

T. 11-17

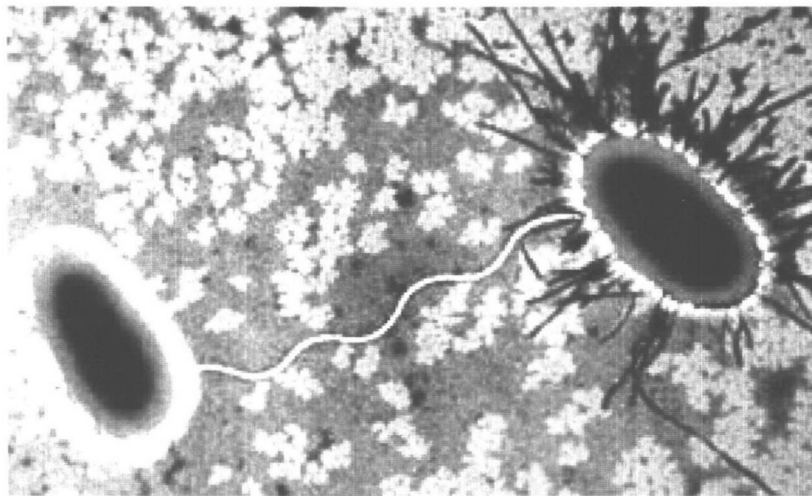
16/9/04
2592



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

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento b16509808
N.º Copia i17826068

UNIVERSIDAD DE GRANADA
09 SET. 2004
COMISION DE DOCTORADO



Biblioteca Universitaria de Granada



01255429

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

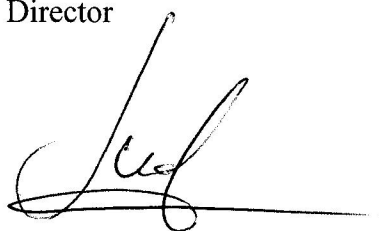
para aspirar al grado de Doctor



Fdo. Daniel Pérez Mendoza

VºBº

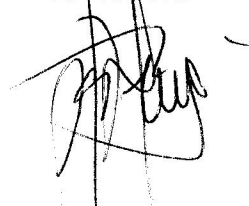
El Director



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

VºBº

El Director



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. Aprender 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.

Al Doctor Juan Sanjuán y a 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 mía. 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, por que 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,... 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 que 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 becarios, 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, 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 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 Mexico 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
OBEJTIVOS.	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.	61
1.5. Antibióticos.	62
1.6. Transferencia conjugativa en condiciones de laboratorio.	62

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 total 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.	71
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 (Southern blot).	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 automática 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.	87
4.3.1. Cultivo axénico en tubos.	87
4.3.2 Medida del grado de infectividad.	88
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	 99
 1. LOCALIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ORÍGENES DE TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN EL GENOMA DE <i>Sinorhizobium meliloti</i> Y <i>Rhizobium etli</i> .	
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.	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> .	94
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> .	
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 los 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 los genes supuestamente 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> están relacionados.	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.	153
3. RELAXASA DEL PLÁSMIDO SIMBIÓTICO DE <i>R. etli</i>; IMPLICACIONES EVOLUTIVAS EN PLÁSMIDOS DEL ORDEN RHIZOBIALES.	
3.1. Caracterización de la proteína TraA del plásmido simbiótico de <i>R. etli</i>.	158
3.2. Estudio <i>in vitro</i>.	163
3.2.1. Purificación del dominio relaxasa de la proteína TraA.	163
3.2.2. Estudio del reconocimiento y unión de la proteína N265TraAHis a distintos sitios <i>nic</i> .	168
3.2.3. Estudio de la capacidad de corte/religación de la proteína N265TraAHis sobre distintos sitios <i>nic</i> .	172
3.3. Estudio <i>in vivo</i>.	176
3.3.1. Estudio de la movilización de diferentes <i>oriTs</i> por el plásmido simbiótico de <i>R. etli</i> .	176
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> .	180
3.4. Discusión.	183
ANEXO CAPÍTULO III.	187

4. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE LOS PLÁSMIDOS CRÍPTICOS DE <i>S. meliloti</i> GR4	
4.1 Secuenciación y anotación de 10 Kb del plásmido pRmeGR4a alrededor de la región <i>mob</i> .	193
4.2. Región Dtr del plásmido pRmeGR4a.	197
4.2.1. Mutagénesis del ORF3 de pRmeGR4a.	202
4.3. Identificación del sistema Mpf del plásmido pRmeGR4a: Secuenciación y anotación de los fragmentos <i>EcoRI</i> 69E1 y 69E0 del cósmido pRmOR69.	202
4.4. Discusión.	212
ANEXO CAPÍTULO IV.	215
CONCLUSIONES.	217
BIBLIOGRAFIA.	219

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” (termino 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 poco 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. Existen en bacterias 3 mecanismos por los que la transferencia genética horizontal puede ocurrir: la 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).

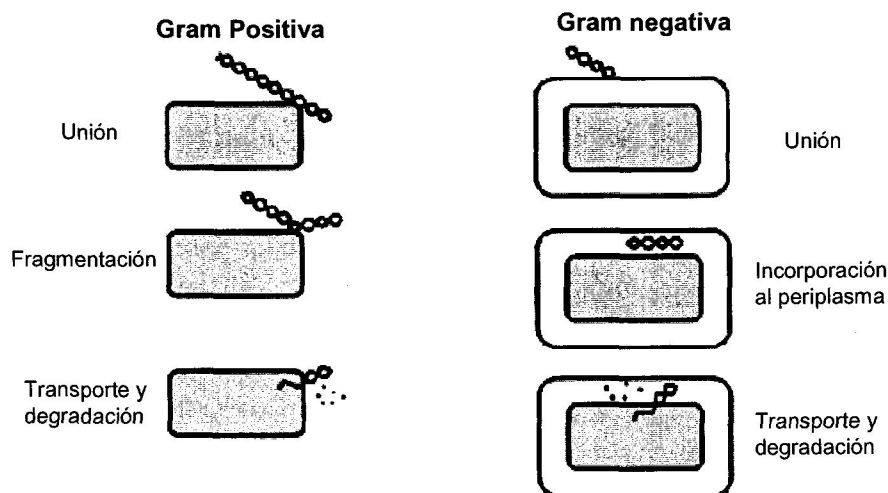


FIGURA Int.1. Transformación bacteriana.

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 para poder 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 de las endonucleasas de restricción de la bacteria receptora.

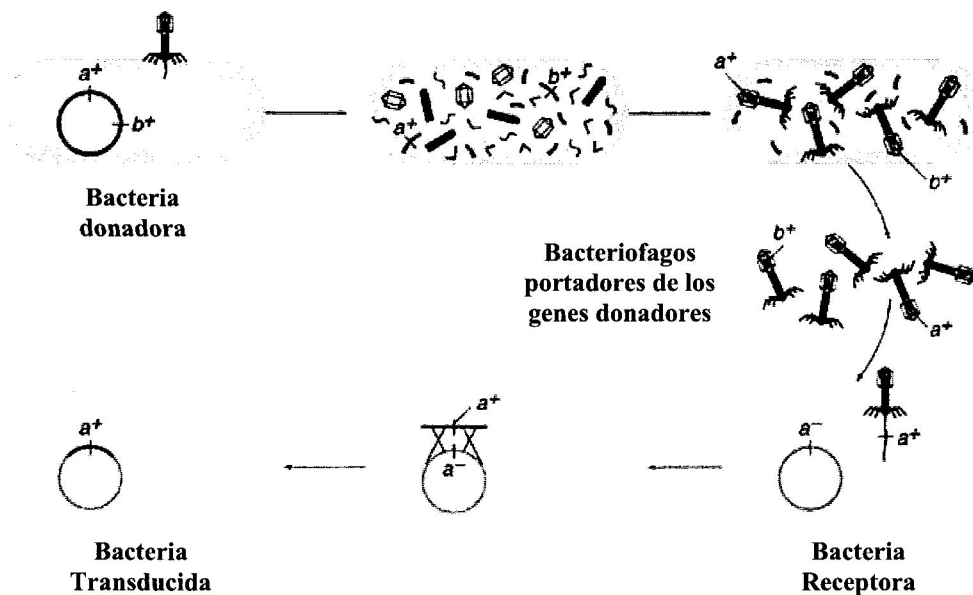


FIGURA Int.2. Transducción bacteriana.

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.

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 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 en 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

Introducción

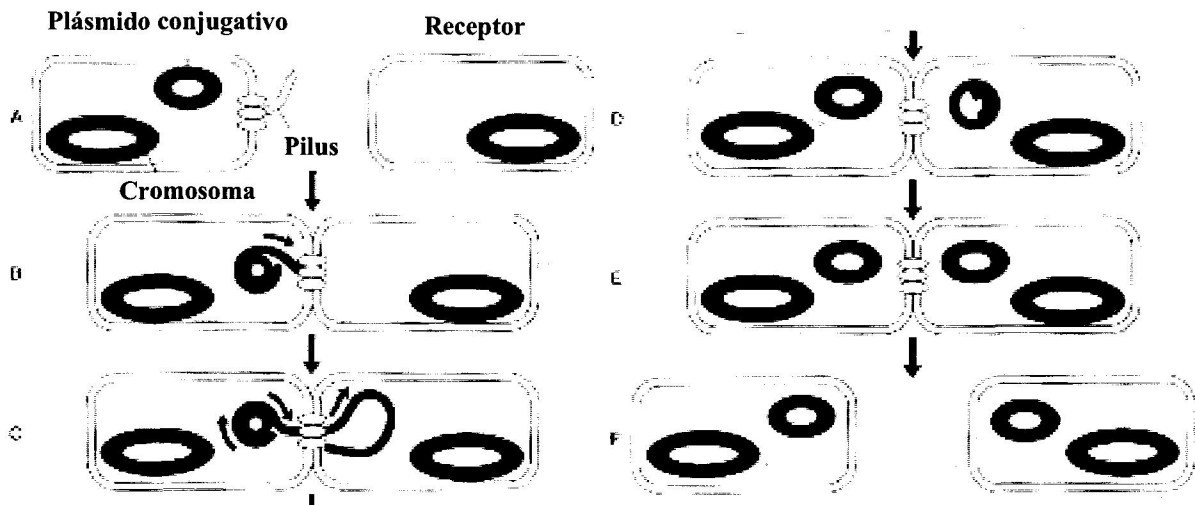


FIGURA. Int.3. Conjugación bacteriana.

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 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).

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 procariotas 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 aquellas 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 esta 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; Scheiffele *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 por 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

Introducción

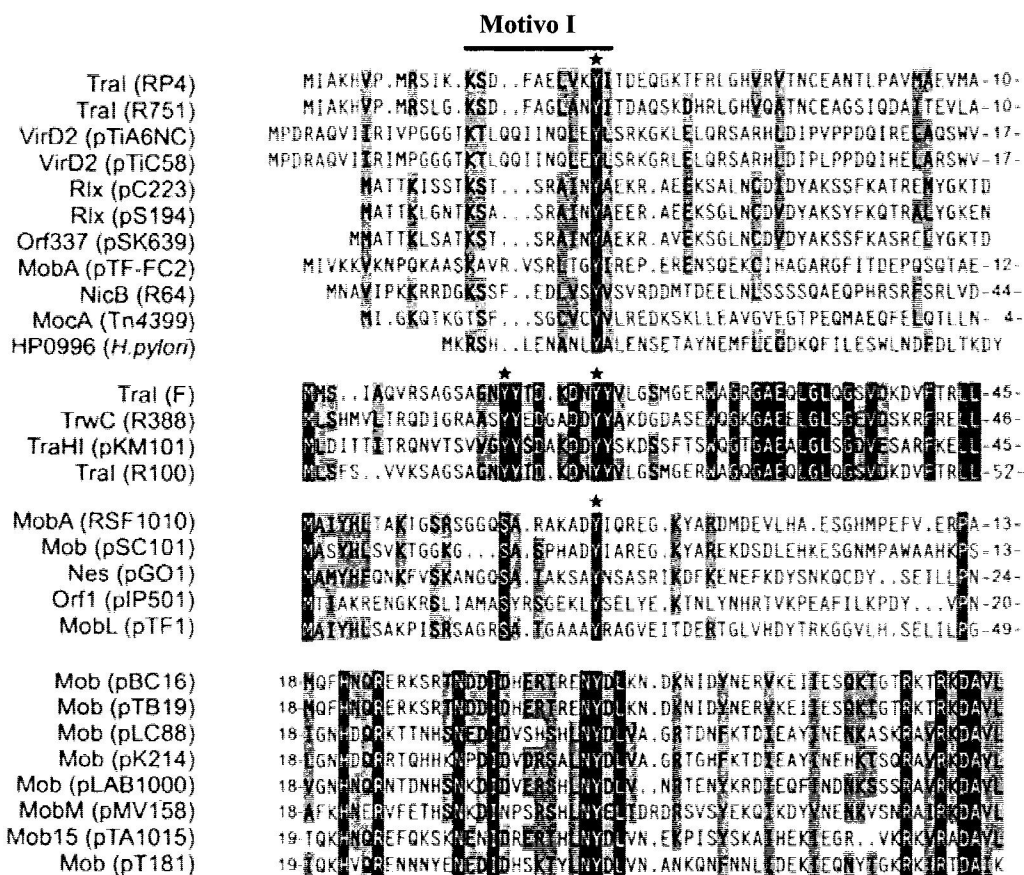


FIGURA Int.4A. Conservación del motivo I en diferentes relaxasas.

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 esta marcada mediante un asterisco. Figura tomada de "Conjugative-DNA transfer process" (Zechner *et al.*, 2000).

este 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 relaxasa al extremo 3'-OH del sitio *nic* generado tras el corte. Así mismo, 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

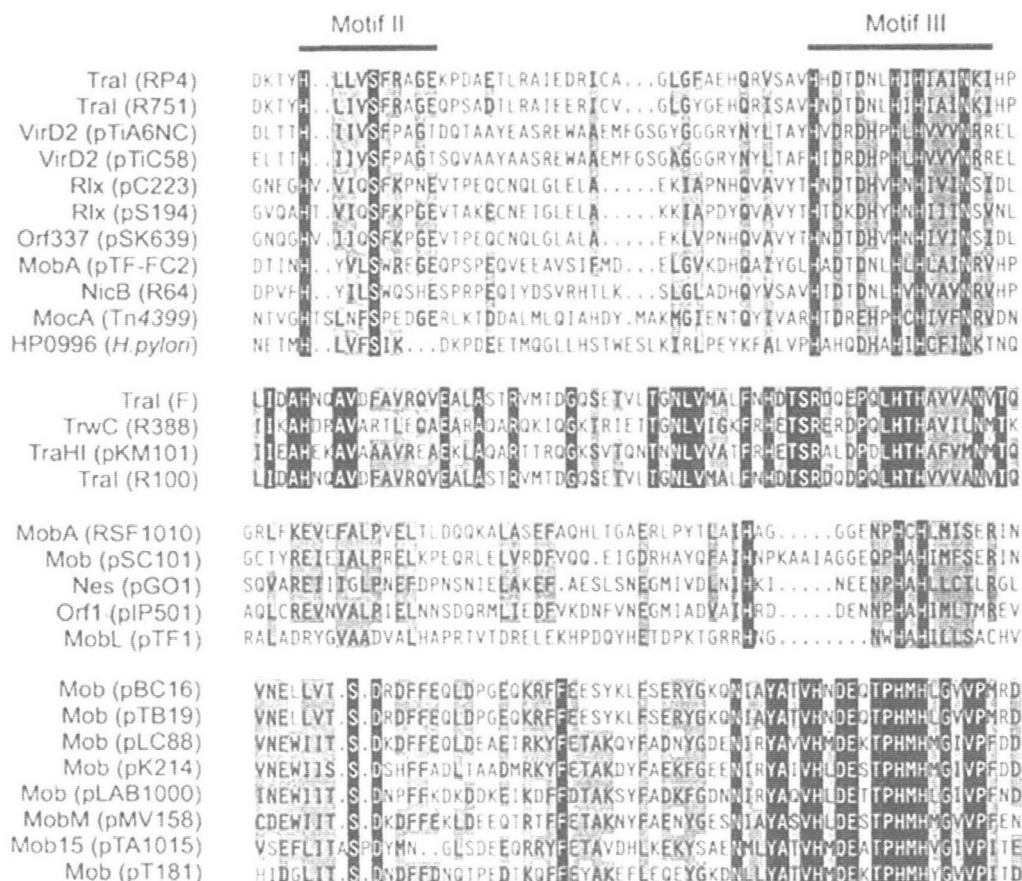


FIGURA Int.4B. Motivos II y III conservados en las diferentes relaxasas.

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 Tral 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).

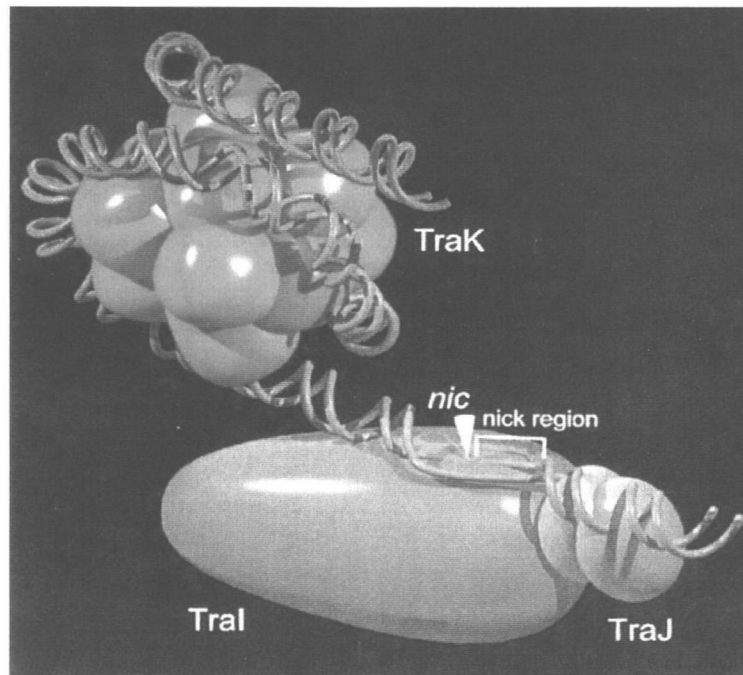


FIGURA Int.5. Modelo del relaxosoma propuesto para plásmidos IncP.

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 accesorias 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 accesorias 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 relaxasa 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 (ADNds) o sencilla (ADNss) 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 en *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).

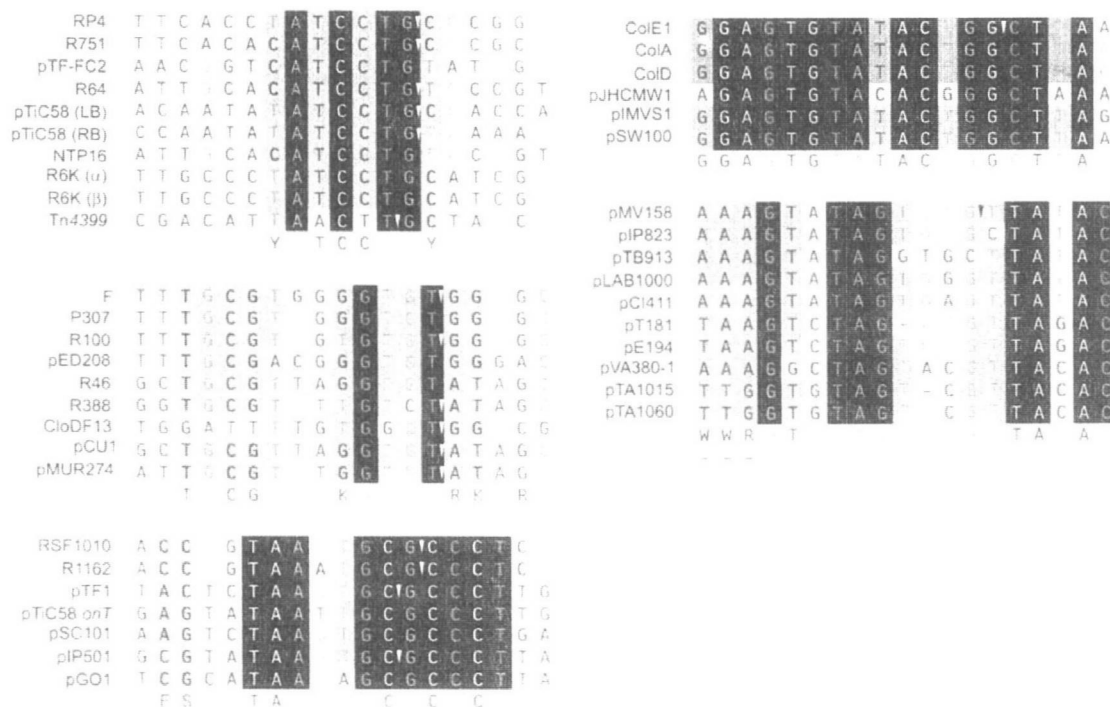


FIGURA Int.6. Alineamiento de *oriT*

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. 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).

Ejemplos de proteínas acopladoras tenemos a 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 esta 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 tiene 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* utiliza 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 como los genes *trbFGHI* y *trbJKL* del la región Tra3 del plásmido pTi15955 han sufrido una reorganización con respecto a los homólogos de la región Tra2 del plásmido RP4.

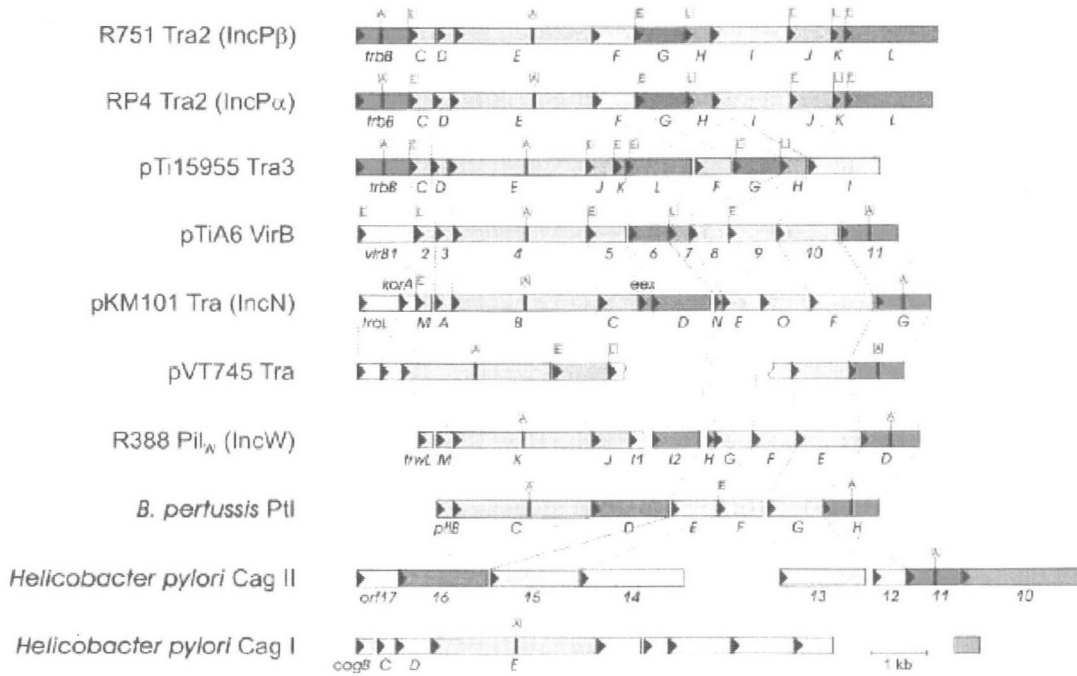


FIGURA Int.7. Conservación de la organización génica de distintos sistemas de secreción tipo IV bacterianos.

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 sus genes, la localización y función de los distintos componentes del Mpf de los distintos sistemas conjugativos, aunque varían de unos sistemas a otros, presentan numerosas analogías entre ellos. Los sistemas más conocidos son los Mpf de los plásmidos 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 formada 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 extracitoplasmática (Dang *et al.*, 1999).

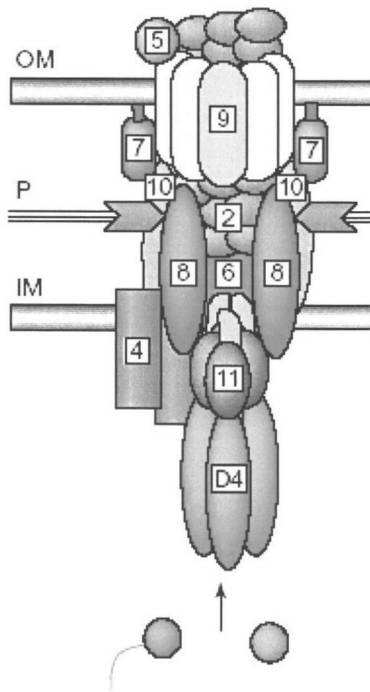


FIGURA. Int.8. Modelo Propuesto para T4SS.

En la figura se indican la hipotética localización de los distintos elementos que componen el T4SS. OM, membrana externa; IM, membrana interna; P, periplasma; círculo rojo unida a línea azul, complejo DNA-T-relaxasa; círculo verde, substrato 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 distribuían 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 un 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 numerosos 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 éstos 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 ¿que 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* interno. 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 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 conforme va entrando el ADN que esta 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 son la familia de las ADN-primasas (Frick y Richardson, 2001). Los ejemplos mejor estudiados corresponden a las primasas codificadas por el gen *sog* del plásmido Collb 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 diferentes. 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. Unos 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 entorno a 1. La regulación de la transferencia de los plásmidos por el sistema FinOP implica un sistema complejo donde se ha visto que intervienen dos sistemas de trasducción 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 ser un sistema que obedece 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 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 los genes reguladores *traM*, *traJ* y *traY*, son estimulados en serie (Figura Int.9B). Los genes de transferencia del plásmido F dependen, principalmente del

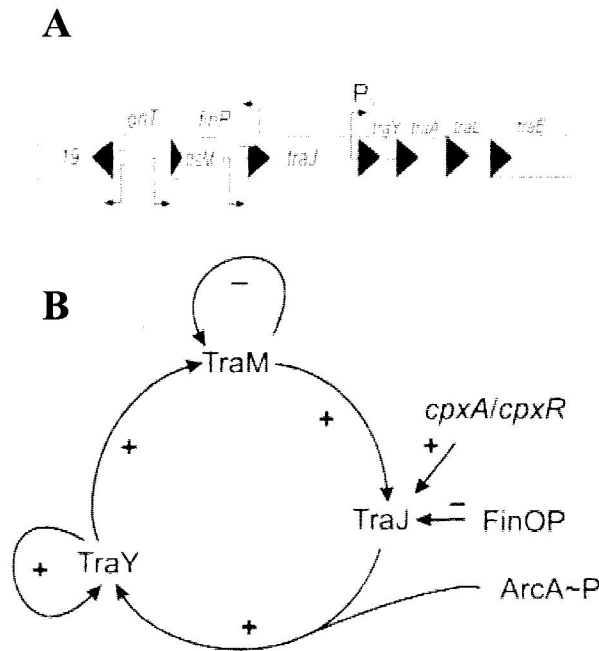


FIGURA. Int.9. Modelo propuesto para la regulación de la transferencia de plásmidos tipo IncF.

(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 con 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). Nuevos experimentos con los plásmidos R1 y R100 sugieren que la expresión de *traJ* también depende de la expresión de *traM* localizado aguas arriba de aquel, 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, cercanos 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 helice-giro-helice (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 han mostrado una jerarquía sobre la preferencia de unión, la cual es 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

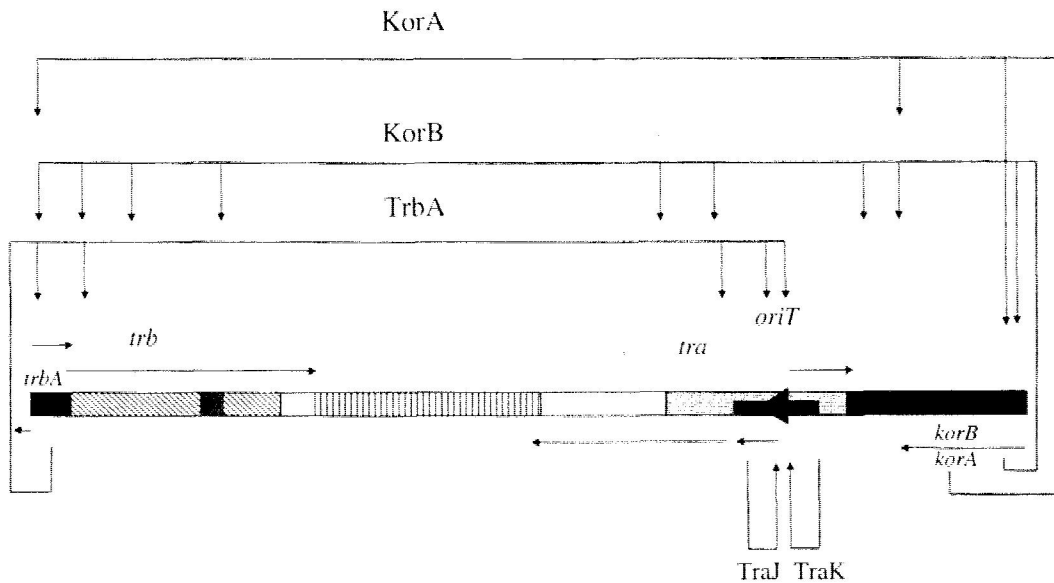


FIGURA. Int.10. Modelo de regulación de los genes de transferencia de plásmidos IncP.

La regulación se lleva a cabo 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 *A. 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 (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 un sistema de transferencia virtualmente idéntico, 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* agrupadas 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

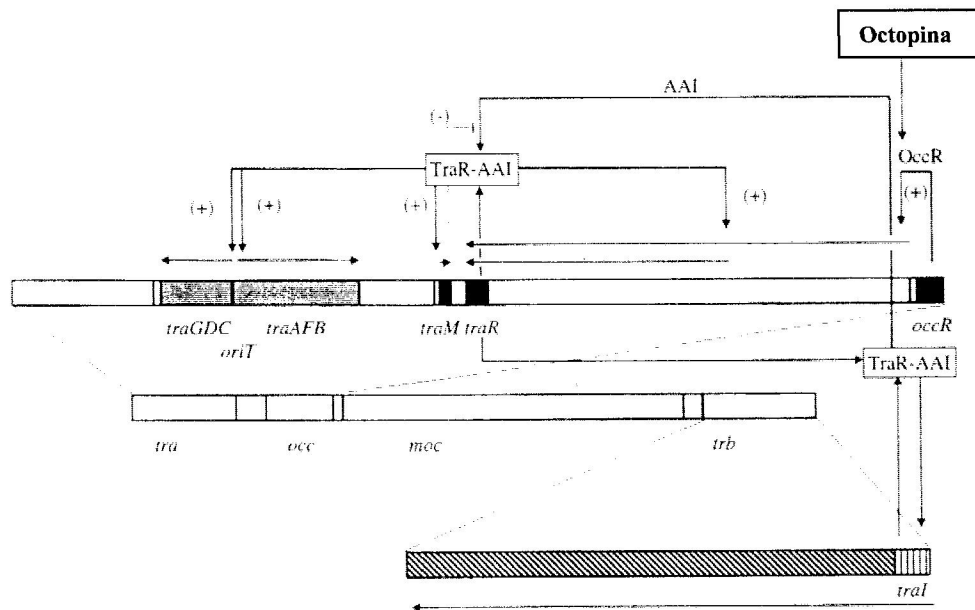


FIGURA. Int.11. Modelo de regulación de los genes de transferencia del plásmido Ti. La transcripción de los genes de transferencia es activada por el complejo TraR-AAI, y por tanto dependiente de la densidad celular. Genes reguladores, en negro; genes de procesamiento del ADN, gris claro; genes Mpf, rayas diagonales; autoinducción de *traI*, rayas verticales; unidades de transcripción se indican mediante flechas horizontales. Figura modificada de "Conjugative-DNA transfer process" (Zechner *et al.*, 2000).

organización genética es similar a la región Tra1 del plásmido RP4, permitiendo a los promotores implicados en la codificación de las funciones de procesamiento del ADN autorregularse negativamente cuando se produce el ensamblamiento del relaxosoma. La región *trb* codifica 12 ORFs, 11 de los cuales presentan similitudes significativas con las proteínas Trb codificadas por la región Tra2 de RP4.

Las opinas, cuya biosíntesis está codificada por el ADN-T transferido de la bacteria a la planta durante la infección, además de servir como nutrientes para el desarrollo de la población bacteriana, también sirve como señal química para activar la transferencia conjugativa de este plásmido. Tanto los regulones de la transferencia conjugativa de los plásmidos tipo octopina como nopalina, se encuentran co-regulados por sendos operones del catabolismo de opinas (Figura Int.11). En los plásmidos tipo octopina, la proteína OccR (de "octopin catabolism regulator") regula positivamente los genes *tra* en presencia de octopinas, a través de la activación de *traR* (Habeeb *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992; Fuqua y Winans, 1994). *traR* se encuentra sujeto igualmente a un proceso de autorregulación positiva por parte del complejo TraR-AAI (AAI, autoinductor). Para acomodar estos dos vías de activación, OccR/opinas y TraR/AAI, *traR* presenta dos promotores localizados

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 los cuales son activados por N-3(oxo[octanoyl])homoserin lactona, el cual en *A. tumefaciens* se conoce con el nombre de autoinductor (AAI). AAI es sintetizado por TraI, la cual 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, tan sólo en condiciones de alta concentración celular, se produce la expresión de los genes de transferencia. 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 *tral* 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 (*tral*, *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 estos promotores (Fuqua y Winans, 1996). La localización de estas cajas sugiere que TraR parece ser 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.

Por lo tanto 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

Introducción

solo unas pocas moléculas de VirA consiguen el estado de activación “en espera”, pasando 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).

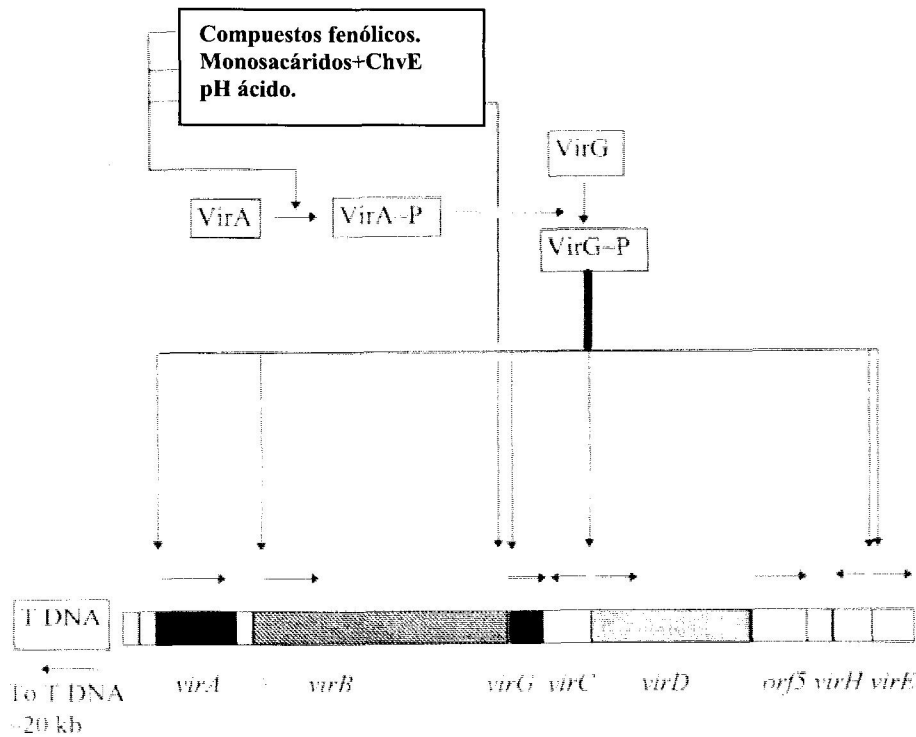


FIGURA. Int.12. Modelo de regulación de los genes *vir* del plásmido Ti

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 estos 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 la asociación entre estos microorganismos y las plantas con las que interactúan. 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 ha 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 auto transferencia, pero también como resultado de un fenómeno de cointegración o movilización *in 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

Introducción

simbiótica. Por una parte las pérdidas de marcadores selectivos puede hacer difícil de detectar la transferencia de ciertos plásmidos que presenten una baja frecuencia de transferencia, y por otra parte, 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 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 aquellos que aunque no son 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 Ti entre bacterias. Dichos sistemas se han estudiado a fondo y han demostrado ser totalmente independientes. De esta forma, la transferencia del ADN-T mediada por el sistema *vir* no requiere las funciones *tra/trb* (Rogowsky *et al.*,

1990) y a su vez, el sistema *tra/trb* no requiere del sistema *vir* para 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).

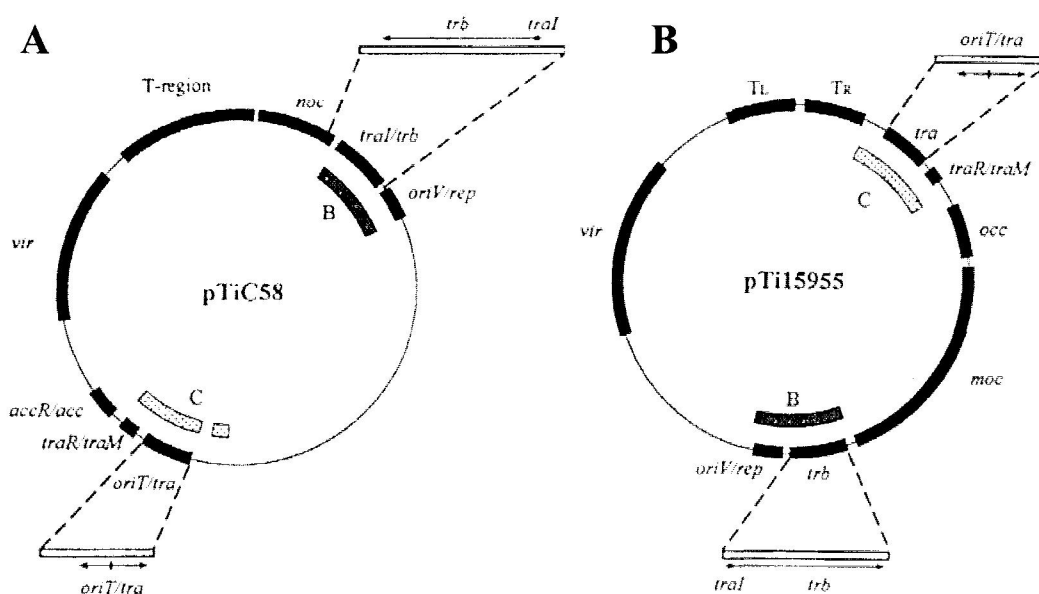


FIGURA. Int.13. Mapa genético de los dos tipo de plásmidos Ti típicos de *A. tumefaciens*.

A) pTiC58, plásmido Ti tipo Nopalina/Agrocipina. 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 agrocipinas 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/Agrocipina y Ti de tipo Octopina/manitilopina 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

Introducción

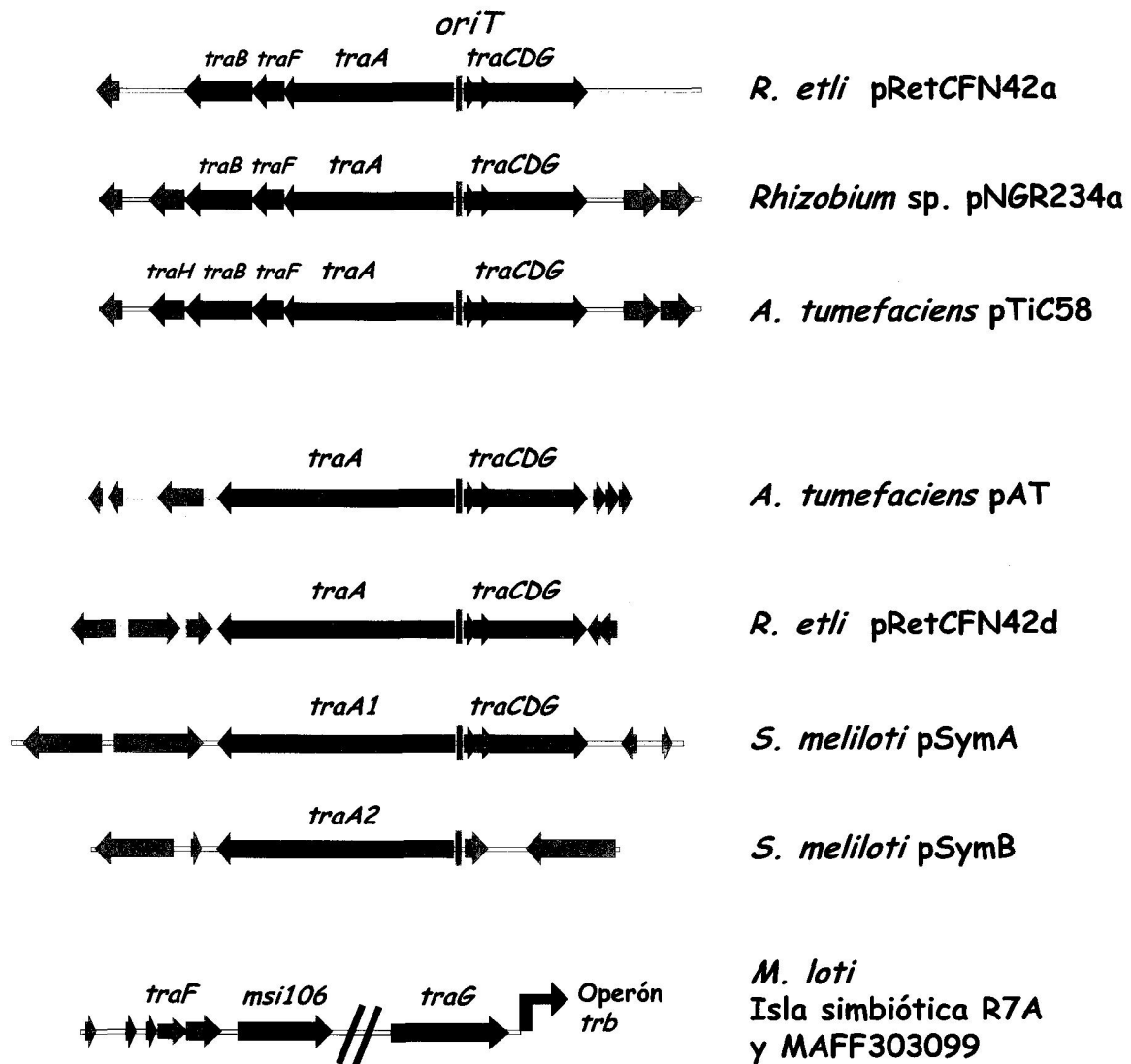


FIGURA Int.14. Regiones Dtr.

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.

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

- 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

Introducción

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 a altas frecuencias, 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).

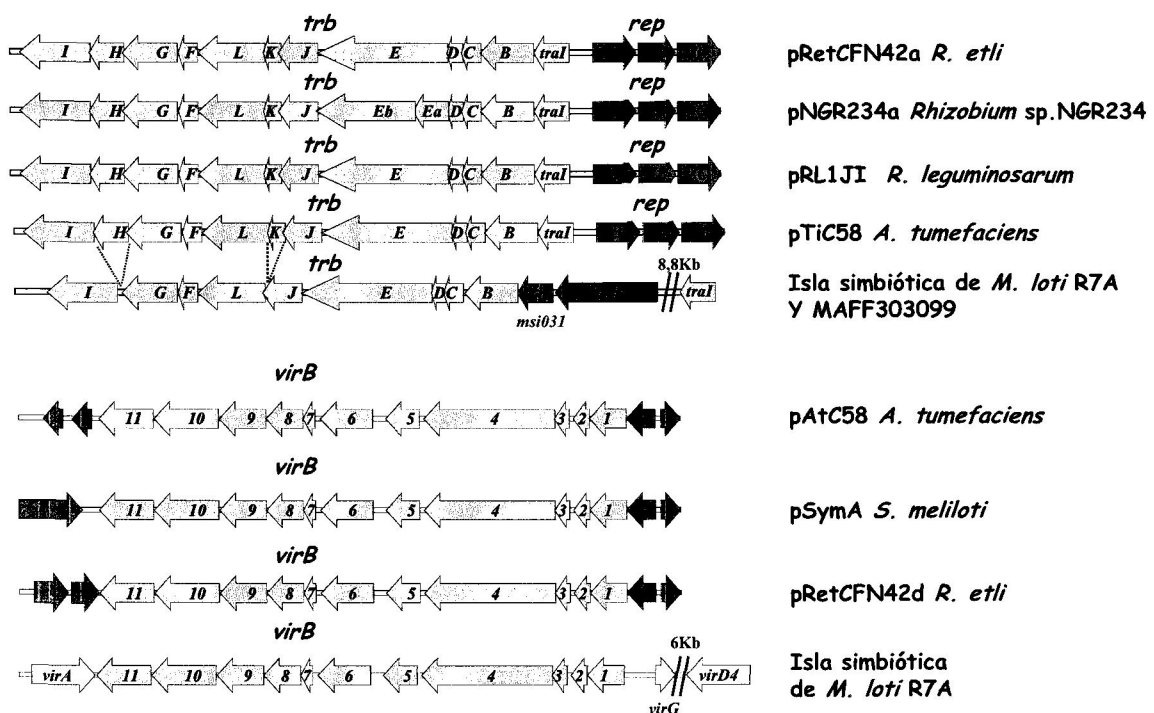


FIGURA Int.15. Regiones Mpf.

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.

- **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

Introducción

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). 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 formadas 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, los cuales 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 donde van a actuar como nutrientes bacterianos. 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 las fuentes amonio o el nitrato. 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 -protobacterias). Por esta razón, las interacciones Rizobio-leguminosa tiene 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 encuentran 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,

Introducción

también se incluye el género *Agrobacterium*, el cual incluye patógenos de plantas como *Agrobacterium tumefaciens* (Martínez-Romero, 2000; Van Berkum y Eardly, 1998). 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" (Garrryt, 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 Rizobiaceae 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 existen 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-quito-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

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. mimosae	<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. phaseoli	<i>P. vulgaris</i>	pSym, 400-500 Kb	2-3
<i>Rhizobium giardinii</i> bv. phaseoli	<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. phaseoli	<i>P. vulgaris</i>	pSym, 400 Kb	4
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii	<i>Trifolium</i> sp.	pSym, 180-500 Kb	2-8
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae	<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

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 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

Introducción

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 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 son 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 resguardado donde desarrollarse (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 su planta hospedadora, e inclusive 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 simbioses de plantas con gran interés agronómico.

La localización de los genes responsable del proceso simbiótico dentro de los pSims 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 de estreses oxidativos y osmóticos 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 del *S. meliloti*, el cual 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 el *R. etli* donde aunque tan sólo 1 de los 6 plásmidos recibe la denominación de pSym de la cepa, el plásmido pRetCFN42d, 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

Introducción

pRetCFN42f un plásmido necesario para la fijación de nitrógeno, dejando sólo el pRetCFN42a como único plásmido dispensable para una simbiosis 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 que, al igual que otros plásmidos, la presencia de un contenido en G+C es 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 el cual presenta una distribución 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). Sin embargo, 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. 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 ver 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 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 al 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

Introducción

transferencia conjugativa de otros elementos tales como la isla simbiótica de *B. japonicum* 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 han 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*, simbiote de la judía, se encuentra en meso América, 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 (He *et al.*, 2003)

Por su parte en *R. etli* CFN42, pRetCFN42a se ha mostrado 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

Introducción

excepción de los genes implicados en el sistema de regulación de la transferencia *traI* y *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 como se ha expuesto, 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 *oriT* 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 ninguno de 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* solo 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 haber podido identificarse 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). Aguas arriba de la región *traR/traM* se localizan al menos, homólogos a los genes *trbI* y *trbH* (Marketon y González, 2002), sugiriendo la existencia de un sistema de regulación de la transferencia similar al pTiC58 y pNGR234a.

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

Introducción

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 *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 BisR 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 vemos el control de la transferencia conjugativa de los plásmidos presentes en la familia Rhizobiaceae por “quorum sensing” 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 esta regulada por amonio (Herrera-Cervera *et al.*, 1996) (para más detalles ver Capítulo 4). Igualmente, la existencia de plásmidos que portando un hipotético sistema

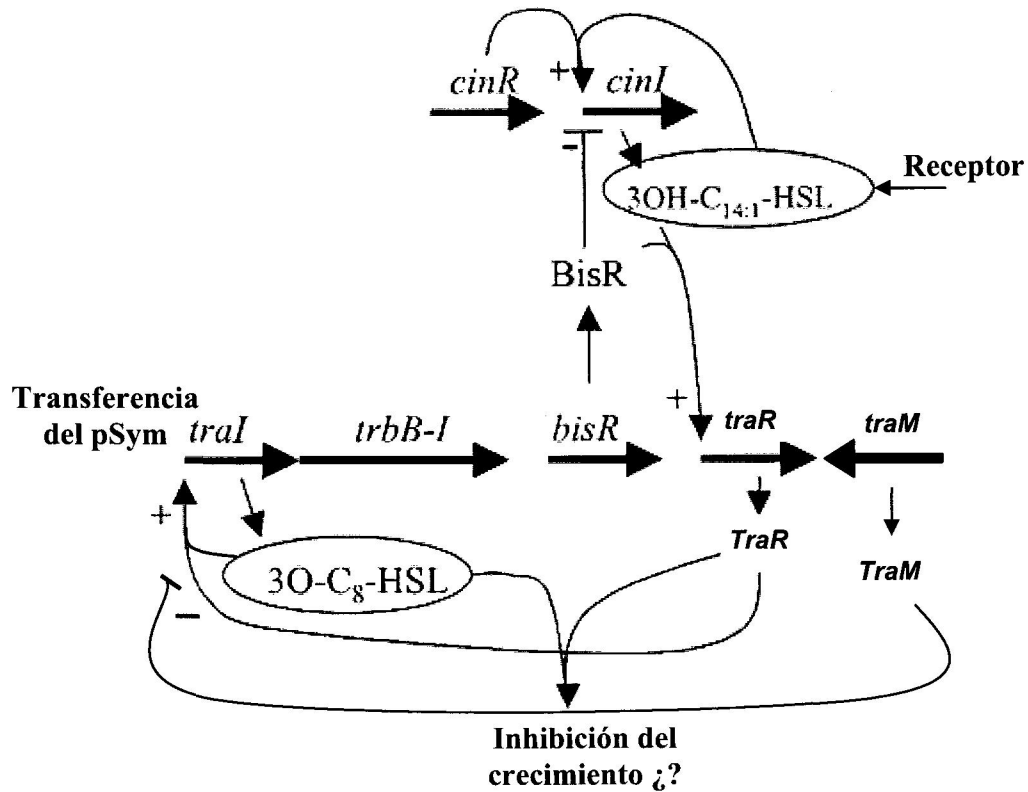


FIGURA Int. 16. Regulación de la transferencia del pRL1JI de *R. leguminosarum*
 En la figura se representa el circuito propuesto para la regulación del plásmido simbiótico pRL1JI. Para más detalles ver texto. Modificado de Wilkinson *et al.*, 2002.

conjugativo completo 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.

