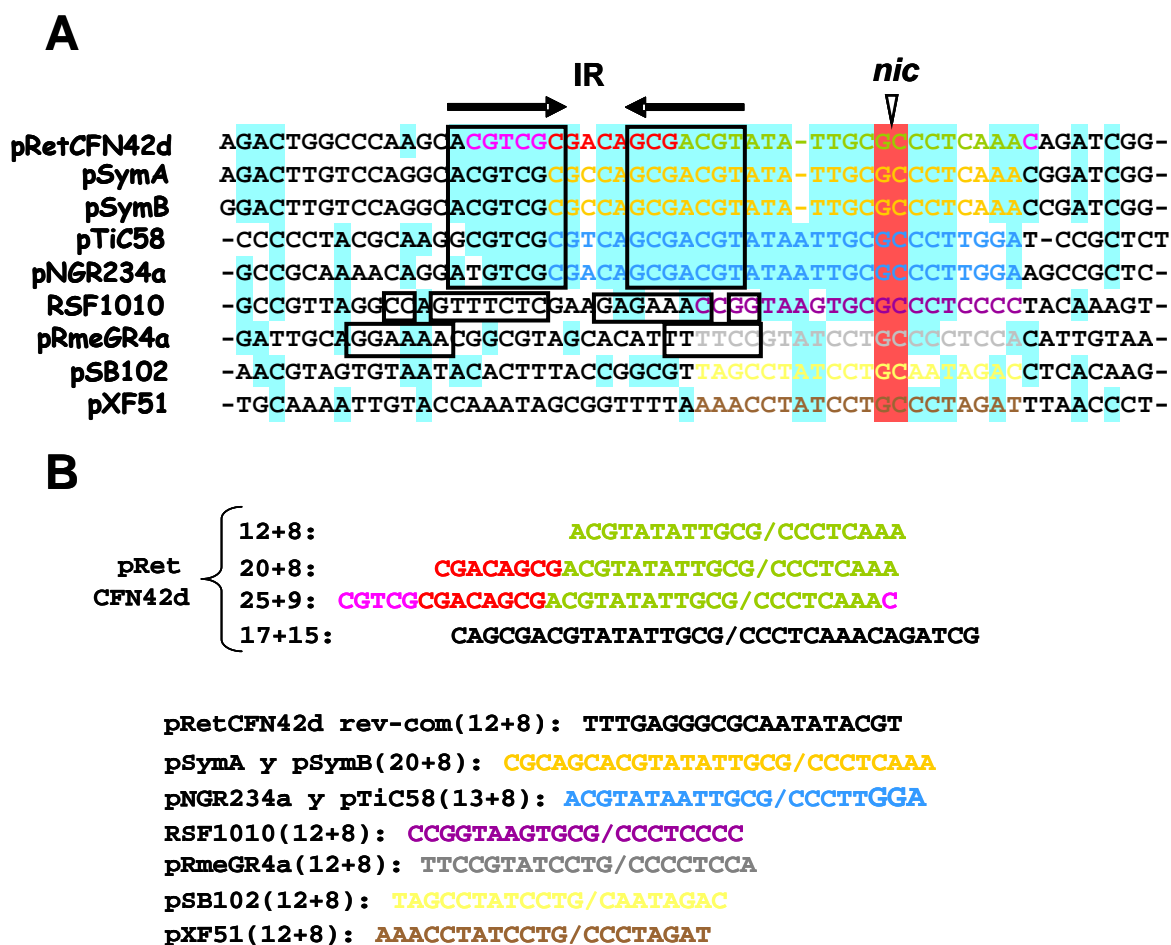


FIGURA 3.10. Alineamiento de las secuencias adyacentes a hipotéticos sitios *nic* de distintos plásmidos relacionados con el plásmido simbiótico de *R. etli*.

A, En el alineamiento de la figura se muestran en diferentes colores la secuencia de los distintos oligonucleótidos utilizados. Se muestran enmarcadas las regiones que presentan secuencias repetidas invertidas (IR) importantes en el reconocimiento del *oriT* por la relaxasa. En fondo rojo se muestran los dos nucleótidos entre los cuales se espera la rotura del enlace fosfodiéster por actuación de la relaxasa (*nic*), en fondo azul los nucleótidos fuertemente conservados.

B, En la figura se indica la secuencia y el tamaño de los diferentes oligonucleótidos utilizados. El tamaño del oligonucleótido se representa con el número de nucleótidos antes del punto de corte esperado + el número de nucleótidos existente después del punto de corte. Los colores de la secuencia de los diferentes oligonucleótidos coinciden con los de la figura A.

Capítulo III

Se diseñaron diferentes oligonucleótidos a partir de las secuencias de las regiones adyacentes a los hipotéticos sitios *nic* de distintos plásmidos (Figura 3.10B): del plásmido pRetCFN42d (de varios tamaños: 12+8, 20+8, 25+9), de otros plásmidos de bacterias del orden Rhizobiales (pSymA/pSymB, pTi/pNGR234a, pRmGR4a), del plásmido RSF1010, del plásmido pXF51 de *Xilella fastidiosa*, de plásmidos crípticos aislados de la rizosfera (pIPO2 y pSB102), así como un oligonucleótido control (secuencia reverso complementaria del oligo 12+8 del plásmido pRetCFN42d).

Para determinar la capacidad de unión del polipéptido N265TraAHis a estos oligonucleótidos, se llevaron a cabo incubaciones de los mismos con concentraciones crecientes de la proteína N265TraAHis. Posteriormente, se realizó una electroforesis del complejo ADN-proteína en geles nativos de poliacrilamida, según lo descrito en material y métodos, y se pudo determinar a qué oligonucleótidos se unía a la proteína N265TraAHis (Figura 3.11). Los ensayos determinaron que la proteína N265TraAHis aparecía retardada en geles de poliacrilamida, y por tanto se unía a los oligonucleótidos que contenían los hipotéticos sitios *nic* de los siguientes megaplásmidos: pRetCFN42d (en las longitudes 12+8, 20+8, 25+9) de *R. etli*, pSymA/pSymB de *S. meliloti* y pTi/pNGR234a de *A. tumefaciens* y *Rhizobium sp* NGR234, respectivamente. Por otra parte, no demostraba ningún tipo de unión hacia el resto de oligonucleótidos, incluido el control con la cadena reverso complementaria del sitio *nic* 12+8 del plásmido pRetCFN42d. Estos resultados sugerían, por tanto, que en los casos en los que se establecía la unión N265TraAHis-ADN, ésta era de tipo específico.

Para calcular los datos de unión se cuantificó el porcentaje de ADN unido a concentraciones crecientes de la proteína N265TraAHis (Figura 3.11) en cada una de las muestras en la que se estableció una interacción positiva. Las constantes de disociación K_d para el complejo ADN-proteína se calcularon con el programa GraphPad Prism TM 3.02, ajustándose los datos a una hipérbola. No se observaron diferencias significativas en las constantes de unión de la proteína N265TraAHis con los diferentes oligonucleótidos utilizados (Con una K_d media a los diferentes oligonucleótidos de 57; Figura 3.12). La constante de disociación de la N265TraAHis a un oligonucleótido muestra la cantidad de proteína necesaria para conseguir que a una determinada concentración de oligonucleótido, la cantidad de complejo proteína-oligo sea igual a la cantidad de oligonucleótido libre.

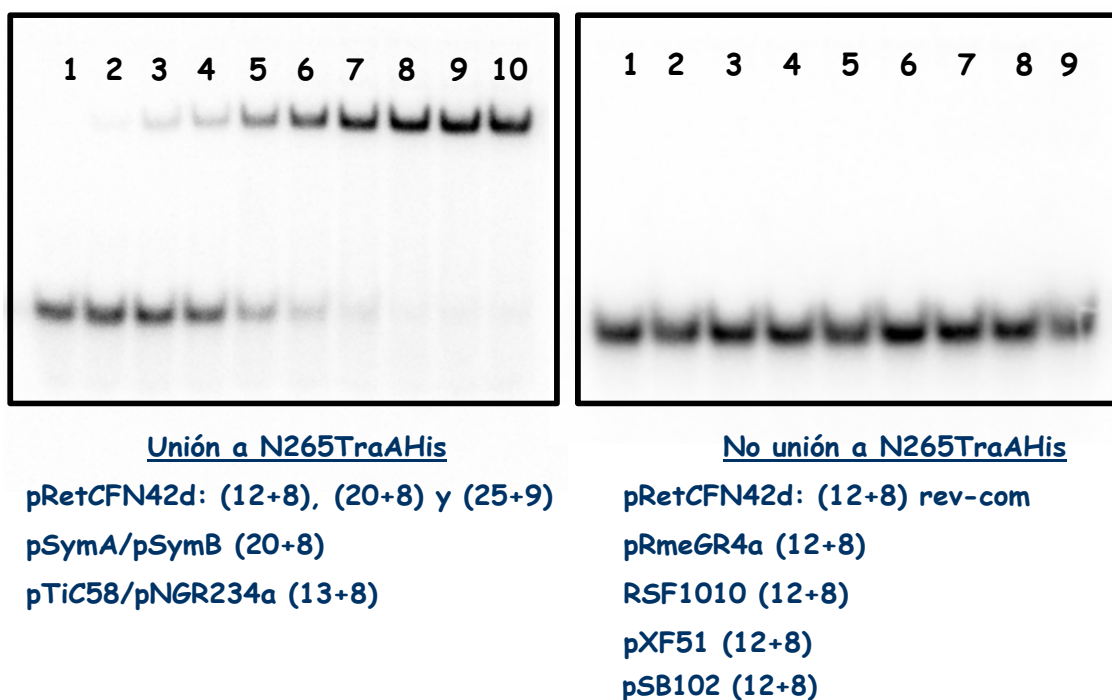
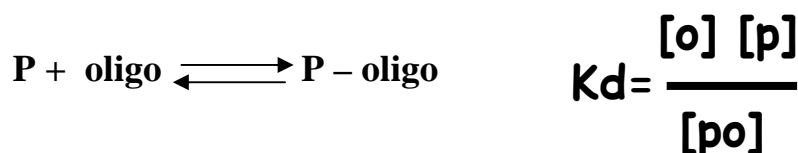


FIGURA 3.11. Unión de la proteína N265TraAHis a diferentes oligonucleótidos.
 Retardos en geles nativos de poliacrilamida al 12%. Carriles de 1 a 10, muestras con los diferentes oligonucleótidos [1nM] incubadas con N265TraAHis a distintas concentraciones: 1, [0nM]; 2, [3nM]; 3, [10nM]; 4, [30nM]; 5, [100nM]; 6, [150nM]; 7, [300nM]; 8, [450nM]; 9, [500nM]; 10, [1000nM]. En la figura se muestra un ejemplo de “unión” y otro de “no unión”.



Igualmente, el tipo de curva hiperbólica observada en la Figura 3.12 indica que la unión de N265TraAHis al oligonucleótido es de tipo no cooperativo, estableciéndose la unión de una molécula de oligonucleótido por una molécula de proteína.

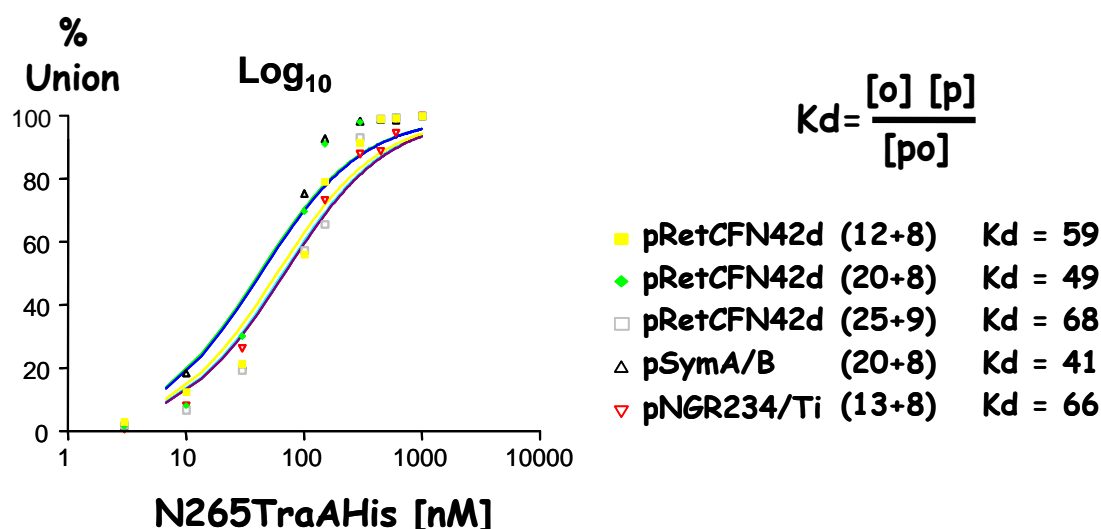


FIGURA 3.12. Curvas de unión de la proteína N265TraAHis a los distintos oligonucleótidos trazadas a partir de los datos obtenidos en los experimentos de retardos en gel.

Las gráficas de la figura relacionan el porcentaje (%) de complejo proteína-oligo (eje Y) con respecto al logaritmo en base 10 de la cantidad de proteína empleada (eje X). Igualmente se expresa el valor numérico de las constantes de los ensayos con cada uno de los oligonucleótidos empleados.

3.2.3. Estudio de la capacidad de corte/religación de la proteína N265TraAHis sobre distintos sitios *nic*

Una vez demostrada la capacidad de unión específica de la proteína N265TraAHis a oligonucleótidos que presentaban los hipotéticos sitios *nic* de diferentes megaplásmidos del orden Rhizobiales, se llevó a cabo un estudio para determinar cuáles de estos oligonucleótidos podrían ser cortados específicamente por la proteína N265TraAHis. Los oligonucleótidos a ensayar fueron marcados previamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]-ATP, mediante la polinucleótido kinasa de T4 (ver Material y Métodos). Posteriormente estos oligonucleótidos marcados, tras un proceso de incubación con N265TraAHis y posterior eliminación de la proteína (mediante SDS y proteinasa K), se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida para resolver su tamaño. La medida de la pérdida de tamaño ocasionada por un corte en la secuencia de un determinado oligonucleótido puede ser cuantificada y evaluada, proporcionando información no sólo del porcentaje de oligonucleótido cortado, sino también del punto exacto donde se ha producido la mella (Figura 3.13). Es, por tanto, un método idóneo para la determinación del sitio *nic* de un determinado plásmido. Con este tipo de ensayo, y mediante la combinación de 2 oligonucleótidos de diferente tamaño que presenten un sitio *nic* específico para N265TraAHis (de los cuales tan sólo 1 está marcado en su extremo 5', tal y como muestra

la Figura 3.13), puede ponerse de manifiesto además de la actividad de corte, la actividad de religación, igualmente presente en este tipo de proteínas.

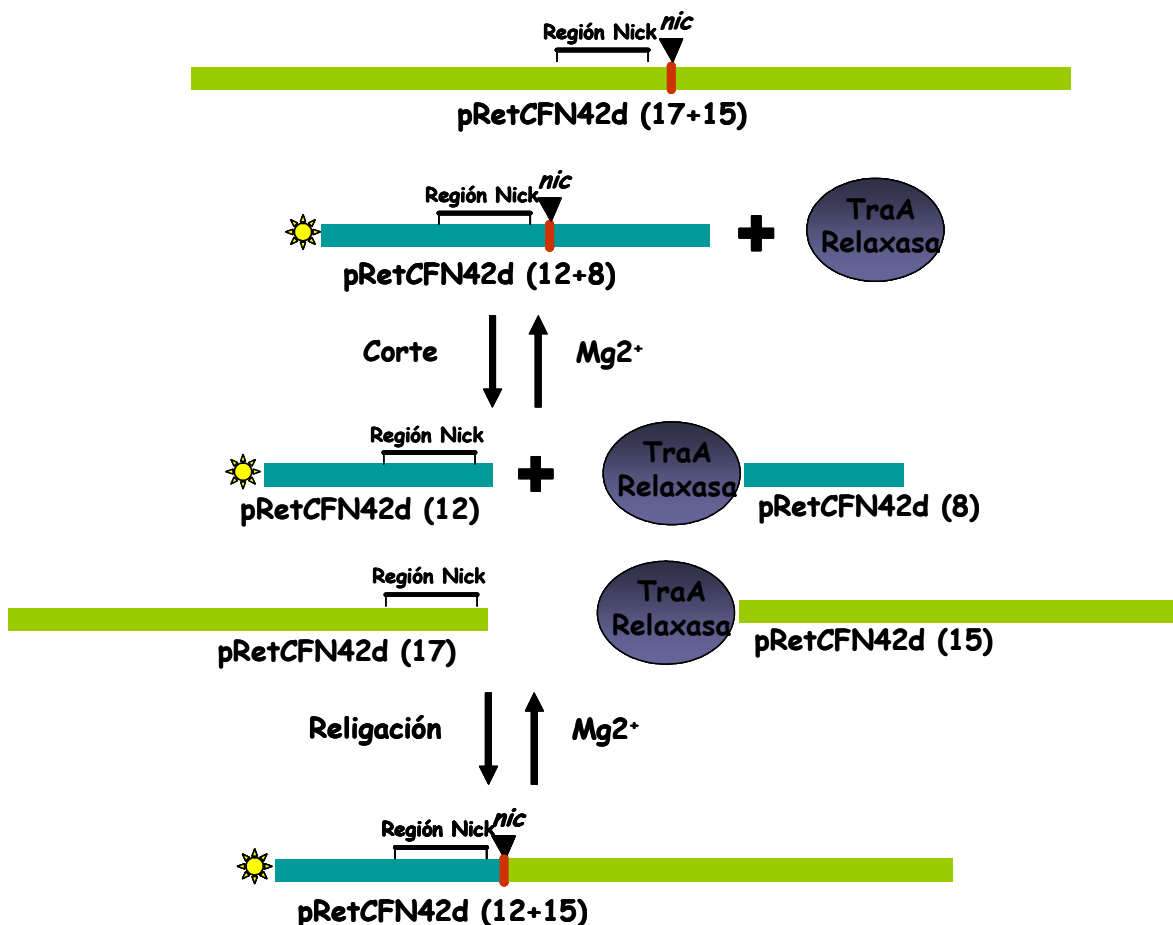


FIGURA 3.13. Ensayo de actividad relaxasa de la proteína N265TraAHis.

Ensayo de la actividad de corte y religación ejemplificado con la proteína TraA y los oligonucleótidos 12+8 y 17+15.

El ensayo de corte se llevó a cabo con los oligonucleótidos que contenían el teórico sitio *nic* de los plásmidos: pRetCFN42d (25+9, 20+8, 12+8), pSymA/pSymB (20+8), pNGR234a/pTiC58 (13+8). Además, se realizó el ensayo de religación con los oligonucleótidos del plásmido pRetCFN42d (12+8 y 17+15). Todos y cada uno de los oligonucleótidos, con o sin incubación previa con la proteína N265TraAHis, se sometieron a electroforesis en carriles consecutivos (Figura 3.14). Como marcador se adicionó a la reacción de corte del oligonucleótido pRetCFN42d (12+8) una mezcla de dATP, ddATP y una nucleotidil transferasa terminal. Esta mezcla genera una escalera de oligonucleótidos con los diferentes tamaños posibles, mediante la adición de un dATP en los extremos

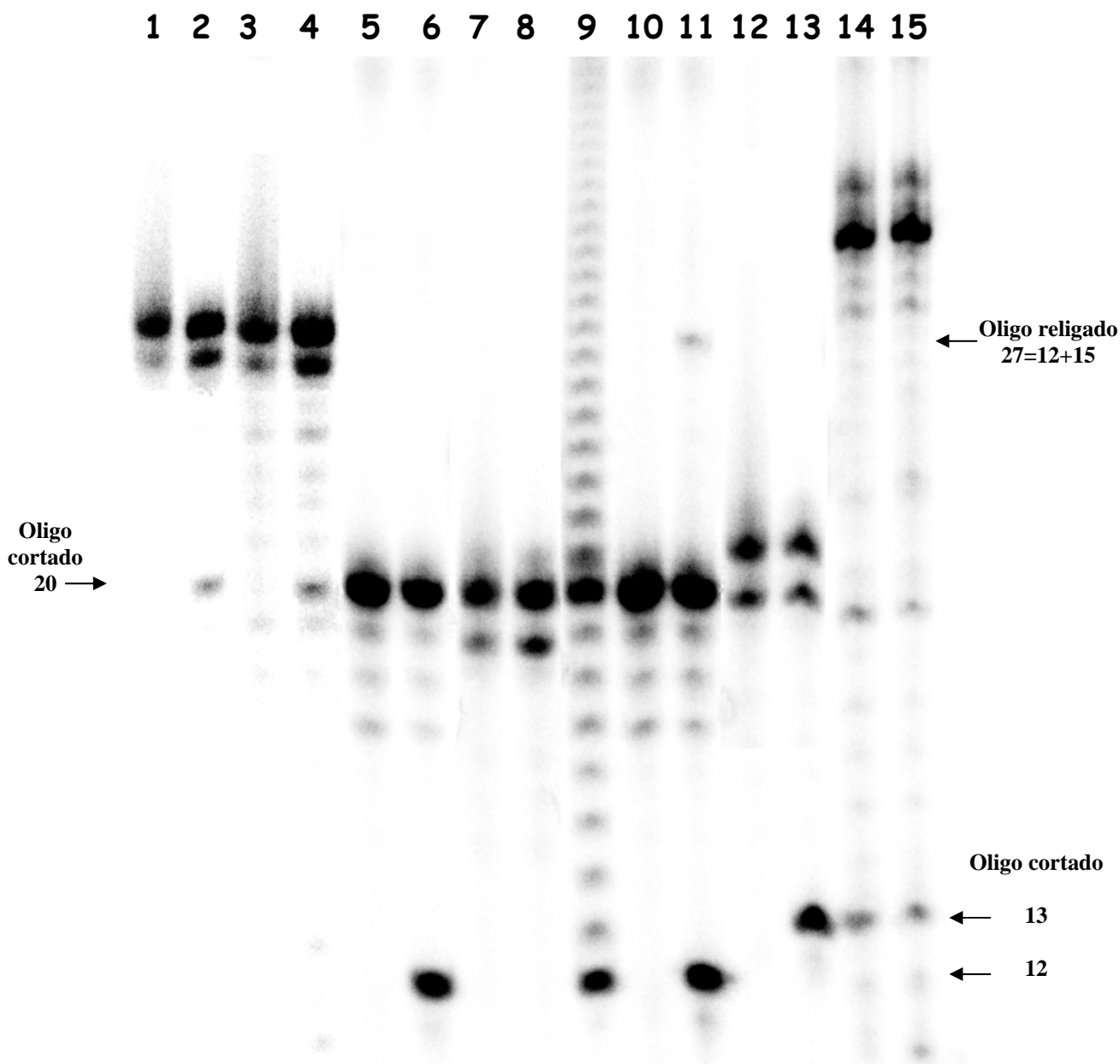


FIGURA 3.14. Ensayo de corte y religación de N265TraAHis con diferentes oligonucleótidos.

Carriles: 1, pSymA/B (20+8); 2, pSymA/B (20+8) + N265TraAHis; 3, pRetCFN42d (20+8); 4, pRetCFN42d (20+8) + N265TraAHis; 5, pRetCFN42d (12+8); 6, pRetCFN42d (12+8) + N265TraAHis; 7, pRetCFN42d rev-com(12+8); 8, pRetCFN42d rev-com (12+8) + N265TraAHis; 9, Marcador: pRetCFN42d (12+8) + N265TraAHis + dATP + ddATP + Tdt; 10, pRetCFN42d (12+8) + pRetCFN42d (17+15); 11, pRetCFN42d (12+8) + pRetCFN42d (17+15) + N265TraAHis; 12, pNGR234a/pC58Ti (13+8); 13, pNGR234a/pC58Ti (13+8) + N265TraAHis; 14, pRetCFN42d (25+9); 15, pRetCFN42d (25+9) + N265TraAHis. Con una flecha se indican distintos tamaños de corte/religación generados por N265TraAHis.

3'-OH libres generados (que vuelve a dejar un extremo 3'-OH libre, pudiendo ser elongado de nuevo posteriormente), o mediante la adición de un ddATP, el cual ya no puede ser elongado, por carecer de extremo 3'OH libre (carril 9 de la Figura 3.14).

La Figura 3.14 muestra que la proteína N265TraAHis es capaz de reconocer y cortar específicamente oligonucleótidos que contengan el hipotético sitio *nic* de los plásmidos pSymA/pSymB, pNGR234a/pTiC58 y pRetCFN42d (carriles 2, 4, 6 y 13) exactamente en el sitio sugerido en la Figura 3.10 (por comparación con el *nic* de RSF1010). Además, la proteína N265TraAHis mostró grandes variaciones en la eficiencia de corte según el tamaño del oligonucleótido empleado. Los resultados obtenidos indican que el incremento de tamaño del oligonucleótido que contiene el *nic* parece disminuir el porcentaje de oligonucleótido cortado. De esta manera, con el sitio *nic* del plásmido pRetCFN42d se puede apreciar que cuando N265TraAHis se incubaba con el oligonucleótido de tamaño (12+8) se obtiene una cantidad de producto de corte (12 nucleótidos) hasta 4,5 veces superior que la cantidad obtenida con el oligonucleótido (20+8) (comparar carriles 2 y 6 de la Figura 3.14 y ver Tabla 3.2). De igual forma, el producto de corte (25 nucleótidos) se hace inapreciable con el uso del oligonucleótido (25+9) (comparar carriles 14 y 15 de la Figura 3.14).

Tabla 3.2. Porcentaje de corte y religión de la proteína N265TraAHis sobre los diferentes oligos.

<i>Oligonucleótido</i>	<i>% de oligonucleótido cortado</i>	<i>% de oligonucleótido religado</i>
pRetCFN42d (12+8)	40,8%	-
pRetCFN42d (20+8)	9,07%	-
pSymA/B (20+8)	14,7%	-
pNGR234a/pTiC58 (13+8)	51,8%	-
pRetCFN42d (12+8) + (17+15)	35%	3%

La cuantificación se ha determinado de forma informatizada (Quantity-One Bio-Rad®) mediante la determinación del número de píxeles por unidad de superficie de las distintas bandas. Los resultados se expresan en tanto por ciento de oligonucleótido cortado/religado con respecto al oligonucleótido total.

En el ensayo de religación (carriles 10 y 11 de la Figura 3.14), puede apreciarse la aparición de una tenue banda específica con un tamaño de 27 nucleótidos, tan sólo en la muestra incubada con la proteína N265TraAHis (carril 11 de la Figura 3.14), generada por la religación cruzada de los sitios *nic* de los oligonucleótidos 12+8 y 17+15. Además, la proteína N265TraAHis, con oligonucleótidos de igual tamaño, mostró una eficiencia de

Capítulo III

corte con sitios *nic* heterólogos igual o superior que con su propio *nic* (comparar carriles 2 y 4 de la Figura 3.14 y ver Tabla 3.2).

3.3. Estudio *in vivo*

3.3.1 Estudio de la movilización de diferentes *oriTs* por el plásmido simbiótico de *R. etli*

Aunque la relaxasa es la proteína clave en el reconocimiento, corte y religación de la secuencia *nic*, y es un factor esencial para determinar la especificidad de este reconocimiento, se ha demostrado en diferentes sistemas que en el reconocimiento del *oriT* están implicadas otras proteínas que se unen a secuencias específicas dentro de la región *nic* y que están implicadas en la especificidad de reconocimiento y eficiencia de corte del *oriT* del ADN que va a ser transferido (Ziegelin *et al.*, 1989; Moncalián *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1995). Asimismo, también se ha descrito en diferentes sistemas que las proteínas adicionales necesarias para que la relaxasa reconozca y corte eficientemente una determinada región *nic* varían dependiendo de que el ADN que contiene el sitio *nic* se encuentre en forma de doble cadena superenrollada o de cadena sencilla (Pansegrau *et al.*, 1990b; Pansegrau *et al.*, 1993b; Matson *et al.*, 1993; Scheifflele *et al.*, 1995; Inamoto *et al.*, 1994; Scherzinger *et al.*, 1993). Por todo ello, y para intentar establecer la capacidad de reconocimiento que presentaba el sistema conjugativo del plásmido pRetCFN42d sobre diferentes *oriTs* (ADN de cadena doble superenrollada) de megaplásmidos relacionados, se diseñaron experimentos de movilización de los *oriTs* de aquellos plásmidos que habían mostrado una interacción positiva con la relaxasa N265TraAHis durante los ensayos *in vitro* (pRetCFN42d, pSymA, pSymB, pNGR234a, pTiC58).

El *oriT* está descrito como la única función en *cis* necesaria para la transferencia conjugativa de un determinado ADN (Lanka y Wilkins, 1995). El tamaño de los *oriTs* varía de unos sistemas conjugativos a otros (Brasch y Meyer, 1987; Cook y Farrand, 1992) con un mínimo funcional que no suele superar las 500 pb (Lanka y Wilkins, 1995). Para llevar a cabo el estudio de movilización de los *oriTs* de los diferentes megaplásmidos, se procedió a amplificar una región de 300 pb (150 pb anteriores y posteriores al sitio *nic*) de cada uno de ellos (ver Anexo 3.4 y 3.5).

Las 5 construcciones diferentes, portadoras de los *oriTs* de los megaplásmidos clonados en el vector pJB3Tc19, se introdujeron por electroporación en una cepa carente

de plásmidos (*A. tumefaciens* GMI9023), a la que previamente se le había introducido un mutante *rctA* del plásmido simbiótico de *R. etli* (pRetCFN42d::Tn5.1 resistente a Km, Ver Capítulo 2), generándose las cepas que contenían cada uno de los siguientes *oriTs* clonados:

- 1) *oriT* de pRetCFN42d de *R. etli*
- 2) *oriT* de pSymA de *S. meliloti*
- 3) *oriT* de pSymB de *S. meliloti*
- 4) *oriT* de pNGR234a de *Rhizobium* Sp NGR234
- 5) *oriT* de pTiC58 de *A. tumefaciens*

Se emplearon además los siguientes controles:

- 6) Cepa sin ninguna construcción
- 7) Cepa con el vector vacío pJB3Tc19
- 8) Cepa con la construcción pJB3rec para control de la movilización por recombinación
- 9) Cepa mutante para el gen *traA* con el *oriT* de pRetCFN42d

La construcción pJB3rec consistía en un fragmento de 398 pb del plásmido pRetCFN42d (subclonado a partir de la construcción pJdp1, ver Capítulo 1, con extremos *SacI/EcoRI* en el vector pJB3Tc19), elegido al azar para evaluar movilización mediante posibles eventos de recombinación. La cepa 9) es una cepa a la que se le ha realizado una mutación del gen *traA* del plásmido pRetCFN42d::Tn5.1 por la inserción de un casete de Gm según lo descrito en el Anexo 1.2.

El uso del plásmido simbiótico de *R. etli* mutado en el gen *rctA* como sistema movilizador de los distintos *oriTs* presentaba dos ventajas principales: (i) tener marcado el plásmido simbiótico (resistencia a Km), lo que permitía establecer la frecuencia de transferencia conjugativa de éste de forma paralela a la de las construcciones con los *oriTs* (resistencia a Tc, Ap); (ii) como se describió en el capítulo 2, la inserción Tn5.1 en el gen *rctA* provoca la subida de la frecuencia de transferencia desde valores no detectables hasta una frecuencia en torno a 10^{-3} . Como se ha visto en el capítulo anterior, este incremento de la frecuencia de transferencia parece estar mediado por una subida de la expresión de los genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido (genes *tra* y *virB*).

La cepa de *R. etli* CFNX218Spc se utilizó como receptora en conjugaciones con las cinco cepas de *A. tumefaciens* generadas (1 al 5) así como con las cepas control (6-9),

Capítulo III

adicionales empleadas como donadoras. En estos ensayos de movilización se determinó de forma paralela la frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d::Tn5.1 (selección de transconjugantes Km-resistentes; Tabla 3.3) y la frecuencia de transferencia de las distintas construcciones portadoras de los distintos *oriTs* (por resistencia a Tc).

Tabla 3.3. Frecuencias de movilización en *trans* de los distintos *oriTs* plasmídicos por pRetCFN42d::Tn5.1.

<i>Construcción</i>	<i>Km</i>	<i>Tc</i>
1) <i>oriT</i> pRetCFN42d	$1,17 \times 10^{-3}$	$6,09 \times 10^{-6}$
2) <i>oriT</i> pSymA	1×10^{-3}	$5,43 \times 10^{-6}$
3) <i>oriT</i> pSymB	$1,02 \times 10^{-3}$	$5,11 \times 10^{-6}$
4) <i>oriT</i> pNGR234a	$9,29 \times 10^{-4}$	n.d.
5) <i>oriT</i> pTiC58	$7,11 \times 10^{-4}$	n.d.
6) Sin construcción	$1,48 \times 10^{-3}$	-
7) pJB3Tc19	$7,25 \times 10^{-4}$	n.d.
8) pJB3Rec	$8,6 \times 10^{-4}$	n.d.
9) Mutante traA + <i>oriT</i> pRetCFN42d	n.d.	n.d.

Frecuencias de transferencia del plásmido pRetCFN42d::Tn5.1 (Km) y de las diferentes construcciones derivadas del vector pJB3Tc19 (Tc); n.d., Transferencia no detectada ($<10^{-8}$); *OriT*, fragmento de 300 pb portadora de la región *nic* de los distintos megaplásmidos. (150 pb a ambos lados del sitio *nic*); Las frecuencias indicadas son el resultado de la media de al menos dos experimentos.

Los resultados obtenidos (Tabla 3.3) demostraron que el plásmido simbiótico pRetCFN42d::Tn5.1 era capaz de movilizar específicamente los *oriTs* de los plásmidos simbióticos pSymA y pSymB de *S. meliloti*, con una eficiencia muy similar a la movilización de su propio *oriT* en *trans*. Por el contrario, este plásmido fue incapaz de movilizar los *oriTs* del plásmido simbiótico de *Rhizobium* sp pNGR234a y del plásmido tumorigénico pTiC58 de *A. tumefaciens*. En relación con estos datos, el alineamiento de la Figura 3.15 muestra, que mientras que la identidad de secuencia del *oriT* (300 pb) del plásmido pRetCFN42d con los *oriTs* de los plásmidos simbióticos pSymA y pSymB de *S. meliloti* es del 79,5% y del 76,8%, respectivamente, el nivel de similitud entre los *oriTs* de los megaplásmidos pRetCFN42d-pNGR234a y pRetCFN42d-pTiC58 desciende hasta el

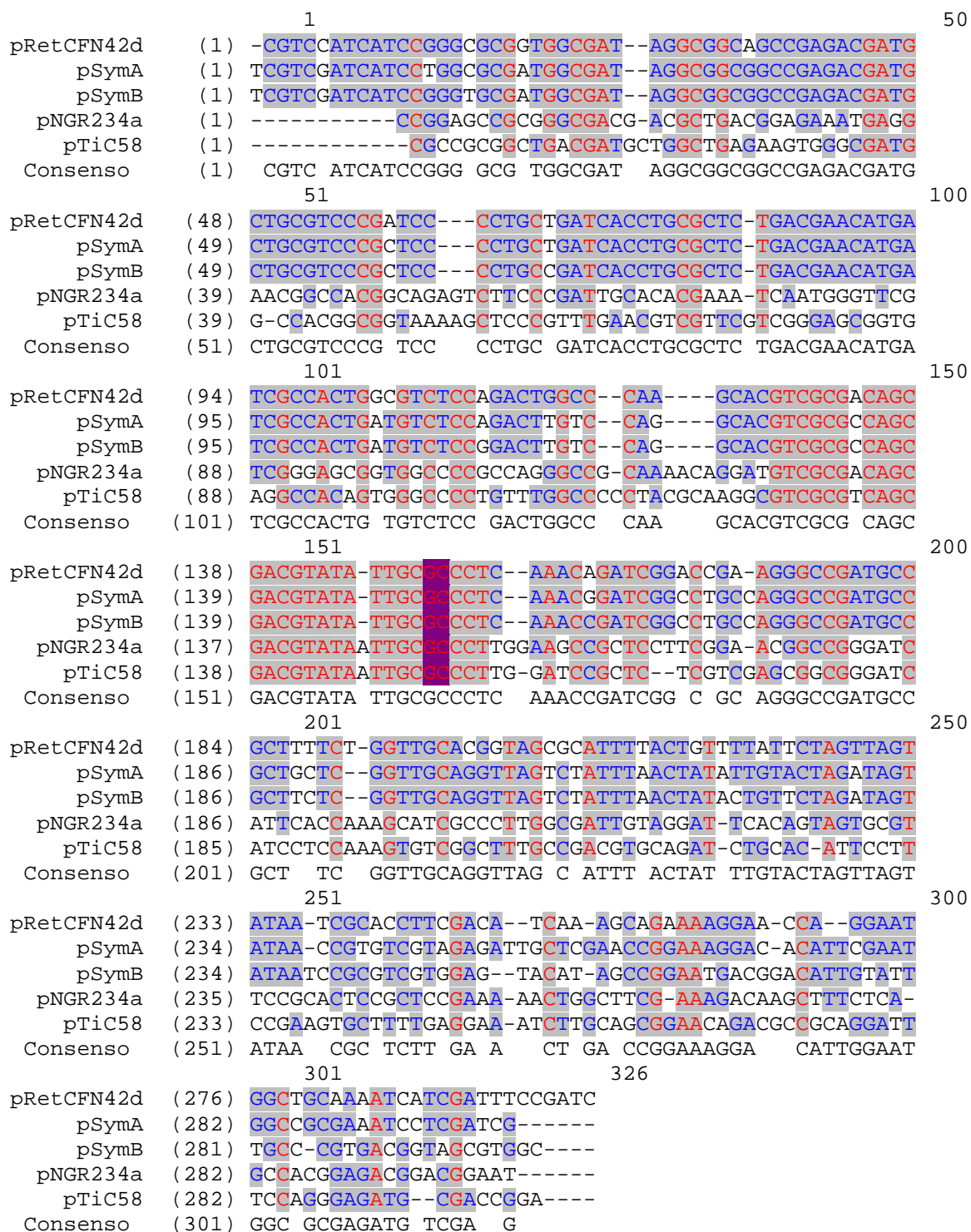


FIGURA 3.15. Alineamiento de los diferentes OriTs cuyos sitios *nic* son reconocidos *in vitro* por la proteína N265TraAHis.

En el alineamiento se muestran las 150 pb anteriores y posteriores al sitio *nic* (punto de corte entre la G y la C con fondo violeta). En color azul se muestran las identidades parciales (mismo nucleótido en más del 50% de los oriTs en una determinada posición) y en rojo las identidades totales (mismo nucleótido en todos los oriTs).

Capítulo III

47,6 % y 47,5 %, respectivamente. Estas diferencias de identidad entre los correspondientes *oriTs* se incrementan si en lugar de las 300 pb analizamos la similitud de secuencia a nivel de los 150 nucleótidos previos al sitio *nic*, lugar donde se localizan la mayoría de las secuencias repetidas invertidas (IR) implicadas en el reconocimiento del *oriT* por la relaxasa (Pansegrau y Lanka, 1996). Dentro de estos 150 nucleótidos la conservación de secuencia entre pRetCFN42d-pSymA y pRetCFN42d-pSymB sube al 92,1 % y 90,7%, respectivamente, mientras que la identidad entre las parejas de *oriTs* pRetCFN42d-pNGR234a y pRetCFN42d-pTiC58 se limita al 50,1% y 53,4%, respectivamente. Estos resultados de homología entre los distintos *oriTs* concuerdan, por tanto, con la ausencia de movilización de los *oriTs* de los plásmidos pNGR234a y pTiC58 por parte del plásmido pRetCFN42d.

La ausencia de movilización de las construcciones control utilizadas (vector pJB3Tc19 vacío y pJB3rec) así como la dependencia de la relaxasa TraA tanto para la movilización como para la transferencia conjugativa del megaplásmido, validan los resultados de estos experimentos.

Sorprendentemente, la frecuencia de transferencia del plásmido pRetCFN42d fue unas 200 veces más eficaz que la movilización en *trans* de su propio *oriT*. Este resultado nos llevó a plantear nuevos experimentos con el fin de estudiar con más detalle la eficacia de transferencia del *oriT* del plásmido pRetCFN42d de *R. etli* en relación a su posición (*cis/trans*) con el gen de la relaxasa *traA*.

3.3.2. Evaluación de la funcionalidad de actuación *cis/trans* de la relaxasa TraA del plásmido pRetCFN42d sobre su *oriT*

El hecho de que la frecuencia de movilización del *oriT* del plásmido pRetCFN42d disminuya unas 200 veces cuando éste se encuentra en posición *trans* respecto al gen *traA*, puede ser debido en principio a dos posibilidades: (i) que el tamaño del fragmento de ADN del *oriT* amplificado y clonado (300 pb) en el vector pJB3Tc19 no sea suficiente para un reconocimiento óptimo por parte de la relaxasa y proteínas accesorias o, (ii) que por alguna razón el reconocimiento del *oriT* por parte de la relaxasa se vea favorecido cuando ambos, el gen que codifica esta enzima y el *oriT*, se encuentran en la misma molécula (*cis*). Para intentar esclarecer estas cuestiones se realizaron varias construcciones adicionales mediante la clonación de fragmentos de diferentes tamaños de la región Dtr del

plásmido pRetCFN42d en el vector pJB3Tc19, y se utilizaron otras ya descritas en el Capítulo 1 (Figura 3.16).

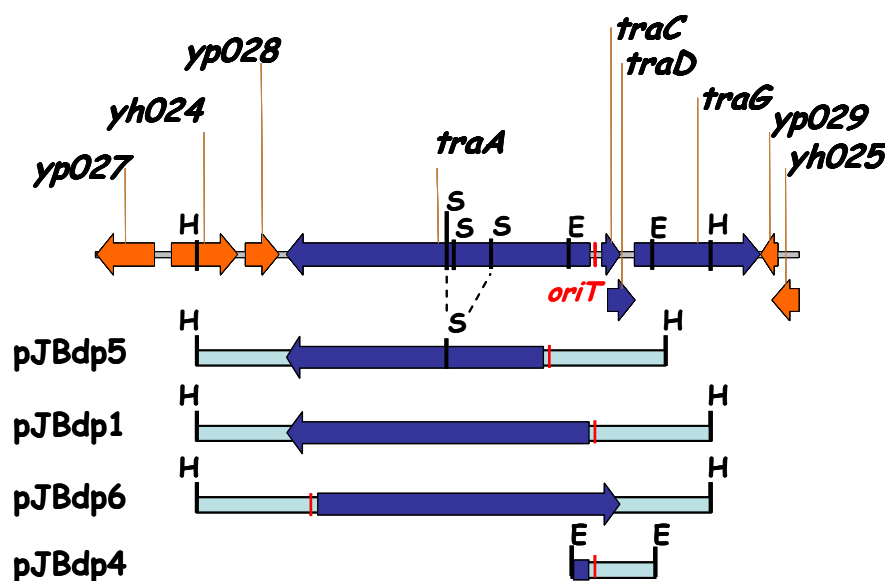


FIGURA 3.16. Diferentes construcciones derivadas de la región Dtr del plásmido pRetCFN42d empleadas en los ensayos de movilización.

Se han utilizado dos de las construcciones descritas en el Capítulo 1 (Figura 1.6) manteniéndose el tipo de nomenclatura para las dos nuevas construcciones generadas (pJBdp5 y pJBdp6). H, sitio *Hind*III; S, sitio *Stu*I; E, *Eco*RI.

La construcción pJBdp4 fue introducida en la cepa de *A. tumefaciens* At pRetCFN42d::Tn5.1 y las construcciones pJBdp1, pJBdp5 y pJBdp6 fueron introducidas tanto en ésta como en la cepa At pRetCFN42d::Tn5.1ΔTraA (mutante en el gen *traA*), todas ellas por electroporación de forma análoga a las anteriores. Estas cepas fueron conjugadas también con la cepa CFNX218Spc de *R. etli* como receptora, realizándose la selección tanto para la transferencia del megaplásmido (pRetCFN42d::Tn5.1 o pRetCFN42d::Tn5.1ΔTraA, portador de resistencia a Km), como para la movilización de las distintas construcciones (portadoras de la resistencia a Tc).

Los resultados obtenidos indicaron que la movilización de las construcciones que contenían el *oriT* del plásmido pRetCFN42d como fragmentos de 300 pb o de 1325 pb (pJBdp4), no presentaban diferencias significativas (ver Tabla 3.3 y Tabla 3.4) y que por tanto, el incremento en secuencia alrededor del sitio *nic* no solventa la bajada de eficiencia en el reconocimiento por la relaxasa de los sitios *nic* dispuestos en *trans*. En este sentido, en la Tabla 3.4 puede observarse que la frecuencia de movilización de las construcciones que contienen en su secuencia el gen de la relaxasa *traA* junto al sitio *nic* (pJBdp1 y

Tabla 3.4. Frecuencias de movilización de los distintos *oriTs*.^a

<i>Cepa</i>	<i>Km</i>	<i>Tc</i>
At p42d::Tn5.1 pJBdp4	$9,6 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-6}$
At p42d::Tn5.1 pJBdp1	$6,11 \times 10^{-4}$	$6,41 \times 10^{-4}$
At p42d::Tn5.1 pJBdp6	$6,47 \times 10^{-4}$	1×10^{-3}
At p42d::Tn5.1ΔTraA pJBdp1	$4,7 \times 10^{-6}$	$4,6 \times 10^{-3}$
At p42d::Tn5.1ΔTraA pJBdp6	$4,1 \times 10^{-6}$	2×10^{-3}
At p42d::Tn5.1ΔTraA pJBdp5	n.d	2×10^{-7}

Frecuencias de transferencia del plásmido pRetCFN42d::Tn5.1 (Km), pRetCFN42d::Tn5.1ΔTraA (Km) y de las diferentes construcciones derivadas del vector pJB3TC19 (Tc).^a El plásmido pRetCFN42d se ha abreviado como p42d; n.d., Frecuencia no detectada; las frecuencias indicadas son el resultado de la media de al menos dos experimentos.

pJBdp6) son movilizadas a frecuencias similares a las observadas para el plásmido completo pRetCFN42d (10^{-3}). Estos resultados apuntan hacia la segunda hipótesis indicada más arriba, que implica un mal funcionamiento en el reconocimiento de los *oriTs* que se encuentran en *trans* con respecto al gen que codifica la relaxasa. Esta hipótesis se demuestra mediante el empleo de las cepas que presentan un plásmido simbiótico con un gen *traA* no funcional (At pRetCFN42d::Tn5.1ΔTraA) y son portadoras de las construcciones pJBdp1 y pJBdp6, donde la bajada de frecuencia se experimenta ahora en la transferencia del plásmido simbiótico (alrededor de 2 órdenes de magnitud) sin sufrir modificaciones significativas la movilización de las construcciones (10^{-3} ; Tabla 3.4). En este mismo fondo (pRetCFN42d::Tn5.1ΔTraA) por el contrario, la construcción pJBdp5 (derivada de la construcción pJBdp1 mediante una delección *StuI*, que elimina uno de los motivos de unión a NTP del hipotético dominio helicasa) presenta una frecuencia de movilización muy baja (3000 veces menor que la construcción pJBdp1 de la que deriva). El empleo de la construcción pJBdp5 excluye la posible influencia de otros genes implicados en el sistema conjugativo del plásmido pRetCFN42d presentes en la construcción pJBdp1 y pJBdp6 (como el gen *yp028*, ver capítulo 1) en el proceso de movilización, atribuyéndose el efecto *cis/trans* observado exclusivamente al complejo de reconocimiento TraA/*oriT*.

3.4. Discusión

La relaxasa es la proteína clave en el reconocimiento, corte y transferencia conjugativa de un determinado ADN (revisiones en Lanka y Wilkins, 1995; Pansegrau y Lanka, 1996), actuando sobre una secuencia específica conocida como *oriT*. Dentro del *oriT*, la relaxasa lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster que separa dos nucleótidos contiguos en lo que se conoce como sitio *nic*. La reacción de corte se produce por una reacción de transferencia de cadena que implica la formación de un intermediario covalente DNA-relaxasa. La formación de éste se cree que permite la restauración de la molécula circular original después de completar la transferencia del ADN, mediante una nueva reacción de transferencia de cadena, en este caso inversa a la primera (Frost *et al.*, 1994; Sherman y Matson, 1994). Esta actividad de corte y religación se localiza en un dominio definido en el extremo N-terminal de este tipo de proteínas, y que en diferentes sistemas ha demostrado ser funcional en ausencia del resto de la molécula (Scherzinger *et al.*, 1992; Llosa *et al.*, 1996; Stern y Schildbach, 2001). Además de este dominio relaxasa se ha demostrado la existencia de otros tipos de dominios dentro de las relaxasas igualmente esenciales para su función, como es el dominio helicasa, situados hacia el extremo C-terminal de la secuencia aminiacídica (Llosa *et al.*, 1996; Fukuda y Ohtsubo, 1995; Traxler y Minkley, 1988). Este dominio helicasa, implicado en el desenrollamiento de la hebra que va a ser transferida, no es universal dentro de estas proteínas, existiendo relaxasas, como TraI del plásmido RP4, que carecen del mismo. El estudio realizado en este trabajo con la relaxasa TraA del plásmido simbiótico de *R. etli*, establece que esta proteína posee un dominio relaxasa contenido dentro de los 265 aminoácidos N-terminales el cual presenta los motivos típicos descritos en este tipo de dominios (Pansegrau y Lanka, 1991; Pansegrau *et al.*, 1994; Francia *et al.*, 2004), y que también ha demostrado ser activo en ausencia del resto de la proteína. Igualmente mediante el estudio de su secuencia se han podido determinar, en el fragmento medio de la proteína, los principales motivos presentes en proteínas con actividad helicasa. Dentro de estos, destacan los motivos de unión a NTPs (motivos Walker, Walker *et al.*, 1982) los cuales son esenciales para la funcionalidad *in vivo* de TraA, como lo demuestra la drástica bajada en la frecuencia de transferencia sufrida por una construcción que presente una delección en esta región (construcción pJBdp5). Estos resultados indican la estructura

Capítulo III

bifuncional de esta proteína de forma análoga a la sugerida para la proteína TraA del plásmido pTiC58 por Farrand y colaboradores (Farrand *et al.*, 1996).

La realización de un árbol filogenético (Figura 3.3) de hipotéticas relaxasas de plásmidos presentes en bacterias del orden Rhizobiales, ha permitido establecer 2 grupos filogenéticos principales dentro de los plásmidos de estas bacterias. En una rama (anotada como plásmidos crípticos) se encuentran las relaxasas de plásmidos no simbióticos de la familia *Rhizobiaceas* como el pRmeGR4a de *S. meliloti* o pMLa de *Mesorhizobium loti*, o los recientemente identificados plásmidos pIPO2 y pSB102 aislados de la rizosfera de leguminosas. Varios de estos plásmidos parecen tener relaxasas y *oriTs* con semejanzas con el plásmido RP4 (Schneiker *et al.*, 2001; Tauch *et al.*, 2002; Herrera-Cervera *et al.*, 1998). En la otra rama (anotada como megaplásmidos e islas simbióticas) se encuentran las relaxasas de los plásmidos simbióticos, tumorigénicos, pertenecientes a islas simbióticas y algún plásmido críptico presente en *Rhizobiaceas*. Dentro de esta segunda rama se localiza la relaxasa TraA del plásmido simbiótico de *R. etli*, que presenta las mayores homologías de secuencia con las relaxasas TraA1 y TraA2 de los plásmidos simbióticos de *S. meliloti*.

La inclusión de relaxasas de plásmidos del grupo IncQ, como la relaxasa MobA de RSF1010, en la rama de los megaplásmidos e islas simbióticas cuando se genera un árbol filogenético tras el alineamiento de los dominios relaxasa (300 aminoácidos N- terminales de distintas relaxasas; Figura 3.4), demuestra la gran similitud que existe entre las relaxasas de estos dos grupos a nivel de este dominio, hecho que ya había sido descrito previamente por otros autores en relación a la hipotética relaxasa TraA del plásmido pTiC58 (Farrand *et al.*, 1996). La co-evolución entre el dominio relaxasa de estas proteínas y sus respectivos sitios *nic*, probablemente ha originado que muchos de los plásmidos simbióticos, entre los que se incluye el pRetCFN42d, presenten un *oriT* análogo al de RSF1010.

La purificación del fragmento N-terminal (N265) de la relaxasa TraA del plásmido pRetCFN42d ha permitido realizar experimentos de reconocimiento *in vitro* con distintos sitios *nic* de plásmidos relacionados. Los resultados han establecido que la proteína N265TraAHis presenta cierta flexibilidad, siendo capaz de reconocer y unirse específicamente por igual a varias regiones *nic* de diferentes plásmidos de *Rhizobiaceas*. Este reconocimiento específico de las regiones *nic* es concordante con las asociaciones

filogenéticas existentes entre la relaxasa TraA del plásmido pRetCFN42d y las relaxasas de los distintos plásmidos simbióticos o tumorigénicos mostrados en los árboles de las Figuras 3.3 y 3.4. Por tanto la proteína N265TraAHis es capaz de unirse específicamente *in vitro* a oligonucleótidos que presenten una secuencia de 16/17 o más nucleótidos [ACGTATA(A ó -)TTGCG/CCCT], la cual está presente en todos los sitios *nic* de los plásmidos anotados como “megaplásmidos e islas simbióticas” en los árboles filogenéticos de las Figuras 3.4 y 3.3. Sin embargo, no reconoce oligonucleótidos con las secuencias de los sitios *nic* de otros plásmidos crípticos, que aún coexistiendo en muchos casos con estos “megaplásmidos e islas simbióticas” en la misma bacteria (P.e., pRmGR4a y pSymA/pSymB de *S. meliloti*), parecen tener una relación filogenética, en cuanto al sistema conjugativo se refiere, más lejana con el plásmido pRetCFN42d (Figura 3.3 y 3.4).

Además de una capacidad de unión a oligonucleótidos específicos, la proteína N265TraAHis tiene capacidad de corte en los sitios *nic* de los oligonucleótidos de todos los plásmidos con los que había mostrado una interacción positiva. El punto de corte se establece en el sitio *nic* esperado según lo publicado para el plásmido RSF1010 (Scherzinger *et al.*, 1992), es decir, entre los nucleótidos G-145829 y C-145830 de la secuencia del plásmido pRetCFN42d (González *et al.*, 2003).

Igualmente se ha puesto de manifiesto la capacidad de religación de la proteína N265TraAHis con el sitio *nic* del plásmido simbiótico de *R. etli*. Curiosamente, el incremento de tamaño del oligonucleótido que contiene el *nic* parece disminuir el porcentaje de oligonucleótido cortado por N265TraAHis, haciéndose indetectable con el oligonucleótido 25+9 que contiene su propio *nic*. Este resultado podría explicarse por un desplazamiento en el equilibrio de la reacción corte/religación hacia esta última cuando se emplean oligonucleótidos de mayor tamaño.

Los estudios de movilización *in vivo* han restringido aún más el reconocimiento del sistema de transferencia del plásmido pRetCFN42d hacia los diferentes *oriT* ensayados, mostrando sólo posibilidad de movilización sobre los *oriTs* de los plásmidos pSymA y pSymB de *S. meliloti*, además del suyo propio, no reconociendo los *oriTs* de los plásmidos de pTiC58 y pNGR234a con los cuales se había establecido reconocimiento y corte por parte de N265TraAHis *in vitro*. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad e implicación de otras proteínas, además de la relaxasa, en el reconocimiento para la transferencia de un determinado ADN de doble cadena superenrollado (*oriT*), demostrada

Capítulo III

experimentalmente para otros sistemas conjugativos (Ziegelin *et al.*, 1989; Moncalián *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1995).

De estos ensayos *in vivo* se han podido extraer dos características específicas de este sistema conjugativo:

(i) Los sistemas de reconocimiento de la relaxasa y proteínas accesorias con el *oriT* sobre el que actúan, han demostrado ser muy específicos en los sistemas descritos hasta la fecha. De esta forma, el reconocimiento de un determinado *oriT* por un sistema de transferencia heterólogo, por parecido que sea, suele implicar un aumento del tamaño del *oriT* necesario para una transferencia óptima. Esta ganancia de tamaño suele ir acompañada de la presencia de alguna de las funciones de transferencia del propio sistema (proteínas accesorias) implicadas en el reconocimiento del *oriT*. Como ejemplo, el *oriT* del plásmido RP4 (IncP α), que se transfiere a unas frecuencias equiparables a la del plásmido entero (frecuencias en torno a 1), se estableció en unas 350 pb (Fürste *et al.*, 1989). Sin embargo el mínimo fragmento necesario para la movilización heteróloga por el plásmido R751, plásmido IncP subgrupo β muy parecido al anterior (Pansegrau y Lanka, 1987), implica un fragmento de unas 2,2 Kb (1,3 Kb a la izquierda y 0,5 KB a la derecha del *oriT*) exhibiendo además unas frecuencias de transferencia de 10 a 100 veces menores (Fürste *et al.*, 1989). La posibilidad de la movilización heteróloga mediante el aumento de tamaño viene acompañada por la ganancia en *cis* del gen que codifica la proteína accesoria TraJ imprescindible para el reconocimiento del *oriT* IncP α . Sin embargo, el sistema conjugativo del plásmido simbiótico de *R. etli* descrito en este Capítulo, ha demostrado la misma capacidad de movilización sobre su *oriT* (300 pb), que sobre los *oriTs* de los plásmidos simbióticos de *S. meliloti* pSymA y pSymB (300 pb).

(ii) El empleo de diferentes construcciones ha permitido establecer la importancia que tiene para la eficacia conjugativa la posición relativa del gen de la relaxasa con respecto al *oriT* en este tipo de sistemas, demostrándose una drástica bajada en la frecuencia de transferencia cuando el gen que codifica la relaxasa *traA* no se encuentra en la misma molécula (en *cis*) que el *oriT* sobre el que debe actuar. Este hecho podría explicarse atendiendo a la necesidad de la presencia de un *oriT* contiguo, aguas arriba del gen de la relaxasa, para un plegamiento correcto de ésta sobre el *oriT* que tiene al lado, lo que daría explicación a la localización invariablemente adyacente del gen de la relaxasa con respecto al *oriT* en los megaplásmidos de estas bacterias. En ensayos de movilización

realizados con otros sistemas no se ha observado este efecto *cis/trans* (relaxasa-*oriT*) tan acusado (más de 2 órdenes de magnitud en la frecuencia de transferencia), lo que sugiere que se trate de una peculiaridad del tipo de sistemas de transferencia analizado en este trabajo. Ensayos de movilización con sistemas conjugativos de plásmidos relativamente cercanos, como el pTiC58 de *A. tumefaciens*, mediante el empleo de clones portadores del *oriT*, presentan frecuencias similares a las frecuencias de transferencia del plásmido completo, aún en ausencia del gen de la relaxasa en *cis* (Cook y Farrand, 1992).

Estas dos peculiares características del sistema conjugativo de pRetCFN42d podrían estar relacionadas entre si y tener una implicación biológica, dado que en los rizobios es frecuente la presencia de numerosos plásmidos. Esta relación podía establecerse en el sentido de que la posible pérdida de eficiencia en la transferencia del propio plásmido debida a la flexibilidad de la relaxasa para el reconocimiento de *oriTs* heterólogos (i), puede ser suplida por la transferencia preferente de aquél plásmido que porta la relaxasa en *cis* con relación al *oriT* (ii).

De esta forma, en el caso de que en una misma célula co-existan varios plásmidos con sistemas Dtr similares, pero sujetos a regulación diferente, se aseguraría que tenga lugar preferentemente la transferencia de aquél plásmido cuya relaxasa ha sido activada o desreprimida, y no la de otros plásmidos que posean un *oriT* reconocible por ésta.

ANEXO CAPÍTULO III

Anexo 3.1. Construcción del plásmido pETtraAp42d

Para llevar a cabo la amplificación completa del gen diana (*traA* del plásmido pRetCFN42d) se diseñaron dos cebadores específicos:

TraAF: ATGGCGATCATGTTCGTCAGA

TraAR: TTCGAGTCTCAGAGGTTGATG

Como vector, se empleó el AccepTor™ de Novagen® que presenta la particularidad de estar linearizado con 3'-dU libres en los extremos, lo que permite la ligación directa del producto amplificado por una polimerasa que deje 3'-dA en los extremos del amplificado. Debido a que se empleó una polimerasa que poseía corrección de errores (actividad exonucleasa 3'-5' para conseguir una máxima fiabilidad en la amplificación), y que dicha polimerasa no deja extremos 3'-dA desapareados, se incubó el producto de PCR obtenido con una *Taq* polimerasa convencional y dATP (ver material y métodos) para la adición de las colas específicas. Con dicha ligación se transformaron las células competentes Novablue® (suministradas por la casa comercial Novagen®), cepa derivada a su vez de la cepa de *E. coli* K-12, *recA*⁻, *endA*⁻, con posibilidad de selección blanco/azul que carece de la RNA polimerasa de T7, y por tanto es una cepa adecuada para minimizar la expresión basal del transgen introducido. Una vez conseguido el clon (pETtraAp42d), se secuenciaron los extremos del gen *traA* mediante cebadores específicos del vector, con fin de comprobar si la construcción pETtraAp42d era correcta.

Anexo 3.2. Construcción del clon pETN265traA

Para llevar a cabo el clon pTEN265TraA se diseñaron los siguientes cebadores específicos:

TraANdeIF TCACTCATATGGCGATCATGTTCGTCAGAG

TraABamHIR TAAGGATCCTCACTCCTGGCGGGCGGCGAG

Una vez obtenido el producto de PCR, este fue digerido (con las enzimas *NdeI* y *BamHI*, subrayadas en las secuencias de los cebadores) y ligado como *NdeI/BamHI* en el vector pET-3a.

Anexo Capítulo III

Anexo 3.3. Construcción del clon pETN265traAHis

Para llevar a cabo el clon pTEN265TraAHis se diseñaron los siguientes cebadores específicos:

TraANdeIF TCACTCATATGGCGATCATGTTTCGTCAGAG

TraAXhoIR TTTATCTCGAGGCGGGCGGAGAT

Una vez obtenido el producto de PCR, este fue digerido (con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, subrayadas en las secuencias de los cebadores) y ligado como *NdeI/XhoI* en el vector pET-29c. Con la realización de este clon se conseguía una proteína de fusión con 6 histidinas en el extremo C-terminal que facilitaba la purificación de ésta mediante una columna de níquel (Figura 3.5, ver material y métodos apartado 1.13.2.2.).



FIGURA 3.5. Región de clonación/expresión pET-29-a-c(+)

En la figura se muestra la región de clonación utilizada para la obtención de la construcción pTEN265TraAHis.

Anexo 3.4. Construcción de los *oriTs* de 300 pb de los plásmidos pRetCFN42d de *R. etli* (pJB3oriTpRetCFN42d) y pSymA y pSymB de *S. meliloti* (pJB3oriTpSymA y pJB3oriTpSymB)

Para ello se diseñaron los siguientes cebadores específicos:

oriTpRetCFN42d-300

oriTs-F AATGAATTCGCTGCTCGTCGATCATCC

pRetCFN42d oriT-R TCGAAAGCTTATCGATGATTTTGCAGCCA

oriTpSymA-300

oriTs-F AATGAATTCGCCTGCTCGTCGATCATCC

psymAoriT-R TTGAAAGCTTGGATTTCGCGGCCATTC

oriTpSymB-300

oriTs-F AATGAATTCGCCTGCTCGTCGATCATCC

pSymBoriT-R AAGCAAGCTTTACCGTCACGGGCAAATAC

Aprovechando la alta homología en secuencia presente entre estos tres plásmidos se amplificaron los tres *oriTs* utilizando un mismo cebador (oriTs-F) combinado con los respectivos cebadores reversos (-R) específicos de cada plásmido. Los *oriTs* amplificados de 300 pb se clonaron en el vector pJB3Tc19 gracias a las dianas *EcoRI* (subrayada en la secuencia del cebador oriTs-F) y *HindIII* (subrayadas en la secuencia de los cebadores reversos).

Anexo 3.5. Construcción de los *oriTs* de 300 pb de los plásmidos pTiC58 (pJB3oriTpC58Ti) y pNGR234a (pJB3oriTpNGR234a) de *A. tumefaciens* y *Rhizobium sp* respectivamente

Se amplificaron las 150 pb anteriores y posteriores al sitio *nic* de los megaplásmidos pNGR234a y pC58Ti mediante los cebadores:

oriTpNGR234-300

pNGR234aoriT-F CAGCACGGCGCTGCGGCC

pNGR234aoriT-R ATTCCGTCCGTCTCCGTGGCTG

oriTpC58Ti-300

pTiC58oriT-F CGGCTGACGATGCTGGCT

pTiC58oriT-R TCCGGTTCGCATCTCCCTG

Los respectivos productos de PCR, fueron clonados de forma independiente en el vector pGemT y posteriormente digeridos (con *EcoRI*) y clonados en el vector pJB3Tc19.

CAPÍTULO IV

4. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS CRÍPTICOS DE *S. meliloti* GR4

Como se ha comentado en distintas ocasiones en esta tesis doctoral, las bacterias del orden Rhizobiales se caracterizan por presentar su genoma muy fragmentado, donde la presencia de numerosos plásmidos (desde 0 hasta 11 plásmidos) es un fenómeno bastante frecuente. Estos plásmidos se caracterizan por poseer un elevado tamaño (hasta aproximadamente 2 Kb), representando en muchas especies hasta el 50% del total del genoma. Tradicionalmente los plásmidos de esta familia se han clasificado como plásmidos simbióticos y plásmidos no simbióticos o crípticos. Esta diferenciación no deja de ser controvertida debido a que gran número de estos plásmidos crípticos, aunque son prescindibles para la simbiosis, pueden tener influencia en la competitividad, infectividad y eficiencia de este proceso (Brom *et al.*, 2000; García-de los Santos *et al.*, 1996; Sanjuán y Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993).

S. meliloti GR4 presenta, además de los 2 plásmidos simbióticos (pSymA y pSymB), 2 plásmidos crípticos denominados pRmeGR4a y pRmeGR4b de 115 y 140 MDa, respectivamente (Toro y Olivares, 1986). Al menos en pRmeGR4b se ha descrito la presencia de genes que están directamente implicados en la eficiencia de nodulación de *S. meliloti* GR4. Este es el caso de los genes *nfe* (de “nodule fomation efficiency”), localizados en el plásmido pRemGR4b (Sanjuán y Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993) y cuya expresión está regulada por el sistema NifA-RpoN (Sanjuán y Olivares, 1991). Aunque la función de estos genes (*nfeA*, *B*, *C*, *D*) no se conoce, presentan homología con genes tales como los *ocd* de *A. tumefaciens* (de “ornitina ciclodeaminasa”) (Soto *et al.*, 1994), lo que sugiere una función relacionada con el catabolismo de compuestos específicos, cuya utilización podría suponer una ventaja en las primeras etapas de la interacción simbiótica. También en el plásmido pRmeGR4b se ha detectado la presencia de genes implicados en la producción de sustancias como la melanina (Mercado-Blanco y Olivares, 1993) aunque a diferencia de otras especies de rizobios, no se ha encontrado una relación entre la producción de esta sustancia y la fijación de nitrógeno.

En cuanto a la replicación de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b, no se conocen bien las funciones de estos plásmidos implicadas en este proceso. Sin embargo, la alta tasa de estabilidad de estos plásmidos en distintos fondos genéticos sugiere la presencia de un eficiente sistema de replicación y reparto (Mercado-Blanco y Olivares,

Capítulo IV

1993). En la secuencia del plásmido pRmeGR4a se identificó un fragmento *Pst*I de 4,8 Kb que contenía el origen de replicación autónoma de este plásmido (Mercado-Blanco y Olivares, 1993). En dicho fragmento se han identificado varios ORFs, el producto de uno de los cuales (*repC*) presenta cierto grado de similitud con la proteína RepC codificada por el plásmido pRiA4b de *Agrobacterium rhizogenes* (Nishiguchi *et al.*, 1987) y pTiB6S3 de *A. tumefaciens*, la cual es esencial para la replicación del plásmido (Mercado-Blanco y Olivares, 1994b). Experimentos de hibridación sugieren la presencia de un gen ortólogo a *repC* también en pRmeGR4b (Sanjuán J., comunicación personal). La implicación del resto de ORFs de este fragmento en la replicación del plásmido pRmeGR4a no está clara. El ORF2 parece jugar un papel en la estabilización del plásmido, mostrando su producto cierta similitud con proteínas de unión a ADN y proteínas del citoesqueleto de células eucariotas (Mercado-Blanco y Olivares, 1994a).

Al contrario que en los plásmidos simbióticos, la capacidad de autotransferencia de los plásmidos crípticos en condiciones de laboratorio es una característica bastante frecuente (Johnston *et al.*, 1982; Hynes *et al.*, 1988; Huguet *et al.*, 1983; Mercado-Blanco y Olivares, 1993; Brom *et al.*, 2000). En *S. meliloti* GR4, el plásmido pRmeGR4a, además de poseer dicha capacidad autoconjugativa, es capaz de promover la movilización del segundo plásmido críptico de la cepa, pRmeGR4b (Mercado-Blanco y Olivares, 1993). La identificación de una región *Mob*⁺ en pRmeGR4b (pRmOR65; Herrera-Cervera *et al.*, 1998) y el hecho de que la frecuencia de transferencia del plásmido pRmeGR4b sea 10 veces menor que la del plásmido pRmeGR4a, apunta a un fenómeno de movilización *trans* para este plásmido. La caracterización de la región *mob* del plásmido pRmeGR4a, mediante la secuenciación de un fragmento *Mob*⁺ de 2,4 Kb, permitió establecer la presencia de dos ORFs con similitud de secuencia a genes implicados en la transferencia conjugativa y replicación de plásmidos como ColE1 y pTiA6NC, así como la presencia de un hipotético *oriT* (Herrera-Cervera *et al.*, 1998).

En cuanto a regulación, se ha determinado que la transferencia del plásmido pRmeGR4a, y vinculada a éste la del plásmido pRmeGR4b, se inhibe en presencia de amonio. Esta inhibición no parece deberse a un cambio en la fase de crecimiento del donador o del receptor, ni parece afectar a la transferencia de otros plásmidos como RP4 (Herrera-Cervera *et al.*, 1996). El efecto inhibitorio ejercido por el amonio parece actuar a nivel del receptor ya que sólo ha sido observado cuando se usa como receptor *S. meliloti*,

no viéndose efecto alguno cuando se emplea como receptor *A. tumefaciens* (Herrera-Cervera *et al.*, 1996). En este capítulo se ha realizado un estudio de la región de transferencia del plásmido pRmeGR4a con el fin de identificar las funciones implicadas en la transferencia autoconjugativa del mismo.

4.1 Secuenciación y anotación de 10 Kb del plásmido pRmeGR4a alrededor de la región *mob*

Los estudios preliminares sobre la región *mob* del plásmido pRmeGR4a realizados por Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998), indicaban que el hipotético *oriT* del plásmido pRmeGR4a se localizaba en un fragmento *EcoRI/BamHI* de 2,4 Kb (69E2B) situado en el extremo del cósmido pRmOR69, cósmido identificado como Mob⁺ (Ver capítulo 1; Figura 4.1). Para llevar a cabo un estudio detallado de la región *mob* del plásmido pRmeGR4a, se procedió a clonar y secuenciar las regiones adyacentes a este fragmento. Se clonó en el vector pBlueScript y se secuenció el otro fragmento *EcoRI/BamHI* situado aguas abajo (69E2RB) el cual, junto al fragmento de 2,4Kb (69E2B) ya secuenciado, completaba la secuencia de uno de los fragmentos *EcoRI* distales del cósmido pRmOR69 (fragmento 69E2, Figura 4.1).

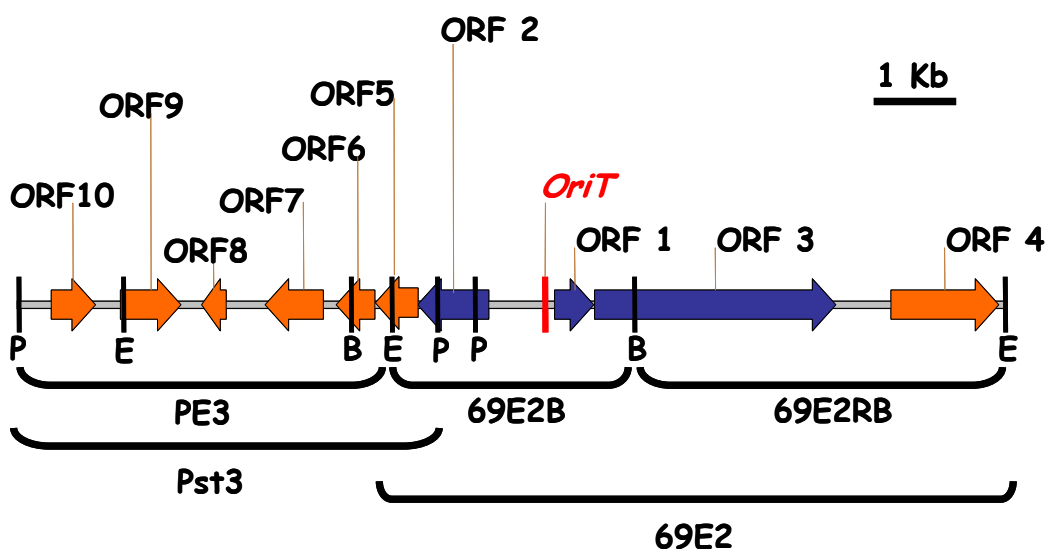


FIGURA 4.1. Región *mob* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4

En la figura se muestran los distintos clones utilizados en la secuenciación de la región *mob* del plásmido pRmeGR4a. En azul se muestran los hipotéticos ORFs implicados en el procesamiento del ADN para la transferencia conjugativa del plásmido. En rojo se indica el hipotético *oriT* propuesto por Herrera-Cervera y colaboradores {Herrera-Cervera, 1998}. P, *PstI*; E, *EcoRI*; B, *BamHI*.

Capítulo IV

Para la identificación de la secuencia situada aguas arriba del fragmento 69E2B, ausente en el cósmido pRmOR69, se utilizó ADN del plásmido pRmeGR4a aislado mediante gradiente de cloruro de cesio. Se clonó y secuenció un fragmento solapante *Pst*I de 4236 pb (*Pst*3; Figura 4.1; Anexo 4.1), que contenía un fragmento *Pst*I/*Eco*RI de 3774 pb de nueva secuencia (PE3; Figura 4.1).

Los fragmentos adyacentes al fragmento conocido 69E2B, fueron secuenciados en doble cadena. El ensamblaje de los distintos fragmentos componían una secuencia total de 9983 pb, formada por un fragmento *Eco*RI/*Pst*I de 3774 pb más la secuencia del fragmento *Eco*RI 69E2 del cósmido pRmOR69 (Figura 4.1). El análisis de la secuencia obtenida mostró los siguientes hipotéticos ORFs:

- ORF10: Se transcribe en dirección al hipotético *oriT*, presenta el codón de iniciación AUG, así como la secuencia GAGGGAA a 7 nucleótidos de éste como posible sitio de unión al ribosoma y el triplete TAA como codón de terminación. Tiene un tamaño de 453 pb cuyo producto (151 aas) presenta homologías significativas con proteínas reguladoras de la transcripción descritas en distintas bacterias del orden Rhizobiales, como *S. meliloti*, *Rhizobium* sp. NGR234, *Mesorhizobium loti*, *A. tumefaciens* y *R. etli*, así como con proteínas reguladores transcripcionales de otras bacterias como *Salmonella* y *Brucella*. Su mayor similitud se establece con la proteína SyrB, cuyo gen se localiza en el pSymA de *S. meliloti* (82% similitud, 74% identidad). El producto de este gen ha sido descrito como un represor de la actividad de SyrM, el cual a su vez es un activador transcripcional de distintos genes como *nodD3* y *syrA* (Barnett y Long, 1997).
- ORF9: Se transcribe en la misma dirección que ORF10, presenta el codón de iniciación AUG, así como la secuencia GAAAG a 4 nucleótidos de éste como posible sitio de unión al ribosoma y el triplete TAG como codón de terminación. Tiene un tamaño de 612 pb cuyo producto (204 aas) presenta homologías significativas (72% similitud, 62% identidad) con el gen SMA1697 del pSymA de *S. meliloti*. Este gen se localiza adyacente y se transcribe en la misma dirección al gen *syrB* y su producto está anotado como una hipotética proteína de función desconocida. La similitud y la localización análoga de ORF9 y ORF10 del plásmido pRmeGR4a con los descritos en pSymA (*syrB* y SMA1697) puede obedecer a un pasado evento de recombinación entre estos dos plásmidos.

- ORF8: ORF de 249 pb, codifica una hipotética proteína de 83 aminoácidos que presenta homología con proteínas de función desconocida que se localizan en plásmidos de bacterias del orden Rhizobiales como la Atu5107 del plásmido críptico pAtC58 de *A. tumefaciens* (53% similitud y 43% de identidad en 79 aas de 103 aas totales), la proteína Yp030 del plásmido simbiótico de *R. etli* (67% similitud y 56% de identidad en 74 aas de 101 aas totales). Igualmente presenta homología con la región carboxilo terminal de la proteína Y4dw hipotética proteína de función desconocida codificada en el plásmido simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234.
- ORF7: ORF de 594 pb que codifica una hipotética proteína de 198 aminoácidos que presenta homología significativa (76% similitud, 54% identidad en 162 aas de la secuencia) con la hipotética proteína de función desconocida Yh012 del plásmido simbiótico de *R. etli*. Igualmente presenta homología con proteínas anotadas como hipotéticos reguladores transcripcionales en distintas bacterias del orden Rhizobiales, entre los que aparece *Mesorhizobium* sp. BNC1 (MBNC02003659, 64% similitud, 34% identidad, en 157 aas de 167 aas totales).
- ORF6: ORF de 390 pb que codifica una hipotética proteína de 130 aas que presenta homología con una pequeña región de una hipotética proteína codificada en el cromosoma de *S. meliloti* de función desconocida (SMc02351 de 155 aas; 54% similitud y 32% identidad, en 37 aas de 155 aas totales).
- ORF5: ORF de 435 pb que codifica una hipotética proteína de 145 aas que presenta homología significativa (54% similitud, 40% identidad, en 109 aas de 117 aas totales) con la hipotética proteína MBNC02003660 de *Mesorhizobium* sp. BNC1.
- ORF2: Ya fue anotado por Herrera-Cervera y colaboradores (1998). La hipotética proteína (240 aas) codificada por este gen (720 pb) presenta homologías con diversas proteínas que en su región carboxilo terminal se caracterizaban por poseer un dominio de unión a NTPs. Las principales homologías se establecieron con las proteínas ParA y VirC1 de megaplásmidos de *A. tumefaciens*, así como con diversas proteínas de origen plasmídico y enzimas bacterianas que unen ATP/GTP. Tras una reciente búsqueda en las bases de datos, se han podido encontrar otras proteínas que poseen un mayor grado de similitud con el hipotético producto del

Capítulo IV

ORF2. De nuevo las mayores similitudes se establecen con proteínas que interactúan con el ADN, como la proteína MBNC02003661 (64% similitud, 41% identidad, en 226 aas de 233 aas totales) anotada como una hipotética proteína implicada en el reparto del cromosoma a las células hijas en *Mesorhizobium* sp. BNC1.

- ORF1: El gen se encuentra en el fragmento 69E2B de 2,4 Kb (Figura 4.1) que contiene el *oriT* de pRmeGR4a y que fue anotado por Herrera-Cervera y colaboradores (1998). Se anotó como una hipotética proteína (133 aas) con homologías significativas con proteínas implicadas en la transferencia conjugativa de distintos plásmidos como el ORF4 del plásmido pTF4.1 de *Thiobacillus ferrooxidans* o la proteína MbeC del plásmido Cole1. Una nueva búsqueda en la base de datos pone de manifiesto, nuevamente, que la mayor homología del ORF1 se establece con una proteína de *Mesorhizobium* sp. BNC1, la MBNC02003662 (66% similitud, 47% identidad, en 121 aas de 131 totales). Esta proteína está anotada como una hipotética fosfotransferasa. Igualmente aparecen similitudes menores (50% similitud, 27% identidad, en 97 aas de 191 aas totales) con otras proteínas plasmídicas de bacterias que establecen interacciones con plantas como XFa0048 del plásmido pXF51 de *Xylella fastidiosa* 9a5c, bacteria patógena de plantas. Esta proteína presenta una posición análoga al ORF1 de pRmeGR4a con respecto al hipotético *oriT*, como se indicará posteriormente.
- ORF3: Se transcribe en la misma dirección que el ORF1 y presenta un tamaño de 2445 pb. El producto de este gen (815 aas) presenta homologías significativas con diferentes proteínas tales como la MBNC02003663 *Mesorhizobium* sp. BNC1 (60% similitud, 49% identidad, en 722 aas de 895 aas totales), la cual está anotada como una relaxasa tipo VirD2. La siguiente proteína con la que presenta más similitud es MII9292, hipotética proteína codificada por el plásmido pMLa de *M. loti* (41% similitud, 24% identidad, en 746 aas de 756 aas totales). Igualmente presenta similitudes parciales con otras proteínas plasmídicas anotadas como hipotéticas relaxasas: TraS del plásmido pSB102 (42% similitud, 28% identidad, en 204 aas de 352 aas totales), XFa0047 del plásmido pXF51 de *Xylella fastidiosa* 9a5c (41% similitud, 27% identidad, en 215 aas de 463 aas totales) o TraR del plásmido pIPO2T (40% similitud, 26% identidad, en 223 aas de 364 aas totales). La

hipotética proteína codificada por el ORF3 presenta homologías con otras proteínas que, al igual que MBNC02003663 de *Mesorhizobium* sp. BNC1, están anotadas como hipotéticas relaxasas de localización cromosómica, este es el caso de las hipotéticas proteínas Bcep02007396, Bcep02000070, Bcep02006795 de *Burkholderia fungorum* LB400, también anotadas como relaxasas semejantes a virD2, localizadas en posición adyacente a sendos sistemas de secreción tipo VirB. El producto de ORF3 presenta una homología con todas ellas de un 40% de similitud y un 27% de identidad en un fragmento central de la proteína (54% del total de la proteína).

- ORF4: Con un tamaño de 1092 pb, codifica una hipotética proteína de 364 aminoácidos, con alta similitud de secuencia a diversas hidrolasas o acetiltransferasas pertenecientes a la superfamilia de hidrolasas α/β . Entre éstas las similitudes más altas se establecen con la hipotética hidrolasa (MBNC02003214) de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (88% similitud, 77% identidad, en 329 aas de 340 aas totales).

4.2. Región Dtr del plásmido pRmeGR4a

Tras la secuenciación y anotación de los genes de la región *mob* del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti*, se realizó un estudio para intentar establecer las posibles relaciones existentes entre los elementos presentes en esta región de pRmeGR4a y elementos de otras hipotéticas regiones *mob*. Este estudio se realizó atendiendo a tres parámetros: (i) caracterización de la hipotética relaxasa (ii) localización y caracterización de la hipotética región *nic* del *oriT* (iii) sintenia u organización de los genes que se establecen en torno al hipotético *oriT*.

Haciendo un repaso de las principales similitudes mostradas por el ORF3, hipotética relaxasa del plásmido pRmeGR4a, con diferentes proteínas de las bases de datos (Tabla 4.1), se pueden establecer diferentes grupos atendiendo a los diferentes grados de similitud presentes entre estas proteínas. Por una parte, la hipotética relaxasa del plásmido pRmeGR4a presenta una similitud relativamente alta a lo largo de la práctica totalidad de su secuencia aminoacídica con las proteínas MBNC02003663 y MII9292 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 y *Mesorhizobium loti* MAFF303099, respectivamente (Tabla 4.1).

Capítulo IV

TABLA 4.1. Similitudes de ORF3 del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti* con otras hipotéticas relaxasas.

Hipotética relaxasa	Localización	Bacteria/fuente	tamaño	Nº de Aas sobre el que se expresan los datos de S e I	S (%)	I (%)
ORF3	pRmeGR4a	<i>Sinorhizobium meliloti</i> GR4	815	-	-	-
MBNC02003663	cromosoma	<i>Mesorhizobium sp</i> BNC1	895	722	60	49
MII9292	pMLa	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	756	746	41	24
XFa0047	pXF51	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	463	215	41	27
TraS	pSB102	Aislado de rizosfera	352	204	42	28
TraR	pIPO2T	Aislado de rizosfera	364	223	40	26

Se muestran los datos de localización, fuente y homología (similitud, S; e Identidad, I) de diferentes proteínas encontradas tras enfrentar la secuencia génica del ORF3 a la base de datos (Blast X).

Las 3 proteínas son de un tamaño parecido (entre 756 y 895 aas) y pertenecen a bacterias de géneros del orden Rhizobiales. No obstante tan sólo 2 de ellas, ORF3 y MII9292, son productos de genes de localización plasmídica, ubicados en los plásmidos crípticos pRmeGR4a y pMLa, respectivamente. De éstos, sólo el plásmido pMLa ha sido totalmente secuenciado (Kaneko *et al.*, 2000). La proteína MBNC02003663, sin embargo, está anotada como el producto de un gen cromosómico, si bien la secuenciación y anotación es relativamente reciente y aún no se ha completado. El alineamiento realizado entre estas 3 proteínas muestra la conservación de motivos típicos descritos para diversas relaxasas (Pansegrau *et al.*, 1994; Pansegrau y Lanka, 1991; Figura 4.3).

Por otro lado, el producto del gen ORF3 presenta una homología parcial con las proteínas XFa0047, TraS y TraR de los plásmidos pXF51, pSB102 y pIPO2T respectivamente. Estos plásmidos tienen sistemas de transferencia conjugativa semejantes, estando sus respectivas relaxasas conservadas, presentando más de un 55% de similitud (Simpson *et al.*, 2000; Schneiker *et al.*, 2001; Tauch *et al.*, 2002), tal y como se muestra en los estudios filogenéticos realizados en el capítulo 3 de esta tesis (Figura 3.3). El plásmido pXF51 de la bacteria fitopatógena *X. fastidiosa* es uno de los dos plásmidos de la cepa 9a5c, presenta un tamaño de 51 Kb, con 64 ORFs anotados de los que 20 son genes hipotéticamente implicados en la transferencia conjugativa del plásmido. Por su parte pSB102 y pIPO2T, de 55 y 45 Kb respectivamente, fueron aislados de la rizosfera de leguminosas (en concreto el pSB102 se aisló de la rizosfera de alfalfa). El plásmido

pSB102 se caracteriza por portar genes de resistencia a metales pesados. Estos 3 plásmidos, pXF51, pSB102 y pIPO2T, han sido descritos como una nueva familia de plásmidos de amplio rango de hospedador presentes en comunidades microbianas asociadas a plantas (Tauch *et al.*, 2002). Las similitudes presentes entre las proteínas ORF3, XFa0047, TraS y TraR, se localizan fundamentalmente en un fragmento central de la hipotética relaxasa del plásmido pRmeGR4a, donde se localiza el motivo III descrito para este tipo de proteínas (Figura 4.3)

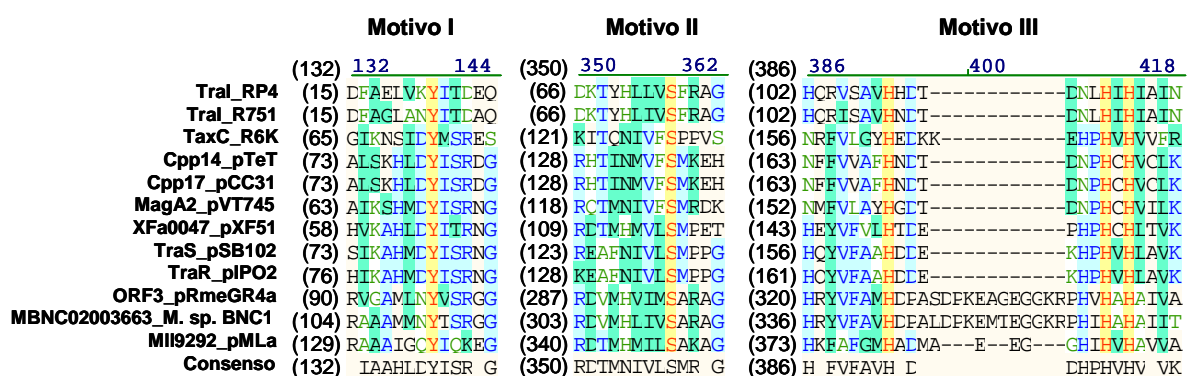


FIGURA 4.3. Alineamiento parcial de diversas proteínas que presentan homologías con hipotéticas relaxasas de plásmidos crípticos del orden Rhizobiales.

En la figura se muestran fragmentos del alineamiento de distintas proteínas: TraI de RP4: S23001, TraI de R751: NP_044272, TaxC de R6K: S72275, Cpp14 de pTet: YP_063459, Cpp17 de pCC31: YP_063412, MagA2 de pVT745: NP_067550, XFa0047 de pXF51: NP_061702, TraS de pSB102: NP_361030, TraR de pIPO2T: NP_444535, ORF3 de pRmeGR4a: esta tesis, MBNC02003663 de *Mesorhizobium* sp. BNC1: ZP_00193217, MII9292 de pMLa: NP_085827. Entre paréntesis se indica la posición del residuo de partida. Se indican los residuos conservados pertenecientes al motivo I, II y III descrito para las relaxasas. Rojo sobre amarillo = aminoácidos invariantes; azul sobre azul = fuertemente conservados; negro sobre verde = similares; verde sobre blanco = poco similares; Negro sobre blanco = no conservados.

Una vez establecidas las similitudes entre las hipotéticas relaxasas descritas en este apartado, se procedió a realizar un análisis comparativo de los supuestos sitios *nic* sobre los que actuarían estas proteínas. Herrera-Cervera y colaboradores describieron un hipotético *oriT* para el plásmido pRmeGR4a (Herrera-Cervera *et al.*, 1998), el cual se encontraba en la región intergénica entre los ORFs 1 y 2 (Figura 4.1). Este hipotético *oriT* contiene una región *nic* que presenta homología de secuencia con la región *nic* del plásmido RP4 (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Por otra parte, para los plásmidos pXF51a, pSB102 y pIPO2T también se han descrito los hipotéticos *oriTs* en una situación análoga al pRmeGR4a con respecto a la hipotética relaxasa, cada uno de los cuales presenta una región en torno al sitio *nic* conservada y similar a la de RP4 (Tauch *et al.*, 2002). Para el plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099, así como para el genoma de

Capítulo IV

Mesorhizobium sp. BNC1 no se ha descrito ningún tipo de origen de transferencia hasta la fecha.

Mediante la búsqueda de secuencias conservadas con la región *nic* del plásmido RP4 en las regiones de ADN adyacentes a los genes de cada una de las respectivas relaxasas, y su posterior alineamiento, se pudieron establecer las hipotéticas regiones *nic* de cada uno de estos replicones, con la excepción del plásmido pMLa (Figura 4.4.A). Los intentos de identificación de otros tipos de secuencias *nic* descritos en la literatura, en una región cercana a la hipotética relaxasa (M119292) en el plásmido pMLa, fueron infructuosos. Sin embargo, un estudio más minucioso de la región intergénica M119294-M119293 permitió poner de manifiesto una secuencia de ADN, la cual, si bien no conservaba una alta identidad, si presentaba cierta similitud con una región *nic* tipo RP4, como la descrita para los anteriores replicones (Figura 4.4.B).

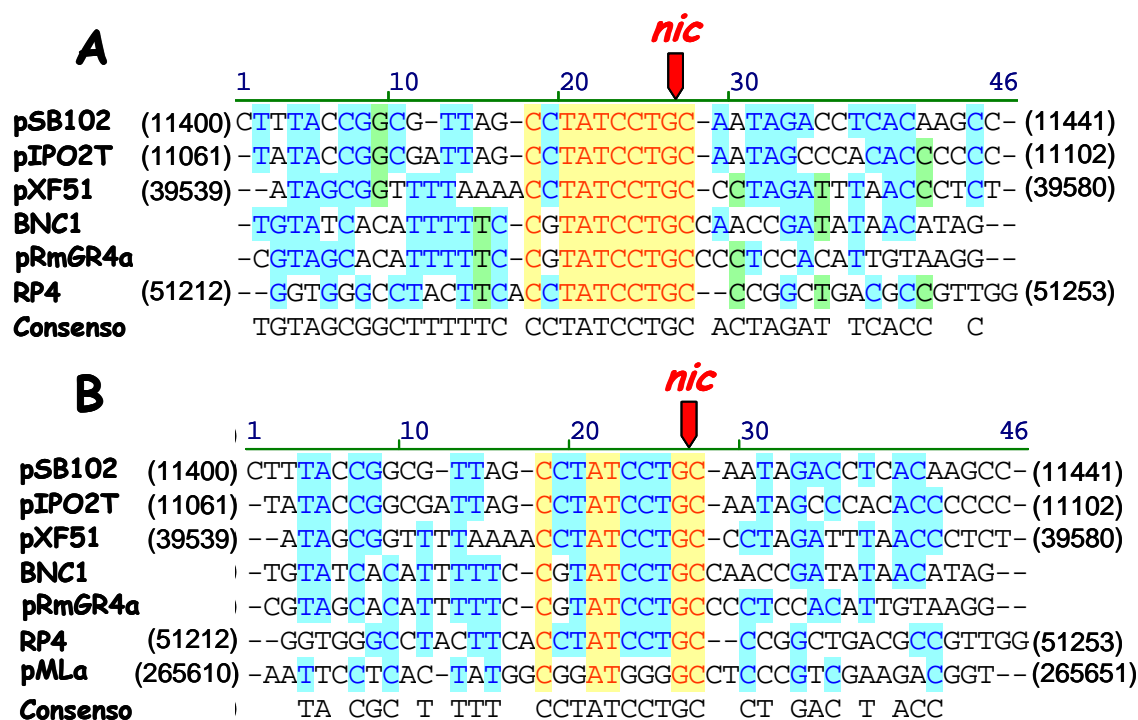


FIGURA 4.4. Alineamiento de las hipotéticas regiones *nic*.

En la figura se muestra el alineamiento de las secuencias de 42 nucleótidos (24+18) de las hipotéticas regiones *nic* de distintos replicones. Entre paréntesis se establecen las posiciones relativas a la secuencia de cada plásmido. En rojo se indica el hipotético sitio *nic*. A, alineamiento sin incluir al pMLa. B, alineamiento A + la hipotética región *nic* del plásmido pMLa. Rojo sobre amarillo = nucleótidos totalmente conservados; azul sobre azul = conservados en más del 50% de las secuencias; negro sobre verde = conservados en el 50% de las secuencias.

Por su parte, el estudio de la disposición de los genes más inmediatos al hipotético *oriT*, presentes en la supuesta región *mob* de cada uno de estos replicones, demostró que existe una organización similar en todos ellos (Figura 4.5). De forma casi invariable, la hipotética relaxasa está separada del posible *oriT* por un ORF que se transcribe en el mismo sentido que aquélla. Estos ORFs codifican funciones que supuestamente están implicadas en el procesamiento del ADN que va a ser transferido conjugativamente hasta la célula receptora. El hipotético *oriT* se establece siempre en la región intergénica que separa el ORF que precede a la relaxasa y un segundo ORF que suele transcribirse en dirección opuesta, con la excepción de ORF14 de pSB102 y ORF12 de pIPO2T, los cuales se transcriben en la misma dirección (Figura 4.5).

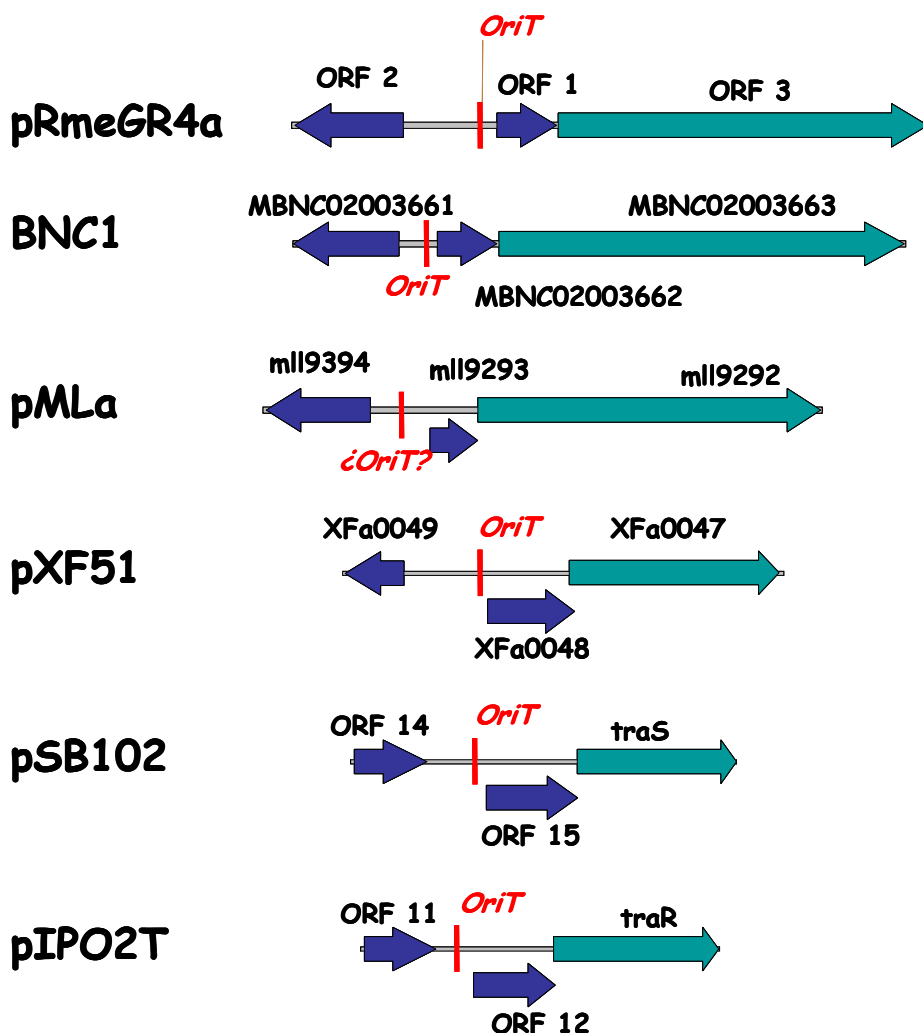


FIGURA 4.5. Organización de varias hipotéticas regiones Dtr.

En la figura se muestran la organización genética de las hipotéticas regiones Dtr de diferentes replicones. En verde se muestra el gen de la supuesta relaxasa. En rojo se indica la posición del hipotético *oriT*.

Capítulo IV

4.2.1. Mutagénesis del ORF3 del plásmido pRmeGR4a

Para comprobar el papel de ORF3 en la transferencia conjugativa de pRmeGR4a, se realizó una mutagénesis dirigida sobre dicho gen en la cepa GR4KL de *S. meliloti* mediante la interposición de un casete de resistencia a gentamicina (Gm) en un sitio *Bam*HI del marco abierto de lectura de dicho gen (Anexo 4.2; Figura 4.6). Dicha cepa presenta marcados los plásmidos pRmeGR4a (Sm/Spc) y pRmeGR4b (Km), lo que posibilitaba un estudio comparativo entre la cepa mutante y silvestre sobre la transferencia de ambos plásmidos crípticos. Una vez obtenido el mutante GR4KLORF3::Gm y comprobado mediante hibridación (Figura 4.7), éste se complementó con el fragmento 69E2 (Figura 4.1) clonado en el vector pJB3Tc19 (pJB69E2; Tc^r, Ap^r) introduciéndose la misma construcción en la cepa parental GR4KL como control. Las diferentes cepas (Tabla 4.2) se conjugaron con la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* como receptora. Se determinó la frecuencia de transferencia de los plásmidos pRmeGR4a (Sm/Spc) y pRmeGR4b (Km), así como la transferencia del plásmido pJB69E2 (Cb) cuando estuvo presente (Tabla 4.2). De los resultados obtenidos se concluye que: (i) La mutagénesis de ORF3 implica una pérdida total de la capacidad de transferencia de pRmeGR4a; (ii) la mutación en el gen ORF3 provoca una disminución de la frecuencia de transferencia de pRmeGR4b (entre 5 y 8 veces), que resulta ser independiente de si dicha mutación se complementa en *trans* o no (Tabla 4.2) (iii) la complementación de la transferencia del plásmido pRmeGR4a no llega a ser total con el fragmento 69E2, observándose un descenso en la frecuencia de transferencia de este plásmido de más de 30 veces desde la cepa mutante complementada (GR4KLORF3::Gm pJB69E2) en comparación con su parental (GR4KL pJB69E2).

4.3. Identificación del sistema Mpf del plásmido pRmeGR4a: Secuenciación y anotación de los fragmentos *Eco*RI 69E1 y 69E0 del cósmido pRmOR69

Tras el estudio de la región *mob* de pRmeGR4a se procedió a localizar un T4SS que pudiera funcionar como sistema Mpf en la transferencia conjugativa de los plásmidos crípticos de *S. meliloti* GR4. Debido al total desconocimiento de la secuencia, más allá del fragmento *Pst*I-*Eco*RI de 10Kb secuenciado (Apartado 4.1), se realizó un estudio de localización de los hipotéticos genes Mpf con respecto a sus respectivas hipotéticas regiones *mob* en aquellos replicones que más similitudes habían mostrado con la región

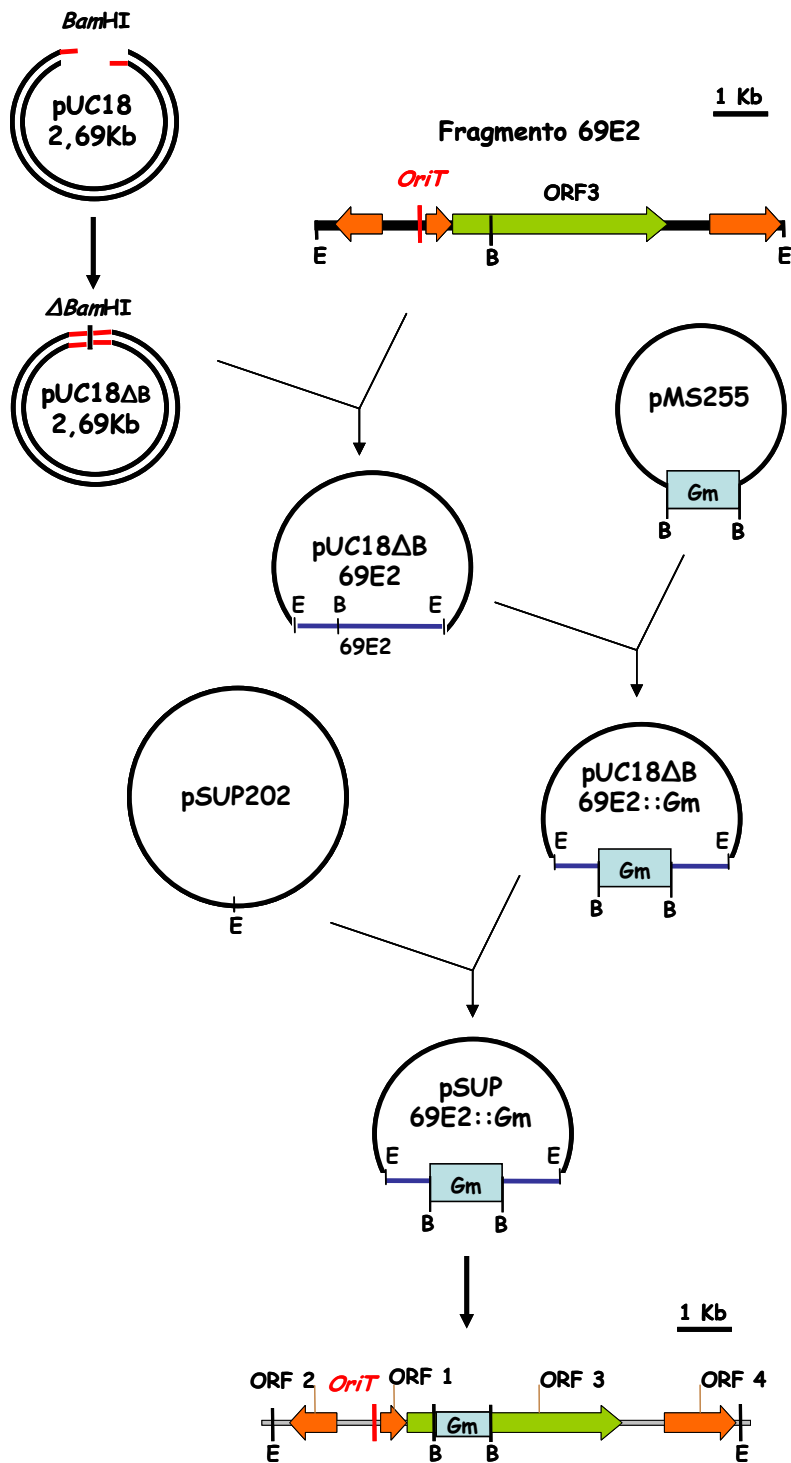


FIGURA 4.6. Mutagénesis de ORF3

Construcción del mutante en el gen ORF3 que codifica la hipotética relaxasa del plásmido pRmeGR4a mediante inserción del gen de la *Gm*. E, *Eco*RI; B, *Bam*HI.

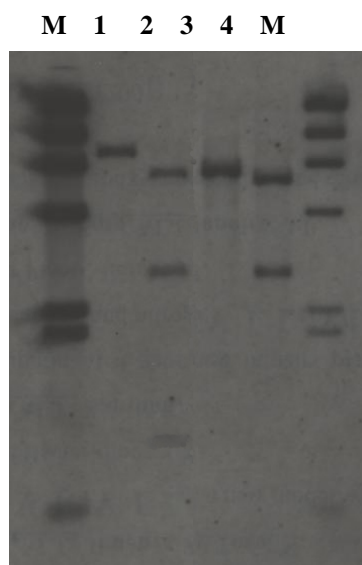


FIGURA 4.7. Hibridación de ADN del mutante ORF3

En la figura se muestra la hibridación de ADN genómico de la cepa GR4KLORF3::Gm (carriles 1 y 2) y de la cepa parental GR4KL (carriles 3 y 4) digeridos con *EcoRI* (carriles 1 y 3) y *BamHI* (carriles 2 y 4) mediante el empleo de la sonda pUCΔB69E2Gm.

TABLA 4.2. Efecto de la mutación en el gen ORF3 en la transferencia de los plásmidos crípticos de *S. meliloti* GR4.

	<i>pRmeGR4b (Km^r)^a</i>	<i>pRmeGR4a (Spc^r)^a</i>	<i>Vector(Cb)^a</i>
GR4KL	7,04 x 10 ⁻⁶	7,26 x 10 ⁻⁵	-
GR4KL pJB69E2	4,92x10 ⁻⁶	5,3x10 ⁻⁵	4,04x10 ⁻⁵
GR4KLORF3::Gm	8,65 x 10 ⁻⁷	0	-
GR4KLORF3::Gm pJB69E2	8,57x10 ⁻⁷	1,6x10 ⁻⁶	3,74x10 ⁻⁵

^a Frecuencias de transferencia por receptor de los plásmidos crípticos utilizando la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens*, como receptora. Las frecuencias indicadas son el resultado de la media de al menos dos experimentos.

mob de pRmeGR4a (plásmido pMLa de *M. loti* MAFF303099 y *Mesorhizobium* Sp. BNC1). En la Figura 4.8 se puede ver como aguas abajo de los genes que codifican las hipotéticas relaxasas *mll9292* del plásmido pMLa de *M. loti* y MBNC02003663 del *Mesorhizobium* sp. BNC1, se encuentran sendos operones que muestran homología a un T4SS de tipo *virB*, a una distancia de 26 Kb y 6Kb respectivamente. Pese a que la distancia entre la supuesta región *mob* y el hipotético T4SS es muy diferente entre estos dos sistemas, la organización de los genes de este T4SS, así como la orientación de todo el operón con respecto a la relaxasa son similares. Se mantienen, además, una conservación relativamente alta entre las secuencias de los diferentes elementos análogos que forman estos 2 T4SS (datos no mostrados). Adyacente a ambos T4SS y dispuestos en el mismo

sentido, se localizan los genes *mlr9261* del plásmido pMLa de *M. loti* y MBNC02003666 de *Mesorhizobium* sp. BNC1, cuyos productos presentan homología significativa con proteínas acopladoras tipo VirD4 (Figura 4.8).

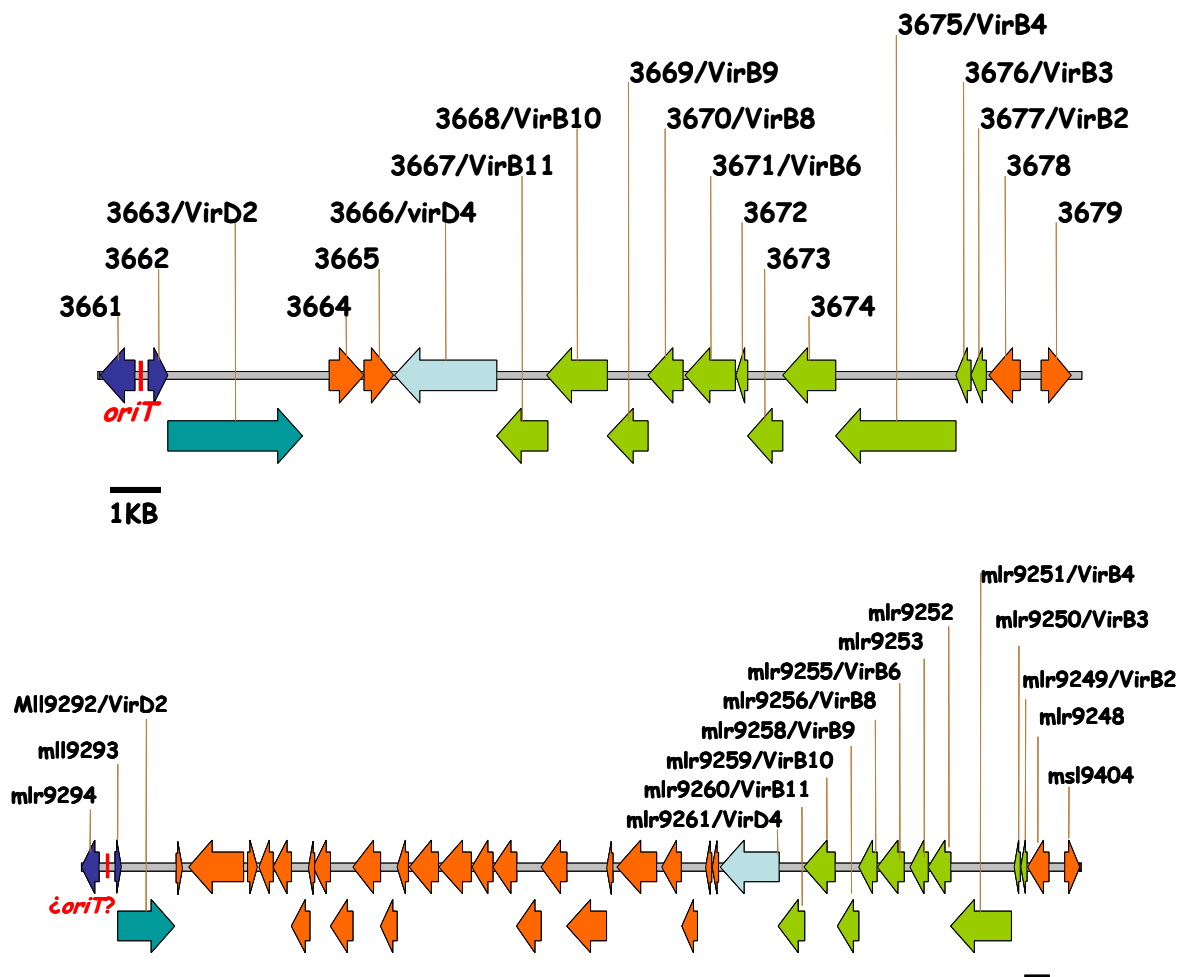


FIGURA 4.8. Organización genética de 2 hipotéticas regiones de transferencia relacionadas con la del plásmido pRmeGR4a.

A, hipotética región de transferencia de *Mesorhizobium* sp BNC1, la nomenclatura de los genes presentes se encuentra de forma que se ha respetado el nombre de anotación abreviándolo con los 4 últimos dígitos acompañado del nombre de la función de transferencia con la que muestra homología en el caso en que así sea, ej MBNC02003663 = 3663/virD2. B, hipotética región de transferencia del pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099, la nomenclatura de los genes presentes se encuentra de forma que se ha respetado el nombre de anotación acompañado del nombre de la función de transferencia con la que muestra homología en el caso en que así sea. Los genes que codifican hipotéticas proteínas accesorias implicadas en el procesamiento del DNA a transferir, se muestran en azul oscuro; la hipotética relaxasa, en turquesa, las hipotéticas proteínas acopladoras, en azul claro; aquellos genes de tipo *virB*, en verde.

Con estos precedentes se decidió secuenciar los fragmentos *EcoRI* 69E1 y 69 E0 que con el fragmento 69E2, ya secuenciado (Figura 4.1), completaban la secuencia del cósmido pRmeOR69, cósmido identificado como portador de la región *mob* del plásmido pRmeGR4a (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Para ello se subclonaron dichos fragmentos en

Capítulo IV

el plásmido pBluescript y se enviaron para su secuenciación por doble cadena a la empresa Sistemas Genómicos[®]. El análisis de la secuencia obtenida mostró los siguientes hipotéticos ORFs, cuya organización se puede observar en la Figura 4.9:

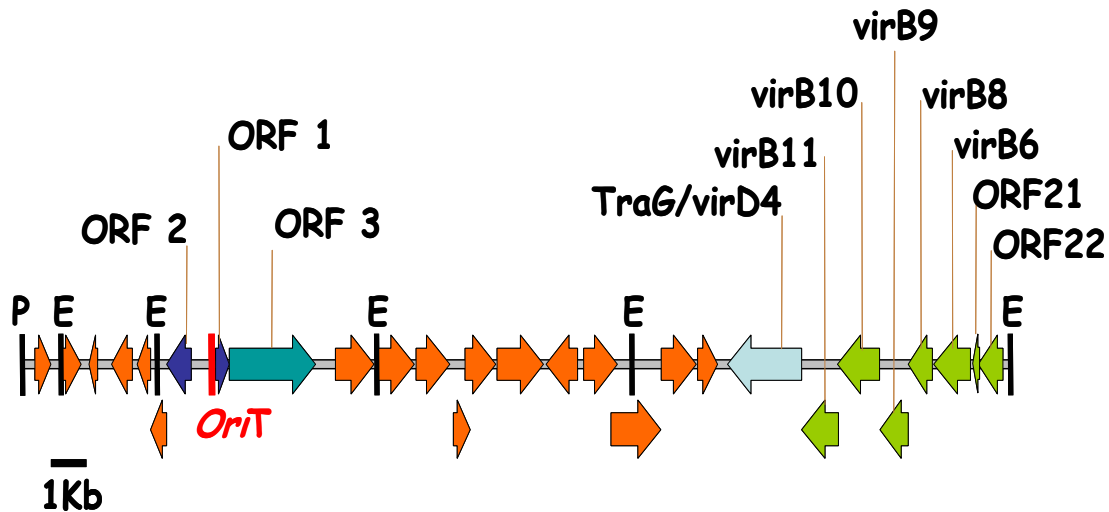


FIGURA 4.9. Organización genética de la hipotética región de transferencia del plásmido pRmeGR4a de *S. meliloti*.

Los genes que codifican hipotéticas proteínas accesorias implicadas en el procesamiento del DNA a transferir, se muestran en azul oscuro; la hipotética relaxasa, en turquesa, las hipotéticas proteínas acopladoras, en azul claro; aquellos genes de tipo *virB*, en verde; E, *EcoRI*; P, *PstI*.

- ORF 11: Presenta un tamaño de 1068 pb y codifica una hipotética proteína de 356 aminoácidos. Se localiza adyacente al ORF4, se transcribe en la misma dirección y presenta alta similitud con diversas hidrolasas o acetiltransferasas, pertenecientes a la superfamilia de hidrolasas α/β , al igual que ORF4. Entre éstas, las similitudes más altas se establecen con la hipotética hidrolasa (MBNC02003215) de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (89% similitud, 79% identidad, en 340 aas de 337 aas totales). Igualmente presenta una alta similitud con otro ORF de *Mesorhizobium* sp. BNC1 anotado como un hipotético regulador transcripcional, el MBNC02003221 (92% similitud, 85% identidad, en 294 aas de 295 aas totales).
- ORF12: Presenta un tamaño de 957 nucleótidos y codifica una hipotética proteína de 319 aas, que exhibe homología parcial con diversas descarboxilasas de procariontes, en su extremo N-terminal. Las mayores similitudes se muestran con descarboxilasas de la especie *Yersinia pestis* (85% de similitud, 75% de identidad en la totalidad de la proteína). La parte

C-terminal de ORF12, sin embargo, muestra homología con distintas hipotéticas proteínas conservadas de función desconocida, las cuales se caracterizan por poseer un motivo hélice- β de doble cadena. Las mayores homologías de la región C-terminal se establecen con la proteína Avin3168 de *Azotobacter vinelandii* (81% de similitud, 71% de identidad en 131 de 132 aas totales)

- ORF13: Con un tamaño de 480 pb codifica una hipotética proteína de 160 aas que presenta un alta conservación de secuencia con una pequeña hipotética proteína de función desconocida de *Mesorhizobium* sp. BNC1, MBNC02003218 (81% de similitud, 69% de identidad en los 160 aas)
- ORF14: Tiene un tamaño de 870 pb que codifica una hipotética proteína de 290 aas, cuyo extremo C-terminal presenta homología con una hipotética proteína de función desconocida de *Mesorhizobium* sp. BNC1, MBNC02003219 (75% de similitud, 60% de identidad en los 232 aas totales de esta proteína). El resto de similitudes mostradas con proteínas de la base de datos son menores y ninguna con función conocida.
- ORF15: Presenta un tamaño de 1236 pb y codifica una hipotética proteína de 412 aas que presenta una discreta homología con adenilato-ciclasas de distintas bacterias. La mayor similitud se establece con la adenilato-ciclasa mlr4588 de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (44% de similitud, 26% de identidad en 432 aas de los 458 aas totales de esta proteína).
- ORF16: Presenta un tamaño de 888 pb y codifica una hipotética proteína de 296 aas, que muestra una gran similitud con proteínas anotadas como reguladores de la transcripción génica. Varias de ellas anotadas como pertenecientes a la familia de Lys-R. Igualmente, las mayores similitudes se establecen con una proteína de *Mesorhizobium* sp. BNC1, MBNC02003221 (92% de similitud, 85% de identidad en 294 aas de los 295 aas totales de esta proteína).
- ORF17: Presenta un tamaño de 975 pb y codifica una hipotética proteína de 325 aas, cuya secuencia muestra una gran homología con diversas proteínas anotadas como aldo/ceto reductasas u oxido-reductasas de diferentes bacterias Gram (-). La mayor similitud se establece con la proteína

aldo/ceto reductasa bl15547, de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (81% de similitud, 71% de identidad).

- ORF18: Presenta un tamaño de 1419 pb, y codifica una hipotética proteína de 473 aas, que muestra homología con diversas proteínas anotadas como oxido-reductasas de diferentes bacterias Gram (-). La mayor similitud se establece con la oxido-reductasa MBNC02003222 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 la cual está anotada como una proteína relacionada con aril-alcohol deshidrogenasas (89% de similitud, 80% de identidad).
- ORF19: Presenta un tamaño de 987 pb y codifica una hipotética proteína de 329 aas, la cual muestra, de nuevo, una homología con diversas oxido-reductasas. En este caso la mayor similitud se muestra con una hipotética oxido-reductasa de *Azotobacter vinelandii*, Avin4231 (88% de similitud, 82% de identidad en 329 aas de los 330 totales de esta proteína).
- ORF20: Presenta un tamaño de 582 pb, codifica una hipotética proteína de 194 aas que muestra una alta similitud con flavodoxinas de diferentes bacterias. La mayor similitud se establece con la hipotética flavodoxina MBNC02003227 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (79% de similitud, 69% de identidad en 193 aas de los 196 totales de esta proteína)
- TraG/VirD4: Presenta un tamaño de 2091 pb y codifica una hipotética proteína de 697 aas, la cual presenta homología con diversas proteínas acopladoras (TraG/virD4) de varios T4SS. Las mayores similitudes, y siguiendo la tendencia del resto de genes implicados en la transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4a, se establecen con la proteína MBNC02003666, anotada como VirD4 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (76% de similitud, 63% de identidad en los 678 aas de 692 totales de esta proteína). La segunda mayor similitud se establece con la hipotética proteína acopladora del plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099, otro plásmido que posee un hipotético sistema de transferencia muy parecido al de pRmeGR4a, tal y como se ha venido apuntando en este capítulo (49% de similitud, 30% de identidad en 610 aas de los 775 totales de esta proteína).

- VirB11: Presenta un tamaño de 1026 pb, codifica una hipotética proteína de 342 aas que tiene homologías con diversas proteínas anotadas como VirB11 de varios T4SS. Igualmente, las mayores similitudes se establecen con la MBNC02003667 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (88% de similitud, 77% de identidad en 325 aas de los 341 totales de esta proteína). De nuevo, la segunda mayor similitud se establece con la hipotética proteína mlr9260, anotada como VirB11 del plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (73% de similitud, 56% de identidad en 323 aas de los 348 totales de esta proteína).
- VirB10: Presenta un tamaño de 1200 pb, codifica una hipotética proteína de 400 aas que muestra homologías con diversas proteínas anotadas como VirB10 de varios T4SS. Siguiendo la misma tendencia, las mayores similitudes se establecen con la proteína MBNC02003668 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (80% de similitud, 67% de identidad en los 405 aas de 406 totales de esta proteína). Igualmente, la segunda mayor similitud se establece con la hipotética proteína mlr9259, anotada como VirB10 del plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (54% de similitud, 40% de identidad en 323 aas de los 348 totales de esta proteína).
- VirB9: Presenta un tamaño de 807 pb, codifica una hipotética proteína de 269 aas que presenta homología con diversas proteínas anotadas como VirB9/TrbG de varios T4SS. Las mayores similitudes se establecen con la MBNC02003669 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (88% de similitud, 78% de identidad en los 251 aas de 269 totales de esta proteína). La segunda mayor similitud se establece con la hipotética proteína mlr9258, anotada como TrbG, del plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (62% de similitud, 46% de identidad en 246 aas de los 278 totales de esta proteína).
- VirB8: Presenta un tamaño de 693 pb, que codifica una hipotética proteína de 231 aas que presenta homologías con diversas proteínas anotadas como VirB8 de varios T4SS. Las mayores similitudes se establecen con la proteína MBNC02003670, anotada como VirB9, de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (87% de similitud, 74% de identidad en los 228 aas de 231 totales de esta proteína). La segunda mayor similitud se establece con la hipotética

Capítulo IV

proteína mlr9256 del plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (70% de similitud, 50% de identidad en 214 aas de los 243 totales de esta proteína).

- VirB6: Exhibe un tamaño de 1035 pb, codifica una hipotética proteína de 345 aas, que presenta homologías con diversas proteínas anotadas como VirB6 de varios T4SS. Las mayores similitudes se establecen con la MBNC02003671 de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (71% de similitud, 51% de identidad en los 345 aas de 336 totales de esta proteína, con 4% de “gaps”). La segunda mayor similitud se establece con la hipotética proteína mlr9255 del plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (46% de similitud, 26% de identidad en 331 aas de los 356 totales de esta proteína).
- ORF21: Presenta un tamaño de 225 pb, codifica una hipotética proteína de 75 aas que sólo presenta una alta similitud con una hipotética proteína de función desconocida de *Mesorhizobium* sp. BNC1, MBNC02003672 (70% de similitud, 56% de identidad en 60 aas de los 74 totales de esta proteína). Aunque de función desconocida, presenta una localización análoga en el hipotético T4SS de *Mesorhizobium* sp. BNC1, precediendo a *virB6*.
- ORF22: Presenta un tamaño de 714 pb, codifica una hipotética proteína de 238 aas, que tiene una alta similitud con MBNC02003673, hipotética proteína aceptora de metilos relacionada con quimiotaxis, de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (77% de similitud, 60% de identidad) que se localiza en una posición análoga en el hipotético T4SS de *Mesorhizobium* sp. BNC1. Igualmente presenta cierta homología con dos hipotéticas proteínas de función desconocida cuyos genes presentan una localización consecutiva e igualmente análoga con relación al hipotético operón del T4SS del plásmido pMLa de *M. loti* MAFF303099 (*mlr9253* y *mlr9253*).

El análisis de secuencia sugiere que a unos 16,5 Kb de distancia del hipotético *oriT* se localiza parte de un posible sistema de secreción T4SS, el cual muestra similitud con los hipotéticos T4SS de *Mesorhizobium* sp. BNC1 y del plásmido pMLa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099. A modo de ejemplo, en la Figura 4.10 se muestra un alineamiento de las hipotéticas proteínas tipo VirB11 de los tres sistemas.

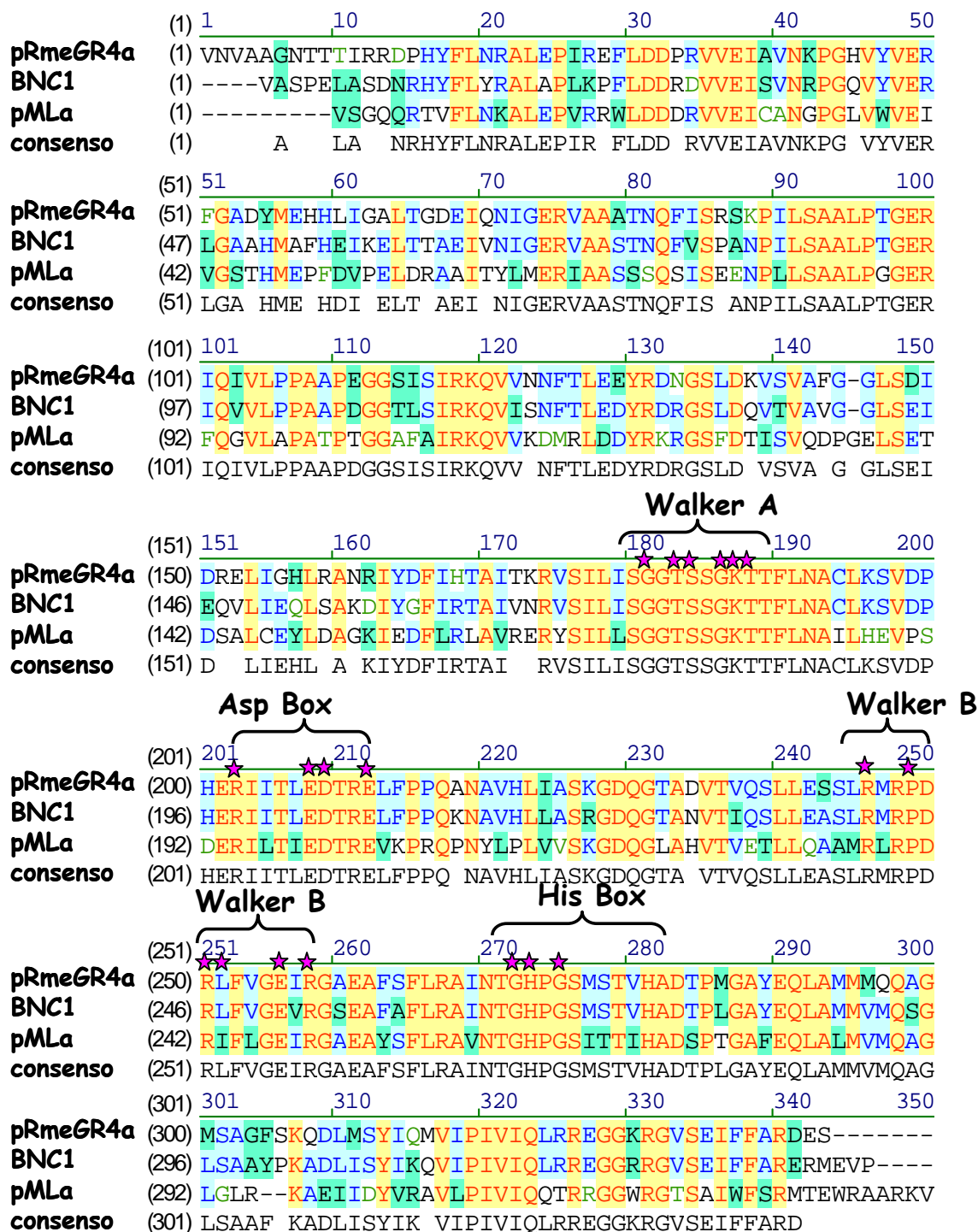


FIGURA 4.10. Alineamientos de hipotéticas proteínas VirB11

En la figura se muestran los alineamientos de la totalidad de la secuencia aminoacídica de las hipotéticas VirB11 del T4SS del plásmido críptico pRmGR4a de *S. meliloti*, del plásmido críptico pMLA de *M. loti* MAFF303099 y de *Mesorhizobium* sp. BNC1. Rojo sobre amarillo = aminoácidos invariantes; azul sobre azul = fuertemente conservados; negro sobre verde = similares; verde sobre blanco = poco similares; Negro sobre blanco = no conservados. Igualmente se indican los principales motivos descritos para estas proteínas. Con estrellas de color rosa se indican las posiciones más conservadas dentro de los motivos descritos para estas proteínas.

4.4. Discusión

Los plásmidos denominados como no simbióticos, presentes en bacterias del orden Rhizobiales, pese a que no suelen presentar un papel indispensable en el proceso de simbiosis/patogénesis, sí es frecuente que participen en la modulación de la eficiencia de los procesos de interacción con plantas. En el caso concreto de las bacterias que forman simbiosis con leguminosas, se ha demostrado en numerosas ocasiones que estos replicones tienen influencia en la competitividad e infectividad de dichas bacterias (Brom *et al.*, 2000; García-de los Santos *et al.*, 1996; Sanjuán y Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993). Dejando a un lado su papel funcional en la ecología de estas bacterias, los plásmidos no simbióticos, mayoritariamente crípticos, son igualmente interesantes como modelos de estudio de procesos fundamentales como la replicación o la transferencia conjugativa. Prueba de ello son los diversos trabajos sobre plásmidos de este tipo que han sido realizados (Hynes *et al.*, 1988; Hynes y McGregor, 1990; Mercado-Blanco y Toro, 1996; Schneiker *et al.*, 2001; Tauch *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Tun-Garrido *et al.*, 2003).

La cepa GR4 de *S. meliloti* se caracteriza por portar dos plásmidos adicionales a los plásmidos simbióticos, pRmeGR4a y pRmeGR4b (Toro y Olivares, 1986). El plásmido pRmeGR4a, además de poseer capacidad autoconjugativa, es el promotor de la movilización del pRmeGR4b (Mercado-Blanco y Olivares, 1993). Herrera-Cervera y colaboradores identificaron 2 cósmidos portadores de las regiones *mob* de sendos plásmidos (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Dentro del cósmido pRmOR69 se identificó un fragmento *EcoRI/BamHI* de 2,4 Kb portador del *oriT* del plásmido pRmeGR4a, que incluye un hipotético sitio *nic* con homología al sitio *nic* del plásmido RP4 (Herrera-Cervera *et al.*, 1998). Este pRmeGR4a tiene interés añadido debido a que parece presentar una regulación de la transferencia conjugativa atípica, que parece estar regulada negativamente por amonio (Herrera-Cervera *et al.*, 1996). Con objeto de realizar la caracterización del sistema conjugativo del plásmido pRmeGR4a, se ha llevado a cabo la completa secuenciación y anotación del inserto del cósmido pRmOR69 (24 Kb) identificado por Herrera-Cervera y colaboradores (Herrera-Cervera *et al.*, 1998), más un fragmento adicional *PstI/EcoRI* de 3774 pb. La anotación de esta secuencia ha permitido identificar la mayor parte de la hipotética región de transferencia de este plásmido. En un extremo distal del cósmido pRmOR69 se ha identificado la probable región Dtr formada por los ORF1, 2 y 3, que presentan homologías significativas con diversas funciones del

procesamiento de ADN de diversos plásmidos. Aguas abajo del ORF1 se ha identificado el ORF3, que presenta similitud con hipotéticas relaxasas descritas en otros plásmidos como pXF51a, pSB102 y pIPO2T, así como con dos hipotéticas proteínas de función desconocida de *M. loti* MAFF303099 (MII9292) y de *Mesorhizobium* sp. BNC1 (MBNC02003663, anotada como VirD2). En la proteína ORF3 además, se han podido identificar los 3 motivos principales descritos para las relaxasas. Igualmente, se ha demostrado que dicho gen es completamente esencial para la transferencia conjugativa de pRmeGR4a. Sin embargo, la mutación en este ORF3 no anula la transferencia de pRmeGR4b, sugiriendo que aunque la transferencia de este plásmido depende de ciertas funciones de pRmeGR4a, pRmeGR4b codificaría su propia relaxasa específica. Aunque se puede detectar transferencia de pRmeGR4b desde la cepa mutante GR4KLORF3::Gm, ésta se reduce entre 5 y 8 veces con respecto a la cepa parental GR4KL. Este efecto podría estar provocado por la introducción del casete de resistencia a Gm, que en nuestra experiencia provoca con cierta frecuencia un enlentecimiento del crecimiento de *S. meliloti*, por lo que sería conveniente el empleo de un casete que codifique la resistencia a otro antibiótico más inocuo, para este modelo de estudio.

La complementación de la mutación en este gen con el fragmento 69E2 en multicopia permite recuperar la capacidad de transferencia del plásmido pRmeGR4a, aunque a unos valores de frecuencia unas 30 veces menores que en la cepa parental (GR4KL pJB69E2). Los valores semejantes de frecuencia obtenidos en la movilización de la construcción pJB69E2 desde las cepas silvestre (GR4KL pJB69E2) y mutante (GR4KLORF3::Gm pJB69E2), apuntan a la posible existencia de un “fenómeno *cis/trans*” análogo al descrito para la relaxasa TraA del plásmido simbiótico de *R. etli* descrito en esta tesis. Este “fenómeno *cis/trans*” podría explicar la falta de complementación total de la transferencia del plásmido pRmeGR4a cuando se le suministra el gen de la relaxasa en *trans* (pJB69E2) con respecto al *oriT*. Igualmente, la presencia de casete de Gm también podría estar ocasionando un efecto negativo en la frecuencia de transferencia de pRmeGR4a complementado.

Los alineamientos realizados entre la hipotética región *nic* del plásmido pRmeGR4a y regiones similares de los plásmidos crípticos pXF51a, pSB102 y pIPO2T (Tauch *et al.*, 2002) sugieren una conservación de secuencia entre ellos. Igualmente se ha podido establecer un hipotético sitio *nic* no descrito en la secuencia parcial disponible de

Capítulo IV

Mesorhizobium sp. BNC1, que presenta una gran similitud con los anteriores, en cuanto a homología de secuencia y localización con respecto a la relaxasa. Estos alineamientos, sin embargo, no dejan clara la presencia de un hipotético sitio *nic* en la región intergénica *ml9294-ml9293* del plásmido pMLa de *M. loti* MAFF303099. Quizás en la región de ADN establecida en el alineamiento de la Figura 4.4.B efectivamente se establece el sitio *nic* de este plásmido y este ha divergido considerablemente, o quizás el *oriT* se encuentra en otra región del plásmido pMLa.

La secuenciación y anotación completa del cósmido pRmOR69 ha permitido identificar de forma parcial un hipotético T4SS que podría funcionar a modo de Mpf en la transferencia conjugativa del plásmido pRmeGR4a, así como en la movilización del plásmido pRmeGR4b. Los genes de este hipotético T4SS presentan homología con genes anotados como *virB/trb* en diferentes bacterias. De nuevo las mayores homologías se establecen con genes de un hipotético T4SS de *Mesorhizobium* sp BNC1 y con el operón *virB* del plásmido críptico pMLa de *M. loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000). El hecho de que el cósmido pRmOR69 tenga un fenotipo Mob⁺Tra⁻ y requiera de la presencia en *trans* del plásmido pRmeGR4a en la célula donadora para su movilización conjugativa (Herrera-Cervera *et al.*, 1998), coincide con el hecho de que este cósmido contiene en su secuencia tan sólo parte del hipotético operón *virB*, desde *virB6* a *virB11*, careciendo por tanto de la parte inicial del operón. La proteína del plásmido pRmeGR4a anotada como VirB11 presenta varios motivos conservados, que han sido descritos como característicos de estas proteínas. Al final de este hipotético operón *virB* se localiza el gen que se ha anotado como *traG/virD4*, el cual codifica la hipotética proteína acopladora del sistema.

El análisis funcional y de secuencia del cósmido pRmOR69 ha permitido establecer los principales elementos del sistema conjugativo del plásmido pRmeGR4a. La organización genética así como la homología de las diferentes funciones establecen a este sistema conjugativo como un sistema muy cercano al del plásmido críptico pMLa de *M. loti* MAFF303099 y a una región cromosómica del *Mesorhizobium* sp. BNC1. La secuenciación y anotación tan preliminar de *Mesorhizobium* sp. BNC1 disponible en la base de datos hace difícil establecer la función de este hipotético sistema de transferencia presente en esta bacteria, y obliga a tomar los datos aquí expuestos con extrema cautela. Igualmente, aunque en menor medida, la región de transferencia del plásmido pRmeGR4a presenta considerables similitudes con otros plásmidos pXF51a, pSB102 y pIPO2T,

pudiendo establecerse como otro miembro conjugativo de la nueva familia de plásmidos presentes en comunidades microbianas asociadas a plantas descrito por Tauch y colaboradores (Tauch *et al.*, 2002).

Los estudios realizados con el plásmido pRmeGR4a de la cepa GR4 de *S. meliloti* han dejado ver que se trata de un plásmido interesante, desde el punto de vista del estudio de su sistema conjugativo, dentro de los plásmidos no simbióticos o crípticos de bacterias simbiontes de leguminosas. Este interés radica, principalmente, en los indicios existentes que sugieren que dicho plásmido presenta un sistema de regulación de la transferencia atípico (inhibición de la transferencia en presencia de amonio) entre los plásmidos descritos en estas bacterias. Los escasos estudios realizados sobre los sistemas de regulación de la transferencia de este tipo de plásmidos, establecen al sistema “Quorum sensing” como único sistema de regulación de la transferencia de los plásmidos crípticos descritos, como son el caso de pRetCFN42a de *R. etli* CFN42 (Tun-Garrido, 2003) y pRme41a de *S. meliloti* (Marketon, datos no publicados). Adicionalmente, la vinculación de la transferencia a pRmeGR4a del otro plásmido de la cepa pRmeGR4b hace igualmente a este sistema interesante como modelo de estudio de la transferencia conjugativa de este tipo de plásmidos.

ANEXO CAPÍTULO IV

Anexo 4.1. Construcción del clon pUCPst3

Para la construcción de este clon se utilizó ADN de pRmeGR4a aislado y purificado previamente en este laboratorio, mediante gradiente de cloruro de cesio. Este ADN fue digerido con las enzimas *Bam*HI, *Pst*I, *Hind*III, *Sma*I, *Eco*RV y *Sac*I y posteriormente hibridado con el plásmido pBS69E2B digerido *Eco*RI/*Bam*HI utilizado como sonda (Figura 4.2). Tras la visualización de los fragmentos originados en la hibridación, se decidió la clonación del fragmento *Pst*I de 4,2 Kb. Para ello se digirió el ADN de pRmeGR4a con la enzima *Pst*I separando los distintos fragmentos electroforéticamente en un gel de agarosa al 0,8 %. Posteriormente se aislaron los distintos fragmentos *Pst*I con un tamaño relativo entre 3,8 Kb y 4,5 Kb. La mezcla de fragmentos *Pst*I aislados, se ligaron con el vector pUC18 previamente linearizado con *Pst*I. Varias colonias blancas originadas tras la transformación con dicha ligación fueron digeridas con las enzimas *Pst*I y *Eco*RI/*Pst*I, comprobándose la presencia del fragmento *Pst*I de 4,2 kb mediante hibridación con el vector pBS69E2B utilizado como sonda. El nuevo fragmento *Pst*I de 4,2 Kb originado se denominó Pst3.

Anexo 4.2. Construcción del mutante en ORF3

El diseño de la estrategia (Figura 4.6) para la mutagénesis del ORF3 implicaba la eliminación de la diana *Bam*HI del plásmido pUC18. Para ello, se digirió el vector con esta enzima, se le adicionó una mezcla de dNTPs y Klenow para rellenar los extremos protuberantes. Posteriormente se realizó una ligación tras lo cual se transformaron células de *E. coli* competentes. Fueron analizados varios clones seleccionando uno de ellos que presentó ausencia de la diana *Bam*HI (pUC18ΔB). Posteriormente se realizó la clonación del fragmento 69E2 en el sitio *Eco*RI del pUC18ΔB previamente desfosforilado (pUC18ΔB69E2). Posteriormente se extrajo el casete de resistencia a gentamicina del plásmido pMS255 mediante una digestión *Bam*HI. Este casete fue purificado y ligado con la construcción pUC18ΔB69E2 previamente linearizada con *Bam*HI. La construcción obtenida, pUC18ΔB69E2::Gm, portaba el casete en el único sitio *Bam*HI del fragmento 69E2 el cual se situaba en la parte inicial del ORF3, interrumpiendo su marco abierto de lectura. El fragmento 69E2::Gm fue escindido mediante digestión *Eco*RI y posteriormente clonado en el vector suicida pSUP202, previamente linearizado con *Eco*RI. La construcción resultante (pSUP69E2::Gm) se introdujo en la cepa de *E. coli* S17.1, la cual

Anexo Capítulo IV

se conjugó con la cepa GR4KL de *S. meliloti*. La selección se realizó en MM Gm³⁰. De unas 400 colonias repicadas, 10 resultaron ser Tc^s, lo cual implicaba, a priori, un evento de doble recombinación en estas colonias, con el consiguiente intercambio del alelo silvestre por el mutante y eliminación del vector pSUP202. Los hipotéticos mutantes en el gen ORF3 se recrecieron durante 3 pases sucesivos en MM Gm³⁰ para la completa eliminación de *E. coli*. Los mutantes obtenidos fueron comprobados posteriormente mediante hibridación (Figura 4.7).

CONCLUSIONES

1. El plásmido simbiótico de *R. etli* posee un sistema conjugativo funcional que le permite transferirse sin la intervención de ningún otro plásmido. Este sistema consta de una región Dtr y probablemente de un T4SS similar al del plásmido pAtC58.
2. La expresión de los operones *traA*, *traCDG* y *virB* de los plásmidos simbióticos de *R. etli* y *S. meliloti* se encuentra normalmente reprimida en condiciones de laboratorio. En ambos plásmidos simbióticos, el gen *rctA* es un elemento esencial en el mecanismo de represión.
3. Al menos en el pSym de *R. etli* existe un probable sistema anti-represor que incluye al gen *rctB*. La sobre-expresión de *rctB* conlleva una reducción tanto de la expresión de *rctA* como de su actividad represora.
4. Al contrario que para el pSym de *R. etli*, mutaciones en *rctA* no provocan una elevación apreciable de la frecuencia de transferencia del pSymA de *S. meliloti* en condiciones de laboratorio. Esto, junto con la ausencia de un gen homólogo a *rctB*, sugiere que existen analogías pero también diferencias en los sistemas de regulación de la transferencia de ambos plásmidos.
5. La proteína TraA de pRetCFN42d es la relaxasa del plásmido simbiótico de *R. etli*, reconociendo y cortando específicamente el sitio *nic* propuesto para este plásmido. Esta proteína forma parte de un sistema conjugativo con la peculiaridad de tener (a) cierta flexibilidad, al ser capaz de movilizar los *oriT* de otros plásmidos como pSymA y pSymB de *S. meliloti*, y (b) la necesidad de la presencia del gen de la relaxasa en *cis* con respecto al *oriT* para conseguir una eficiencia óptima de transferencia.
6. El plásmido críptico pRmeGR4a de *S. meliloti* GR4 presenta un sistema conjugativo similar al presente en otros plásmidos de rizobios pero muy distinto al de los pSyms. En este plásmido se ha identificado el ORF3, esencial para su transferencia conjugativa, como la probable relaxasa.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Monem, M. y Hoffmann-Berling, H. (1976) Enzymic unwinding of DNA 1. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* **65**: 431-440.

Abo, T., Inamoto, S. y Ohtsubo, E. (1991) Specific DNA binding of the TraM protein to the *oriT* region of plasmid R100. *J.Bacteriol.* **173**: 6347-6354.

Alt-Mörbe, J., Stryker, J.L., Fuqua, C., Li, P.L., Farrand, S.K. y Winans, S.C. (1996) The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid *vir* genes. *J.Bacteriol.* **178**: 4248-4257.

Amabile-Cuevas, C.F. y Chicurel, M.E. (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**: 189-199.

Balzer, D., Ziegelin, G., Pansegrau, W., Kruft, V. y Lanka, E. (1992) KorB protein of promiscuous plasmid RP4 recognizes inverted sequence repetitions in regions essential for conjugative plasmid transfer. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1851-1858.

Balzer, D., Pansegrau, W. y Lanka, E. (1994) Essential motifs of relaxase (TraI) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4. *J. Bacteriol.* **176**: 4285-95.

Barnett, M.J. y Long, S.R. (1997) Identification and characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, SyrB, that negatively affects *syrM* expression. *Mol.Plant Microbe Interact.* **10**: 550-559.

Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Palm, C., Peck, M.C., Surzycki, R., Wells, D.H., Yeh, K.C., Davis, R.W., Federspiel, N.A. y Long, S.R. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 9883-9888.

Beck von Bodman, S., McCutchan, J.E. y Farrand, S.K. (1989) Characterization of conjugal transfer functions of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *J.Bacteriol.* **171**: 5281-5289.

Beck von Bodman, S., Hayman, G.T. y Farrand, S.K. (1992) Opine catabolism and conjugal transfer of the nopaline Ti plasmid pTiC58 are coordinately regulated by a single repressor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 643-647.

Becker, A., Schmidt, M., Jager, W. y Pühler, A. (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**: 37-9.

Beringer, J.E. (1974) R Factor Transfer in *Rhizobium-Leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.

Bever, J.D. y Simms, E.L. (2000) Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of *Rhizobium*. *Heredity* **85**: 366-372.

Bibliografía

- Bhattacharjee, M.K. y Meyer, R.J. (1993) Specific binding of MobA, a plasmid-encoded protein involved in the initiation and termination of conjugal DNA transfer, to single-stranded oriT DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4563-8.
- Binns, A.N., Beaupre, C.E. y Dale, E.M. (1995) Inhibition of VirB-mediated transfer of diverse substrates from *Agrobacterium tumefaciens* by the IncQ plasmid RSF1010. *J.Bacteriol.* **177**: 4890-4899.
- Bladergroen, M.R. y Spaink, H.P. (1998) Genes and signal molecules involved in the rhizobia-*Leguminosae* symbiosis. *Curr.Opin.Plant Biol.* **1**: 353-359.
- Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K. y Valla, S. (1997) Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 370-9.
- Boyer, H.W. y Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **41**: 459-472.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**: 248-254.
- Brasch, M.A. y Meyer, R.J. (1987) A 38 base-pair segment of DNA is required in *cis* for conjugative mobilization of broad host-range plasmid R1162. *J.Mol.Biol.* **198**: 361-369.
- Brewin, N.J., Beringer, J.E. y Johnston, A.W.B. (1980) Plasmid-Mediated Transfer of Host-Range Specificity Between 2 Strains of *Rhizobium-Leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 413-420.
- Brom, S., García-de los Santos, A., de Lourdes, G.M., Dávila, G., Palacios, R. y Romero, D. (1991) High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. *J.Bacteriol.* **173**: 1344-1346.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D. y Palacios, R. (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J.Bacteriol.* **174**: 5183-5189.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R. y Romero, D. (2000) In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44**: 34-43.
- Broughton, W.J. y Perret, X. (1999) Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr.Opin.Plant Biol.* **2**: 305-311.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S. y Perret, X. (2000) Keys to symbiotic harmony. *J.Bacteriol.* **182**: 5641-5652.
- Bundock, P., Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. y Hooykaas, P.J. (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**: 3206-3214.

Bushman, F. (ed) (2002) *Lateral DNA transfer mechanisms and consequences* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Byrd, D.R. y Matson, S.W. (1997) Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol.Microbiol.* **25**: 1011-1022.

Cabezón, E., Lanka, E. y de la Cruz, F. (1994) Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: TrwB and RP4 TraG are interchangeable. *J.Bacteriol.* **176**: 4455-4458.

Cabezón, E., Sastre, J.I. y de la Cruz, F. (1997) Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol.Gen.Genet.* **254**: 400-406.

Caruthers, J.M. y McKay, D.B. (2002) Helicase structure and mechanism. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **12**: 123-133.

Cavalli, L.L., Lederberg, J. y Lederberg, E.M. (1953) An Infective Factor Controlling Sex Compatibility in Bacterium-Coli. *J. Gen. Microbiol.* **8**: 89-103.

Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. y Covacci, A. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 14648-14653.

Charles, T.C. y Nester, E.W. (1993) A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Bacteriol.* **175**: 6614-6625.

Chen, L., Chen, Y., Wood, D.W. y Nester, E.W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **184**: 4838-45.

Christie, P.J., Ward, J.E., Winans, S.C. y Nester, E.W. (1988) The *Agrobacterium tumefaciens virE2* gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *J.Bacteriol.* **170**: 2659-2667.

Christie, P.J., Ward, J.E., Jr., Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1989) A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**: 9677-9681.

Christie, P.J. (1997) *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: A paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* **179**: 3085-3094.

Christie, P.J. y Vogel, J.P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**: 354-360.

Christie, P.J. (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* **40**: 294-305.

Clewell, D.B. (ed) (1993) *Bacterial conjugation* . New York, London: Plenum Press.

Bibliografía

Cook, D.M. y Farrand, S.K. (1992) The *oriT* region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. *J.Bacteriol.* **174**: 6238-6246.

Cook, D.M., Li, P.L., Ruchaud, F., Padden, S. y Farrand, S.K. (1997) Ti plasmid conjugation is independent of *vir*: reconstitution of the *tra* functions from pTiC58 as a binary system. *J.Bacteriol.* **179**: 1291-1297.

Covacci, A. y Rappuoli, R. (1993) Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol.Microbiol.* **8**: 429-434.

Covacci, A., Falkow, S., Berg, D.E. y Rappuoli, R. (1997) Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol.* **5**: 205-208.

Danese, P.N. y Silhavy, T.J. (1997) The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Gene Dev.* **11**: 1183-1193.

Dang, T.A., Zhou, X.R., Graf, B. y Christie, P.J. (1999) Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter. *Mol.Microbiol.* **32**: 1239-1253.

Danino, V.E., Wilkinson, A., Edwards, A. y Downie, J.A. (2003) Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol.Microbiol.* **50**: 511-525.

Das, A. y Xie, Y.H. (2000) The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J.Bacteriol.* **182**: 758-763.

Davison, J. (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.

De Greve, H., Decraemer, H., Seurinck, J., Van montagu, M. y Schell, J. (1981) The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiB6s3. *Plasmid* **6**: 235-248.

de la Cruz, F. y Lanka, E. (1998) Function of the Ti-Plasmid Vir Proteins: T-Complex Formation and Transfer to the Plant Cell. In *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P.J.J. (eds). Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, pp. 281-301.

Debelle, F., Moulin, L., Mangin, B., Denarie, J. y Boivin, C. (2001) Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim.Pol.* **48**: 359-365.

Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M.,

Olsen, G.J. y Swanson, R.V. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**: 353-358.

Dempsey, W.B. (1994) Regulation of R100 conjugation requires *traM* in *cis* to *traJ*. *Mol.Microbiol.* **13**: 987-1000.

Deng, W., Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1995) Sequence and distribution of IS1312: evidence for horizontal DNA transfer from *Rhizobium meliloti* to *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Bacteriol.* **177**: 2554-2559.

Denison, R.F. (2000) Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *Am. Nat.* **156**: 567-576.

Di Laurenzio, L., Frost, L.S. y Paranchych, W. (1992) The TraM protein of the conjugative plasmid F binds to the origin of transfer of the F and ColE1 plasmids. *Mol.Microbiol.* **6**: 2951-2959.

Di Laurenzio, L., Scraba, D.G., Paranchych, W. y Frost, L.S. (1995) Studies on the binding of integration host factor (IHF) and TraM to the origin of transfer of the IncFV plasmid pED208. *Mol.Gen.Genet.* **247**: 726-734.

Ding, Z.Y., Atmakuri, K. y Christie, P.J. (2003) The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* **11**: 527-535.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**: 7347-51.

Dubnau, D. (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* **53**: 217-244.

Dunny, G.M., Brown, B.L. y Clewell, D.B. (1978) Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75**: 3479-3483.

Dunny, G.M., Leonard, B.A. y Hedberg, P.J. (1995) Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J. Bacteriol.* **177**: 871-6.

Eckhardt, T. (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.

Egelhoff, T.T. y Long, S.R. (1985) *Rhizobium meliloti* nodulation genes: identification of nodDABC gene products, purification of nodA protein, and expression of nodA in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **164**: 591-9.

Elkins, C., Thomas, C.E., Seifert, H.S. y Sparling, P.F. (1991) Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J.Bacteriol.* **173**: 3911-3913.

Bibliografía

- Engler, G., Depicker, A., Maenhaut, R., Villarroel, R., Van montagu, M. y Schell, J. (1981) Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Mol.Biol.* **152**: 183-208.
- Farrand, S.K., Hwang, I. y Cook, D.M. (1996) The *tra* region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. *J. Bacteriol.* **178**: 4233-47.
- Farrand, S.K. (1998) Conjugal plasmid and their transfer. In *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink,H.P., Kondorosi,A., and Hooykaas,P.J.J. (eds). Amsterdam: Kluwer Academic Publisher., pp. 199-233.
- Farrand, S.K., Van Berkum, P.B. y Oger, P. (2003) *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **53**: 1681-1687.
- Figurski, D.H. y Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **76**: 1648-52.
- Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorhölter, F.J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. y Pühler, A. (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 9889-9894.
- Fischer, H.M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol.Rev.* **58**: 352-386.
- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C. y de la Cruz, F. (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol.Rev.* **28**: 79-100.
- Fraysse, N., Couderc, F. y Poinso, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur.J.Biochem.* **270**: 1365-1380.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. y Perret, X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401.
- Frick, D.N. y Richardson, C.C. (2001) DNA primases. *Annu.Rev.Biochem.* **70**: 39-80.
- Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J. y Ausubel, F.M. (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* **18**: 289-96.
- Frost, L.S., Ippen-Ihler, K. y Skurray, R.A. (1994) Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol.Rev.* **58**: 162-210.
- Fukuda, H. y Ohtsubo, E. (1995) Large scale purification and characterization of TraI endonuclease encoded by sex factor plasmid R100. *J.Biol.Chem.* **270**: 21319-21325.

Fukuda, H. y Ohtsubo, E. (1997) Roles of TraI protein with activities of cleaving and rejoining the single-stranded DNA in both initiation and termination of conjugal DNA transfer. *Genes Cells* **2**: 735-751.

Fuqua, W.C. y Winans, S.C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J.Bacteriol.* **176**: 2796-2806.

Fuqua, C., Burbea, M. y Winans, S.C. (1995) Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. *J.Bacteriol.* **177**: 1367-1373.

Fuqua, C. y Winans, S.C. (1996) Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol.Microbiol.* **20**: 1199-1210.

Fürste, J.P., Ziegelin, G., Pansegrau, W. y Lanka, E. (1987) Conjugative transfer of promiscuous plasmid RP4: plasmid-specified functions essential for formation of relaxosomes. In *Mechanism of DNA replication and recombination*. McMacken, K (ed). New York: Lyss,Inc.,pp. 553-564.

Fürste, J.P., Pansegrau, W., Ziegelin, G., Kroger, M. y Lanka, E. (1989) Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**: 1771-5.

Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dréano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernández-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C. y Batut, J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-72.

García-de los Santos, A., Brom, S. y Romero, D. (1996) *Rhizobium* plasmids in bacteria legume interactions. *World J. Microbiol.Biotechnol.* **12**: 119-125.

García-de los Santos, A. y Brom, S. (1997) Characterization of two plasmid-borne *lps* beta loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol.Plant Microbe Interact.* **10**: 891-902.

Garryt, G.M. (ed) (2001) *Bergey's manual of systematic bacteriology* New York: Springer.

Gietl, C., Koukolikova-Nicola, Z. y Hohn, B. (1987) Mobilization of T-DNA from *Agrobacterium* to plant cells involves a protein that binds single-stranded DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**: 9006-9010.

Bibliografía

Girard, L., Brom, S., Davalos, A., López, O., Soberon, M. y Romero, D. (2000) Differential regulation of fixN-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel fixL-fixK cascade. *Mol.Plant Microbe Interact.* **13**: 1283-1292.

Gomis-Rüth, F.X., Moncalián, G., Pérez-Luque, R., González, A., Cabezón, E., de la Cruz, F. y Coll, M. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**: 637-41.

Gomis-Rüth, F.X., de la Cruz, F. y Coll, M. (2002) Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer. *Res.Microbiol.* **153**: 199-204.

González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., Hernández-Celis, J.C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodríguez, O., Flores, M., Cevallos, M.A., Collado-Vides, J., Romero, D. y Dávila, G. (2003) The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology* **4**: R36.

Goodman, S.D. y Scocca, J.J. (1988) Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 6982-6986.

Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R. y Hennecke, H. (2001) Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J.Bacteriol.* **183**: 1405-1412.

Guasch, A., Lucas, M., Moncalian, G., Cabezas, M., Pérez-Luque, R., Gomis-Ruth, F.X., de la Cruz, F. y Coll, M. (2003) Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nat.Struct.Biol.* **10**: 1002-1010.

Guzmán, L.M. y Espinosa, M. (1997) The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J.Mol.Biol.* **266**: 688-702.

Habeeb, L.F., Wang, L. y Winans, S.C. (1991) Transcription of the octopine catabolism operon of the *Agrobacterium* tumor-inducing plasmid pTiA6 is activated by a LysR-type regulatory protein. *Mol.Plant Microbe Interact.* **4**: 379-385.

Hahn, M. y Hennecke, H. (1987) Mapping of A *Bradyrhizobium Japonicum* DNA Region Carrying Genes for Symbiosis and An Asymmetric Accumulation of Reiterated Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2247-2252.

Hamilton, C.M., Lee, H., Li, P.L., Cook, D.M., Piper, K.R., Von Bodman, S.B., Lanka, E., Ream, W. y Farrand, S.K. (2000) TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* **182**: 1541-8.

Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P.C. y Baron, C. (2000) VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Bacteriol.* **182**: 4505-4511.

Hattermann, D.R. y Stacey, G. (1990) Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 833-6.

Hayes, W. (1953) Observations on A Transmissible Agent Determining Sexual Differentiation in Bacterium-Coli. *J. Gen. Microbiol.* **8**: 72-88.

He, X., Chang, W., Pierce, D.L., Seib, L.O., Wagner, J. y Fuqua, C. (2003) Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J.Bacteriol.* **185**: 809-822.

Heath, J.D., Charles, T.C. y Nester, E.W. (1995) Ti plasmid and chromosomally encoded two-components systems important in plant cell transformation. In *Two component of signal transduction*. Hoch, Slihavy (eds). Washinton, D.C.: ASM press, pp. 367-385.

Heinemann, J.A. y Sprague, G.F. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**: 205-209.

Heinemann, J.A. y Roughan, P.D. (2000) New hypotheses on the material nature of horizontally mobile genes. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* **906**: 169-186.

Henderson, D. y Meyer, R.J. (1996) The primase of broad-host-range plasmid R1162 is active in conjugal transfer. *J.Bacteriol.* **178**: 6888-6894.

Herrera-Cervera, J.A., Olivares, J. y Sanjuán, J. (1996) Ammonia inhibition of plasmid pRmeGR4a conjugal transfer between *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1145-1150.

Herrera-Cervera, J.A., Rodriguez-Alonso, F.I., Olivares, J. y Sanjuán, J. (1997) Evaluation of the recA-based containment system in *Rhizobium meliloti* GR4. *Fems Microbiology Ecology* **22**: 49-56.

Herrera-Cervera, J.A., Sanjuán-Pinilla, J.M., Olivares, J. y Sanjuán, J. (1998) Cloning and identification of conjugative transfer origins in the *Rhizobium meliloti* genome. *J. Bacteriol.* **180**: 4583-90.

Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J. y Sanjuán, J. (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 87-97.

Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inze, D., Engler, G., Villarroel, R. y . (1980) The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**: 212-230.

Hooykaas, P.J.J., Vanbrussel, A.A.N., Dendulkras, H., Vanslogteren, G.M.S. y Schilperoort, R.A. (1981) Sym Plasmid of *Rhizobium-Trifolii* Expressed in Different Rhizobial Species and *Agrobacterium-Tumefaciens*. *Nature* **291**: 351-353.

Howard, E.A., Zupan, J.R., Citovsky, V. y Zambryski, P.C. (1992) The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* **68**: 109-118.

Bibliografía

Howard, M.T., Nelson, W.C. y Matson, S.W. (1995) Stepwise assembly of a relaxosome at the F plasmid origin of transfer. *J.Biol.Chem.* **270**: 28381-28386.

Huerta-Zepeda, A., Ortuno, L., Du, P.G., Durán, S., Lloret, A., Merchant-Larios, H. y Calderón, J. (1997) Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation of asparagine. *J.Bacteriol.* **179**: 2068-2072.

Huguet, T., Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., De lajudie, P., Jouanin, L., Batut, J., Boistard, P., Julliot, J.S. y Denarie, J. (1983) Studies on *Rhizobium meliloti* plasmids and on their role in the control of nodule formation and nitrogen fixation: the pSym megaplasmid and other large plasmids. In *Mol. gen.Bacteria Plant Interact.* Pühler, A. (ed). Berlin: Springer-Verlag, pp. 36-45.

Hwang, I., Li, P.L., Zhang, L., Piper, K.R., Cook, D.M., Tate, M.E. y Farrand, S.K. (1994) TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 4639-4643.

Hwang, I., Cook, D.M. y Farrand, S.K. (1995) A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J.Bacteriol.* **177**: 449-458.

Hynes, M.F., Brucksch, K. y Priefer, U. (1988) Melanin Production Encoded by A Cryptic Plasmid in A *Rhizobium-Leguminosarum* Strain. *Arch. Microbiol.* **150**: 326-332.

Hynes, M.F. y McGregor, N.F. (1990) Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol.Microbiol.* **4**: 567-574.

Ilyina, T.V. y Koonin, E.V. (1992) Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3279-85.

Inamoto, S. y Ohtsubo, E. (1990) Specific binding of the TraY protein to *oriT* and the promoter region for the *traY* gene of plasmid R100. *J.Biol.Chem.* **265**: 6461-6466.

Inamoto, S., Yoshioka, Y. y Ohtsubo, E. (1991) Site- and strand-specific nicking *in vitro* at *oriT* by the TraY-TraI endonuclease of plasmid R100. *J.Biol.Chem.* **266**: 10086-10092.

Inamoto, S., Fukuda, H., Abo, T. y Ohtsubo, E. (1994) Site-Specific and Strand-Specific Nicking at *oriT* of Plasmid R100 in A Purified System - Enhancement of the Nicking Activity of TraI (Helicase-I) with TraY and IHF. *J.Biochem.* **116**: 838-844.

Innes, R.W., Hirose, M.A. y Kuempel, P.L. (1988) Induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kilobase pairs of DNA from the *Rhizobium trifolii* symbiosis plasmid. *J.Bacteriol.* **170**: 3793-3802.

Ippen-Ihler, K. y Mannewannakul, S. (1991) Conjugation among enteric bacteria: mating systems dependent on expression of pili. In *Microbial Cell-Cell interactions.* Dworkin, M. (ed). Washington DC : American Society for Microbiology Press, pp. 35-69.

- Ishihama, A. (1993) Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J.Bacteriol.* **175**: 2483-2489.
- Jacob, F. y Wollman, E.L. (1958) Genetic and physical determinations of chromosomal segments in *Escherichia coli*. *Symp.Soc.Exp.Biol.*
- Jagura-Burdzy, G., Khanim, F., Smith, C.A. y Thomas, C.M. (1992) Crosstalk between plasmid vegetative replication and conjugative transfer: repression of the *trfA* operon by *trbA* of broad host range plasmid RK2. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3939-3944.
- Jagura-Burdzy, G. y Thomas, C.M. (1995) Purification of KorA protein from broad host range plasmid RK2: definition of a hierarchy of KorA operators. *J.Mol.Biol.* **253**: 39-50.
- Jiang, S.C. y Paul, J.H. (1998) Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**: 2780-2787.
- Jin, S.G., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G. y Nester, E.W. (1990a) Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *J.Bacteriol.* **172**: 4945-4950.
- Jin, S.G., Roitsch, T., Christie, P.J. y Nester, E.W. (1990b) The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *J.Bacteriol.* **172**: 531-537.
- Johnston, A.W.B., Beynon, J.L., Buchananwollaston, A.V., Setchell, S.M., Hirsch, P.R. y Beringer, J.E. (1978) High-Frequency Transfer of Nodulating Ability Between Strains and Species of *Rhizobium*. *Nature* **276**: 634-636.
- Johnston, A.W.B., Hombrecher, G., Brewin, N.J. y Cooper, M.C. (1982) 2 Transmissible Plasmids in *Rhizobium-Leguminosarum* Strain 300. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 85-93.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. y Tabata, S. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**: 331-8.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. y Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**: 189-197.
- Knight, K.L., Bowie, J.U., Vershon, A.K., Kelley, R.D. y Sauer, R.T. (1989) The Arc and Mnt repressors. A new class of sequence-specific DNA-binding protein. *J.Biol.Chem.* **264**: 3639-3642.

Bibliografía

- Koraimann, G., Koraimann, C., Koronakis, V., Schlager, S. y Hogenauer, G. (1991) Repression and derepression of conjugation of plasmid R1 by wild-type and mutated *finP* antisense RNA. *Mol.Microbiol.* **5**: 77-87.
- Koraimann, G., Teferle, K., Markolin, G., Woger, W. y Hogenauer, G. (1996) The FinOP repressor system of plasmid R1: analysis of the antisense RNA control of *traJ* expression and conjugative DNA transfer. *Mol. Microbiol.* **21**: 811-21.
- Kostelidou, K., Jagura-Burdzy, G. y Thomas, C.M. (1998) Mutational analysis of the global regulator KorA of broad-host-range plasmid RK2. *J.Mol.Biol.* **281**: 453-463.
- Krause, S., Bárcena, M., Pansegrau, W., Lurz, R., Carazo, J.M. y Lanka, E. (2000a) Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 3067-3072.
- Krause, S., Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F. y Lanka, E. (2000b) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J.Bacteriol.* **182**: 2761-2770.
- Krishnapillai, V. (1988) Molecular genetic analysis of bacterial plasmid promiscuity. *FEMS Microbiol.Rev.* **4**: 223-237.
- Kumar, R.B., Xie, Y.H. y Das, A. (2000) Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol.Microbiol.* **36**: 608-617.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. y Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- Kupelwieser, G., Schwab, M., Hogenauer, G., Koraimann, G. y Zechner, E.L. (1998) Transfer protein TraM stimulates TraI-catalyzed cleavage of the transfer origin of plasmid R1 *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **275**: 81-94.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laguerre, G., Fernández, M.P., Edel, V., Normand, P. y Amarger, N. (1993) Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **43**: 761-767.
- Lai, E., Clark, K.L., Burley, S.K. y Darnell, J.E., Jr. (1993) Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or "winged helix" proteins: A family of transcription factors of diverse biologic function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 10421-10423.
- Lamb, J.W., Hombrecher, G. y Johnston, A.W.B. (1982) Plasmid-Determined Nodulation and Nitrogen-Fixation Abilities in *Rhizobium-Phaseoli*. *Molecular and General Genetics* **186**: 449-452.

- Lanka, E. y Barth, P.T. (1981) Plasmid RP4 specifies a deoxyribonucleic acid primase involved in its conjugal transfer and maintenance. *J.Bacteriol.* **148**: 769-781.
- Lanka, E. y Wilkins, B.M. (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu.Rev.Biochem.* **64**: 141-169.
- Lawrence, J.G. y Ochman, H. (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 9413-9417.
- Lederberg, J. y Tatum, E.L. (1946) Gene Recombination in *Escherichia-Coli*. *Nature* **158**: 558.
- Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J.Bacteriol.* **119**: 1072-1074.
- Lee, S.H., Frost, L.S. y Paranchych, W. (1992) FinOP repression of the F plasmid involves extension of the half-life of FinP antisense RNA by FinO. *Mol.Gen.Genet.* **235**: 131-139.
- Lee, Y.W., Jin, S., Sim, W.S. y Nester, E.W. (1995) Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 12245-12249.
- Leemans, J., Soberón, G., Cevallos, M.A., Fernández, L., Pardo, M.A., de la Vega, H., Flores, M., Quinto, C. y Palacios, R. (1984) General organization in *R. phaseoli* nif plasmids. In *Advances in nitrogen fixation reserch*. Veeger,C. y Newton,W.E. (eds). Netherlands: Nijhoff-Junk-Pudoc.,pp.710.
- Lessl, M., Pansegrau, W. y Lanka, E. (1992) Relationship of DNA-transfer-systems: essential transfer factors of plasmids RP4, Ti and F share common sequences. *Nucleic Acids Res.* **20**: 6099-6100.
- Lessl, M., Balzer, D., Weyrauch, K. y Lanka, E. (1993) The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *J.Bacteriol.* **175**: 6415-6425.
- Li, P.L., Hwang, I., Miyagi, H., True, H. y Farrand, S.K. (1999) Essential components of the Ti plasmid *trb* system, a type IV macromolecular transporter. *J.Bacteriol.* **181**: 5033-5041.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P. y Downie, J.A. (2000) The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol.Microbiol.* **37**: 81-97.
- Llosa, M., Grandoso, G. y de la Cruz, F. (1995) Nicking Activity of TrwC Directed Against the Origin of Transfer of the Incw Plasmid R388. *J.Mol.Biol.* **246**: 54-62.
- Llosa, M., Grandoso, G., Hernando, M.A. y de la Cruz, F. (1996) Functional domains in protein TrwC of plasmid R388: dissected DNA strand transferase and DNA helicase activities reconstitute protein function. *J.Mol.Biol.* **264**: 56-67.

Bibliografía

- Llosa, M., Gomis-Ruth, F.X., Coll, M. y de la Cruz, F.F. (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol.Microbiol.* **45**: 1-8.
- Lorkiewicz, Z. (1997) Nodulation genes in the *Rhizobium*-plant signal exchange. *Acta Biochim.Pol.* **44**: 1-12.
- Lynch, A.S. y Lin, E.C. (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J.Bacteriol.* **178**: 6238-6249.
- Mantis, N.J. y Winans, S.C. (1992) The *Agrobacterium tumefaciens* *vir* gene transcriptional activator *virG* is transcriptionally induced by acid pH and other stress stimuli. *J.Bacteriol.* **174**: 1189-1196.
- Mantis, N.J. y Winans, S.C. (1993) The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli* *phoB* mutation and is required for virulence. *J.Bacteriol.* **175**: 6626-6636.
- Marketon, M.M. y González, J.E. (2002) Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J.Bacteriol.* **184**: 3466-3475.
- Marketon, M.M., Gronquist, M.R., Eberhard, A. y González, J.E. (2002) Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J.Bacteriol.* **184**: 5686-5695.
- Martínez, E., Palacios, R. y Sánchez, F. (1987) Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J.Bacteriol.* **169**: 2828-2834.
- Martínez-Romero, E. (2000) Dinitrogen-fixing prokaryotes. In *The Prokaryotes: an Electronic Resource for Microbiological Community*. Balows,A., Trüper,H.G., Dworkin,M., Harder,W. y Schleifer,K.H. (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-12.
- Matson, S.W. y Morton, B.S. (1991) *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a site- and strand-specific nicking reaction at the F plasmid *oriT*. *J.Biol.Chem.* **266**: 16232-16237.
- Matson, S.W., Nelson, W.C. y Morton, B.S. (1993) Characterization of the Reaction Product of the *oriT* Nicking Reaction Catalyzed by *Escherichia coli* DNA Helicase-I. *J.Bacteriol.* **175**: 2599-2606.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E. y Ausubel, F.M. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J.Bacteriol.* **149**: 114-122.
- Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. (1993) Stability and Transmissibility of the Cryptic Plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4 - Their Possible Use in the Construction of Cloning Vectors for Rhizobia. *Arch.Microbiol.* **160**: 477-485.

- Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. (1994a) A Protein Involved in Stabilization of A Large Non-Symbiotic Plasmid of *Rhizobium-Meliloti* Shows Homology to Eukaryotic Cytoskeletal Proteins and DNA-Binding Proteins. *Gene* **139**: 133-134.
- Mercado-Blanco, J. y Olivares, J. (1994b) The Large Nonsymbiotic Plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium-Meliloti* GR4 Encodes A Protein Involved in Replication That Has Homology with the RepC Protein of *Agrobacterium* Plasmids. *Plasmid* **32**: 75-79.
- Mercado-Blanco, J. y Toro, N. (1996) Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 535-545.
- Merryweather, A., Barth, P.T. y Wilkins, B.M. (1986) Role and specificity of plasmid RP4-encoded DNA primase in bacterial conjugation. *J.Bacteriol.* **167**: 12-17.
- Meyer, T.S. y Lamberts, B.L. (1965) Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim.Biophys.Acta* **107**: 144-145.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics* New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miroux, B. y Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**: 289-298.
- Moncalián, G., Grandoso, G., Llosa, M. y de la Cruz, F. (1997) *oriT*-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J. Mol. Biol.* **270**: 188-200.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., Fraser, C.M. y . (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323-329.
- Nelson, W.C., Morton, B.S., Lahue, E.E. y Matson, S.W. (1993) Characterization of the *Escherichia coli* F factor *traY* gene product and its binding sites. *J.Bacteriol.* **175**: 2221-2228.
- Nelson, W.C., Howard, M.T., Sherman, J.A. y Matson, S.W. (1995) The *traY* gene product and integration host factor stimulate *Escherichia coli* DNA helicase I-catalyzed nicking at the F plasmid *oriT*. *J.Biol.Chem.* **270**: 28374-28380.
- Nester, E.W. y Kosuge, T. (1981) Plasmids specifying plant hyperplasias. *Annu.Rev.Microbiol.* **35**: 531-565.
- Nishiguchi, R., Takanami, M. y Oka, A. (1987) Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy-root-inducing plasmid-pRiA4B. *Mol.Gen.Genet.* **206**: 1-8.

Bibliografía

Nomura, N., Masai, H., Inuzuka, M., Miyazaki, C., Ohtsubo, E., Itoh, T., Sasamoto, S., Matsui, M., Ishizaki, R. y Arai, K. (1991) Identification of eleven single-strand initiation sequences (ssi) for priming of DNA replication in the F, R6K, R100 and ColE2 plasmids. *Gene* **108**: 15-22.

Ochman, H., Lawrence, J.G. y Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.

Olivares, J., Casadesus, J. y Bedmar, E.J. (1980) Method for Testing Degree of Infectivity of *Rhizobium-Meliloti* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 967-970.

Oresnik, I.J., Liu, S.L., Yost, C.K. y Hynes, M.F. (2000) Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.* **182**: 3582-6.

Pan, S.Q., Charles, T., Jin, S., Wu, Z.L. y Nester, E.W. (1993) Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant-Agrobacterium signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 9939-9943.

Pansegrau, W. y Lanka, E. (1987) Conservation of a common 'backbone' in the genetic organization of the IncP plasmids RP4 and R751. *Nucleic Acids Res.* **15**: 2385.

Pansegrau, W., Balzer, D., Kruft, V., Lurz, R. y Lanka, E. (1990a) In vitro assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**: 6555-9.

Pansegrau, W., Ziegelin, G. y Lanka, E. (1990b) Covalent association of the *traI* gene product of plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J.Biol.Chem.* **265**: 10637-44.

Pansegrau, W. y Lanka, E. (1991) Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3455.

Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B. y Lanka, E. (1993a) Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 11538-42.

Pansegrau, W., Schröder, W. y Lanka, E. (1993b) Relaxase (TraI) of IncP alpha plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 2925-9.

Pansegrau, W., Schröder, W. y Lanka, E. (1994) Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (TraI) of conjugative plasmid RP4. *J.Biol.Chem.* **269**: 2782-2789.

Pansegrau, W. y Lanka, E. (1996) Enzymology of DNA transfer by conjugative mechanisms. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **54**: 197-251.

Penfold, S.S., Simon, J. y Frost, L.S. (1996) Regulation of the expression of the *traM* gene of the F sex factor of *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **20**: 549-558.

- Perwez, T. y Meyer, R. (1996) MobB protein stimulates nicking at the R1162 origin of transfer by increasing the proportion of complexed plasmid DNA. *J.Bacteriol.* **178**: 5762-5767.
- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Cassedelbart, F. y Tempe, J. (1983) Further Extension of the Opine Concept - Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* Cooperate for Opine Degradation. *Mol.Gen.Genet.* **190**: 204-214.
- Pogliano, J., Lynch, A.S., Belin, D., Lin, E.C. y Beckwith, J. (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev.* **11**: 1169-1182.
- Prentki, P. y Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-13.
- Quinto, C., Delavega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., Girard, M.D., Calva, E. y Palacios, R. (1985) Nitrogenase Reductase - A Functional Multigene Family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**: 1170-1174.
- Rabel, C., Grahn, A.M., Lurz, R. y Lanka, E. (2003) The VirB4 family of proposed traffic nucleoside triphosphatases: common motifs in plasmid RP4 TrbE are essential for conjugation and phage adsorption. *J.Bacteriol.* **185**: 1045-1058.
- Ramírez-Romero, M.A., Bustos, P., Girard, L., Rodríguez, O., Cevallos, M.A. y Dávila, G. (1997) Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* **143**: 2825-2831.
- Rao, J.R., Fenton, M. y Jarvis, B.D.W. (1994) Symbiotic Plasmid Transfer in *Rhizobium-Leguminosarum* Biovar Trifolii and Competition Between the Inoculant Strain Icmp2163 and Transconjugant Soil Bacteria. *Soil Biol.Biochem.* **26**: 339-351.
- Rashkova, S., Zhou, X.R., Chen, J. y Christie, P.J. (2000) Self-assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 traffic ATPase. *J.Bacteriol.* **182**: 4137-4145.
- Rees, C.E. y Wilkins, B.M. (1989) Transfer of Tra proteins into the recipient cell during bacterial conjugation mediated by plasmid ColIb-P9. *J.Bacteriol.* **171**: 3152-3157.
- Rees, C.E. y Wilkins, B.M. (1990) Protein transfer into the recipient cell during bacterial conjugation: studies with F and RP4. *Mol.Microbiol.* **4**: 1199-1205.
- Regensburg-Tuink, A.J. y Hooykaas, P.J. (1993) Transgenic *N. glauca* plants expressing bacterial virulence gene *virF* are converted into hosts for nopaline strains of *A. tumefaciens*. *Nature* **363**: 69-71.
- Reygers, U., Wessel, R., Muller, H. y Hoffmann-Berling, H. (1991) Endonuclease activity of *Escherichia coli* DNA helicase I directed against the transfer origin of the F factor. *EMBO J.* **10**: 2689-2694.
- Rigaud, J. y Puppo, A. (1975) Indole-3 Acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 223-228.

Bibliografía

Rivas, S., Bolland, S., Cabezón, E., Goñi, F.M. y de la Cruz, F. (1997) TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation. *J.Biol.Chem.* **272**: 25583-25590.

Robertson, B.K., Aman, P., Darvill, A.G., Mcneil, M. y Albersheim, P. (1981) The Structure of Acidic Extracellular Polysaccharides Secreted by *Rhizobium-Leguminosarum* and *Rhizobium-Trifolii*. *Plant Physiol.* **67**: 389-400.

Rodríguez, R.L. y Tait, R.C., 1983. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.

Rogowsky, P.M., Powell, B.S., Shirasu, K., Lin, T.S., Morel, P., Zyprian, E.M., Steck, T.R. y Kado, C.I. (1990) Molecular characterization of the *vir* regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63-kbp regulon cloned as a single unit. *Plasmid* **23**: 85-106.

Romero, D. y Brom, S. (2004) The symbiotic plasmid of the *Rhizobiaceae*. In *Plasmid biology*. Funnell, B.E., Phillips, G.J. (eds). Washington: ASM Press, pp. 271-290.

Rosenberg, C. y Huguet, T. (1984) The pAtC58 Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Is Not Essential for Tumor-Induction. *Mol.Gen.Genet.* **196**: 533-536.

Salzberg, S.L., White, O., Peterson, J. y Eisen, J.A. (2001) Microbial genes in the human genome: lateral transfer or gene loss? *Science* **292**: 1903-1906.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (eds) (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanjuán, J. y Olivares, J. (1989) Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. *J. Bacteriol.* **171**: 4154-61.

Sanjuán, J. y Olivares, J. (1991) NifA-NtrA regulatory system activates transcription of *nfe*, a gene locus involved in nodulation competitiveness of *Rhizobium meliloti*. *Arch.Microbiol.* **155**: 543-548.

Sastre, J.I., Cabezón, E. y de la Cruz, F. (1998) The carboxyl terminus of protein TraD adds specificity and efficiency to F-plasmid conjugative transfer. *J.Bacteriol.* **180**: 6039-6042.

Sawada, H., Kuykendall, L.D. y Young, J.M. (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J.Gen.Appl.Microbiol.* **49**: 155-179.

Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Puhler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

Scheiffele, P., Pansegrau, W. y Lanka, E. (1995) Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA in vitro. *J.Biol.Chem.* **270**: 1269-1276.

Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R. y Otto, S. (1991) Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1203-1211.

Scherzinger, E., Lurz, R., Otto, S. y Dobrinski, B. (1992) In vitro cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins. *Nucleic Acids Res.* **20**: 41-8.

Scherzinger, E., Kruft, V. y Otto, S. (1993) Purification of the large mobilization protein of plasmid RSF1010 and characterization of its site-specific DNA-cleaving/DNA-joining activity. *Eur.J.Biochem.* **217**: 929-38.

Schicklmaier, P. y Schmieger, H. (1995) Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**: 1637-1640.

Schneiker, S., Keller, M., Droge, M., Lanka, E., Puhler, A. y Selbitschka, W. (2001) The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. *Nucleic Acids Res.* **29**: 5169-81.

Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F. y Watson, J.M. (1987) Evidence for Genetic Exchange and Recombination of *Rhizobium* Symbiotic Plasmids in A Soil Population. *Appl.Environ.Microbiol.* **53**: 2942-2947.

Schulein, R. y Dehio, C. (2002) The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol.Microbiol.* **46**: 1053-1067.

Schultze, M. y Kondorosi, A. (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu.Rev.Genet.* **32**: 33-57.

Schwab, M., Gruber, H. y Hogenauer, G. (1991) The TraM protein of plasmid R1 is a DNA-binding protein. *Mol.Microbiol.* **5**: 439-446.

Segal, G. y Shuman, H.A. (1998) Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol.Microbiol.* **30**: 197-208.

Segovia, L., Young, J.P. y Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **43**: 374-377.

She, Q., Phan, H., Garrett, R.A., Albers, S.V., Stedman, K.M. y Zillig, W. (1998) Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. *Extremophiles.* **2**: 417-425.

Bibliografía

Sherman, J.A. y Matson, S.W. (1994) *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a sequence-specific cleavage/ligation reaction at the F plasmid origin of transfer. *J.Biol.Chem.* **269**: 26220-26226.

Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y. y Machida, Y. (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**: 6684-6688.

Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S. y Machida, Y. (1993) Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *J.Biol.Chem.* **268**: 26552-26558.

Shirasu, K., Koukolikova-Nicola, Z., Hohn, B. y Kado, C.I. (1994) An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol.Microbiol.* **11**: 581-588.

Silverman, P.M., Wickersham, E. y Harris, R. (1991) Regulation of the F plasmid *traY* promoter in *Escherichia coli* by host and plasmid factors. *J.Mol.Biol.* **218**: 119-128.

Silverman, P.M. y Sholl, A. (1996) Effect of *traY* amber mutations on F-plasmid *traY* promoter activity in vivo. *J.Bacteriol.* **178**: 5787-5789.

Simms, E.L. y Bever, J.D. (1998) Evolutionary dynamics of rhizopine within spatially structured rhizobium populations. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**: 1713-1719.

Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A. (1983) A Broad Host Range Mobilization System for *In vivo* Genetic-Engineering-Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.

Simpson, A.J., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L.M., Araya, J.E., Baia, G.S., Baptista, C.S., Barros, M.H., Bonaccorsi, E.D., Bordin, S., Bove, J.M., Briones, M.R., Bueno, M.R., Camargo, A.A., Camargo, L.E., Carraro, D.M., Carrer, H., Colauto, N.B., Colombo, C., Costa, F.F., Costa, M.C., Costa-Neto, C.M., Coutinho, L.L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A.P., Ferreira, A.J., Ferreira, V.C., Ferro, J.A., Fraga, J.S., Franca, S.C., Franco, M.C., Frohme, M., Furlan, L.R., Garnier, M., Goldman, G.H., Goldman, M.H., Gomes, S.L., Gruber, A., Ho, P.L., Hoheisel, J.D., Junqueira, M.L., Kemper, E.L., Kitajima, J.P., Krieger, J.E., Kuramae, E.E., Laigret, F., Lambais, M.R., Leite, L.C., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Lopes, S.A., Lopes, C.R., Machado, J.A., Machado, M.A., Madeira, A.M., Madeira, H.M., Marino, C.L., Marques, M.V., Martins, E.A., Martins, E.M., Matsukuma, A.Y., Menck, C.F., Miracca, E.C., Miyaki, C.Y., Monteriro-Vitorello, C.B., Moon, D.H., Nagai, M.A., Nascimento, A.L., Netto, L.E., Nhani, A., Jr., Nobrega, F.G., Nunes, L.R., Oliveira, M.A., de Oliveira, M.C., de Oliveira, R.C., Palmieri, D.A., Paris, A., Peixoto, B.R., Pereira, G.A., Pereira, H.A., Jr., Pesquero, J.B., Quaggio, R.B., Roberto, P.G., Rodrigues, V., de, M.R.A.J., de Rosa, V.E., Jr., de Sa, R.G., Santelli, R.V., Sawasaki, H.E., da Silva, A.C., da Silva, A.M., da Silva, F.R., da Silva, W.A., Jr., da Silveira, J.F., Silvestri, M.L., Siqueira,

W.J., de Souza, A.A., de Souza, A.P., Terenzi, M.F., Truffi, D., Tsai, S.M., Tsuhako, M.H., Vallada, H., Van Sluys, M.A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A.L., Zago, M.A., Zatz, M., Meidanis, J. y Setubal, J.C. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**: 151-7.

Smith, H.O., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Fleischmann, R.D. y Venter, J.C. (1995) Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* Rd genome. *Science* **269**: 538-540.

Soto, M.J., Zorzano, A., Mercado-Blanco, J., Lepek, V., Olivares, J. y Toro, N. (1993) Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes *nfe*. *J.Mol.Biol.* **229**: 570-576.

Soto, M.J., Zorzano, A., García-Rodríguez, F.M., Mercado-Blanco, J., Lopez-Lara, I.M., Olivares, J. y Toro, N. (1994) Identification of a novel *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency *nfe* gene homolog of *Agrobacterium* ornithine cyclodeaminase. *Mol.Plant Microbe Interact.* **7**: 703-707.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**: 503-517.

Steck, T.R., Lin, T.S. y Kado, C.I. (1990) *virD2* gene product from the nopaline plasmid pTiC58 has at least two activities required for virulence. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6953-6958.

Stern, J.C. y Schildbach, J.F. (2001) DNA recognition by F factor TraI36: highly sequence-specific binding of single-stranded DNA. *Biochemistry* **40**: 11586-11595.

Strack, B., Lessl, M., Calendar, R. y Lanka, E. (1992) A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primases and the α protein of the *Escherichia coli* satellite phage P4. *J.Biol.Chem.* **267**: 13062-13072.

Strohmaier, H., Noiges, R., Kotschan, S., Sawers, G., Hogenauer, G., Zechner, E.L. y Koraimann, G. (1998) Signal transduction and bacterial conjugation: Characterization of the role of ArcA in regulating conjugative transfer of the resistance plasmid R1. *J.Mol.Biol.* **277**: 309-316.

Stroun, M., Anker, P. y Auderset, G. (1970) Natural release of nucleic acids from bacteria into plant cells. *Nature* **227**: 607-608.

Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B. y Ronson, C.W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 8985-8989.

Sullivan, J.T. y Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 5145-9.

Bibliografía

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., De Bruijn, F.J. y Ronson, C.W. (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J.Bacteriol.* **184**: 3086-95.

Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A. y Ream, W. (1996) VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J.Bacteriol.* **178**: 1207-1212.

Tanaka, K., Rogi, T., Hiasa, H., Miao, D.M., Honda, Y., Nomura, N., Sakai, H. y Komano, T. (1994) Comparative analysis of functional and structural features in the primase-dependent priming signals, G sites, from phages and plasmids. *J.Bacteriol.* **176**: 3606-3613.

Tauch, A., Schneiker, S., Selbitschka, W., Puhler, A., van Overbeek, L.S., Smalla, K., Thomas, C.M., Bailey, M.J., Forney, L.J., Weightman, A., Ceglowski, P., Pembroke, T., Tietze, E., Schroder, G., Lanka, E. y van Elsas, J.D. (2002) The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere. *Microbiology* **148**: 1637-53.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Thomas, C.M. (ed) (2000) *The horizontal gene pool bacterial plasmids and gene spread* Amsterdam: Harwood academic publishers.

Thorsted, P.B., Macartney, D.P., Akhtar, P., Haines, A.S., Ali, N., Davidson, P., Stafford, T., Pocklington, M.J., Pansegrau, W., Wilkins, B.M., Lanka, E. y Thomas, C.M. (1998) Complete sequence of the IncP-beta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J.Mol.Biol.* **282**: 969-990.

Timmers, A.C., Soupene, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P. y Truchet, G. (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol.Plant Microbe Interact.* **13**: 1204-1213.

Tinland, B., Koukolikova-Nicola, Z., Hall, M.N. y Hohn, B. (1992) The T-DNA-linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 7442-7446.

Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C. y . (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.

Toro, N. y Olivares, J. (1986) Characterization of A Large Plasmid of *Rhizobium-Meliloti* Involved in Enhancing Nodulation. *Mol.Gen.Genet.* **202**: 331-335.

- Traxler, B.A. y Minkley, E.G., Jr. (1988) Evidence that DNA helicase I and *oriT* site-specific nicking are both functions of the F TraI protein. *J.Mol.Biol.* **204**: 205-209.
- Tun-Garrido, C., Bustos, P., González, V. y Brom, S. (2003) Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J.Bacteriol.* **185**: 1681-92.
- Turner, S.L. y Young, J.P. (1995) The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8JI. *FEMS Microbiol.Lett.* **133**: 53-58.
- Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Power, R.S., Amarger, N. y Young, J.P. (1996) Diversity of repC plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **142** (Pt 7): 1705-1713.
- Turner, S.L., Knight, K.A.L. y Young, J.P.W. (2002) Identification and analysis of rhizobial plasmid origins of transfer. *FEMS Microbiol.Ecol.***42**: 227-234.
- Van Berkum, P. y Eardly, B.D. (1998) Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. In *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink,H.P., Kondorosi,A., y Hooykaas,P.J.J. (eds). Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-24.
- Van de Sande, K. y Bisseling, T. (1997) Signalling in symbiotic root nodule formation. *Essays Biochem.* **32**: 127-142.
- Van montagu, M. y Schell, J. (1979) The plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* . In *Plasmids of medical, environmental and comercial importance*. Timmis,K.N., Pühler,A. (eds). Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press., pp. 71-95.
- Vlassak, K.M. y Vanderleyden, J. (1997) Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. *Crit.Rev.Plant Sci.* **16**: 163-229.
- Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K. y Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**: 873-876.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. y Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-951.
- Wang, E.T., van Berkum, P., Sui, X.H., Beyene, D., Chen, W.X. y Martínez-Romero, E. (1999) Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49 Pt 1**: 51-65.
- Wang, L., Helmann, J.D. y Winans, S.C. (1992) The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell* **69**: 659-667.
- Watanabe, T. y Fukasawa, T. (1960) Resistance Transfer Factor An Episome in Enterobacteriaceae. *Biochem.Bioph.Res.Co.* **3**: 660-665.

Bibliografía

- Watanabe, T. (1963) Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria. *Bacteriol.Rev.* **27**: 87-115.
- Waters, V.L., Strack, B., Pansegrau, W., Lanka, E. y Guiney, D.G. (1992) Mutational analysis of essential IncP α plasmid transfer genes *traF* and *traG* and involvement of *traF* in phage sensitivity. *J.Bacteriol.* **174**: 6666-6673.
- Waters, V.L. y Guiney, D.G. (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol.Microbiol.* **9**: 1123-1130.
- Weiss, A.A., Johnson, F.D. y Burns, D.L. (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 2970-2974.
- Wernegreen, J.J. y Riley, M.A. (1999) Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol.Biol.Evol.* **16**: 98-113.
- Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J.K. y Downie, J.A. (2002) N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J.Bacteriol.* **184**: 4510-4519.
- Williams, D.R., Motallebi-Veshareh, M. y Thomas, C.M. (1993) Multifunctional repressor KorB can block transcription by preventing isomerization of RNA polymerase-promoter complexes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1141-1148.
- Winans, S.C., Ebert, P.R., Stachel, S.E., Gordon, M.P. y Nester, E.W. (1986) A gene essential for *Agrobacterium* virulence is homologous to a family of positive regulatory loci. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**: 8278-8282.
- Wirth, R. (1994) The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just a plasmid-collection mechanism? *Eur.J.Biochem.* **222**: 235-246.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **51**: 89-103.
- Zatyka, M. y Thomas, C.M. (1998) Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol.Rev.* **21**: 291-319.
- Zechner, E.L., de la Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A.M., Koraimann, G., Lanka, E., Muth, G., Pansegrau, W., Thomas, C.M., Wilkins, B.M. y Zatyka, M. (2000) Conjugative-DNA transfer process. In *The horizontal gene pool Bacterial plasmid and gene spread*. Thomas, C.M. (ed). Amsterdam: harwood academic publishers, pp. 87-174.

Zhou, X.R. y Christie, P.J. (1997) Suppression of mutant phenotypes of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase by overproduction of VirB proteins. *J.Bacteriol.* **179**: 5835-5842.

Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. y Winans, S.C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J.Bacteriol.* **182**: 3885-3895.

Ziegelin, G., Furste, J.P. y Lanka, E. (1989) TraJ protein of plasmid RP4 binds to a 19-base pair invert sequence repetition within the transfer origin. *J.Biol.Chem.* **264**: 11989-94.

Ziegelin, G., Pansegrau, W., Lurz, R. y Lanka, E. (1992) TraK protein of conjugative plasmid RP4 forms a specialized nucleoprotein complex with the transfer origin. *J.Biol.Chem.* **267**: 17279-17286.

