

11281
35

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

DETERMINACION DEL *LOCUS* QUE INHIBE LA INTEGRACION
HOMOLOGA DE LA REGION REPLICADORA DEL PLASMIDO
SIMBIOTICO DE LA CEPA CFN42 DE *Rhizobium etli*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A:
VERONICA QUINTERO HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSE GUILLERMO DAVILA RAMOS

CUERNAVACA, MOR.

FEBRERO DEL 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: VERONICA QUINTERO
HERNANDEZ

FECHA: 3 DE FEBRERO DEL 2003

FIRMA: [Firma]

Dedicada a

A toda mi familia,

A mis abuelos: Gabriel y Margarita; Ramón y Luisa

A mis padres: Gabriel y Cecilia,

A mis hermanos: Isma, Gaby, Dany y Alina,

A Mary, Paulina y Sandy.

A mi esposo Rive,

y

A mis consentidos: Adalai, Derian, Arandu, Antulio y Hannia Saori.

!!!! Por que lo mejor de mi vida son ustedes !!!!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi familia, a mis padres: Gabriel y Cecilia, a mis hermanos: Ismael, Gabriel, Daniel y Alina, y a mi esposo Rive. Por tanto cariño, apoyo e inmensa alegría que siempre me han brindado. Por Todo !!!

A Chely, Cristy, Karina, Lucy, Aracely, Magda, Rosa Elena, Blanca, Alma, Charo, Eduardo, Edgar, José Espiritu, Jacobo y Jesús, por ser mis mejores amigas (os), por los innumerables momentos de alegría que hemos compartidos y por todo su apoyo en los momentos difíciles.

Agradezco mucho a mis tutores por su enorme contribución a la realización de este trabajo: a Memo, por darme un lugar en su laboratorio y por apoyarme en todo lo que necesite a lo largo del Doctorado; a Mac, por asesorarme en todo momento y en todos los aspectos; al Dr. Mario Soberon, por su valiosa participación y comentarios en los tutoriales. A los tres: Mil Gracias !!!

A los miembros del Jurado: Dr. Guillermo Dávila Ramos, Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, Dr. David Romero Camarena, Dr. Rafael Camacho Carranza, Dr. Enrique Mérimo Pérez, Dra. Gloria Soberon Chávez y al Dr. José Luis Puente García, por sus valiosas correcciones y sugerencias.

Al Dr. David Romero Camarena, por ponerme el ejemplo de lo que significa ser un excelente investigador, por su ayuda y enseñanza en el curso propedeutico, en los tópicos y en el mejoramiento de esta tesis.

Al Dr. Miguel A. Ramírez, por su amistad, por toda su ayuda y enseñanzas, gracias Maestro!!!.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio y del CIFN: A Jacobo, Javier Rivera, Laura, Jaime, Manuel, Jesus, Lupita, Gama, Víctor, Juan, Angeles, Nora, Javier, paty, Ismael, Toño, Luis, Tania, Irina, Pablo y Oscar Rodríguez; gracias a todos por que siempre me ayudaron cuando lo necesite!!!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Lolita, por todos los tramites!!!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

0

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCION	4
1. Plásmidos	4
1.1 Replicación de plásmidos.	5
1.2 Partición de plásmidos.	11
2. Incompatibilidad	13
3. Recombinación	15
3.1 Recombinación homóloga	15
3.2 Recombinación sitio-específica	20
4. Plásmidos de <i>Rhizobium</i>	26
5. Modelo de estudio: el plásmido simbiótico de <i>Rhizobium etli</i> cepa CFN42.	28
2. ARTICULO	30
3. RESULTADOS ADICIONALES	40
3.1 El papel de la Resolvasa RinQ en la estabilidad del p42d.	40
3.2 Presencia de Recombinasas homólogas a RinQ en otros replicadores tipo <i>repABC</i> .	41
4. DISCUSION	44
5. PERSPECTIVAS	47
6. REFERENCIAS	48

RESUMEN

La región de replicación/partición del plásmido simbiótico p42d de *Rhizobium etli* se caracteriza por la presencia del operón *repABC* el cual codifica para las proteínas RepA y RepB, involucradas en la segregación del plásmido y el control del número de copias, y la proteína RepC, esencial para la replicación.

El plásmido pH3, derivado de pSUP202 (vector incapaz de replicar en *Rhizobium*) y que contiene la región de replicación/partición mencionada, es capaz de replicar en una cepa derivada de *R. etli*, curada del p42d con la misma estabilidad y número de copias mostrado por el plásmido parental. También ejerce incompatibilidad contra el p42d cuando se introduce a una cepa de *R. etli recA-*. Sin embargo, cuando pH3 se introduce dentro de la cepa silvestre, en lugar de ejercer incompatibilidad contra el p42d, forma un cointegrado con él, mediado por recombinación homóloga. Por otra parte, cuando el plásmido cGD47, el cual contiene un inserto mayor que el inserto clonado en pH3, se introduce a la cepa silvestre o a la cepa *recA-* de *R. etli*, cGD47 ejerce incompatibilidad contra el p42d y permanece como un replicon independiente.

La finalidad de este trabajo fue identificar y caracterizar el *locus* genético (presente en cGD47 y ausente en pH3), que suprime la formación de cointegrados y promueve la expresión de las propiedades de incompatibilidad contra el p42d en el fondo genético de la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos muestran que este *locus* contiene una resolvasa sitio-específica y sus sitios de acción, los cuales son factores esenciales para ejercer incompatibilidad contra el plásmido simbiótico p42d. La resolvasa se requiere para la resolución de los cointegrados formados con el p42d permitiendo la expresión de un verdadero fenotipo de incompatibilidad. Se propone un modelo para este novedoso mecanismo de incompatibilidad.

Resultados adicionales demuestran que la resolvasa no es esencial para la estabilidad del p42d y la presencia de resolvasas de este tipo, no está restringida a plásmidos de *R. etli*, lo cual sugiere que el fenómeno descrito es común para otros plásmidos *repABC*.

En conjunto, los resultados obtenidos representan un avance en el conocimiento de la biología de plásmidos de las Rhizobiaceas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

The replication/partition region of the symbiotic plasmid p42d from *Rhizobium etli* is characterized by the presence of the *repABC* operon which encodes for the RepA and RepB proteins involved in plasmid segregation and copy number control, and the RepC protein which is essential for replication.

A recombinant plasmid (pH3) of pSUP202 (a transferable vector unable to replicate in *Rhizobium*) containing the replication/partition region is able to replicate in a *R. etli* derivative cured from p42d, with the same stability and copy number shown by the parental plasmid. In addition, pH3 exerts incompatibility against p42d when it is tested in a *R. etli* CE3 *recA*- derivative. However, when pH3 is introduced into the wt strain, instead of exerting incompatibility against the p42d, pH3 forms a stable cointegrate with p42d, this cointegrate is mediated by homologous recombination. On the other hand, when the plasmid cGD47, containing an insert larger than insert cloned in pH3, is introduced into a wt or a *recA*- strain of *R. etli*, cGD47 displaces p42d and it remains as an independent replicon.

The objective of this work was to identify and to characterize the genetic locus (contained in cGD47, but absent in pH3) which suppresses the cointegrate formation and promotes the incompatibility properties against p42d in the wt genetic background.

The results showed that this locus contains a site-specific resolvase and its action sites are essential factors to displace the symbiotic plasmid p42d. We propose a model for this novel incompatibility mechanism.

Additional studies shown that: a) this resolvase is not essential for p42d stability, and b) genes with a high degree of identity with this resolvase can be found in other *repABC* plasmids.

Collectively, the results represent an advance in our understanding of Rhizobial plasmid biology.

INTRODUCCION

1. PLASMIDOS.

El genoma de los organismos procariotes esta constituido por dos tipos de moléculas de DNA: el cromosoma y los plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de DNA circulares o lineales, que se distinguen por su separación física del cromosoma y por mantenerse de manera estable en ese estado extracromosomal. Los plásmidos varían considerablemente en tamaño (1.5 kb a 2400 kb) y número de copias (1 a 500 copias), y además pueden coexistir con diferentes plásmidos en una misma célula (Burian *et al.* 1999; Kado 1998).

El término de plásmidos se propuso en 1952 (Lederberg 1952). En un principio los plásmidos solo llamaron la atención por su papel como agentes de intercambio genético pseudosexual y después, el interés en ellos se centró en los genes de resistencia a antibióticos que contenían. Actualmente, se sabe que codifican para una enorme variedad de funciones que le permiten a su bacteria hospedera incrementar sus posibilidades de habitar en un medio ambiente atípico. También se ha descubierto que algunos plásmidos contienen genes que codifican para funciones metabólicas básicas, utilización de nutrientes y síntesis de componentes celulares (Brubaker 1985; García-de los Santos *et al.* 1996). Además, los plásmidos constituyen un importante factor en la evolución de los procariotes ya que pueden dar origen a diversos rearrreglos genéticos tales como: amplificaciones, deleciones, inversiones, así como cointegraciones con el cromosoma u otros plásmidos (Berg 1990; Romero *et al.* 1995; Flores *et al.* 2000), y pueden movilizarse lateralmente por transducción, transformación y conjugación a bacterias pertenecientes a diferentes géneros.

La persistencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas se debe a varias razones: 1) le confieren una ventaja fenotípica a su célula hospedera, 2) se heredan de manera estable de la célula parental a la célula hija y 3) muchos plásmidos son autotransmisibles o movilizables por otros plásmidos y esta habilidad les permite diseminarse de una bacteria a otra con alta eficiencia y colonizar nuevas especies bacterianas. El mantenimiento de los plásmidos dentro de su célula huésped se debe a que poseen módulos de DNA, estructuralmente independientes pero funcionalmente

relacionados, que codifican las funciones necesarias para su replicación y segregación, los cuales, en muchos casos están contenidos en segmentos de 2 a 5 kb llamados replicones básicos (Summers 1996). Algunos plásmidos tienen dos o mas replicones básicos, pero la mayoría solo tiene uno (Bartosik *et al.* 1997).

1.1 Replicación de plásmidos.

El proceso esencial para el mantenimiento de un plásmido es su replicación. La replicación de plásmidos se lleva a cabo por la acción de proteínas del hospedero y del plásmido mismo. El proceso consiste en utilizar al plásmido a replicar como molde y apartir de éste se sintetiza un plásmido idéntico, el cual posteriormente se hereda a una célula hija. La replicación puede dividirse en 3 etapas:

- 1) Inicio. En esta etapa se forma la horquilla de replicación, que es la región donde el DNA se está replicando y en la cual se ensambla la maquinaria enzimática de replicación (replisoma). Para lograr lo anterior, las proteínas de inicio de la replicación interaccionan con el DNA en una región específica denominada origen de replicación (*ori*), en donde catalizan la apertura de la doble cadena de DNA. Además de las proteínas de inicio codificadas por el plásmido, existen otras (codificadas por el cromosoma bacteriano), que ayudan a desnaturalizar la doble cadena de DNA, tales como la proteína DnaA (proteína de inicio de la replicación del cromosoma), que participa en la replicación de algunos plásmidos y las proteínas IHF, HU y FIS (proteínas similares a histonas). Después de la apertura de la doble cadena de DNA, se incorpora la helicasa DnaB en la horquilla recién formada, la cual desplaza a las proteínas de inicio y recluta a la primasa DnaG para que sintetize el iniciador de RNA necesario para la fase de elongación de la nueva cadena de DNA. Posteriormente, el complejo multiproteico de la DNA polimerasa se incorpora a la horquilla para dar lugar a la formación del replisoma. A diferencia de los plásmidos tipo ColE1, la mayoría de los plásmidos codifican una proteína que cataliza el inicio de la replicación (Helinski *et al.* 1996).

- 2) Elongación. Se caracteriza por que el replisoma se desliza a lo largo del DNA. En esta etapa intervienen proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (SSB) que ayudan a evitar la renaturalización y el daño a la molécula de DNA.
- 3) Terminación. Involucra el desmantelamiento del replisoma y la separación física de las moléculas obtenidas.

Replicador básico.

Las funciones de replicación se agrupan dentro de una región conocida como el replicador básico, el cual constituye la región más pequeña de un plásmido capaz de replicar con el mismo número de copias que el plásmido padre (Nordström y Austin 1989). El replicador básico generalmente está constituido por segmentos contiguos de información que incluyen un origen de replicación (*ori*) y uno o más elementos adyacentes de control de la replicación. El origen de replicación es el lugar donde se inicia la síntesis del DNA y en el cual se localizan sitios de unión para las proteínas de inicio de la replicación y para las proteínas accesorias. Los sitios de unión para las proteínas de inicio, en algunos plásmidos (como el P1 y F), son secuencias repetidas de DNA de longitud corta (de 12 a 22 pb, usualmente separadas por 11 pb), conocidas como iterones, los cuales se relacionan con el inicio y con el control de la replicación, por lo cual pueden localizarse en el origen de replicación o en alguna región reguladora. Además de los iterones existen secuencias palindrómicas que funcionan como sitios de reconocimiento para proteínas de inicio (como en los plásmidos R1 y pAL5000). En adición a lo anterior, el origen de replicación puede tener uno o más sitios de unión para las proteínas accesorias (tales como DnaA, IHF, HU y FIS).

Tipos de replicación.

En la mayoría de los plásmidos, bacteriófagos y replicones del cromosoma, la secuencia de eventos que ocurren en el inicio de la replicación tienen muchas características en común. Sin embargo, en los plásmidos, una vez que se inicia la

replicación, ésta puede proceder de manera unidireccional o bidireccional por medio de tres tipos de replicación, que además constituyen una forma de clasificarlos:

1) Replicación por desplazamiento de cadena.

Se conoce también como “loop D”. En este mecanismo la maquinaria de replicación desnaturaliza la doble cadena de DNA y utiliza como templado, en un inicio, una de las dos cadenas. Cuando se mueve el replisoma a través de la doble hélice, provoca que se desplace la cadena que aún no se replica, misma que permanece como cadena sencilla hasta que una segunda señal promueve su replicación. Los mejores ejemplos de plásmidos que replican por este mecanismo son los plásmidos promiscuos de la familia IncQ, de los cuales los más estudiados son: el plásmido RSF1010 de *E.coli*. (prototipo de la familia IncQ), el plásmido R1162 de *Pseudomonas aeruginosa* y el plásmido R300B de *Salmonella enterica* serovar typhimurium (Rawlings y Tietze 2001).

2) Replicación tipo theta.

Ocurre en plásmidos circulares. Se denomina así porque el plásmido en replicación forma una molécula similar a la letra griega theta (θ). La molécula puede estar formada por una o dos horquillas de replicación en muchas ocasiones. Las proteínas de inicio de los plásmidos con replicación theta (proteínas de la familia Rep) tienden a formar dímeros en solución mediante un motivo de “cierre de leucina” y a unirse al DNA a través de un motivo HTH (Giraldo *et al.* 1998). En la forma homodimérica, las proteínas Rep funcionan como represores de su transcripción, mientras que en la forma monomérica catalizan el inicio de la replicación. Ejemplos de plásmidos con este tipo de replicación: los plásmidos ColE1 y P1 de *E. coli* y el plásmido pPS10 de *Pseudomonas syringae* pathovar savastanoi (Del Solar *et al.* 1998).

3) Replicación por círculo rodante

Este tipo de replicación comienza cuando la proteína de inicio de la replicación realiza un corte en una de las cadenas; esta acción genera un extremo 3' que se usa como iniciador para comenzar la síntesis de la cadena que no sufrió el corte. Cuando la replicación de esta cadena concluye, se replica y repara la cadena que sufrió el corte. Las proteínas de los plásmidos con replicación por círculo rodante forman dímeros o multímeros que tienen la doble función de romper un enlace fosfodiéster de una de las cadenas de DNA, y reparar el daño al terminar el ciclo de replicación del plásmido (Espinosa *et al.* 1995). Estas proteínas no tienen un motivo de unión a DNA tipo HTH, pero sí forman dímeros a través del motivo de cierre de leucina (Del Solar *et al.* 1998). Dentro de los plásmidos que replican por un mecanismo de círculo rodante se encuentran: el plásmido pKYM de *Shigella sonnei*, el plásmido pT181 de *Staphylococcus aureus* y el plásmido pMV158 de *Streptococcus pneumoniae* (Novick 1989; Yasukawa 1998; del Solar 1993).

Mecanismos de inicio de la replicación.

En los plásmidos de replicación theta, la forma dimérica de las proteínas Rep se activa para la replicación mediante la conversión a monómeros, reacción catalizada por proteínas chaperoninas como DnaK, DnaJ, GrpE y ClpX (Kawasaki *et al.* 1990. Sozhamannan y Chattoraj 1993, Konieczny 1997). Las proteínas Rep, en su forma monomérica, se unen a los iterones del *ori*, y en colaboración con las proteínas IHF y HU, promueven la desnaturalización local de la cadena en una región rica en AT (Marczynski 1993; Brendler *et al.* 1997). Simultáneamente, la proteína de inicio recluta a la helicasa DnaB y a la primasa DnaG en la horquilla recién formada, para posteriormente abandonar el complejo y permitir la síntesis del iniciador de RNA indispensable para continuar con la fase de elongación de la nueva molécula de DNA.

Con respecto a los plásmidos con replicación por círculo rodante, la forma dimérica de la proteína de inicio se une a secuencias repetidas en el origen e introduce un corte en una de las cadenas del DNA al romper un enlace fosfodiéster; en la mayoría de los casos la proteína de inicio permanece unida al extremo 5' del DNA y se genera un extremo 3' libre

que se utiliza para la síntesis de la cadena líder. Cuando se concluye esta etapa se libera un intermediario de cadena sencilla, en donde la RNA polimerasa sintetiza un iniciador que sirve de sustrato para sintetizar la cadena complementaria (Espinosa *et al.* 1995).

Control de la replicación de plásmidos.

La clave para que un plásmido exista en un estado extracromosomal, y en un número de copias definido, es su habilidad para regular la frecuencia del inicio de la replicación. Los plásmidos se mantienen en un número constante de copias por célula y esto se debe a que su replicación está estrictamente controlada.

El control de la replicación se lleva a cabo ya sea a través de sistemas de control activos o pasivos. En los sistemas pasivos, la replicación se limita por un factor externo y en los sistemas de control activo la replicación es controlada por el plásmido mismo.

Se han propuesto varios mecanismos para el control de la replicación, entre ellos el modelo de dilución del inhibidor y el del autorepresor. Ambos describen sistemas de control activo, en los cuales la tasa de replicación se ajusta por un represor codificado por el plásmido, es decir, la tasa de replicación por plásmido se incrementa o disminuye apropiadamente cuando el número de copias se desvía del promedio.

En el modelo de dilución del inhibidor (Pritchard 1984), un inhibidor (proteína o RNA), codificado constitutivamente por el plásmido, actúa directamente en el origen para inhibir la replicación o bien, indirectamente al actuar sobre el promotor y prevenir la síntesis de la proteína de inicio. La vida media del inhibidor es baja y su concentración es proporcional al número de copias del plásmido. Por lo tanto, cuando la célula aumenta de tamaño la concentración del inhibidor disminuye por dilución y esto promueve la replicación del plásmido, lo cual resulta en un incremento en el número de copias. Por el contrario, al aumentar el número de copias, aumenta la concentración del inhibidor hasta un punto en el cual la replicación se inhibe nuevamente (Ver Figura 1).

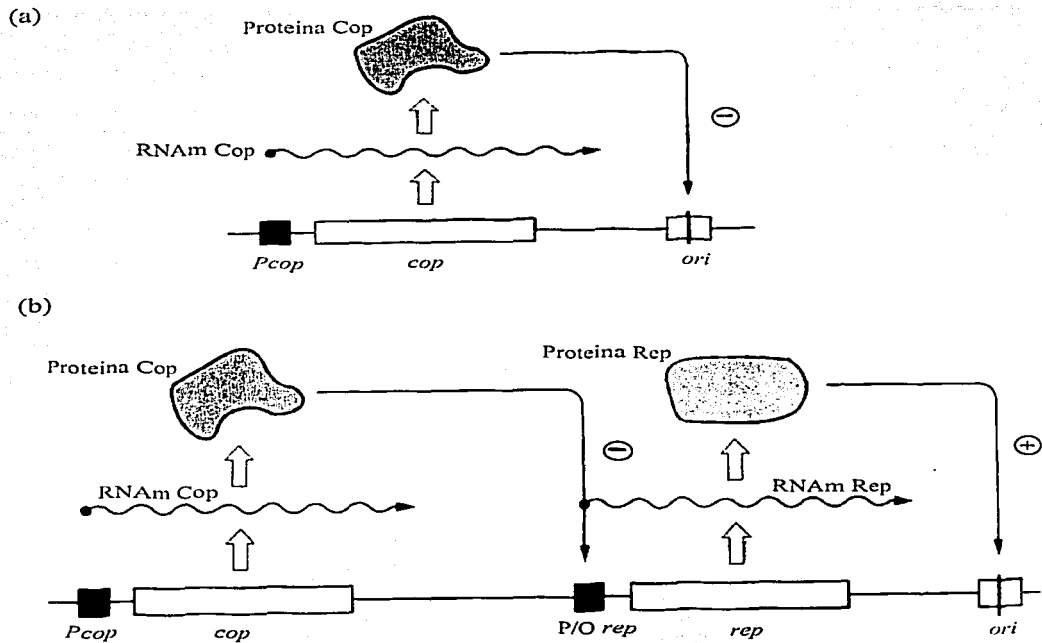


Figura 1. Alternativas del Modelo de Dilución del Inhibidor. Los diagramas ilustran los mecanismos alternativos para inhibir la replicación: a) Una proteína inhibidora (Cop) es sintetizada por el plásmido y actúa directamente en el origen para inhibir la replicación. b) La proteína Cop actúa indirectamente para inhibir la replicación, al prevenir la síntesis de una proteína esencial para el inicio de la replicación (Rep). Abreviaturas: *Pcop*, promotor del gen *cop*; *cop*, gen que codifica para la proteína Cop; *ori*, origen de replicación; RNAm Cop, RNA mensajero de Cop; RNAm Rep, RNA mensajero de Rep; P/O *rep*, promotor/operador de *rep*; -, control negativo (inhibición); +, control positivo (activación). Tomado de Summers, 1996.

En el modelo del Autorepresor (Sompayrac y Maaloe 1973), la replicación se detona por una proteína de inicio (Rep). La proteína Rep es el factor que limita el inicio de la replicación y su concentración determina el número total de eventos de replicación por célula en cada generación. El gen *rep* es parte de un operón el cual también contiene a el gen *atr*, el cual codifica un autorepresor que regula transcripción de ambos genes y mantiene una concentración constante de las proteínas Atr y Rep. El autorepresor regula la concentración de Rep y por lo tanto, la replicación (figura 2a). Una alternativa del modelo del autorepresor, es que la funciones del autorepresor y de la proteína de inicio se llevan a cabo por una sola proteína bifuncional (figura 2b). La retroalimentación negativa que provee la autorepresión asegura que la concentración de la proteína Rep (y por lo tanto la tasa de replicación) sea constante. Una tasa de replicación constante por célula significa que la tasa por plásmido es inversamente proporcional a su número de copias: si el número de copias "cae" a la mitad del valor promedio, la frecuencia de replicación por plásmido se duplica; por el contrario, si el número de copias se duplica, la frecuencia de replicación disminuye a la mitad del valor promedio. Bajo estas condiciones, la tasa de replicación por plásmido es variable, pero, el número total de eventos de replicación por célula por generación es constante.

1.2 Partición de plásmidos.

Un proceso fundamental para la persistencia de los plásmidos es su partición, la cual los distribuye por partes iguales a las células hijas. Los plásmidos con un elevado número de copias, se difunden azarosamente a las células hijas, y en ellas se corrige el número de copias. Pero cuando el número de copias es bajo (1 a 10) se necesita una maquinaria que asegure que al menos una copia del plásmido se establezca en cada una de las células hijas.

El proceso de partición puede dividirse en dos etapas: la decatenación o resolución de los plásmidos recién replicados para producir unidades separables y su equipartición a cada lado del plano divisional (Møller-Jensen *et al.* 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

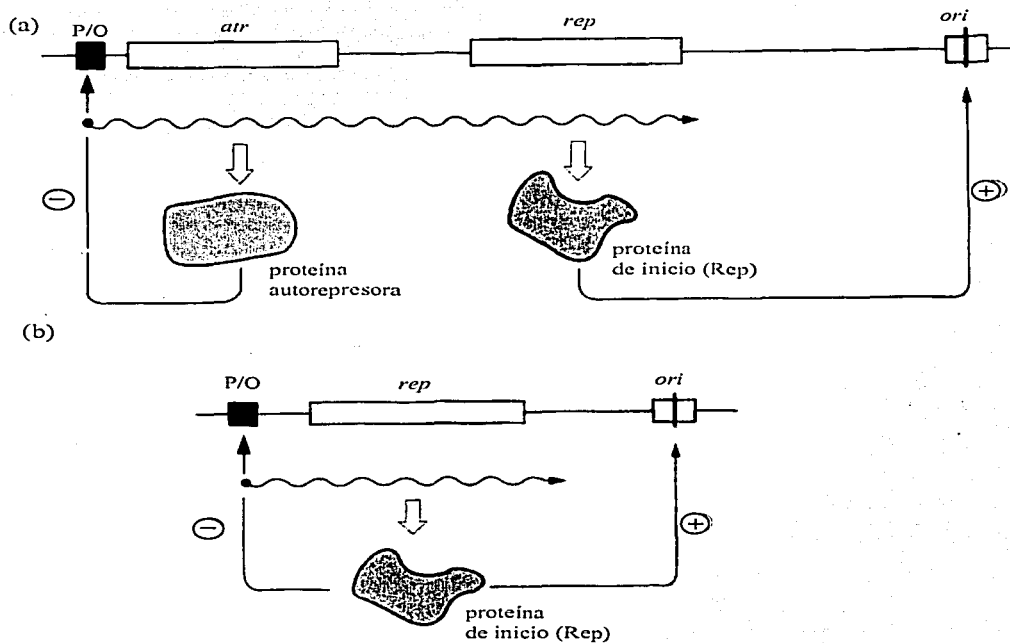


Figura 2. Modelo del autorepresor. a) Los genes del autorepresor (*atr*) y de la proteína de inicio (*rep*) se co-transcriben. El autorepresor regula la transcripción cuando se une a la región del promotor-operador (P/O) y mantiene una concentración constante de proteínas Atr y Rep. La replicación se activa por la unión de Rep al origen (*ori*). b) En una forma alternativa del modelo del autorepresor la proteína Rep es bifuncional, actuando como represor transcripcional (uniéndose a la región P/O) y como proteína de inicio actuando en el origen de replicación (*ori*). Tomado de Summers, 1996.

Sistemas de partición.

La eficiencia de partición se optimiza por: **a)** sistemas de recombinación sitio-específica (descritos mas adelante) que resuelven plásmidos diméricos (Austin *et al.* 1981), los cuales si no son resueltos crean defectos de partición, **b)** por sistemas de "adicción" también conocidos como sistemas "killer", los cuales se basan en la existencia de sustancias tóxicas y de antídotos codificados por el operón de un mismo plásmido, en donde el antídoto es codificado por el primer gen y la toxina en el segundo. Estos sistemas se autoregulan a nivel de la transcripción, mediante la unión del complejo antídoto-veneno al promotor del operón. En todos los sistemas estudiados la molécula tóxica es estable y el antídoto, aunque menos estable, se sintetiza en grandes cantidades. Por lo tanto, cuando la bacteria pierde el plásmido, la concentración del antídoto decae rápidamente, mientras la molécula tóxica persiste en el citoplasma, lo que provoca daños en la bacteria y finalmente su muerte (Salmon, 1994; Jensen *et al.* 1995; Engelbert-Kulka 1999), y **c)** sistemas de partición activa, en los cuales cada plásmido tiene un sitio similar a un centrómero, al cual se unen proteínas específicas de partición y promocionan su segregación (Gordon y Wright 2000). Los tres sistemas son modulares y pueden transferirse a otros plásmidos donde permanecen completamente funcionales. El módulo de partición activa es esencial para el movimiento de los plásmidos replicados en las células en división. Los estudios realizados en los plásmidos de bajo número de copias P1, F y R1 y la utilización de microscopía de fluorescencia han logrado grandes avances para entender la segregación de plásmidos. Los plásmidos y cromosomas bacterianos llevan a cabo la partición de forma altamente dinámica, lo que sugiere la presencia de un aparato similar al mitótico como se ha propuesto en los recientes modelos de partición (Møller-Jensen *et al.* 2000; Gordon y Wright 2000).

2. Incompatibilidad.

La persistencia exitosa de un plásmido, dentro de las poblaciones bacterianas, no solo radica en segregarse a las células hijas sino también de diseminarse a otras bacterias y mantenerse en ellas. Una forma de prevalecer en la bacteria hospedera es recombinando

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

con el cromosoma o con los plásmidos residentes, otra forma es replicando independientemente. Sin embargo, aún teniendo la capacidad de replicar, los plásmidos se enfrentan a un evento que puede desestabilizar su replicación: la incompatibilidad.

La incompatibilidad puede definirse como la incapacidad que tienen dos plásmidos de poder heredarse juntos (replicando de manera autónoma), y establemente en la misma línea celular (Novick 1987). Si la introducción de un plásmido B desestabiliza la heredabilidad de un plásmido A, se dice que A y B son plásmidos incompatibles.

La incompatibilidad de dos plásmidos es una consecuencia de compartir uno o más elementos de los sistemas de replicación o partición (Austin y Nordström 1990). Por ésta similitud, los plásmidos no pueden distinguirse por uno u otro de esos sistemas y una elección al azar eventualmente dará origen a células hijas que tienen uno u otro plásmido, pero no ambos. No existe un gen específico de incompatibilidad (Novick 1987), pero sí hay determinantes de ella y son de dos tipos, los elementos *trans*: que incluyen proteínas y RNAs responsables de la replicación, partición o regulación de ambos procesos y los elementos *cis*: origen de replicación, región centromérica o secuencias reguladoras.

La incompatibilidad de los plásmidos se debe en primer lugar a la interferencia entre las funciones del control de la replicación y ésta constituye un tipo de incompatibilidad fuerte, mientras que un efecto débil de incompatibilidad se observa en plásmidos que emplean funciones de partición cercanamente relacionadas.

Como se mencionó anteriormente, muchos plásmidos producen un represor (inhibidor) de la replicación que actúa en *trans* y cuya concentración es proporcional al número de copias del plásmido. Cuando el número de copias del plásmido y la concentración del represor son altas, la replicación del plásmido se inhibe, mientras que cuando el número de copias y la concentración son bajas, la replicación se inicia. Si una célula contiene plásmidos compatibles, cada plásmido produce su propio represor, el cual actúa solo sobre el plásmido que lo codifica y por lo tanto no interfiere en la replicación del plásmido contrario; estos plásmidos mantienen su número de copias normalmente y persisten independientemente uno del otro. Cuando una célula contiene plásmidos incompatibles, ellos producen un represor que regula no solo su propia replicación, sino también la del otro. Una consecuencia de la inhibición cruzada es que el número total de copias de plásmido en una célula es menor a la suma del número normal de copias de cada

plásmido, debido a que cada plásmido responde a la concentración total del inhibidor (Summers 1996). Otra causa de incompatibilidad se da cuando la proteína de inicio codificada por un plásmido actúa en *trans* sobre el *ori* de otro plásmido incompatible, esto reduce la concentración de proteína de inicio y en consecuencia se anula la replicación del plásmido parental lo cual abate la posibilidad de que este plásmido se herede a las células hijas (Ver Figuras 3 y 4).

La incompatibilidad mediada por la partición se origina cuando dos plásmidos dentro de una misma célula, poseen un sitio idéntico o similar necesario para su partición. En el momento de división de la célula solo uno de los sitios de los dos plásmidos es reconocido (indistintamente) por el sistema de partición activa, lo cual provoca que las células hijas tengan uno, pero no los dos plásmidos.

Basándose en la incompatibilidad se ha propuesto un sistema de clasificación de plásmidos en el cual pares de plásmidos incompatibles se asignan a un mismo grupo.

3. Recombinación.

Los plásmidos son moléculas que al igual que cualquier material genómico, están sujetos a cambios, ya sea por mutaciones puntuales o bien por rearrreglos genéticos tales como integraciones, amplificaciones, inversiones, deleciones y cointegraciones consigo mismos o con otros plásmidos o con el cromosoma, lo cual origina una enorme diversidad plasmídica. Estos rearrreglos se deben tanto a recombinación homóloga como a una recombinación sitio-específica y se describen a continuación:

3.1 Recombinación homóloga.

El proceso de recombinación homóloga es esencial para todos los organismos, e involucra el intercambio de secuencias de DNA entre dos cromosomas, moléculas o segmentos de DNA. Semejante intercambio contribuye a la generación de diversidad genética, la reparación de DNA dañado y la apropiada segregación de los replicones (Kowalczykowski *et al.* 1994). Su característica principal es que las enzimas responsables del proceso pueden usar cualquier par de secuencias homólogas como substratos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

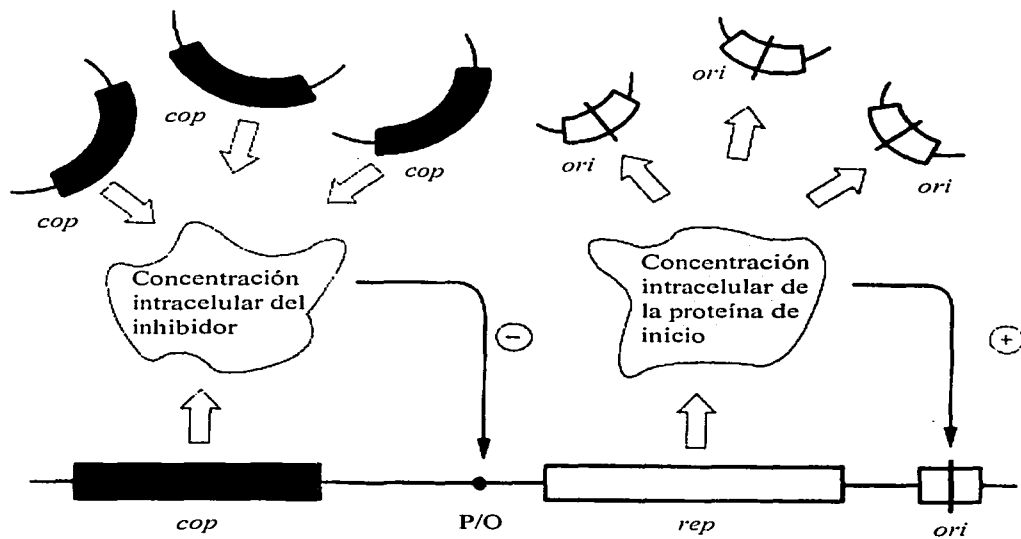


Figura 3. Causas de la incompatibilidad. La línea recta representa el replicón básico del plásmido bajo investigación. Fragmentos de este replicón insertados dentro de vectores multicopia se muestran como curvas. Copias clonadas de *cop* (inhibidor) aumentan la concentración del inhibidor y reprimen la replicación del replicón parental. Por otra parte, los orígenes de replicación clonados titulan la proteína iniciadora (que actúa en *trans*), lejos del origen de replicación parental y reduce la frecuencia de inicio de la replicación. Tomado de Summers, 1996.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

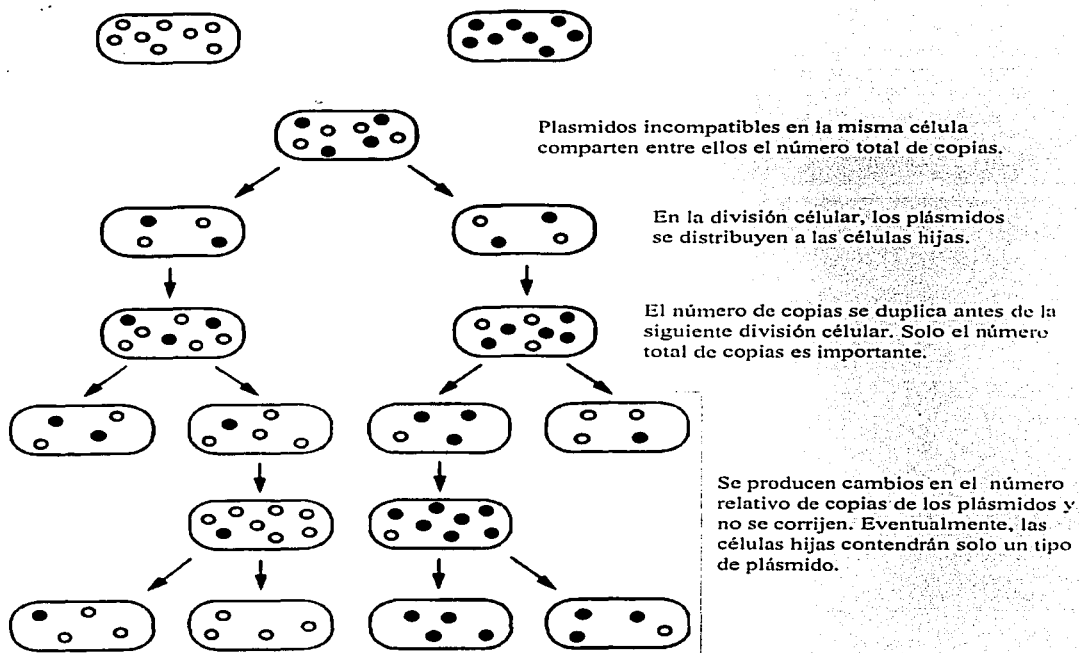


Figura 4. Incompatibilidad de plasmidos. La inhibición mutua dada por los sistemas de control de la replicación en una cepa que contiene dos plasmidos incompatibles conduce a la segregación de los plasmidos y a la formación de líneas celulares con solo un tipo de plasmido. Tomado de Summers, 1996.

En recombinación homóloga la reunión de los segmentos de DNA exhibe un grado de precisión ó fidelidad pero, generalmente hablando, no ocurre en sitios específicos. El intercambio puede ocurrir en cualquier lugar a lo largo de los segmentos homólogos; esto significa que las proteínas que catalizan recombinación homóloga no son proteínas de unión a secuencias o sitios específicos, como es el caso de las proteínas de recombinación sitio-específicas que se mencionarán mas adelante (Camerini-Otero y Hsieh 1995).

El sistema modelo para el estudio de recombinación homóloga ha sido *Escherichia coli* y en la cual se identificó el primer gen de recombinación, *recA*, cuya función es crucial en las reacciones de recombinación homóloga. Hasta la fecha se han descrito 25 genes involucrados en el proceso (Kowalczykowski *et al.* 1994) y se han agrupado en tres vías de recombinación: RecBCD, RecF y RecE, las cuales están presentes en la cepa silvestre y se han hecho evidentes por análisis mutacional. Eventos de recombinación que involucran homología de más de 1 kb generalmente son mediados por RecA.

Se han propuesto varios modelos de recombinación homóloga en procariotes, entre ellos: el modelo de Holliday, el modelo de Meselson-Radding y el modelo de ruptura en doble cadena (Ver Figura 5) (Holliday 1964; Meselson *et al.* 1975; Szostak *et al.* 1983). Estudios genéticos y bioquímicos de los diferentes genes de recombinación permitieron proponer un modelo que explica el proceso de recombinación en varias etapas:

- a) **Iniciación.** En esta etapa se genera DNA de cadena sencilla con un extremo 3'-OH a partir de DNA de doble cadena.
- b) **Apareamiento homólogo e intercambio de DNA.** El extremo 3'-OH invade un segmento o molécula de DNA homólogo. Después de la invasión ocurre un intercambio recíproco de cadenas de DNA y se forma un heteroduplex ó unión Holliday.
- c) **Extensión del heteroduplex de DNA.** Hay migración del DNA heteroduplex debido a la acción de proteínas como RecA, RuvAB, RecG. Las DNA helicasas también pueden participar en este paso.
- d) **Resolución.** El paso final es la resolución de la unión Holliday, dependiendo del sitio de corte se pueden generar moléculas con una región heteroduplex o bien moléculas recombinantes.

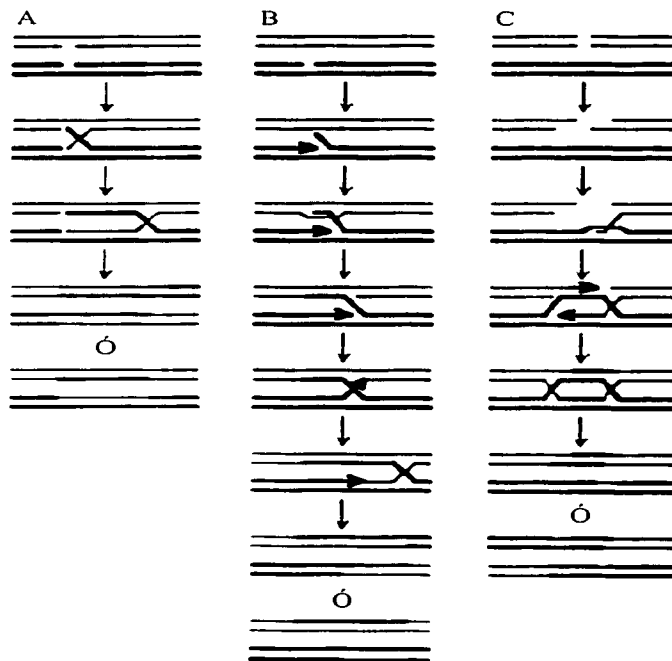


Figura 5. Modelos para recombinación genética. (A) el modelo de Holliday; (B) el modelo de Meselson-Radding. (C) el modelo de ruptura en doble cadena. Note que en el panel B la molécula invasora es la molécula de abajo mientras que en el panel C la molécula que invade es la molécula de arriba. Cabezas de flecha indican síntesis de DNA. Tomado de Kowalczykowski *et al.* 1994.

Además de proteínas, también se han reportado sitios que incrementan la recombinación. En cepas silvestres de *E. coli* (*recBC+*), muchos eventos de recombinación conjugacional proceden a través de la vía RecABCD y en esta vía, la recombinación se estimula por la presencia de las secuencias chi (χ) (5'-GCTGGTGG-3'), que crean un "hotspot" de recombinación.

3.2 Recombinación sitio-específica.

La recombinación sitio-específica es un proceso de intercambio recíproco de DNA catalizado por proteínas específicas de recombinación (recombinasas sitio-específicas) que actúan en sitios de DNA también específicos. Durante el proceso no ocurre pérdida o síntesis de DNA, por lo cual se ha llamado conservativa (Campbell 1981), y el intercambio ocurre por un simple mecanismo de ruptura y reunión.

Semejante recombinación no requiere el producto del gen *recA* u otros genes necesarios para recombinación homóloga (Kucherlapati y Smith 1988).

El mecanismo de acción es diferente al de la recombinación homóloga debido a su especificidad. En la recombinación sitio-específica, la sinapsis de los sitios de DNA se media por una interacción proteína-proteína, entre las recombinasas unidas a sus respectivos sitios de DNA. Estas recombinasas reconocen sus sitios de DNA de la misma forma que lo hacen otras proteínas de unión a sitios de DNA específicos, tales como los factores de transcripción o represores específicos (Camerini-Otero y Hsieh 1995). Las secuencias blanco (sitios de acción) son asimétricas: no son como los palíndromes perfectos reconocidos por muchas endonucleasas de restricción tipo II y es precisamente esta asimetría lo que imparte la dirección a las reacciones de recombinación sitio-específica. Frecuentemente, el gen que codifica para la recombinasa sitio-específica está adyacente a su (s) sitio (s) de acción (Stark *et al.* 1992; Komano 1999).

Existen tres posibles resultados cuando ocurre una recombinación sitio-específica (Ver Figura 6), los cuales dependen del arreglo de los sitios de recombinación: eventos intramoleculares producen excisión (resolución) o inversión, mientras que eventos intermoleculares producen integración (Stark *et al.* 1992; Nash 1996).

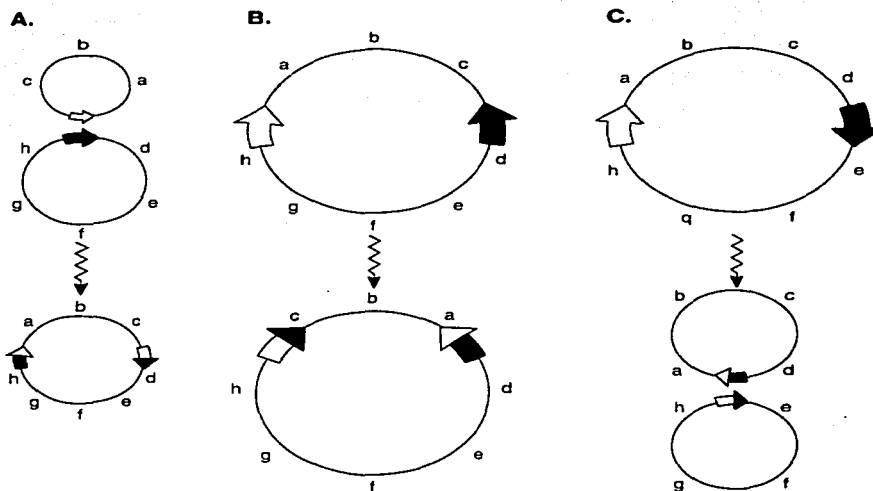


Figura 6. Consecuencias estructurales de una recombinación sitio-específica. El DNA duplex está definido por una línea sencilla; las letras en minúsculas proveen marcadores de identificación y orientación a lo largo de estas moléculas. Cada sitio de recombinación está definido por una flecha (sin escala). La recombinación ocurre dentro de los sitios y produce un sitio de recombinación híbrido (flecha híbrida) y un rearrreglo del cromosoma. Los diagramas ilustran el resultado de la recombinación entre A) sitios en moléculas separadas, B) sitios que están en orientación invertida sobre una misma molécula, y C) sitios que se encuentran en orientación directa sobre una misma molécula. Tomado de Nash, 1996.

Funciones biológicas de la recombinación sitio-específica.

Numerosos procesos biológicos en procariotes involucran recombinación sitio-específica. Estos incluyen la integración y excisión de ciertos bacteriófagos, la expresión alternada de genes (en bacterias y bacteriófagos), la estabilización de plásmidos, y la formación de los productos finales de transposición de ciertos elementos transponibles. Los sistemas de recombinación sitio-específica son ubicuos en las eubacterias, prevalentes en las arqueas y también se han detectado en los eucariotes (Smith y Thorpe 2002).

Familias de recombinasas sitio-específicas y su mecanismo de acción.

Las recombinasas sitio-específicas se dividen en dos principales familias basándose en su mecanismo de acción y similitud de aminoácidos: la familia tirosin-recombinasa (también llamada familia de la λ -integrasa) que incluye a las proteínas relacionadas con la integrasa del bacteriófago lambda (Int) junto con las recombinasas Cre y Flp (Argos *et al.* 1986) y la familia serin-recombinasa (ó familia de las resolvasas/invertasas), que incluye las resolvasas codificadas por transposones de la familia Tn3 y las DNA-invertasas (Hatfull *et al.* 1988; Stark *et al.* 1992; Nash 1996; Grindley 1997).

El mecanismo de recombinación sitio-específica involucra los siguientes pasos:

4. Sinapsis: La recombinasa reconoce el DNA de los dos sitios de recombinación reuniéndolos mediante contacto proteína-DNA.
5. Ruptura de hebra: la ruptura de hebra involucra el ataque de una recombinasa sobre un enlace fosfodiéster. La recombinación requiere 4 rupturas de ese tipo. Cada ruptura es una reacción en la cual un enlace fosfodiéster, que une segmentos de una hebra de DNA, es reemplazado por un enlace fosfodiéster entre un residuo nucleofílico de la proteína y un segmento de DNA. En el proceso, el otro segmento de DNA queda libre. La ruptura se da por transesterificación mediada por la recombinasa.

Las recombinasas de la familia tirosin-recombinasa utilizan un residuo hidroxilo de una de sus tirosinas como el nucleófilo que ataca y que libera un segmento 5' terminal. Por otra parte, la familia de las serin-recombinasas utilizan un grupo hidroxilo de una de sus serinas como el nucleófilo atacante y se libera un segmento 3' terminal. Las serin-

recombinasas realizan una ruptura en doble cadena en los dos sitios de recombinación antes de cualquier intercambio y reunión de las cadenas de DNA. Este mecanismo contrasta con el de las tirosin-recombinasas, las cuales hacen una ruptura y reunión en cadena sencilla, formando un intermediario de unión tipo Holliday (Gopaul *et al.* 1998: Nash 1996).

6. Transferencia de hebra: Para efectuar un rearrreglo genético, las hebras divididas de los dos sitios deben intercambiar posiciones cada una con respecto de la otra. Los detalles de la transferencia no se conocen, pero experimentos topológicos indican que un movimiento ordenado es la regla y que hay un fuerte control sobre la clase de movimiento que puede ocurrir.
7. Ligación: La ligación de las hebras transferidas es lo contrario al paso de ruptura de hebras, la unión fosfodiéster de la recombinasa con un segmento de DNA es atacada por un residuo hidroxilo de otro segmento de DNA, un segmento creado por una ruptura previa del otro sitio de DNA. La transesterificación libera a la recombinasa de su unión covalente con el DNA y crea un nuevo enlace fosfodiéster que une segmentos de DNA de dos hebras de los sitios de DNA parentales.

Diversidad de la familia serin-recombinasa y su grupo representante: las resolvasas/invertasas.

La familia de las tirosin-recombinasas es estructuralmente diversa y funcionalmente versátil e incluye integrasas, resolvasas, invertasas y transposasas.

Estudios recientes han revelado que la familia de las serin-recombinasas es igualmente versátil y puede subdividirse en tres grupos estructurales representados por las resolvasas/invertasas, las serin-recombinasas de alto peso molecular y las relacionadas con la transposasa IS607 (Smith y Thorpe 2002).

Las resolvasas/invertasas están altamente reguladas, solo afectan resolución e inversión, tienen un dominio catalítico en el extremo N-terminal y un dominio de unión a DNA en el extremo C-terminal. El grupo de recombinasas de alto peso molecular causan integración y escisión con dirección estrictamente controlada y tienen un dominio N-terminal catalítico pero un dominio C-terminal mucho más largo comparado con el de las

resolvasas/invertasas. El tercer grupo, recombinasas relacionadas a la transposasa IS607, es similar en tamaño a las resolvasas/invertasas, pero tienen tanto el dominio de unión a DNA como el dominio catalítico en el extremo N-terminal (Smith y Thorpe 2002). Sin embargo, el arquetipo de la familia serin-recombinasa es el grupo de las resolvasas/invertasas, de las cuales han sido estudiados en detalle cuatro sistemas de esta familia: resolución de cointegrados por la $\gamma\delta$ -resolvasa y la Tn3 resolvasa, expresión del antígeno flagelar en *Salmonella* (Hin invertasa) y expresión de los genes que codifican para la cola del fago Mu (Gin invertasa).

Invertasas.

La inversión de un fragmento de DNA es el resultado de la recombinación entre dos secuencias invertidas de DNA que bordean ese fragmento y lo cataliza una recombinasa. En la recombinación sitio-específica, los sitios de acción o IRs (secuencias invertidas repetidas), flanquean la región invertible de DNA y son el sitio de reconocimiento de una recombinasa específica llamada DNA-invertasa. Los sistemas de inversión son complejos, requieren de un factor FIS (Factor for Inversion Stimulation), unido a un DNA "enhancer", además de la invertasas unidas en cada sitio de acción (Hallet y Sherratt 1997; Merickel *et al.* 1998). Los sitios de acción de las DNA-invertasas son pequeños (cerca de 30 pb; Sadowski 1986; Stark *et al.* 1992).

Las DNA-Invertasas promueven la inversión de DNA eficientemente si los sitios de unión de la invertasa están en orientación invertida, y resuelven muy pobremente cointegrados con sitios en orientación directa repetida (Plasterk *et al.* 1983b; Johnson y Simon 1985).

Ejemplos de sistemas de inversión son: Hin, Gin y Cin (Silverman y Simon 1983; Plasterk y van de Putte 1984; Simon y Herskowitz 1985). La proteína Hin, responsable de la variación de fase flagelar en *Salmonella spp.*, realiza la inversión de un segmento de DNA que contiene el promotor para el gen de la flagelina H2. El gen solo se activa en una orientación (Zeig *et al.* 1977). Gin invierte una región del genoma del bacteriófago Mu, lo cual alterna la expresión de dos grupos de genes de la cola del bacteriófago Mu (Kamp *et*

al. 1984). Cin controla la expresión de los genes que codifican para la cola del bacteriófago P1 (Kamp *et al.* 1984).

Resolvasas.

Los requerimientos para los sistemas de resolución "*in vitro*" son simples: una resolvasa, un cointegrado de DNA superenrollado negativamente como sustrato y un buffer simple. Los sitios de acción de las resolvasas (sitios *res*) deben estar sobre la misma molécula en orientación directa repetida, para una recombinación eficiente. Si los sitios *res* están en la orientación invertida, los productos de inversión se detectan escasamente (Reed 1981b). La especificidad direccional de las resolvasas/invertasas contrasta con el comportamiento promiscuo de la familia λ -integrasa, las cuales ejecutan integración, excisión e inversión con la misma facilidad (Weisberg y Landy 1983).

Los sitios *res* de las resolvasas son de mayor longitud que los sitios de las invertasas (> 100 pb). Cada sitio *res* está formado por tres subsitios: los subsitios II y III promueven la sinapsis para que la resolvasa se una al subsitio I, en el cual ocurre el intercambio de hebra y por lo tanto, la recombinación (Grindley *et al.* 1982; Stark *et al.* 1992; Smith y Thorpe 2002).

La resolvasa se une a *res* en forma de dímeros. La interacción de esos dímeros se ha caracterizado muy bien (Hughes *et al.* 1993). La resolvasa se activa solo dentro de una completa sinapsis que contiene seis dímeros de la resolvasa y dos sitios *res*.

La resolvasa $\gamma\delta$ y la resolvasa Tn3 son los prototipos de los sistemas de resolución sitio-específica cuya función es resolver el cointegrado de transposición formado entre los replicones donador y blanco, en los productos finales de transposición (Sarkis *et al.* 2001).

Además de su papel en transposición, otra importante función de las resolvasas es su participación en la segregación eficiente de los plásmidos. Dado que, dentro de una célula todas las copias de un determinado plásmido son homólogas unas a otras, pueden recombinar y formar plásmidos multiméricos. Si esto ocurre, el control de la replicación no puede compensar la formación de multímeros y por lo tanto el número de unidades segregantes (plásmidos) se reduce, lo que afecta la segregación de plásmidos de alto y bajo número de copias. En el caso de plásmidos de copia única la formación de un dímero hace

imposible su partición. Para corregir este problema, las resolvasas rápidamente resuelven cualquier forma multimérica a monómeros, lo cual permite llevar a cabo el proceso de partición de manera exitosa (Austin 1981).

4. Plásmidos de *Rhizobium*.

Las bacterias del género *Rhizobium* llevan a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno durante la simbiosis que establecen con las raíces de algunas leguminosas. Este género pertenece a la familia Rhizobiaceae, la cual incluye 2 géneros que fijan nitrógeno: *Sinorhizobium* y *Rhizobium*. El género *Agrobacterium* (que incluye a patógenos de plantas tales como *A. tumefaciens*), también forma parte de esta familia (Garrity 2001).

El genoma de *Rhizobium* está compuesto de un cromosoma y de 2 a 10 plásmidos (García-de los Santos *et al.* 1996; Brom *et al.* 2002), los cuales tienen un tamaño que varía de 180 a 1500 kb, razón por la cual pueden constituir hasta el 50% del total del genoma (Martínez *et al.* 1990).

El estudio de los plásmidos de *Rhizobium* se ha enfocado a los plásmidos simbióticos, los cuales contienen la mayor parte de los genes involucrados en la especificidad por el hospedero, la nodulación y la fijación de nitrógeno. Sin embargo, esto no descarta que se hayan realizado estudios con otros plásmidos no simbióticos. Estos estudios revelan que esos plásmidos contienen genes que codifican para funciones metabólicas básicas, utilización de nutrientes y síntesis de componentes celulares (Brom, *et al.* 1992; García-de los Santos *et al.* 1996; Brom, *et al.* 2002).

Una de las habilidades más importantes de los plásmidos de la familia Rhizobiaceae es que pueden transferirse y funcionar en miembros de diferente género (pero de la misma familia). Se han descrito plásmidos simbióticos auto-transferibles, asociados a producción de bacteriocinas, en cepas de *R. leguminosarum* (Johnston *et al.* 1982; Brewin *et al.* 1980), y plásmidos no simbióticos auto-transmisibles (Johnston *et al.* 1982; Hynes *et al.* 1988; Mercado-Blanco y Olivares 1993), dentro de los cuales se han identificado plásmidos que ayudan a la transferencia de otros plásmidos (Brom *et al.* 2000). Además, se han identificado sectores cromosomales que se transfieren a otras cepas, como la isla simbiótica (500kb) de *Mesorhizobium loti* (Sullivan y Ronson, 1998).

En cuanto a la replicación y partición se refiere, se ha determinado que los replicadores tipo *repABC* están ampliamente distribuidos entre las Rhizobiaceas (Nishiguchi *et al.* 1987; Tabata *et al.* 1989; Turner y Young 1995; Freiberg *et al.* 1997; Ramírez-Romero *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 1998; Li y Farrand 2000; Cevallos *et al.* 2002), y que además, distintos plásmidos *repABC* pueden coexistir en una misma bacteria e incluso con un cromosoma tipo *repABC* (Rigottier-Gois *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001; Goodner *et al.*, 2001; Cevallos *et al.* 2002). Los replicones *repABC* se localizan también en cepas de *Paracoccus versutus* (Bartosik *et al.* 1998), de *P. pantotrophus*, y de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (Bartosik *et al.* 2002).

Se desconoce el tipo de replicación (theta o círculo rodante), así como la dirección de la replicación de estos plásmidos, pero, se ha determinado que los plásmidos *repABC* son de bajo número de copias (1 o 2 copias por célula), y que contienen 3 genes: *repA*, *repB*, y *repC* organizados en un operón. De ellos se sabe que los productos de *repA* y *repB* están relacionados con la partición del plásmido y con la regulación del número de copias, y que el producto de *repC* es esencial para la replicación. Dentro de esta región de replicación/partición se localizan dos determinantes *cis*-incompatibles: uno localizado en la región intergénica entre *repB* y *repC* (*inc α o* *incl*), y otro curso abajo de *repC* (*inc β o* *inc2*). La región *inc β* es esencial para la segregación pero no para la replicación, lo que sugiere que ésta es la región similar al centrómero (Bartosik *et al.* 1998). La región promotora/operadora del operón se localiza curso arriba de *repA* en un segmento de 127 pb y RepA es un regulador negativo de la transcripción del operón, y además, es un factor *trans*-incompatible (Bartosik *et al.* 1998; Ramírez-Romero *et al.* 2000).

Se ha observado que existe incompatibilidad entre los plásmidos de *Rhizobium*, los de *Agrobacterium* y entre los plásmidos de ambos géneros (Hooykas *et al.* 1985, García-de los Santos y Brom,1997; O'Connell *et al.* 1987), y esto ha permitido clasificar a los plásmidos de *Rhizobium* en diferentes grupos de incompatibilidad, por lo cual ahora se sabe que los plásmidos pTiC58, pTiB6S3 de *A. tumefaciens* y pTAV1 de *P. versutus* pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, mientras que el plásmido pRiA4b de *A. rhizogenes* pertenece al mismo grupo que el plásmido p42d (Hooykas *et al.* 1980; Nester y Kosuge 1981; White y Nester 1980; Cevallos *et al.* 2002). Además, la existencia de cepas con más de un replicón *repABC* demuestra que estos plásmidos abarcan más de un grupo de

incompatibilidad y los análisis filogenéticos de las regiones de replicación/partición de estos replicones *repABC* indican que estos plásmidos se adquieren comúnmente por transferencia lateral (Cevallos *et al.* 2002).

5. Modelo de estudio: el plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* cepa CFN42.

La cepa tipo de *Rhizobium etli* (CFN42) contiene 6 plásmidos (p42a a p42f), cuyo tamaño varía de 180 a 600 kb. Uno de ellos, el p42d, es el plásmido simbiótico. Además de las funciones de nodulación y fijación de nitrógeno asociadas al p42d, estudios con los otros plásmidos han revelado que el p42a es un plásmido auto-transmisible dispensable para la simbiosis pero indispensable para la movilización del p42d (Brom *et al.* 2000); que el plásmido p42b contiene secuencias para la biosíntesis de lipopolisacáridos y es necesario para el establecimiento exitoso de la simbiosis (García-de los Santos *et al.* 1996), mientras que los plásmidos p42c y p42e se requieren para competir, con otras cepas, por la nodulación y que en el plásmido p42f se localiza un homólogo a *fixL* y una reiteración de los genes *fixK* y *fixNOQP*, por lo cual es necesario para la fijación de nitrógeno (Girard *et al.* 2000). Los plásmidos p42a, p42b y p42d pertenecen al tipo de plásmidos *repABC* (Cevallos *et al.* 2002)

El mayor aporte al conocimiento de los plásmidos de *Rhizobium etli* CFN42, sin duda ha sido obtenidos de los estudios realizados en el plásmido simbiótico p42d. Este plásmido circular, unicopia, cuenta con 371-255 pb, dentro de las cuales están identificados 359 ORFs (González *et al.* en preparación).

Este plásmido contiene una gran cantidad de secuencias reiteradas las cuales generan diversos rearrreglos genómicos, tales como amplificaciones y deleciones, mediados por recombinación homóloga (Flores, *et al.* 1993; Romero y Palacios 1997; Romero *et al.* 1997). Otro tipo de rearrreglo que se observa en el plásmido p42d es su cointegración con otros replicones, lo cual resulta de la recombinación homóloga entre las secuencias repetidas que comparten, ejemplo de esto es el cointegrado entre el p42d y el p42b (Brom *et al.* 1991), y el cointegrado del p42d con el p42a, lo cual es necesario para la movilización del p42d (Brom *et al.* 2000).

La región de replicación/partición del p42d está identificada y caracterizada (Ramirez-Romero *et al.* 1997). Para ello se utilizó una colección ordenada de cósmidos de este plásmido (construida en un vector incapaz de replicar en *Rhizobium*) (Girard *et al.* 1991), de los cuales, solo uno de ellos (cGD47) contiene el replicador básico y por lo cual, ejerce incompatibilidad contra el p42d cuando se introduce a la cepa silvestre (CFN42).

Sin embargo, cuando un plásmido derivado de pSUP202 (vector incapaz de replicar en *Rhizobium*) que contiene el replicador básico del p42d (pH3), se introduce a la cepa silvestre (CFN42), éste forma un cointegrado con el p42d, en lugar de desplazarlo por incompatibilidad como habría de esperarse, ya que portan replicadores idénticos. Aún más, pH3 ejerce incompatibilidad contra el p42d en una cepa *recA*- derivada de CFN42.

El objetivo del proyecto fue determinar el *locus* involucrado en el fenómeno descrito y los resultados obtenidos involucran la participación de recombinación sitio-específica en un novedoso mecanismo de incompatibilidad.

A site-specific recombinase (RinQ) is required to exert incompatibility towards the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*

Verónica Quintero, Miguel A. Cevallos and Guillermo Dávila*

Programa de Evolución Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

Summary

The replication/partition region of the symbiotic plasmid p42d of *Rhizobium etli* CE3 is characterized by the presence of the *repABC* operon. A recombinant plasmid containing this region is able to replicate in a *R. etli* derivative cured from p42d, with the same stability and copy number shown by the parental plasmid. However, when this construct is introduced into the wild-type strain, instead of exerting incompatibility against the p42d, it forms a stable cointegrate with it. In this paper, we show that a site-specific resolvase, and its action sites are essential factors to displace the symbiotic p42d. We propose a model for this novel incompatibility mechanism.

Introduction

Rhizobium etli CFN42 is a soil bacterium with the ability to induce nitrogen-fixing nodules on the roots of bean plants. This strain contains six large plasmids of low copy number. One of them, p42d is the symbiotic plasmid harbouring most of the genes required to establish a symbiotic interaction with bean. Previously, with the aim to identify and characterize the replication/partition (*rep/par*) region of p42d, an ordered cosmid collection (Girard *et al.*, 1991) of this plasmid, constructed in a vector unable to replicate in *Rhizobium*, was introduced into a strain lacking p42d. Only one clone, cGD47, was able to replicate in *Rhizobium*. A 5.6 kb *HindIII* fragment of cGD47 encodes all the elements required for stable replication in *Rhizobium*. DNA sequence analysis of the 5.6 kb *HindIII* fragment established that p42d belongs to the *repABC* plasmid family (Ramírez-Romero *et al.*, 1997). The pres-

ence of *repABC* plasmids among members of the Rhizobiaceae is very common as shown by hybridization studies (Rigottier-Gois *et al.*, 1998). Moreover, all plasmids reported in the recently published sequences of the genomes of *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Sinorhizobium meliloti* 1021 and *Agrobacterium tumefaciens* C58 are members of the *repABC* family. In all of these strains, at least two *repABC* replicons coexist, indicating that *repABC* replicons encompass several incompatibility groups (Rigottier-Gois *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001).

The *repABC* replicators are not exclusive to the Rhizobiaceae as they have also been isolated from one strain of *Paracoccus versutus* (Bartosik *et al.*, 1998).

The *repABC* plasmids are characterized by the presence of the *repA*, *repB* and *repC* genes organized in an operon. The RepA and RepB proteins are involved in plasmid segregation and copy number control (Ramírez-Romero *et al.*, 2000; Bartosik *et al.*, 2001). Furthermore, RepA is a transcriptional repressor of its own operon (Ramírez-Romero *et al.*, 2001). The RepC protein is essential for replication and most probably is the initiation protein (Tabata *et al.*, 1989; Bartosik *et al.*, 1998; Ramírez-Romero *et al.*, 2000).

When introduced into wild-type (wt) strain CFN42, cosmid cGD47 displaces p42d, demonstrating that they are incompatible. When recombinant plasmids of pSUP202 (a transferable vector unable to replicate in *Rhizobium*) containing either the 5.6 kb *HindIII* (pH3) or the 14 kb *BamHI* (pB79) fragments from cGD47 (both stable replicons in *R. etli*), are independently introduced into the wt strain, instead of displacing p42d, each forms a stable cointegrate with the sym plasmid. However, plasmids pH3 and pB79 exert incompatibility against p42d when tested in a *recA* derivative of *R. etli* CE3 (Ramírez-Romero *et al.*, 1997).

The 5.6 kb *HindIII* fragment contains two *cis*-incompatibility sites, one located in the intergenic sequence between *repB* and *repC* (*inca*) and the other located immediately downstream of *repC* (*incβ*), and one *trans*-acting incompatibility factor, RepA. Each of these elements can exert incompatibility against p42d (Ramírez-Romero *et al.*, 2000).

These results suggest that besides RecA, and the

Accepted 5 August, 2002. *For correspondence. E-mail davila@citr.unam.mx; Tel. (+52) 777 313 38 81; Fax (+52) 777 317 55 81.

incompatibility determinants of the replicator region, a genetic locus contained in cGD47, but absent from pB79 and pH3, suppresses the cointegrate formation and promotes the 'expression' of incompatibility properties against p42d in the wt genetic background. In this paper, we show that this locus contains a site-specific resolvase and its target site and propose a model to explain the participation of these elements in incompatibility.

Results

Identification of the minimal region required to exert incompatibility in a wt background

When cGD47 (Fig. 1) is introduced into the wt or a *recA* strain of *R. etli* it displaces p42d and remains as an independent replicon. The insert of this cosmid consists of 11 *Bam*HI fragments with a total length of 37.6 kb. A recombinant plasmid (pB79) containing one of these fragments (B79) is stably maintained in a strain lacking p42d. However, the capacity of pB79 to exert incompatibility against p42d only occurs in a *recA* background (Ramírez-Romero *et al.*, 1997). The introduction of pB79 into a wt strain results in the cointegration of the incoming plasmid with p42d.

These results indicate that the locus that suppresses cointegrate formation and allows incompatibility in a wt background resides in cGD47 outside of B79. To map this locus, a collection of 13 derivatives of cGD47 lacking, at random, one or more *Bam*HI fragments, but retaining B79, were constructed, introduced into a wt *R. etli* strain, and the plasmid profiles of the transconjugants analysed. pL78-79, which contains two contiguous *Bam*HI fragments, B78 (2.8 kb) and B79, is the smallest construct that still exerts incompatibility against p42d.

Earlier, we showed that pH3 carrying a 5.6 kb *Hind*III insert, also present in B79, contains the minimal DNA region capable of replicating in a *R. etli* p42d-cured derivative (Ramírez-Romero *et al.*, 1997).

As the *trans* and *cis* incompatibility determinants are shared by pH3 and pB79 (Ramírez-Romero *et al.*, 2000), fragment B78 was introduced in both orientations into the *Bam*HI site of pH3, to generate constructs pH3-B78 and pH3-B78-I. The former construct retains B78 in the same orientation in respect to the *repABC* operon as it is in cGD47, whereas pH3-B78-I contains B78 fragment inversely oriented. Both constructs were introduced into a wt *R. etli* strain and the plasmid profiles of the transconjugants were analysed. In all pH3-B78 transconjugants, p42d was absent. However, only one out of 12 transconjugants lost p42d when pH3-B78-I was used, whereas the rest formed cointegrates with the sym plasmid (Fig. 1). These results suggest that the displacement of p42d in a wt background depends on the orientation of B78 with respect to the *repABC* operon.

DNA sequence of fragments B78 and B79

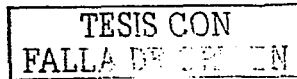
The double-stranded DNA sequence of fragments B78 and B79 was determined. Besides the *repABC* genes, the sequence analysis showed the presence of 11 open reading frames (ORFs), two of them located in fragment B78 and eight in fragment B79. One ORF encoding a site-specific recombinase of the resolvase/invertase (γ S) family, hereafter referred as *rinQ*, was found between fragments B78 and B79 (see Fig. 1). This type of site-specific recombinase can be found as part of the plasmid multimer resolution system, as in the case of P1 (Austin *et al.*, 1981; Eberl *et al.*, 1994). Commonly the *cis*-acting target sites of a site-specific recombinase overlap with or are adjacent to the 5'-end of its own gene (i.e. Grindley *et al.*, 1982; Garnier *et al.*, 1987; Eberl *et al.*, 1994; Komano, 1999). The activity of *rinQ* depends on the relative orientation of their target sites (*ris*). All resolvases described have an absolute requirement for the presence of two such sites, as direct repeats, located in the same DNA strand. In contrast, invertases also need two target sites in the same DNA strand, but as inverted repeats (Thorpe and Smith, 1998; Smith and Thorpe, 2002). This attribute supports the proposition that *rinQ* is a resolvase, and that its target site is the locus that participates in the incompatibility towards p42d.

The 5'-end of *rinQ* gene is essential for incompatibility with p42d in a wt background

To define the element(s) of fragment B78 required for incompatibility with p42d in a wt background, polymerase chain reaction (PCR) products of different lengths, containing the regions around the start codon of *rinQ*, were cloned in the *Bam*HI site of pH3 in both orientations. The constructs were then introduced into a wt *R. etli* strain and their ability to displace p42d was evaluated by analysing the plasmid profiles of the transconjugants. A summary of the results is found in Fig. 1.

The 317 bp insert of pH3-F317 contains 133 bp downstream and 184 bp upstream of the start codon of *rinQ*, in the same orientation with respect to the *repABC* operon as found in the original cosmid. This construct expels p42d (Fig. 2A), whereas its counterpart, pH3-F317-I, displaced p42d only in two out of 10 strains analysed. In the remaining eight strains, a pH3-F317-I::p42d cointegrate was formed (Fig. 2B). Derivatives of pH3 containing smaller versions of the 317 bp insert never or rarely displaced the plasmid, irrespective of their orientation (see Fig. 1).

These results indicate that the locus in fragment B78 that participates in the displacement of p42d in a wt background is located within the insert of construct pH3-F317 and its activity is orientation dependent. This insert does not encode a protein, suggesting that the presence of a



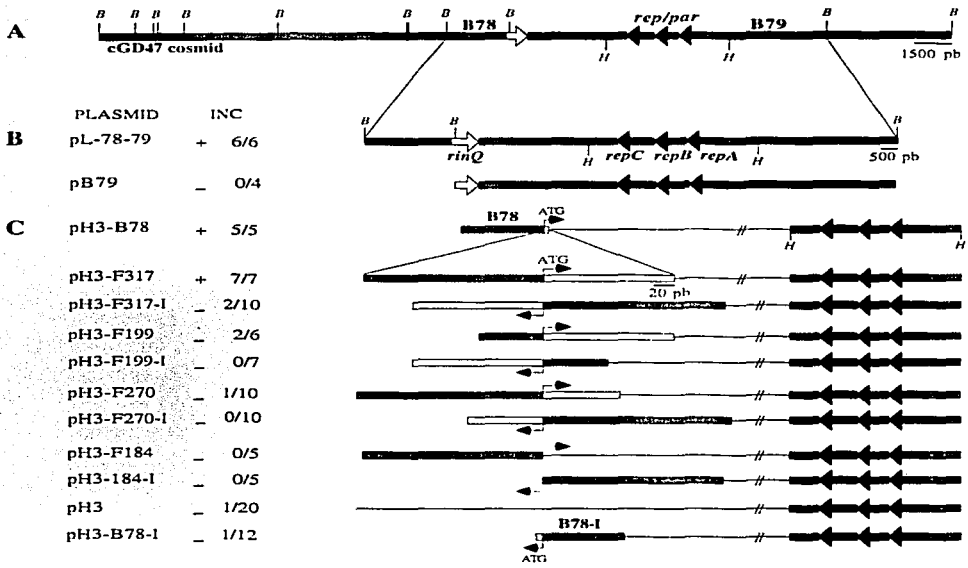


Fig. 1. Incompatibility properties of pSUP202 derivatives containing different fragments from cosmid cGD47. A. The upper grey bar is a *Bam*HI (B) map of the cosmid cGD47, on which the positions of fragments B78 and B79 are indicated. The black arrows show the position of the *rep/par* region lying between two *Hind*III sites (H) and the white arrow indicates the position of *rinQ* gene. B. Shows the plasmid inserts of pL78-79 and pB79, indicating the position and orientation of the *rinQ* gene, and of the *repABC* operon. C. Plasmid pH3-B78 and constructs shown below are derivatives of plasmid pH3. The thin line interconnecting the rectangles and the black arrows represents the sequence of pSUP202. Grey and white rectangles represent fragments of cGD47 or of the *rinQ* gene respectively. The start codon of *rinQ* and its relative orientation in the constructs are indicated. The left columns, list the plasmid names and their incompatibility behaviour against p42d. Fractions are the proportion of transconjugants that lost p42d. The 'I' symbol at the end of the construct name indicates that the insert is inverted in regard to the original orientation present in p42d. The '+' symbol indicates that the construct was capable of displacing p42d, and the '-' symbol indicates a lack of or a reduction in the ability to displace p42d.

cis-acting site is required for incompatibility towards p42d in a wt background.

RinQ is essential for exerting incompatibility against p42d

The insert of pH3-F317 carries the putative *cis*-acting site for the recombinase mentioned above (Komano, 1999; Minakhina *et al.*, 1999). We propose that this *cis*-acting site participates in the incompatibility towards p42d through the action of RinQ. To test this hypothesis, an

Ω -Km interposon was introduced into the *rinQ* gene located in p42d of *R. etli*, to generate strain VQH 01. The introduction of pH3-F317 into VQH01 did not cause the displacement of p42d.

On the other hand, the introduction of pL78-79, containing the *rep/par* region, *rinQ* and its *cis*-action site into VQH 01, provoked the loss of p42d. These results demonstrate that the recombinase is essential to exert incompatibility against the symbiotic plasmid. For these reasons, *rinQ* was named for resolvase related to incompatibility.



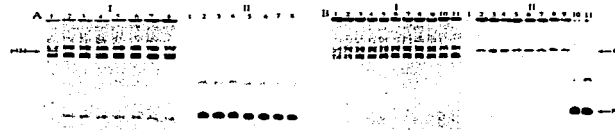


Fig. 2. Plasmid pattern of *Rhizobium etli* transconjugants selected for transfer of pH3-F317 and pH3-F317-I. Panels I show the ethidium bromide-stained Wheatcroft gels. Panels II show the hybridization of the plasmid profiles with pSUP202. Strains: lanes 1, CE3 (wt); lanes 2-8, transconjugants containing pH3-F317 (A); lanes 2-11, transconjugants containing pH3-F317-I (B). Arrows indicate the position of: the symbiotic plasmid 'p42d', the incoming plasmid 'P', and the cointegrated plasmid 'C'.

Plasmid retention tests showed that p42d carrying the *rinQ::Ω-Km* insertion was as stable as the wt p42d, indicating that RinQ does not play an essential role in plasmid maintenance.

Topological requirements for exerting incompatibility against p42d

Plasmids pH3-F317 and pH3-F317-I have two regions homologous to p42d; one corresponds to the *rep/par* region (the 5.6 *Hind*III fragment) and the other to the 317 bp containing the 5'-segment of the recombinase gene. The relative orientation of the *rep/par* region and the 317 bp insert in plasmid pH3-F317 is the same as that found in p42d (see Fig. 3A). A single crossover between p42d and pH3-F317 in either of the two homologous regions results in the duplication of the *rep/par* region, and the *ris* site; in this cointegrated plasmid one of the *rep/par* regions is bordered by the two *ris* sites as direct repeats (see Fig. 3A). In contrast, the orientation of the *ris* insert in pH3-F317-I is the opposite of that found in p42d. A single crossover between p42d and pH3-F317-I within their *rep/par* regions will duplicate those regions and the *ris* site, with one of the *rep/par* regions surrounded by two *ris* sites but in inverse orientation. However, if the crossover occurs within the *ris* sites, the resultant molecule will

have two *rep/par* regions with one of them bordered by two *ris* sites as direct repeats (see Fig. 3B). Cointegrated plasmids with one of the *rep/par* duplications flanked by two *ris* sites in direct repeat could generate, by the action of RinQ, a new circular molecule with autoreplicative properties. The RinQ recombinase will not resolve any recombination events from a *rep/par* region circumscribed by two inverted *ris* sites, and a stable cointegrate will be obtained.

To determine the relative orientation of the participating elements of p42d, pH3-F317 and pH3-F317-I in the cointegrated plasmids, *R. etli* transconjugants were evaluated by eight different PCR reactions. The forward and reverse primers for these PCRs were specifically designed to detect: (i) the *rep/par* region of p42d or of the incoming plasmid, primers 3/2 and 7*/6* respectively (see Fig. 3); (ii) the *ris* sites of p42d or the *ris* sites of the constructs, primers 9/8 and 5*/4* respectively; (iii) the *rep/par* hybrid regions with primers 7*/2 and 3/6* (see Fig. 3A, structures *c* and *d*); and (iv) the *ris* hybrid sites with primers 1/4* and 5*/8. The results of these experiments are summarized in Table 1.

The loss of p42d provoked by the introduction of pH3-F317 in seven *R. etli* transconjugants analysed was confirmed by plasmid profile analysis, and hybridization (see Fig. 2) of those profiles with pSUP202, which is the

Table 1. Topology of hybrid plasmids and cointegrates established by PCR assays.

Primers (forward/reverse)	Amplified product	Proportion of PCR products		
		A*	B*	C*
9/8	<i>ris</i> sites of p42d	2/7	8/8	0/2
3/2	<i>rep/par</i> region of p42d	0/7	8/8	0/2
5*/4*	<i>ris</i> sites of pH3-F317	2/7	8/8	0/2
7*/6*	<i>rep/par</i> region of pH3-F317	2/7	8/8	2/2
1/4*	<i>ris</i> hybrid region <i>c</i>	7/7	0/8	0/2
7*/2	<i>rep/par</i> hybrid region <i>c</i>	7/7	8/8	0/2
5*/8	<i>ris</i> hybrid region <i>d</i>	0/7	0/8	0/2
3/6*	<i>rep/par</i> hybrid region <i>d</i>	0/7	8/8	0/2

a. Proportion of PCR products obtained when DNA of pH3-F317 transconjugants, which were able to displace the p42d (INC+), were used as templates.

b. Proportion of PCR products obtained when DNA of pH3-F317-I transconjugants, containing a cointegrate p42d:pH3-F317-I (INC-), were used as templates.

c. Proportion of PCR products obtained when DNA of pH3-F317-I transconjugants (INC+), were used as templates.

The positions of forward/reverse primers, the size of each amplified product and the *c* and *d* hybrid regions are indicated in Fig. 3.

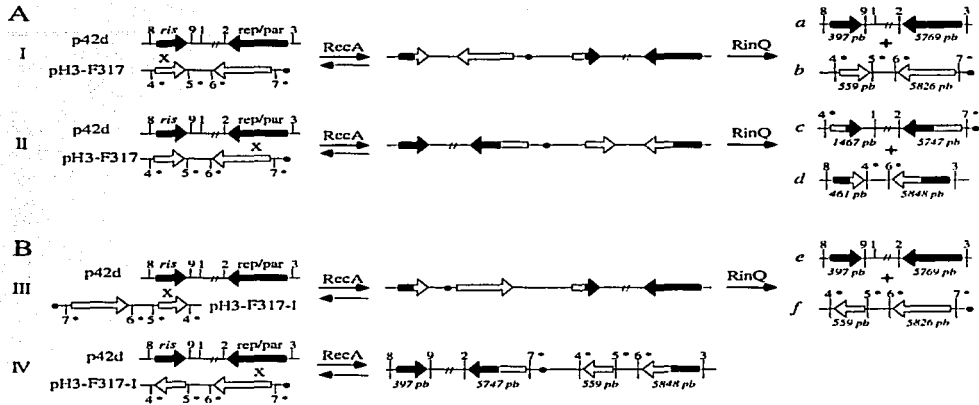


Fig. 3. Structures of the recombination intermediates and their resolution products generated between p42d and an incoming plasmid. **A.** Structures of the recombination intermediates between p42d and pH3-F317 and their resolution products. (I) Structure of the recombination intermediate if the crossover occurs within the *ris* site; 'a' and 'b' show the resolution products if this intermediate is resolved via RinQ. (II) Structure of the recombination intermediate if the crossover occurs within the *rep/par* regions; 'c' and 'd' are the resolution products if resolved via RinQ. **B.** Structures of the recombination intermediates between p42d and pH3-F317-I and their resolution products. (III) Structure of the recombination intermediate if the crossover occurs within the *ris* sites; 'e' and 'f' show the resolution products if this intermediate is resolved via RinQ. (IV) Structure of the recombination intermediate when the crossover occurs within the *rep/par* regions. Black arrows show the *rep/par* region and the *ris* site of p42d. White arrows represent the *rep/par* region and the *ris* site of the incoming plasmid. Black and white hybrid arrows show the recombined regions between the incoming and resident plasmids. Numbers are specific primers for p42d (the resident plasmid). Numbers with an asterisk are specific primers for the incoming plasmid. Numbers in italics indicate the size of the expected PCR products. The black circle indicates the position of the chloramphenicol resistant gene.

plasmid core of pH3-F317. A new small plasmid was present in all plasmid profiles of these strains. In these transconjugants, PCR products always detected the presence of hybrid regions at *ris*, and at *rep/par* (structure 'c' of Fig. 3A). In contrast, PCR products indicative of hybrid regions of structure 'd', Fig. 3A, were not found. Less abundant PCR products representing *ris* and *rep/par* regions of plasmid pH3-F317 were also present. These results (Table 1, column A) demonstrate that the incoming plasmid recombined through the *rep/par* region and the cointegrate was resolved using the *ris* sites generating a new replicon (structure 'c' of Fig. 3A). As p42d was displaced because the antibiotic resistant marker of the incoming plasmid was selected, PCR products indicative of structure 'd' of Fig. 3A, were not found.

The plasmid profiles of 10 *R. etli* pH3-F317-I transconjugants were analysed. In eight, a p42d::pH3-F317-I cointegrate was detected and confirmed by hybridization with pSUP202. In the remaining two strains, the loss of p42d

and the presence of a new small plasmid were demonstrated by analysing these plasmid profiles. The PCR analyses performed with these strains are shown in Table 1, columns B and C. PCR products representing the hybrid *ris* regions were not obtained. However, PCR products characteristic of *rep/par* hybrid regions were always detected as well as products indicative of the *ris* and *rep/par* wt regions of p42d and pH3-F317-I. These results indicate that the cointegration events and their resolution occurred between the *rep/par* regions.

In the two *R. etli* pH3-F317-I transconjugants in which p42d was displaced, only the PCR products characteristic of the presence of *ris* and *rep/par* regions of plasmid pH3-F317-I were obtained (Table 1, column C). In these two strains, the PCR products were indicative of the presence of the incoming plasmid in unmodified form. These results are consistent with the idea that the incoming plasmid seldom recombines through the *ris* region in a RecA-dependent manner and RinQ resolves this cointegrate.



Fig. 4. *RinQ* invertase activity assay. Structures of the p42d::pH3-F317-I cointegrate before and after the inversion event if *RinQ* had invertase activity. Black arrows show the *rep/par* region and the *ris* site of p42d (the resident plasmid). White arrows represent the *rep/par* region and the *ris* site of the incoming plasmid. Black and white hybrid arrows show the recombinant regions between the incoming and resident plasmids. Numbers are specific primers of p42d. Numbers with an asterisk are specific primers for the incoming plasmid. Numbers in italics are the sizes of the expected PCR products. The black circle indicates the position of the chloramphenicol resistance gene.

p42d was eliminated by incompatibility because the incoming plasmid was selected.

RinQ recombinase is a resolvase with no detectable invertase activity

The cointegration of pH3-F317-I with p42d creates a duplication of the *rep/par* region, in which two inversely oriented *ris* sites border one of the *rep/par* copies (Fig. 4). If the *RinQ* recombinase had an invertase activity, it would catalyse the flipping of the region contained between the *ris* sites. To test for such inversions, PCR products using primers 4*8 and 9*5* were assessed using DNA from *R. etli* containing a p42d::pH3-F317I cointegrate as template (Fig. 4). No such PCR products were detected, strongly suggesting that *RinQ* is a resolvase with no detectable invertase activity.

Discussion

Incompatibility is an intrinsic property of plasmids and has been defined as the inability of two plasmids to stably coexist in the same cell in the absence of external selection (Novick *et al.*, 1976). Two mechanisms to explain incompatibility have been proposed: first, the sharing of one or more elements of the replication and partition systems, and second, the interference with the ability of the plasmid to correct stochastic fluctuations in its copy number (Novick, 1987). Incompatibility has been observed between plasmids of the Rhizobiaceae family

(Baynon *et al.*, 1980; Brewin *et al.*, 1980; O'Connell *et al.*, 1984; Rosenberg and Huguet, 1984; Hooykaas *et al.*, 1985; Hynes *et al.*, 1985; O'Connell *et al.*, 1987). Nevertheless, cointegrate formation between incompatible plasmids of the Rhizobiaceae family has been frequently reported (Brewin *et al.*, 1980; Hooykaas *et al.*, 1980; Johnston *et al.*, 1982; Ramírez-Romero *et al.*, 1997). Interestingly, these cointegrates are stable.

A recombinant plasmid containing the *rep/par* region of p42d displaces the symbiotic plasmid in an *R. etli* *recA* background. But, if it is introduced into a wt strain, it forms a stable cointegrate. In this paper, we have shown that the ability of an incoming plasmid to displace the p42d in a wt background depends on two factors: The presence of a *rep/par* region of the same incompatibility group as that of the resident plasmid, and the presence of a site-specific recombinase (resolvase), *RinQ*, and its action sites (*ris*). The absence of one of these elements suppresses the ability of an incoming plasmid to displace the p42d in a wt background. It is important to point out that in the absence of an active *RecA*-dependent recombination system the only elements that play a role in the displacement of the symbiotic plasmid are the *cis* and *trans* incompatibility determinants located in the *rep/par* region. A model that combines these elements is outlined in Fig. 5.

We propose that the introduction of a plasmid of the same incompatibility group as p42d into *R. etli* will lead to the formation of a cointegrate between the incoming plasmid and the resident plasmid (p42d) by the general homologous recombination system (*RecA*-dependent). If the

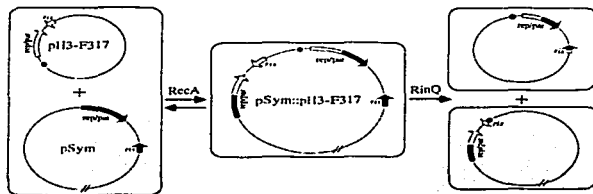


Fig. 5. Participation of *RecA* and *RinQ* in incompatibility against the p42d. The introduction of a plasmid (pH3-F317) containing homologous regions and incompatible with p42d into *R. etli* drives the formation of a cointegrate between the incoming and the resident plasmids through a *RecA*-dependent recombination process. Every event of cointegration between these plasmids will lead to the duplication of the *rep/par* region, with one of them bordered by two *ris* sites as direct repeats. *RinQ* resolves this cointegrate acting at *ris* sites generating two new hybrid circular molecules with autoreplicative properties. In the absence of selective pressure, incompatibility causes the segregation of each of these plasmids into different cells.

orientation between the *rep/par* region and the *cis*-acting site for the resolvase in the incoming plasmid are the same as that found in the resident plasmid, every event of cotegration between these plasmids will induce the duplication of the *rep/par* region. If two resolvase *cis*-acting sites, in direct repeats, surround one of these *rep/par* regions, the action of the resolvase will excise an autoreplicative circular molecule.

Inside the cell, the new circular molecule and the resident plasmid will be found in two forms: as independent replicons which, in the absence of selective pressure, will drive the segregation of each of the two plasmid types into different cells or, in the form of a bireplicon, if the homologous recombination system cotegrates the new plasmid with the resident p42d. The role of the resolvase is to displace the equilibrium between these two forms, favouring the former, and in this way promoting the displacement of one of the plasmids.

The *rinQ* gene shares a high degree of identity with the site-specific recombinases (see *Supplementary material*) of the invertase/resolvase family (γ family). The conserved region includes the catalytic serine residue involved in the formation of the phosphodiester bond with the 5'-end of the recombining DNA strand (Reed and Moser, 1984; Hatfull and Grindley, 1986; Smith and Thorpe, 2002).

As observed in all resolvases, RinQ acts only if the *ris* sites are directly oriented (Smith and Thorpe, 2002). Inversely oriented *ris* sites do not yield the inversion of the region between them, indicating that RinQ is a resolvase and not an invertase.

The *cis*-acting sites of resolvases are longer than those found for the invertases (between 100 and 160 bp), and consist of one core site where actual crossover occurs, and two accessory sites usually required for synaptosome complex formation and the transactivation of strand exchange. The experiments shown here indicate that RinQ resolvase requires for its activity a *cis*-acting site (*ris*) of 317 bp (Fig. 1), which is consistent with its resolvase role.

Site-specific recombination has been implicated in the maintenance of low copy-number plasmids including P1 (Austin *et al.*, 1981) and RP4 (Gerlitz *et al.*, 1990), as well as multicopy plasmids like CloDF13 (Hakkaart *et al.*, 1984) and ColE1 (Summers and Sherratt, 1984). However, insertion mutations in the *rinQ* gene of p42d did not affect its stability (data not shown), suggesting that the resolvase is not essential for resolution of multimers. Similarly, in RP4 dimer resolution by itself is not sufficient for stabilization (Gerlitz *et al.*, 1990).

It is not always possible to find detectable amounts of plasmid multimers in DNA preparations from *recA* and *wt* strains. Larger amounts of plasmid dimers can be isolated from *recBC* derivative strains, indicating that in this

genetic background it is easier to evaluate the role of site specific recombinases in plasmid multimer resolution (Gerlitz *et al.*, 1990).

The presence of the *rinQ* gene is not confined to the symbiotic plasmids of *R. etli*. Genes with a high degree of identity (ranging from 41% to 77%) can be found in other *repABC* plasmids and in the same relative orientation with respect to the *repABC* genes than that found in p42d. Among these are, the octopine-type Ti plasmids pTiC58, and pTi-SAKURA of *A. tumefaciens*; pRI1724 of *A. rhizogenes*, and the symbiotic plasmid of *Rhizobium sp.* NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2000; Goodner *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 2001). This observation suggests that the phenomenon described here is common to other *repABC* plasmids present in the Rhizobiaceae.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

Escherichia coli DH5 α (Hanahan, 1983) and S17-1 (Simon *et al.*, 1983) were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium. *R. etli* CE3 and derivatives were grown at 30°C in PY medium (Noel *et al.*, 1984). When needed antibiotics were added at the following concentrations (in microgrammes per millilitre): nalidixic acid, 20; kanamycin, 30; chloramphenicol, 25; ampicillin and spectinomycin, 100.

Bacterial matings

Derivatives of cGD47 and pH3 were introduced into *Rhizobium* using *Escherichia coli* S17-1 as the donor strain. Strains were grown in the proper liquid medium to stationary phase, mixed in a donor:recipient ratio of 1:2 on PY plates, and incubated at 30°C overnight. Cells were resuspended in fresh PY medium, and serial dilutions were plated on the appropriate selective medium.

Plasmid profiles and hybridization

Profiles of high-molecular-weight plasmids were obtained by the in-gel lysis procedure described by Wheatcroft *et al.* (1990). Gels were transferred onto Hybond N+ membranes (Amersham) using the manufacturers protocol and cross-linked using a UV crosslinker unit (Stratagene). Hybridizations were performed overnight using $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-labelled probes (Megaprime kit; Amersham) under high-stringency conditions (65°C in rapid-Hyb buffer, Amersham). Hybridization signals were detected on X-DMAT-K films (Kodak) in the presence of intensifying screens.

DNA isolation and manipulation

Genomic and plasmid DNA were isolated as described by Sambrook *et al.* (1989). Samples of DNA were restricted and ligated under the conditions specified by the manufacturer

(Amersham), Taq polymerase (Gibco BRL) was used for polymerase chain reaction (PCR). PCR products were cloned using a pMOSSBlue blunt-ended cloning kit (Amersham).

Plasmid construction

To identify the elements required to exert incompatibility against p42d in a wt background, a collection of subclones, PCR products and deletion derivatives of cosmid cGD47 were created. One collection was introduced into the *Bam*HI site of plasmid pH3, a mobilizable vector able to replicate in *Rhizobium* (Ramírez-Romero *et al.*, 1997). All members of this collection were named with the prefix pH3- followed by the name of the insert.

Deletion derivatives of cosmid cGD47 were obtained by partially restricting the DNA of cGD47 with *Bam*HI. The restriction products were re-ligated and transformed into *E. coli* cells using kanamycin for selection. The *Bam*HI restriction patterns of the transformants were analysed. In total, 13 clones containing different combinations of fragment B79 and the other 10 *Bam*HI restriction fragments of the cGD47 insert were selected, introduced into *R. etli* CE3 and their ability to displace p42d was determined.

Mutagenesis of the *rinQ* gene

A PCR product of 1.89 kb containing the *Bam*HI site located between fragments B78 and B79 was cloned into pWS233, a gene replacement vector containing *sacRB* (Selbitschka *et al.*, 1993). An Ω -Km interposon was introduced into the *Bam*HI site between B78 and B79, thus interrupting the resolvase gene (*rinQ*). The resulting construct was mated into *R. etli* CE3, and double marker-exchange events were selected on PY plates containing nalidixic acid, kanamycin and sucrose (15%). The genotypes of the recombinant strains were confirmed by Southern hybridization analysis.

DNA sequencing

A shotgun DNA library of cosmid cGD47 with insert sizes from 1 to 2 kb was constructed using M13 phage as vector. The sequence of clones was obtained using a BigDye terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit and a 373-A DNA Sequencing System (Applied Biosystems). Clonings were assembled using the CONSED program (Gordon *et al.*, 1998). Most of the sequence of cosmid cGD47 was obtained from the random clones, but the double-strand DNA sequence of fragments B78 and B79 was completed by primer walking using custom-made primers (GenBank accession no. U80928).

Bioinformatics

Open reading frames (ORFs) were identified using GLIMMER 2.02 (Salzberg *et al.*, 1998). Nucleotide and deduced amino acid sequences were compared with those deposited in the GenBank non-redundant database using the BLAST 2.1 algorithm at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul *et al.*, 1997).

Determination of the structure of hybrid plasmids and cointegrates

To determine if a construct displaced p42d or formed cointegrates with it, the Wheatcroft gels of at least four transconjugants of each cross were blotted and hybridized with a ³²P-labelled pSUP202 DNA probe.

Genomic DNAs of the transconjugants were used as substrate in eight test PCR reactions. Four primers complementary to pSUP202 were designed and their number marked with an asterisk. Two of them (4* and 5*) flank the *Bam*HI site of pSUP202, and the other two (6* and 7*) border the *Hind*III site. Five primers were designed complementary to p42d. The exact position of these primers is identified according to the reported sequence of this region (where base one is the first nt of the *Bam*HI site of B78): reverse primer 1, 3881–3898; forward primer 2, 7106–7123; reverse primer 3, 12857–12874; forward primer 8, 2564–2580; reverse primer 9, 2927–2952 (see Fig. 3). PCR products were resolved by electrophoresis in agarose gels and stained with ethidium bromide (see *Supplementary material*).

Detection of invertase activity

To detect if *RinQ* possess invertase activity reflected as the flipping of the DNA region located between two inverted *nis* sites, the DNA of transconjugants containing the cointegrate p42d::pH3-F317-1 were utilized as template for two PCR reactions designed to detect these movements. The first PCR utilized primers 4* and 8 (positions mentioned above); the second reaction, primers 5* and 9 (see Fig. 4).

Acknowledgements

We wish to thank Susana Brom, David Romero, Miguel A. Ramírez-Romero, Michael Dunn and Stephan Farrand for their critical comments, and also Rosa E. Gómez, José A. Gama and Patricia Bustos for their skilful technical support. We are grateful to Paul Gaytán and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides. This work was partially supported by CONACYT grants no. 36758-N and N-028.

Supplementary material

The following material is available from <http://www.blackwell-science.com/products/journals/suppmat/mole/mole3205/mni3205sm.htm>

Alignment of the amino acid sequences of *RinQ* and other recombinases belonging to the resolvase/invertase family. Analysis of the PCR products used to determine the topology of the cointegrates and chimeric plasmids of pH3-F37 and pH3-F317-1 transconjugants.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Austin, S., Ziese, M., and Sternberg, N. (1981) A novel role

- for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* **25**: 729–736.
- Bartosik, D., Baj, J., and Włodarczyk, M. (1998) Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology* **144**: 3149–3157.
- Bartosik, D., Szymanski, M., and Wysocka, E. (2001) Identification of the partitioning site within the *repABC*-type replicon of the composite *Paracoccus versutus* plasmid pTAV1. *J Bacteriol* **183**: 6234–6243.
- Beynon, J.L., Beringer, J.E., and Johnston, A.W.B. (1980) Plasmids and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J Gen Microbiol* **120**: 421–429.
- Brewin, N.J., Beringer, J.E., and Johnston, A.W.B. (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **120**: 413–420.
- Eberli, L., Kristensen, C.S., Givskov, M., Grohmann, E., Gerlitz, M., and Schwab, H. (1994) Analysis of the multimer resolution system encoded by the *parCBA* operon of broad-host-range plasmid RP4. *Mol Microbiol* **12**: 131–141.
- Freilberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., and Perret, X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394–401.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Pöhler, A., Abola, P., Ampe, F., et al. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668–672.
- Garnier, T., Saurin, W., and Cole, S.T. (1987) Molecular characterization of the resolvase gene, *res*, carried by a multicopy plasmid from *Clostridium portingens*: common evolutionary origin for prokaryotic site-specific recombinases. *Mol Microbiol* **1**: 371–376.
- Gerlitz, M., Hrabak, O., and Schwab, H. (1990) Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination. *J Bacteriol* **172**: 6194–6203.
- Girard, M.L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R., and Dávila, G. (1991) Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli. *J Bacteriol* **165**: 723–731.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Millar, N., Blanchard, M., Ouello, B., Goldman, B.S. et al. (2001) Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2323–2328.
- Gordon, D., Abajian, C., and Green, P. (1998) CONSED: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**: 195–202.
- Grindley, N.D., Lauth, M.R., Wells, R.G., Wityk, R.J., Salvo, J.J., and Reed, R.F. (1982) Transposon-mediated site-specific recombination: identification of three binding sites for resolvase at the *res* sites of gamma delta and Tn3. *Cell* **30**: 19–27.
- Hakkaert, M.J., van den Elzen, P.J., Veltkamp, E., and Nijkamp, H.J. (1984) Maintenance of multicopy plasmid Clo DF13 in *E. coli* cells: evidence for site-specific recombination at *parB*. *Cell* **36**: 203–209.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* plasmids. *J Mol Biol* **166**: 407–428.
- Hatfull, G.F., and Grindley, N.D. (1986) Analysis of $\gamma 6$ resolvase mutants in vitro: evidence for an interaction between serine-10 of resolvase and site I of *res*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5429–5433.
- Hooykaas, P.J.J., den Dulk-Ras, H., Ooms, G., and Schilperoord, R.A. (1980) Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **143**: 1295–1306.
- Hooykaas, P.J., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuinik, A.J., van Brussel, A.A., and Schilperoord, R.A. (1985) Expression of a *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid in *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens*: incompatibility with a *R. trifolii* Sym plasmid. *Plasmid* **14**: 47–52.
- Hynes, M.F., Simon, R., and Pöhler, A. (1985) The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAT C58. *Plasmid* **13**: 99–105.
- Johnston, A.W.B., Hombrecht, G., Brewin, N.J., and Koper, M.C. (1982) Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J Gen Microbiol* **128**: 85–93.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., et al. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**: 331–338.
- Komano, T. (1999) Shufflons: multiple inversion systems and integrons. *Annu Rev Genet* **33**: 171–191 (Review).
- Minakhina, S., Kholdid, G., Mindlin, S., Yuriva, O., and Nikiforov, V. (1999) Tn5053 family transposons are *res* site hunters sensing plasmid *res* sites occupied by cognate resolvases. *Mol Microbiol* **33**: 1059–1068.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N.S., Kataoka, M., Tanaka, N., and Yoshida, K. (2001) The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiales. *J Mol Biol* **307**: 771–784.
- Novik, R.P., Sánchez, J., Fernández, L., Leamas, J., and Cavallos, M.A. (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol* **158**: 148–155.
- Novick, R.P. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* **51**: 381–395.
- Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss, R., Ildatta, N., and Falkow, S. (1976) Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* **40**: 168–189.
- O'Connell, M.P., Dowling, D., Neilan, J., Simon, R., Dunican, L.K., and Puhler, A. (1984) Plasmid interactions in *Rhizobium*: incompatibility between symbiotic plasmids. In *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Veeger C. and Newton W. E. (eds). The Hague: Nijhoff Junk, p. 713.
- O'Connell, M.P., Hynes, M.F., and Puhler, A. (1987) Incompatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and Ri plasmid of *Agrobacterium*. *Plasmid* **18**: 156–163.
- Ramírez-Romero, M.A., Bustos, P., Girard, M.L., Rodríguez, O., Cavallos, M.A., and Dávila, G. (1997) Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* **143**: 2825–2831.
- Ramírez-Romero, M.A., Soberón, N., Pérez-Oseguera, A.,

- Télez-Sosa, J., and Cevallos, M.A. (2000) Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* Symbiotic plasmid. *J Bacteriol* **182**: 3117–3124.
- Ramírez-Romero, M.A., Télez-Sosa, J., Barrios, H., Pérez-Oseguera, A., Rosas, V., and Cevallos, M.A. (2001) RopA negatively autoregulates the transcription of the *repABC* operon of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid basic replicon. *Mol Microbiol* **42**: 195–204.
- Reed, R.R., and Moser, C.D. (1984) Resolvase-mediated recombination intermediates contain serine residue covalently linked to DNA. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **49**: 245–249.
- Rigottier-Gois, L., Turner, S.L., Young, J.P.W., and Amarger, N. (1998) Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* from field populations. *Microbiology* **144**: 771–780.
- Rosenberg, C., and Huguet, T. (1984) The *pATC58* of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol Gen Genet* **196**: 533–536.
- Salzberg, S.L., Delcher, A.L., Kasif, S., and White, O. (1998) Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res* **26**: 544–548.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Selbitschka, W., Niemann, S., and Pühler, A. (1993) Construction of gene replacement vectors for Gram⁺ bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**: 615–618.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio / Technology* **1**: 784–791.
- Smith, M.C.M., and Thorpe, H.M. (2002) Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol* **44**: 299–307.
- Summers, D.K., and Sherratt, D.J. (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**: 1097–1103.
- Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., *et al.* (2000) Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid. *Gene* **242**: 331–336.
- Tabata, S., Hooykaans, P.J.J., and Oka, A. (1989) Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTIB6S3. *J Bacteriol* **171**: 1665–1672.
- Thorpe, H.M., and Smith, M.C. (1998) *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5505–5510.
- Wheatcroft, R., McRae, G.D., and Miller, R.W. (1990) Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**: 9–17.

RESULTADOS ADICIONALES

Los resultados descritos en el artículo demuestran que la resolvasa sitio-específica RinQ y sus sitios de acción, presentes en el plásmido simbiótico de *R. elli*, se requieren para la resolución de cointegrados formados con el p42d y para permitir la expresión de un verdadero fenotipo de incompatibilidad. En esta sección se describen los experimentos realizados para determinar el papel de la resolvasa RinQ en la estabilidad del plásmido p42d, así como también el análisis para explorar la presencia de este tipo de resolvasas en otros plásmidos tipo *repABC*.

1. El papel de la Resolvasa RinQ en la estabilidad del p42d.

Como se mencionó en la introducción, muchas de las resolvasas sitio-específicas reportadas en la literatura, desempeñan un importante papel en la segregación de los plásmidos. Este tipo de enzimas resuelven los cointegrados (dímeros o multímeros) que se forman por la recombinación homóloga entre un plásmido recién sintetizado y el plásmido parental, al término de la replicación. Las resolvasas resuelven rápidamente cualquier forma multimérica a monómeros, haciendo posible que el proceso de partición ocurra de manera exitosa.

Dado que el plásmido p42d tiene entre 1 y 2 copias por célula (Ramírez-Romero *et al.* 2000), una recombinación homóloga entre las copias de este plásmido, puede dar origen a la formación de un cointegrado, el cual, si no es resuelto puede provocar lo siguiente: 1) que los plásmidos que forman el cointegrado se hereden a una sola célula hija, 2) que se genere una célula hija sin plásmido y 3) que el cointegrado vuelva a recombinar, con una copia de él, al momento de su replicación y se genere un multímero de igual forma inestable. Por todo lo anterior, nos interesó explorar el papel de la resolvasa RinQ en la estabilidad del plásmido p42d. Para ello se utilizaron dos cepas con una resolvasa funcional (RinQ +): la cepa silvestre CE3, resistente al ácido nalidixico (Nal), y la cepa CFNX192 (Brom *et al.* 1992), que porta el transposon Tn5mob en el p42d, con resistencia a Nal y a kanamicina (Km); y dos cepas con una resolvasa inactiva (RinQ -): la cepa VQH01 que tiene una inserción mutacional (un interposón Ω kanamicina) en el gen que codifica para la

resolvasa RinQ, resistente a Nal y a Km, y la cepa VQHO2, derivada de la cepa CFNX192, que tiene un interposón Ω espectinomicina insertado en el gen que codifica para la resolvasa RinQ, con resistencia a Nal y a espectinomicina (Sp). Esta última cepa, fue construida utilizando la misma estrategia que se empleó para obtener la cepa VQH01 (ver materiales y métodos del artículo).

La estabilidad del p42d se calculó de la siguiente manera: Se cultivaron las 4 cepas en medio PY con el antibiótico respectivo. Se cosecharon en la fase estacionaria y se lavaron con PY sin antibiótico con el fin de eliminar el antibiótico, posteriormente las células se diluyeron en medio fresco sin selección hasta obtener una densidad óptica de 0.001 a 620 nm. Después se cultivaron por 2, 5, 12, 18 y 25 generaciones (el tiempo entre generaciones es aproximadamente de 2.5 hrs.). En estos tiempos se tomaron muestras, a las cuales se les hicieron diluciones seriadas y se platearon en medio sólido sin selección. Luego, se eligieron 100 colonias y se probaron en cajas con y sin selección. Todo este procedimiento se realizó por triplicado.

En todas las generaciones analizadas, ninguna cepa pierde el plásmido p42d, lo cual también se comprobó al realizar el perfil de plásmidos (método descrito en el artículo) de cada cepa al término de las 25 generaciones. Los resultados obtenidos indican que la resolvasa RinQ no tiene un papel esencial en la estabilidad del plásmido; las posibles explicaciones de estos resultados se presentan en la sección de discusión y las estrategias alternativas para evaluar la estabilidad del p42d, en la sección de perspectivas.

2. Presencia de Recombinasas homólogas a RinQ en otros replicadores tipo *repABC*.

Con la finalidad de conocer si resolvasas similares a RinQ, se encuentran presentes en otros replicadores tipo *repABC*, y en qué orientación se encuentran con respecto a la región replicadora, se realizó un análisis utilizando el programa BLASTP (Altschul *et al.* 1997). En este análisis se comparó la secuencia en aminoácidos de la resolvasa RinQ contra la base de datos no redundante (nr) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y se encontró que genes con un alto grado de identidad (con un rango de 41% a 77%) con la resolvasa RinQ, se localizan en otros replicones tipo *repABC* en la misma orientación relativa con respecto a los genes *repABC*

que se encuentran en el p42d. Entre los plásmidos que contienen este tipo de recombinasas están: los plásmidos Ti tipo octopina: pTi-SAKURA y pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens*; el plásmido pRi1724 de *Agrobacterium rhizogenes*, y el plásmido simbiótico de *Rhizobium sp.* NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2000; Goodner *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 2001). Un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la resolvasa RinQ y los genes que codifican para las recombinasas presentes en los plásmidos mencionados anteriormente se encuentra en la figura 7.

RinQ	1	M	P	Y	L	Y	K	L	L	R	D	R	A	V	T	S	A	M	A	K	P	Q	T	R	F	D	N	Q	S	Q	P	K	R	L	I	G	34											
pTi Sakura	1	M	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	N	T	A	Q	N	Y	R	F	N	S	Q	P	L	R	I	I	G	19										
NGR234	1	M	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	N	T	A	Q	N	Y	R	F	N	S	Q	P	L	R	I	I	G	18										
pTiC58	1	M	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	N	T	A	Q	N	Y	R	F	N	S	Q	P	L	R	I	I	G	19										
Ganunadelta	1	M	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	N	T	A	Q	N	Y	R	F	N	S	Q	P	L	R	I	I	G	5										
							*																																									
RinQ	35	Y	A	R	V	S	T	D	E	O	V	H	D	A	O	O	L	E	I	R	R	A	S	A	G	Q	Q	-	-	D	I	R	I	H	O	E	H	G	S	66								
pTi Sakura	20	Y	A	R	V	S	T	D	E	O	V	H	D	A	O	O	V	E	I	R	R	A	S	A	G	Q	Q	-	-	D	H	R	I	I	H	O	E	H	G	S	51							
NGR234	19	Y	A	R	V	S	T	D	E	O	V	H	D	A	O	O	V	E	I	R	R	A	S	A	G	Q	Q	-	-	D	H	R	I	I	H	O	E	H	G	S	50							
pTiC58	20	Y	A	R	V	S	T	D	E	O	V	H	D	A	O	O	V	E	I	R	R	A	S	A	G	Q	Q	-	-	D	I	R	I	H	O	E	H	G	S	51								
Ganunadelta	6	Y	A	R	V	S	T	S	Q	O	S	L	D	I	O	V	R	A	L	K	R	D	A	G	V	K	A	N	R	I	I	F	T	D	K	A	S	39										
RinQ	67	G	A	S	R	A	R	F	V	L	T	R	L	L	A	R	E	I	S	A	G	D	D	V	L	I	V	V	R	L	D	R	L	A	R	S	V	100										
pTi Sakura	52	G	A	S	R	A	R	F	V	L	S	K	L	L	A	R	E	I	S	A	G	D	D	V	L	I	V	V	R	L	D	R	L	A	R	S	V	85										
NGR234	51	G	A	S	R	A	R	F	V	L	A	K	L	L	A	R	E	I	S	A	G	D	D	V	L	I	V	V	R	L	D	R	L	A	R	S	V	84										
pTiC58	52	G	A	S	R	A	R	F	V	L	S	K	L	L	A	R	E	I	S	A	G	D	D	V	L	I	V	V	R	L	D	R	L	A	R	S	V	85										
Ganunadelta	40	G	A	S	R	A	R	F	V	L	D	I	R	M	K	V	E	R	E	G	D	D	V	I	L	V	V	K	E	L	D	R	L	A	R	S	V	73										
RinQ	101	S	H	L	L	S	V	I	E	D	L	E	A	R	G	V	H	F	R	S	I	R	D	P	I	D	T	S	T	P	O	G	M	F	S	154												
pTi Sakura	86	S	H	L	L	E	V	I	E	D	M	T	E	A	R	G	V	H	F	R	S	I	R	D	P	I	D	T	S	T	P	O	G	M	F	S	119											
NGR234	85	S	H	L	L	E	V	I	E	D	L	E	F	A	R	G	V	H	F	R	S	I	R	D	P	I	D	T	S	T	P	O	G	M	F	S	118											
pTiC58	86	S	H	L	L	E	V	I	E	D	M	T	E	A	R	G	V	H	F	R	S	I	R	D	P	I	D	T	S	T	P	O	G	M	F	S	119											
Ganunadelta	74	A	D	M	I	Q	L	I	F	E	F	D	A	Q	G	V	S	T	N	F	I	D	D	G	L	I	S	T	D	G	E	M	G	K	M	V	107											
RinQ	155	L	O	V	L	G	A	V	A	O	L	E	R	A	L	I	A	S	E	R	T	K	K	A	G	I	K	A	A	K	A	R	K	G	K	L	P	G	168									
pTi Sakura	120	L	O	V	L	G	A	V	A	O	L	E	R	A	L	I	A	S	E	R	T	K	K	A	G	I	K	A	A	K	A	R	K	G	K	L	P	G	155									
NGR234	119	L	O	V	L	G	A	V	A	O	L	E	R	A	L	I	A	S	E	R	T	K	K	A	G	I	M	I	R	A	A	K	A	R	K	G	K	L	P	G	152							
pTiC58	120	L	O	V	L	G	A	V	A	O	L	E	R	A	L	I	A	S	E	R	T	K	K	A	G	I	K	A	A	K	A	R	K	G	K	L	P	G	153									
Ganunadelta	108	V	T	I	L	S	A	V	A	O	A	E	N	Q	R	I	L	E	R	T	N	E	G	F	Q	E	A	M	A	K	G	V	V	F	G	141												
RinQ	169	N	P	G	L	I	R	E	R	E	R	R	P	E	A	I	K	A	I	S	O	A	R	K	E	K	A	Y	G	L	D	E	L	I	O	A	S	A	O	T	W	202						
pTi Sakura	154	N	P	G	L	I	R	E	R	E	R	R	P	E	A	I	K	A	I	S	O	A	R	K	E	K	A	Y	G	L	D	E	L	I	O	A	S	A	O	T	W	187						
NGR234	153	N	P	G	L	I	R	E	R	E	R	R	P	E	A	I	K	A	I	S	O	A	R	K	E	K	A	Y	G	L	D	E	L	I	O	A	S	A	O	T	W	186						
pTiC58	154	N	P	G	L	I	R	E	R	E	R	R	P	E	A	I	K	A	I	S	O	A	R	K	E	K	A	Y	G	L	D	E	L	I	O	A	S	A	O	T	W	187						
Ganunadelta	142	N	P	G	L	I	R	E	R	E	R	I	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	147						
RinQ	203	L	P	M	V	V	R	Q	L	R	P	Q	H	S	W	D	N	V	V	R	M	L	N	K	F	R	G	H	D	W	T	V	E	R	L	L	R	R	236									
pTi Sakura	188	L	P	T	V	V	R	R	F	M	R	P	H	S	W	D	N	V	V	R	M	L	N	K	F	R	G	H	D	W	T	V	E	R	L	L	R	R	221									
NGR234	187	L	P	T	V	V	R	R	F	M	R	P	H	S	W	D	N	V	V	R	M	L	N	K	F	R	G	H	D	W	T	V	E	R	L	L	R	R	220									
pTiC58	188	L	P	T	V	V	R	R	F	M	R	P	H	S	W	D	N	V	V	R	M	L	N	K	F	R	G	H	D	W	T	V	E	R	L	L	R	R	221									
Ganunadelta	148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	D	A	V	L	N	M	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	155									
RinQ	237	A	V	H	R	M	V	T	R	E	R	K	L	V	A	E	K	E	A	L	L	A	R	S	P	P	R	R	A	P	E	D	Y	L	M	K	L	V	A	A	270							
pTi Sakura	222	A	V	K	W	M	V	T	R	E	R	K	L	V	A	D	A	A	L	L	A	R	S	P	P	R	R	A	P	E	D	Y	L	M	K	L	V	A	A	255								
NGR234	221	A	V	H	R	L	V	T	R	E	R	K	L	V	A	E	P	E	L	L	A	R	S	P	P	R	R	A	P	E	D	H	L	M	K	L	V	A	A	254								
pTiC58	222	A	V	K	W	M	V	T	R	E	R	K	L	V	A	D	A	A	L	L	A	R	S	P	P	R	R	A	P	E	D	Y	L	M	K	L	V	A	A	255								
Ganunadelta	156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	155								
RinQ	271	I	A	I	A	S	N	P	P	N	L	L	S	K	L	R	R	D	I	A	A	G	O	L	E	D	Q	M	G	E	R	R	P	P	V	R	S	G	G	G	K	N	W	W	A	P	S	304
pTi Sakura	256	I	A	S	N	P	P	N	L	L	S	K	L	R	R	D	I	A	A	G	O	L	E	D	Q	M	G	E	R	R	P	P	V	R	S	G	G	G	K	N	W	W	A	P	S	289		
NGR234	255	I	A	I	A	S	N	P	P	N	L	L	S	K	L	R	R	D	I	A	A	G	O	L	E	D	Q	M	G	E	R	R	P	P	V	R	S	G	G	G	K	N	W	W	A	P	S	288
pTiC58	256	I	A	S	N	P	P	N	L	L	S	K	L	R	R	D	I	A	A	G	O	L	E	D	Q	M	G	E	R	R	P	P	V	R	S	G	G	G	K	N	W	W	A	P	S	289		
Ganunadelta	156	-	-	-	-	Q	Q	G	L	G	A	S	H	I	S	K	T	M	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	169		
RinQ	305	S	V	R	V	L	L	L	I	D	E	R	A	H	R	R	R	F	S	G	L	I	J	T	R	D	V	D	I	A	A	A	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	321		
pTi Sakura	290	S	V	K	N	L	L	L	I	D	E	R	A	H	R	R	R	F	S	G	L	I	J	T	R	D	V	D	I	A	A	A	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	313		
NGR234	289	S	V	R	A	L	L	L	I	D	E	R	A	H	R	R	R	F	S	G	L	I	J	T	R	D	V	D	I	A	A	A	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	305		
pTiC58	290	S	V	K	N	L	L	L	I	D	E	R	A	H	R	R	R	F	S	G	L	I	J	T	R	D	V	D	I	A	A	A	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	315		
Ganunadelta	170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	A	R	S	T	V	Y	K	V	I	N	E	S	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	185	

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de RinQ, resolvasa del p42d de *Rhizobium elii* y las recombinasas, pertenecientes a la familia de las resolvasas/invertasas, de los plásmidos Ti tipo octopina: pTi-SAKURA y pTiC58 de *Agrobacterium tumefaciens*; el plásmido pRi1724 de *Agrobacterium rhizogenes*, y el plásmido simbiótico de *Rhizobium sp.* NGR234, así como también la secuencia de la gammadelta resolvasa de *E. coli*. El asterisco señala la serina catalítica del sitio activo de las recombinasas de esa familia.

DISCUSION

En la evolución de las especies bacterianas, los plásmidos representan un factor muy importante debido a que pueden transferir e intercambiar información genética dentro de las poblaciones bacterianas.

Sin embargo, para que la transferencia e intercambio de material genético mediada por los plásmidos sea exitosa es necesario que dichos plásmidos se mantengan establemente y coexistan con los plásmidos residentes, dentro de estas bacterias. Por lo tanto, las opciones de mantenimiento que tiene un plásmido cuando se transfiere a una nueva bacteria son: a) mantenerse replicando estable e independientemente dentro de la bacteria. b) cointegrarse con el cromosoma o con alguno de los plásmidos residentes, o bien, c) desplazar por incompatibilidad a algún plásmido residente

Desde el punto de vista de la transferencia lateral de material genético, la incompatibilidad constituye una barrera que limita la dispersión y el establecimiento de nueva información genética dentro de las células. El estudio de los mecanismos de mantenimiento de un plásmido, las bases moleculares de la incompatibilidad, estabilidad y replicación, provee el conocimiento para entender el flujo de información entre bacterias y por ende entender uno de los mecanismos mas importantes de la evolución de estos organismos. En los plásmidos de la familia Rhizobiaceae se ha demostrado que ellos pueden transferirse y funcionar en miembros de diferente género, por ejemplo: las cepas de *Agrobacterium* que adquieren plásmidos simbióticos son capaces de nodular y las cepas de *Rhizobium* a las cuales se les introduce plásmidos pRi o pTi de *Agrobacterium* se vuelven patogénicas (Hooykaas, *et al.* 1981; O'Connell, 1984; Hooykaas, *et al.* 1985; Hynes, *et al.* 1985; O'Connell, 1987; Martínez *et al.* 1990; Mercado-Blanco y Olivares 1993). También se ha observado que existe incompatibilidad entre los plásmidos de esta familia, y los determinantes *cis* y *trans* de incompatibilidad de algunos de ellos han sido caracterizados (Rigottier *et al.* 1998; Ramírez-Romero *et al.* 2000). Se han reportado cointegraciones, mediadas por recombinación homóloga, entre dos replicones e incluso entre todos los replicones de una cepa (Mavingui *et al.* 2002), y además, se ha observado la formación de cointegrados estables entre plásmidos incompatibles (Brewin *et al.* 1980; Hooykaas *et al.* 1980; Ramírez-Romero *et al.* 1997). Sin embargo, hasta antes del presente

trabajo, no se habían realizado estudios sobre el mecanismo por el cual los plásmidos incompatibles forman cointegrados en lugar de desplazarse por incompatibilidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo incluyen la caracterización genética y funcional del gen de una nueva proteína, la resolvasa RinQ, codificada en el plásmido simbiótico p42d. Los experimentos realizados indican que una región del plásmido (rep/par) aunado a la proteína RinQ y sus sitios de acción, están involucrados en un novedoso mecanismo de incompatibilidad en el cual participan los procesos de recombinación homóloga, recombinación sitio-específica e incompatibilidad.

Los datos publicados en el artículo demuestran que el cointegrado que se forma entre los plásmidos incompatibles: pH3 y p42d, es el resultado de una recombinación entre las secuencias homólogas que comparten, mediada por RecA. Además, que el cósmido cGD47 también forma un cointegrado con el p42d, pero este se resuelve por la acción de una resolvasa sitio-específica (RinQ), lo cual permite la expresión de las propiedades de incompatibilidad entre ambos plásmidos. El mismo resultado que se obtiene con el cGD47 se observa con un plásmido derivado de pH3 (pH3-F317), que porta el sitio de acción de la resolvasa RinQ, en la misma orientación relativa con respecto al replicador que se encuentra en el p42d, éste forma un cointegrado con el p42d mediante la recombinación homóloga de las regiones de replicación/partición que ambos contienen, posteriormente, este cointegrado al poseer dos sitios de acción en orientación directa, se resuelve por la acción de RinQ, mediante recombinación sitio-específica en los dos sitios. La resolución del cointegrado genera dos nuevos plásmidos híbridos, ambos con la misma capacidad de replicar y por lo tanto, de ejercer incompatibilidad uno contra otro.

La generación de esos dos nuevos plásmidos nos permite visualizar una vía por medio de la cual se puede originar una enorme diversidad plasmídica. Lo estudiado aquí, es un ejemplo de lo que puede suceder cuando un plásmido se introduce a una bacteria que transporta un plásmido cercanamente relacionado.

Por otra parte, dentro de los sistemas de control de la partición de plásmidos, se encuentran los sistemas de resolución de multímeros: las recombinasas sitio-específicas, las cuales participan en el mantenimiento de plásmidos de bajo y de alto número de copias. Las resolvasas descritas tienen el papel de resolver el multímero y "convertirlo" en monómeros, permitiendo así que sean reconocidos por el sistema de partición activa y sean segregados

correctamente a las células hijas. Sin embargo, la inactivación de RinQ debido a una inserción mutacional en el gen, no tiene ningún efecto en la estabilidad del plásmido p42d. Este hecho ha sido reportado también para otras resolvasas (Gerlitz *et al.* 1990, Tolmasky, 2000), y puede explicarse por varias razones: 1) para que un fenotipo de inestabilidad se manifieste por causa de una resolvasa, se requiere de la existencia de un multímero y la ausencia de la resolvasa, aún contando con el segundo requisito, no siempre es posible encontrar cantidades detectables de plásmidos multiméricos a partir de cepas *recA*- o cepas silvestres *recA*+. Grandes cantidades de plásmidos diméricos se han aislado de cepas *recBC*- (Gerlitz *et al.* 1990), lo cual indica que en este fondo genético es más fácil evaluar el papel de una resolvasa en la resolución de multímeros y por lo tanto en la estabilidad del plásmido, 2) La resolución de un cointegrado, dímero o multímero, no solo depende de una resolvasa; dado que este tipo de moléculas tienen información duplicada e idéntica 100%, el sistema de recombinación homóloga puede encargarse de recombinar y resolver el multímero, 3) La existencia de varias resolvasas sitio-específicas (diferentes), en el mismo plásmido, con sus propios sitios y con la misma capacidad de estabilizar al plásmido, al participar en la resolución de multímeros; en la literatura se encuentra, por lo menos, un ejemplo de este último caso (Tolmasky, 2000).

La función encontrada para RinQ puede estimular el estudio de otros plásmidos que contienen resolvasas crípticas, en las cuales no se observa un fenotipo de estabilidad. La ausencia de una función como la que realiza RinQ, puede explicar el hecho de que plásmidos incompatibles de diferentes cepas formen frecuentemente cointegrados y rearreglos.

Existen recombinasas de la familia resolvasa/invertasa con alta homología a la resolvasa RinQ en otros replicadores *repABC*, y sorprendentemente, en la misma orientación con respecto al operón *repABC* (orientación invertida), y cerca de esa región de replicación/partición, lo cual señala que en estos plásmidos los módulos del mantenimiento plasmídico presentan una organización similar y que el mecanismo de incompatibilidad descrito en este trabajo puede estar presente también en esos plásmidos.

En conjunto, los resultados obtenidos representan un avance en el conocimiento de la biología de plásmidos de las Rhizobiaceas y de las funciones de las resolvasas sitio-específicas.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este trabajo son:

- 1) Delimitar el sitio de acción de RinQ y determinar los subsitios que lo componen.
- 2) Evaluar el papel de RinQ sobre la estabilidad del p42d en un fondo genético equivalente a *recBC*-.
- 3) Determinar la presencia de otros sistemas de resolución en el p42d que pudieran estar relacionados con su estabilidad.
- 4) Extrapolar los estudios realizados en este trabajo a otras recombinasas, como las relacionadas a RinQ que se localizan en otros plásmidos de la familia Rhizobiaceae.
- 5) Los cointegrados formados entre plásmidos incompatibles también pueden ser modelos para estudiar la interacción, en *cis*, entre dos regiones de replicación/partición similares, con el objetivo de determinar como funcionan los sistemas del control de la replicación y la partición en este tipo de moléculas, y si funcionan ambas regiones al momento de la replicación, o al momento de la partición, o solo una de ellas.
- 6) El sistema de resolución que provee la resolvasa RinQ y a sus sitios de acción puede ser utilizado como una herramienta genética. Este sistema, dado su sencillez, puede expresarse en otras bacterias e incluso eucariontes, y utilizarse para eliminar segmentos de DNA que se requieran quitar, para lo cual, solo se requiere bordear el segmento a eliminar por dos sitios de acción y proveer la resolvasa en *trans*. Debido a que este sistema es sitio-específico y solo requiere dos sitios de acción, tiene ventajas sobre: a) la creación de deleciones utilizando enzimas de restricción, cuyos sitios de reconocimiento pueden estar dentro (o muy lejos) del segmento que se desea remover, b) deleciones creadas por recombinación homóloga, cuya frecuencia es baja con respecto a la de las recombinasas sitio-específicas y debido a que las secuencias en directa repetida requeridas para crear deleciones, mediante recombinación homóloga, también pueden crear amplificaciones, y c) una resolvasa tiene ventajas sobre otro tipo de recombinasas sitio-específicas debido a que no requiere factores accesorios como los que necesitan las invertasas y las integrasas (Saucr, 1994; Huang *et al.* 1997; Yoon, 1998; Liu, 1998; Hochhut, 1999; Choi, 2000).

REFERENCIAS.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.

Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J. B., Haggard-Ljungquist, E., *et al.* 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* 5: 433-440.

Austin, S., Ziese, M. and Sternberg, N. 1981. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729-736.

Austin, S. and Nordström, K. 1990. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* 60: 351-354.

Bartosik, D., Wlodarczyk, M. y Thomas, C. M. 1997. Complete nucleotide sequence of replicator region of *Paracoccus (Thiobacillus) versutus* pTAV1 and its correlation to several plasmids of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Plasmid*. 38: 53-59.

Bartosik, D., Baj, J., and Wlodarczyk, M. 1998. Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology* 144: 3149-3157.

Bartosik, D., Baj, J., Piechucka, E., Waker, E. and Wlodarczyk, M. 2002. Comparative characterization of *repABC*-type replicons of *Paracoccus pantotrophus* composite plasmids. *Plasmid* 48: 130-41.

Bates, E.E. and Gilbert, H.J. 1989. Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Gene* 85: 253-258.

Berg, D.E. 1990. Genomic rearrangements in prokaryotes. In B.D.H. & D.M. Grovers (eds). *Gene Rearrangement* (pp. 1-50). Oxford: IRL Press.

Brendler, T. G., Abeles, A. L., Reaves, L. D. y Austin, S. J. 1997. The iteron bases and spacers of the P1 replication origin contain information that specifies the formation of a complex structure involved in initiation. *Mol. Microbiol.* 23: 559-567.

Brewin, N.J., Beringer, J.E. and Johnston, A.W.B. 1980. Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 120: 413-420.

Brom, S., García-de los Santos, A., Girard, M.L., Dávila, G., Romero, D. and Palacios, R. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. *J. Bacteriol.* 173: 1344-1346.

Brom, S., García-de los Santos, A., Stepkowski, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D. and Palacios, R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174: 5183-5189.

Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R. and Romero, D. 2000. In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* 44: 34-43.

Brom, S., Girard, L., García-de los Santos, A., Sanjuán-Pinilla, J.M., Olivares, J. and Sanjuan, J. 2002. Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2555-2561.

Brubaker, R.R. 1985. Mechanisms of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 21-50.

Burian, J., Stuchlik, S. y Kay, W. W. 1999. Replication control of a small cryptic plasmid of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 294: 49-65.

Camerini-Otero, R.D. and Hsieh, P. 1995. Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Genetics.* 29: 509-552.

Campbell, A.M. 1981. Some general questions about movable elements and their implications. *Colds Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45: 1-9.

Cevallos, M.A., Porta, H., Izquierdo, J., Tun-Garrido, C., García-de-los-Santos, A., Dávila, G. and Brom, S. 2002. *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. *Plasmid*: 48: 104-116.

Choi, S., Begum, D., Koshinsky, H., Ow, D.W. and Wing, R.A. 2000. A new approach for the identification and cloning of genes: the pBACwich system using Cre/lox site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 28, No. 7. e19: 1-7.

del Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M. 1993. Rolling circle-replicating plasmids from Gram-positive bacteria: a wall falls. *Mol. Microbiol.* 8: 789-796.

del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M. y Díaz-Orejas, R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microb. and Mol. Biol. Rev.* 62: 434-464.

Engelbert-Kulka, H. and Glaser G. 1999. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu.Rev.Microbiol.* 53: 43-70.

Espinosa, M., del Solar, G., Rojo, F. y Alonso, J. C. 1995. Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 111-120.

Flores, M., Brom, S., Stepkowski, T., Girard, M.L., Dávila, G., Romero, D. and Palacios, R. 1993. Gene amplification in *Rhizobium*: identification and in vivo cloning of discrete

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 4932-4936.

Flores, M., Mavingui, P., Perret, X., Broughton, W.J., Romero, D., Hernandez, G., Dávila, G. and Palacios, R. 2000. Prediction, identification, and artificial selection of rearrangements in *Rhizobium*: toward a natural genomic design. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 9138-9143.

Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. and Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387: 394-401.

Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C. and Batut, J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science 293: 668-672.

García-de los Santos, A., Brom, S., and Romero, D. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. World J. Microbiol. & Biotechnol. 12: 119-125.

García-de los Santos, A. and Brom, S. 1997. Characterization of two plasmid-borne *lpsB* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 891-902.

Garrity, G.M. (editor in chief). 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. Springer-Verlag, New York.

Gerlitz, M., Hrabak, O., and Schwab, H. 1990. Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination. *J Bacteriol* 172: 6194-203.

Giraldo, R., Andreu, J. M. y Díaz-Orejás, R. 1998. Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. The EMBO Journal. 17: 4511-4526.

Girard, M.L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. and Dávila, G. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli. *J. Bacteriol.* 165: 723-731.

Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberon, M., and Romero, D. 2000. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 1283-1292.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. and Slater, S. 2001. Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2323-2328.

Gopaul, N.D., Guo, F., and Van Duyne, G.D. 1998. Structure of the Holliday junction intermediate in *Cre-loxP* site-specific recombination. *EMBO J.* 17: 4175-4187.

Gordon, G.S. and Wright, A. 2000. DNA segregation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 681-708.

Grindley, N. D. F., Lauth, M. R., Wells, R. G., Wityk, R.J., Salvo, J. J., *et al.* 1982. Transposon-mediated site-specific recombination: identification of three binding sites for resolvase at the *res* site of $\gamma\delta$ and Tn3. *Cell* 30: 19-27.

Grindley, N.D.F. 1997. Site-specific recombination: synapsis and strand exchange revealed. *Curr. Biol.* 7: 608-612.

Hallet B. and Sherratt D.J. 1997. Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 157-78.

Hatfull, G.F., Salvo, J.J., Falvey, E.E., Rimphanitchayakit, V. and Grindley, N.D.F. 1988. Site-specific recombination by the $\gamma\delta$ resolvase. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 43: 149-181.

Helinski, D. R., Toukdarian, A. E. y Novick, R. P. (1996). Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids. En *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, *et al.*, ed.), 2a edic., pp. 2295-2324, ASM Press. Washington DC.

Hochhut, B. and Waldor, M.K. 1999. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol. Microbiol.* 32: 99-110.

Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5: 282-304.

Hooykaas, P. J. J., Den Dulk-Ras, H., Ooms, G., and Schilperoort, R. A. 1980 Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 143: 1295-1306.

Hooykaas, P. J. J., van Brussel, A.A.N., Den Dulk-Ras, H., Von Slogteren, G.M.S. and Schilperoort, R. A. 1981. Sym-plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291: 351-353.

Hooykas, P.J.J., Den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuink, A.J.G., van Brussel, A.A.N. and Schilperoort, R.A. 1985. Expression of a *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid in *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens*: incompatibility with a *Rhizobium* Sym plasmid. Plasmid 14: 47-52.

Huang, L., Wood, E.A. and Cox, M.M. 1997. Convenient and reversible site-specific targeting of exogenous DNA into a bacterial chromosome by use of the FLP recombinase: the FLIRT system. J. bacteriol. 179: 6076-6083.

Hughes, R.E., Rice, P.A., Steitz, T.A., and Grindley, N.D.F. 1993. Protein-protein interactions directing resolvase site-specific recombination: a structure-function analysis. EMBO J. 12: 1447-1458.

Hynes, M. F., Simon, R., and Pühler, A. 1985. The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAt C58. Plasmid 13: 99-105.

Hynes, M.F., Brucksch, K. and Priefer, U.B. 1988. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. Arch. Microbiol. 150: 326-332.

Jensen, R. B., Grohmann, E., Schwab, H., Díaz-Orejas, R. y Gerdes, K. 1995. Comparison of *cdd* of F, *parD* of RP4, and *parD* of R1 using a novel conditional replication system of plasmid R1. Mol. Microbiol. 17: 211-220.

Johnson, R.C., and Simon, M.I. 1985. Hin-mediated site-specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. Cell 41: 781-791.

Johnston, A.W.B., Hombrecher, G., Brewin, N.J. and Cooper, M.C. 1982. Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. J. Gen. Microbiol. 128: 85-93.

Kado, C. I. (1998). Origin and evolution of plasmids. Antonie van Leeuwenhoek. 73: 117-126.

Kamp, D., Kardas, E., Ritthaler, W., Sandulache, R., Schmucker, R. and Stern, B. 1984. Comparative analysis of invertible DNA in phage genomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49: 301-311.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA res. 7: 331-338.

Kawasaki, Y., Wada, C. y Yura, T. 1990. Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. Mol. Gen. Genet. 220: 277-282.

Koepsel, R.R., Murray, R.W. and Kahn, S.A. 1986. Sequence-specific interactions between the replication initiator protein of plasmid pT181 and its origin of replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 5484-5488.

Komano, T. 1999. Shufflons: Multiple inversion systems and integrons. Annu. Rev. Genet. 33: 171-191.

Konieczny, I. y Helinski, D. R. 1997. The replication initiation protein of the broad-host-range plasmid RK2 is activated by the ClpX chaperone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 14378-14382.

Kowalczykowski, S.C., Dixon, A.D., Eggleston, A.K., Lauder, S.D. and Rehrauer, W.M. 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 58: 401-465.

Kucherlapati, R. y Smith, G.R. 1988. Genetic recombination. Washington: American Society for Microbiology. pp. 3

Lederberg, J. 1952. Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiol. Rev. 32: 403-430.

Li, P.L. and Farrand, S.K. 2000. The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. J. Bacteriol. 182: 179-188.

Liu, Q., Li, M., Leibham, D., Cortez, D. and Elledge, S.J. 1998. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. Curr. Biol. 8: 1300-1309.

Martínez, E., Romero, D. and Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. Crit. Rev. Plant Sci. 9: 59-93.

Marczynski, G. T. and Shapiro, L. 1993. Bacterial chromosome origins of replication. Curr. Opin. Gen. Dev. 3: 775-782.

Mavingui, P., Flores, M., Guo, X., Dávila, G., Perret, X., Broughton, W.J. and Palacios, R. 2002. Dynamics of genome architecture in *Rhizobium sp.* Strain NGR234. J. Bacteriol. 184: 171-176.

Mercado-Blanco, J. and Olivares, J. 1993. Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4. Arch. Microbiol. 160: 477-485.

Merickel, S.K., Haykinson, M.J., and Johnson, R.C. 1998. Communication between Hin recombinase and Fis regulatory subunits during coordinate activation of Hin-catalyzed site-specific DNA inversion. Genes Dev. 12: 2803-2816.

Meselson, M.S., and Radding, C.M. 1975. A general model for genetic recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 358-361.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Møller-Jensen, J., Jensen, R.B. and Gerdes, K. 2000. Plasmid and chromosome segregation in prokaryotes. *Trends in Microbiol.* 8:313-320.

Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka, M., Tanaka, N. and Yoshida, K. 2001. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.* 307: 771-84.

Nash, H. 1996. Site-specific recombination: integration, excision, resolution, and inversion of defined DNA segments. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol. I. Curtis, R., III, Ingraham, J., Lin, E., Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Shaechter, M., and Umberger, H. (eds). Washington: American Society for Microbiology Press, pp. 2363-2376.

Nester, E. W. y Kosuge, T. 1981. Plasmids specifying plant hyperplasias. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 531-565.

Nishiguchi, R., Takanami, M. and Oka, A. 1987. Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy-root-inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.* 206: 1-8.

Nordström, K. and Austin, S.J. 1989. Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Ann. Rev. Genet.* 23: 37-69.

Novick, R.P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51: 381-395

Novick, R.P. 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 537-565.

O'Connell, M. P., Dowling, D., Neilan, J., Simon, R., Dunican, L. K., and Puehler, A. 1984. Plasmid interactions in *Rhizobium*: incompatibility between symbiotic plasmids. In *Advances in Nitrogen Fixation Research*, p.713. Edited by C. Veeger and W. E. Newton. The Hague: Nijhoff Junk.

O'Connell, M. P., Hynes, M. F., and Puehler, A. 1987. Incompatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and Ri plasmid of *Agrobacterium*. *Plasmid* 18: 156-163.

Plasterk, R.H., Imer, T.A.M., and Van de putte, P. 1983b. Site-specific recombination by Gin of bacteriophage Mu : inversions and deletions. *Virology* 127: 24-36.

Plasterk, R.H., and Van de Putte, P. 1984. Genetic switches by DNA inversions in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 782: 111-119.

Pritchard, R.H. 1984. Control of the DNA replication in bacteria. In P. Nurse & E. Streiblova (eds). *The Microbial Cell Cycle* (pp. 19-27). Boca Raton, FL: CRC Press.

Ramírez-Romero, M.A., Bustos, P., Girard, L., Rodríguez, O., Cevallos, M.A. and Dávila, G. 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* 143: 2825-2831.

Ramírez-Romero, M. A., Soberón, N., Pérez-Oseguera, A., Téllez-Sosa, J., and Cevallos, M. A. 2000. Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* Symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 182: 3117-3124.

Rawlings, D.E. and Tietze, E. 2001. Comparative Biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 481-496.

Reed, R.R., and Grindley, N.D.F. 1981b. Transposon-mediated site-specific recombination in vitro: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site. *Cell* 25: 721-728.

Rigottier-Gois, L., Turner, S.L., Young, J.P.W. and Amarger, N. 1998. Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* from field populations. *Microbiology* 144: 771-780.

Romero, D., Martínez-Salazar, J., Girard, L., Brom, S., Dávila, G. *et al.* 1995. Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J. Bacteriol.* 177: 973-980.

Romero, D. and Palacios, R. 1997. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 31: 91-111.

Romero, D., Dávila, G. and Palacios, R. 1997. The dynamic genome of *Rhizobium*. In *Bacterial Genomes: physical structure and analysis*, pp. 153-161. Edited by F.J. de Bruijn., J.R. Lupski and G. Weinston. New York: Chapman and Hall.

Sadowski, P. 1986. Site-specific recombinases: Changing partners and Doing the Twist. *J. of bacteriol.* 165: 341-347.

Salmon, M. A., L. van Melderen, P. Bernard, and M. Couturier. 1994. The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey. *Mol. Gen. Genet.* 244: 530-538.

Sarkis, G.J., Murley, L.L., Lesschziner, A.E., Brocock, M.R., Stark, W.M., and Grindley, N.D. 2001. A model for the $\gamma\delta$ -resolvase synaptic complex. *Molecular Cell.* 8: 623-631.

Sauer, B. 1994. Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 521-527.

Silverman, M., and Simon, M. 1983. Phase variation and related systems. In J. A. Shapiro (ed.) *Mobile Genetic Elements*. Academic press, Inc., New York. p. 537-557.

Simon, M., and Herskowitz, I. (ed.). 1985. *Genome rearrangement*. Alan R. Liss, Inc., New

York.

Smith, M.C.M. and Thorpe, H.M. 2002. Diversity in the serine recombinases. *Mol. Microbiol.* 44: 299-307.

Sompayrac, L. and Maaloe, O. 1973. Autorepressor model for control of DNA replication. *Nat. New. Biol.* 241: 133-135.

Sozhamannan, S., and D. K. Chattoraj. 1993. Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiator binding to the origin. *J. Bacteriol.* 175: 3546-3555.

Stark, W.M., Boocock, M.R., and Sherrat, D.J. 1992. Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 8: 432-439.

Sullivan, J.T. and Ronson, C.W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500 kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5145-5149.

Summers, D. K. 1996. The biology of plamids. pp. 1-91. Blackwell Sience, Inc., USA.

Suzuki, K., Ohta, N., Hattori, Y., Uraji, M., Kato, A. and Yoshida, K. 1998. Novel structural difference between nopaline- and octopine-type *irbJ* genes: construction of genetic and physical map and sequencing of *irbIraI* and *rep* gene clusters of a new Ti plasmid pTi-SAKURA. *Biochim. Biophys.Acta.* 1396: 1-7.

Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., Kato, A. and Yoshida, K. 2000. Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid. *Gene* 242: 331-336

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. 1983. The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35.

Tabata, A., Hooykaas, P.J.J. and Oka, A. 1989. Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J.Bacteriol.* 171: 1665-1672.

Tolmasky, M.E., Colloms, S., Blakely, G. and Sherratt, D.J. 2000. Stability by multimer resolution of pJHCMW1 is due to the Tn1331 resolvase and not to the *Escherichia coli* Xer system. *Microbiology* 146: 581-589.

Tomizawa, J. 1990a. Control of ColE1 plasmid replication. Intermediates in the binding of RNA I and RNA II. *J.Molec.Biol.* 212: 683-694.

Turner, S. and Young, P.W. 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid PRL8JI. *FEMS Microbiol. Lett.* 133: 53-58.

Weisberg, R.A., and Landy, A. 1983. Site-specific recombination in phage lambda. In R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl, and R.A. Weisberg (ed.), Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

White, F. F. Nester, E. W. 1980. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. J. Bacteriol. 144: 710-720.

Yasukawa, H., Viller, E., and Masamune, Y. 1998. Identification of the region required for monomerization of the rolling circle plasmid pKYM. DNA Res. 5: 11-14.

Yoon, Y.G., Cho, J.H. and Kim, S.C. 1998. Cre/loxP-mediated excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. Genetic Analysis: Biomol. Eng. 14: 89-95.

Zeig, J., Silverman, M., Hilmen, M., and Simon, M. 1977. Recombinational switch for gene expression. Science 196: 170- 172.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALLA DE ORIGEN
TESIS CON