



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ANALISIS GENETICO DE GENES INVOLUCRADOS EN LA PRE-SINAPSIS DE RECOMBINACION HOMOLOGA EN *Rhizobium etli*

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO
EN DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :
Q. F. B. JACOBO ZUÑIGA CASTILLO**

TUTOR: DR. JAIME M. MARTINEZ SALAZAR



CUERNAVACA, MOR

DICIEMBRE DEL 2004



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.

INDICE

ABSTRACT	2
RESUMEN	4
INTRODUCCION	6
- Lesiones en el DNA	6
- Respuesta SOS	7
- Sistemas de reparación reversible en una cadena en procariontes	10
- Sistemas de reparación mediados por recombinación homóloga	11
- Modelo de recombinación homóloga	13
- Vías de recombinación homóloga en bacterias	16
- Mecanismo de formación del 3´-OH-ssDNA (pre-sinápsis)	18
- Procesamiento de SSGs	18
- Procesamiento de DSBs	20
- Generalidades de las Rhizobiaceas	23
- Dinámica del genoma de las rhizobias	24
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	26
RESULTADOS	28
The recombination genes <i>addAB</i> are not restricted to Gram-positive bacteria: Genetic analysis of the recombination initiation enzymes RecF and AddAB in <i>Rhizobium etli</i> .	
RESULTADOS ADICIONALES	29
- Análisis bioinformático de la proteína RecF	29
- Analisis bioinformático de las proteínas AddA y AddB	32
- Origen evolutivo de los genes <i>addA</i> y <i>addB</i>	34
- Análisis del contenido de GC	34
- Frecuencia de uso de codones	36
- Análisis de la sintenia	36
- Caracterización molecular de las mutantes de <i>R. etli</i>	40
- La recombinación post-conjugacional es independiente de RecF y AddAB	43
- Expresión genética de los genes <i>addAB</i> de <i>R. etli</i>	46
DISCUSION Y PERSPECTIVAS	51
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA	64

ABSTRACT

Single-strand gaps (SSGs) and double-strand breaks (DSBs) are the major initiation sites for recombination. In bacteria, the SSGs are repaired by RecFOR, while the DSBs are processed by RecBCD in Gram-negative bacteria and AddAB in Gram-positive bacteria. Unexpectedly, instead of *recBCD* genes, the *addAB* genes were found in members of the alpha-proteobacteria group (Gram-negative). In addition *recF* gene was found. Taking *Rhizobium etli* as a model, the role of *recF* and *addAB* genes in homologous recombination and repair of damaged DNA was evaluated. To that end, strains harboring *recF::loxP*Sp, *addA::loxP*Sp and *recF::loxP-addA::loxP*Sp were generated by homologous gene replacement.

Inactivation of either *recF* or *addA* provoked strong sensitivity to UV radiation and mitomycin C, while an additive effect was observed in the *recF-addA* mutant. The DSBs generated by nalidixic acid caused low viability only in the *addA* mutant.

The recombination frequency of large and small plasmids was reduced in the *recF* mutant (24- and 36-fold, respectively), whereas a slight decrease (threefold) in the *addA* mutant was observed. Moreover, an additive effect (47- and 90-fold, respectively) was observed in the double mutant, but it was not as dramatic as that in a *recA* mutant. Interestingly, the frequency of deletion and Campbell-type recombination was slightly affected in either single or double mutants.

These results suggest that in *R. etli*: i) SSGs are repaired by RecFOR pathway while DSBs by AddAB pathway, ii) recombination of small and large plasmids depends on RecFOR pathway, ii) another pathway exists that allows deletion and Campbell-type recombination in the absence of *recF* and *addA* genes.

RESUMEN

Las discontinuidades de cadena sencilla (SSGs) y las rupturas en doble cadena (DSBs) son los sitios mayoritarios de inicio de recombinación. En bacterias, las SSGs son reparadas por RecFOR, mientras que las DSBs son procesadas por RecBCD en bacterias Gram-negativas y AddAB en Gram-positivas. Inesperadamente, en miembros del grupo de las alfa-proteobacterias (Gram-negativas) en lugar de los genes *recBCD* se encontraron los *addAB*, además del gen *recF*. Considerando a *Rhizobium etli* como modelo, se evaluó el papel de los genes *recF* y *addAB* en la recombinación homóloga y reparación del DNA dañado. Para ello, se construyeron las cepas *recF::loxP*Sp, *addA::loxP*Sp y *recF::loxP-addA::loxP*Sp mediante reemplazamiento genético.

La inactivación de *recF* o *addA* provocó una fuerte sensibilidad a radiación UV y mitomicina C, mientras que un efecto aditivo se observó en la cepa *recF-addA*. Las DSBs generadas por el ácido nalidíxico provocaron una baja viabilidad solamente en la mutante *addA*.

La frecuencia de recombinación de plásmidos pequeños y de alto peso molecular disminuyó en la mutante *recF* (24- y 36-veces, respectivamente), mientras que la mutante *addA* presentó una ligera disminución (3 veces). Además en la doble mutante se observó un efecto aditivo (47- y 90-veces, respectivamente), aunque éste no fué tan dramático como una mutante *recA*. Interesantemente, la frecuencia de deleción y recombinación tipo Campbell se afectó ligeramente en las

mutantes sencillas y en la doble. Estos resultados sugieren que en *R. etli*:

- i) las SSGs son reparadas vía RecFOR y las DSBs vía AddAB, ii) la recombinación de plásmidos pequeños y de alto peso molecular depende de la vía RecFOR, iii) existe otra vía que en ausencia de los genes *recF* y *addA* permite la delección y la recombinación tipo Campbell.

INTRODUCCION

Lesiones en el DNA.

En los organismos, el DNA al igual que otras macromoléculas experimenta lesiones durante el proceso de replicación, por productos del metabolismo o por agentes externos a la célula. Debido a que el DNA sirve de templado para su propia replicación y la transcripción, la reparación de cualquier lesión es esencial para el buen funcionamiento y la conservación de la información genética. Las lesiones del DNA pueden originarse de forma intrínseca por metabolitos de desecho (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) o extrínseca por agentes extracelulares (radiación UV, sustancias químicas, etc.). Ambas fuentes generan: a) la depurinación o desaminación hidrolítica de bases, b) la formación de aductos covalentes en el DNA (dímeros de timina, bases metiladas, cadenas entrecruzadas) y c) la oxidación de bases. Se ha estimado que los daños mas frecuentes ocurren en una cadena, sin embargo las rupturas en doble cadena (DSBs, double strand breaks) aunque son poco frecuentes resultan altamente tóxicas al atentar la integridad del genoma. Este tipo de lesiones solamente son reparadas por los sistemas de recombinación homóloga (Kuzminov, 1999; Norbury y Hickson, 2001).

Las DSBs son generadas principalmente por: radiación ionizante, inhibidores de topoisomerasas (antibióticos) y la replicación de DNA que contiene discontinuidades de cadena sencilla (SSGs, single strand gaps)

(Cox, 2001; Kowalczykowski, 2000; Kuzminov, 1999). La radiación ionizante (rayos X y γ) genera radicales libres que causan varios tipos de lesiones en el DNA, incluyendo la ruptura de los enlaces fosfodéster cercanos a un sitio (Kuzminov, 1999); los antibióticos como el norfloxacino y el ácido nalidíxico son inductores indirectos de DSBs, ambos inhiben la subunidad beta de la enzima DNA girasa encargada del corte y unión del DNA en el proceso del superenrollamiento (Sugino *et al.*, 1977). Durante el proceso de la replicación del DNA se generan SSGs de manera normal debido a que las DNA polimerasas solo sintetizan en dirección 5'-3' y como consecuencia la síntesis de una de las dos cadenas es discontinua (fragmentos de Okazaki), mientras que los DSBs se generan cuando la DNA polimerasa encuentra un corte en alguna de las dos cadenas (Cox, 2001; Kowalczykowski, 2000). Por otro lado, si la horquilla de replicación encuentra dímeros de timina, cadenas entrecruzadas generadas por psoraleno o mitomicina C no reparados, se desacopla y re-inicia en un punto posterior al sitio del daño generando un SSG (Cox, 2001; Kowalczykowski, 2000; Kuzminov, 1999).

Respuesta SOS.

En procariontes como la bacteria *Escherichia coli* la capacidad reparadora del DNA es inducible en respuesta al DNA dañado, denominada respuesta SOS (Kuzminov, 1999). La respuesta SOS

comprende alrededor de 20 genes (Tabla 1) que son expresados en forma ordenada y secuencial, que incluyen: a) la inducción de proteínas del sistema de escisión de nucleótidos (NER, Nucleotide Excision Repair) que contienen con daño en una cadena del DNA; b) el incremento de la expresión de la proteína DNA polimerasa I que sintetiza la cadena complementaria en regiones que contienen SSGs; c) el incremento en la concentración celular de las proteínas RecA y RecN (más de 50 veces), así como otras implicadas en la reparación recombinacional; d) el desacople del replisoma y re-inicio de la replicación en un punto posterior a la lesión, fenómeno denominado reactivación del replisoma; y e) la sobreproducción de la proteína SfiA la cual inhibe la división celular dando tiempo para que ocurra la reparación recombinacional. Cuando la reparación recombinacional no puede eliminar las lesiones, las enzimas UmuD'C y DNA polimerasa IV catalizan la replicación del DNA aún cuando éste contiene sitios sin bases nitrogenadas que sirvan de templado (síntesis translesión), la cual aunque introduce mutaciones permite replicar el DNA (Kuzminov, 1999).

El sistema SOS es regulado por el represor LexA. Esta proteína forma dímeros que se unen a la secuencia palindrómica 5'-TACTGTATATATACAGTA-3' (caja SOS) ubicada en la región promotora de los genes SOS impidiendo el inicio de la transcripción. En presencia de DNA de cadena sencilla (ssDNA, single-stranded DNA), la proteína RecA se activa (RecA*) y promueve la autodegradación de LexA evitando la formación de complejos represores e incrementando la

expresión de los genes SOS. Se ha observado que RecA* también es capaz de promover la autodegradación de otros represores, incluyendo los de algunos profágos (Kuzminov 1999; Little and Mount, 1982; Walker, 1996).

Tabla 1 Proteínas inducidas durante la respuesta SOS de *E. coli*^a.

Gen	Proteína/ Función	No. de copias/célula	
		Nivel basal	Nivel inducido
Respuesta primaria			
<i>lexA</i>	LexA/Represor de SOS	1,300	1
<i>uvrA</i>	Escinucleasa UvrABC/NER	20	250
<i>uvrB</i>	Escinucleasa UvrABC/NER	250	1,000
<i>uvrD</i>	Helicasa II/NER y recombinación	5,000-8,000	25,000-65,000
<i>polB</i>	DNApol II/Síntesis translesión	40	300
<i>ruvA</i>	Helicasa RuvAB/Recombinación	700	5,600
<i>ruvB</i>	Helicasa RuvAB/Recombinación	200	1,600
<i>dinI</i>	Inhibe el procesado de UmuD	500	2,300
Respuesta secundaria			
<i>recA</i>	Co-proteasa-activadora de SOS/Recom.	1,000-10,000	100,000
<i>recN</i>	RecN/Recombinación	-----	-----
Respuesta terciaria			
<i>sfiA</i>	SfiA(SulA)/Inhibidor de división celular	-----	-----
<i>umuD</i>	Subunidad de UmuD' C/Síntesis translesión	180	2,400
<i>umuC</i>	Subunidad de UmuD' C/Síntesis translesión	0	200

a. Tabla tomada y modificada de Kuzminov, 1999

En eucariontes, en lugar de una respuesta SOS existen los puntos de monitoreo (checkpoints). Durante cada etapa del ciclo celular, al final de la misma se revisa que los procesos hayan concluido de manera correcta. En caso contrario debido a la presencia de daño, la célula detiene el ciclo celular para que la maquinaria de reparación restaure la integridad genómica (Kuzminov, 1999; Norbury y Hickson, 2001).

Debido a la diversidad de daños, la evolución ha desarrollado diferentes mecanismos y enzimas en bacterias y eucariontes para mantener la integridad del genoma. Kuzminov, agrupa a los sistemas de

reparación en: a) reversibles, b) reparación mediada por una cadena y c) reparación que requiere de otra molécula de DNA (recombinación homóloga) (Kuzminov, 1999).

Sistemas de reparación reversibles en una cadena en procariontes.

En *E. coli*, las bases nitrogenadas alteradas (oxidadas, acetiladas, metiladas, etc) son removidas por enzimas del sistema de escisión de bases (BER, Base Excision Repair), el cual restaura el DNA a través de la remoción y re-síntesis de la base modificada (Norbury y Hickson, 2001). Las lesiones que distorsionan el DNA (aductos, dímeros de timina, etc.) son eliminadas por el sistema de escisión de nucleótidos (NER, Nucleotide Excision Repair), el cual remueve segmentos de 12- 13 nucleótidos alrededor del daño que posteriormente re-síntetiza. Por último, el sistema de corrección de apareamientos incorrectos (MMR, Methyl-directed Mismatch Repair), remueve las uniones A-C, T-G, y bases inapropiadas (3-metil-guanosina, 5-hidroxi-uracilo, etc) incorporadas durante la replicación del DNA. Este sistema dependiente de metilación es responsable de mantener la integridad del genoma durante la replicación, remueve regiones de 300-1000 nucleótidos no metiladas que son re-síntetizadas utilizando como templado la cadena metilada (Eisen y Hanawalt, 1999; Norbury y Hickson, 2001).

De acuerdo con un estudio filogenético, la mayoría de los genes de los sistemas NER, BER y MMR están ampliamente distribuidos y

conservados en procariontes (Eisen y Hanawalt, 1999). En eucariontes existen sistemas de reparación equivalentes a los descritos en *E. coli*, aunque en la mayoría de los casos los genes no son homólogos de los bacterianos; sin embargo las actividades bioquímicas se conservan (Norbury y Hickson, 2001).

Sistemas de reparación mediados por recombinación homóloga.

El proceso de recombinación homóloga en bacterias fue considerado inicialmente como un mecanismo de generación de variabilidad, similar a lo que ocurre en eucariontes durante la reproducción sexual; sin embargo las mutantes en los genes de recombinación presentaban una alta sensibilidad a los agentes que dañan el DNA (Horii y Clark, 1973). Lo anterior, permitió postular que la recombinación homóloga desempeña un papel importante en la reparación del DNA (reparación recombinacional), además de promover el intercambio de cadenas para generar variabilidad genética (Kuzminov, 1999).

La recombinación homóloga esta involucrada en la reparación de DSBs y SSGs, para ello depende de una copia homóloga la cual es empleada como templado (Cox, 2001; Kowalczykowski, 2000; Kuzminov, 1999). Este sistema es vital para el caso de DSBs, ya que permite mantener el material genético sin la pérdida de información. En particular en *E. coli*, se han descrito tres mecanismos de reparación recombinacional: a) la reparación de SSGs (DSGR, daughter strand gap

repair) que depende de la enzima RecFOR; b) la reparación de DSBs (DSBR, double strand end repair) promovida por el complejo RecBCD y c) la reparación por alineamientos de cadena sencilla (SSA, single strand annealing) procesado por la enzima RecE (Fig. 1). Cabe mencionar que las dos primeras enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias, mientras que la última es codificada por el profágo Rac en la cepa de *E. coli* K12, aunque muchos fagos también tienen este tipo de enzima (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kowalczykowski, 2000).

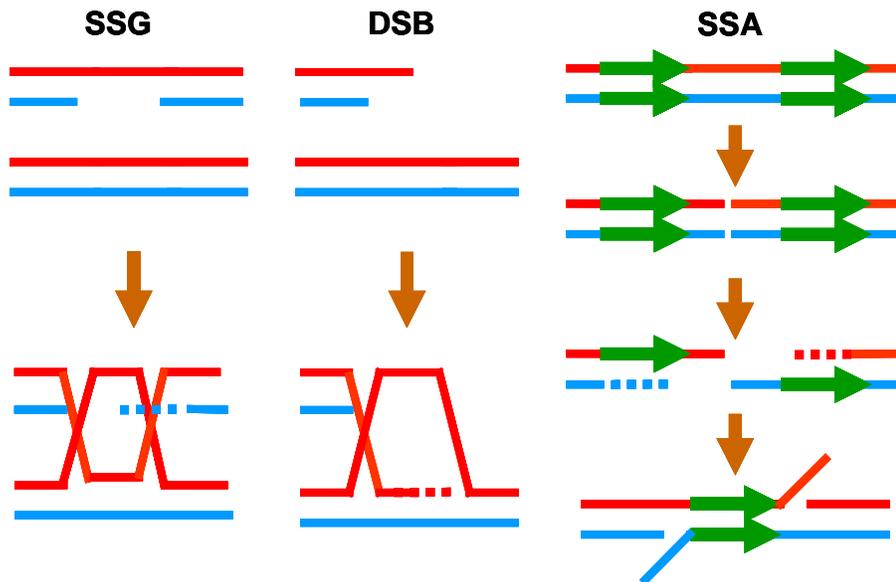


Figura 1.- Modelos de reparación recombinacional del DNA en *E. coli*. Figuras tomadas de Kowalczykowski, 2000; Kuzminov, 1999.

Recientemente se ha reportado que algunas bacterias (*Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces pyogenes*, *etc.*) tienen genes homólogos a *Ku70*, *Ku80* y *Lig IV* de eucariontes, cuyos productos son capaces de unir DSBs en ausencia de homología (NHEJ, nonhomologous end-joining). En *B. subtilis* la inactivación de los genes

que codifican para *Ku-like* y *Lig IV* provocó una fuerte sensibilidad a la radiación ionizante indicando que estos genes están involucrados en la reparación de DSBs (Weller *et al.*, 2002).

Modelo de recombinación homóloga en *E. coli*.

Los estudios genéticos y bioquímicos realizados en *E. coli* y eucariontes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Ascobolus*, etc.) han permitido definir cuatro etapas sucesivas del proceso de recombinación homóloga; pre-sinápsis, sinápsis, migración del heterodúplex y resolución (Kowalczykowski *et al.*, 1994) (Fig 2).

La pre-sinápsis consiste en la formación de un DNA de cadena sencilla con extremo 3'-OH (3'-OH-ssDNA). El 3'-OH-ssDNA es creado por procesamiento de SSGs o DSBs y tiene la capacidad de invadir la región homóloga de una segunda molécula, como resultado se establece la sinápsis entre las dos moléculas (Fig 2). En la sinápsis, el 3'-OH-ssDNA funciona como iniciador de la replicación, de forma que la polimerización desplaza una cadena de la segunda molécula generando una estructura de "D" (D-loop). La cadena desplazada establece un intercambio recíproco de cadenas formando una región de heterodúplex denominada estructura de Holliday (Fig 2). Esta estructura tiene la capacidad de migrar en cualquier sentido, promoviendo extensiones variables en el heterodúplex. Finalmente el intermediario de Holliday es resuelto a través de cortes simétricos, dependiendo del sitio de corte se pueden generar dos tipos de

productos. Los recombinantes recíprocos (que poseen cadenas de ambos DNAs parentales) y los recombinantes parciales (en donde sólo un sector se transfiere a la segunda molécula) (Kowalczykowski *et al.*, 1994).

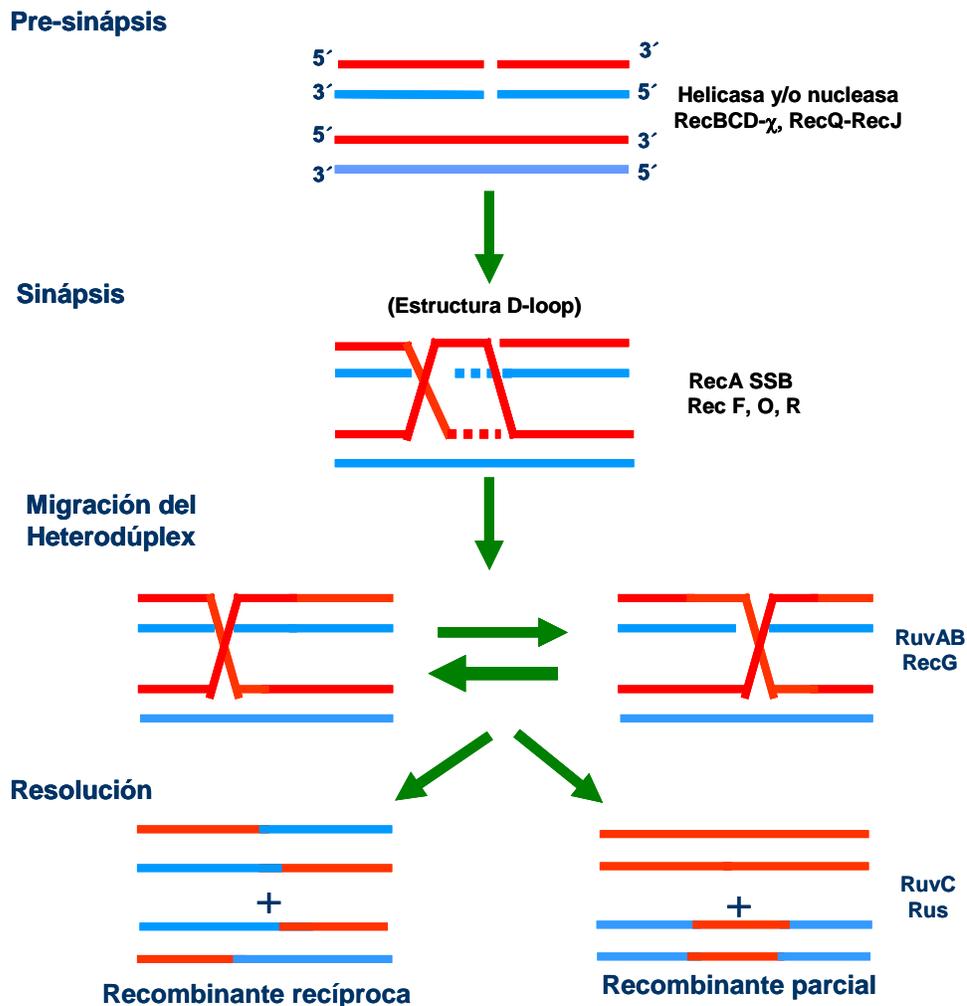


Figura 2.- Modelo bioquímico de recombinación homóloga en *E. coli*. Tomado y modificado de Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kowalczykowski, 2000.

Los análisis genéticos realizados en *E. coli* y *B. subtilis* han identificado y caracterizado alrededor de 25 genes involucrados en el proceso de recombinación homóloga (Tabla 2) (Fernández *et al.*, 2000; Kowalczykowski *et al.*, 1994). La mayoría de estos genes se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias. En eucariontes actividades

bioquímicas similares a las descritas en bacterias pueden ser codificadas por genes no homólogos a los bacterianos (Camerin-Otero y Heish, 1995; Norbury y Hickson, 1999; West, 1992).

Tabla 2 Proteínas y sitios involucrados en recombinación homóloga de *B. subtilis* y *E. coli*^a.

<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Actividad
RecA	RecA	Entrecruzamiento de cadenas, Renaturaliza el DNA, ATPasa dependiente de DNA, Co-proteasa dependiente de ATP y de DNA.
AddAB	RecBCD (ExoV)	DNA Helicasa, Exonucleasa de ssDNA y dsDNA ATP-dependiente.
RecE*	RecE* (ExoVIII)	Exonucleasa de ssDNA 5'-3'.
RecD	?	Desconocida.
RecF	RecF	Une ssDNA y dsDNA de forma ATP dependiente.
RecG	RecG	Migración de la estructura de la Holliday, Helicasa de DNA.
RecH	?	Desconocida.
RecJ	RecJ	Exonucleasa de ssDNA 5'-3'.
RecL	?	Desconocida, en <i>B. subtilis</i> interacciona con RecFOR.
RecN	RecN	ATPasa, probable helicasa de DNA.
RecO	RecO	Renaturaliza DNA, interacciona con RecF-RecR.
RecP	?	Desconocida.
RecQ	RecQ	Helicasa de DNA.
RecR	RecR	Une ssDNA y dsDNA, interacciona con RecO y RecF.
RecS	No	Helicasa de DNA.
RecT*	RecT*	Renaturaliza el DNA.
RecU	No	Renaturaliza el DNA.
RuvA	RuvA	Unión a estructuras de Holliday, interacciona con RuvB.
RuvB	RuvB	Migración de la estructura de Holliday, interacciona con RuvA.
No	RuvC	Resuelve estructura de Holliday, interacciona con RuvB y RuvA.
SbcB	SbcB (ExoI)	Exonucleasa de ssDNA 3'-5'.
SbcCD	SbcCD	Exonucleasa de dsDNA dependiente de ATP.
SSB	SSB	Une ssDNA.
TopoI	TopoI	Topoisomerasa de DNA tipo I.
Girasa	Girasa	Topoisomerasa de DNA tipo II.
Ligasa	Ligasa	Ligasa de DNA.
Pol I	Pol I	DNA polimerasa, exonucleasa 5'-3' y 3'-5'.
Hel II	Hel II	Helicasa de DNA.
Hel IV	Hel IV	Helicasa de DNA.
Chi (χ)	Chi (χ)	Secuencia moduladora de la actividad de nucleasa de AddAB (5'-AGCGG-3') y RecBCD (5'-GCTGGTGG-3'), respectivamente.

^a Datos tomados de las tablas presentes en Fernández *et al.*, 2000 (*B. subtilis*) y Kowaczykowski *et al.*, 1994 (*E. coli*). * Presentes en profágos (SKIN en *B. subtilis* y Rac en *E. coli*). ? no tiene homólogo.

El gen *recA* es crucial dentro del proceso, su inactivación provoca una severa disminución en la capacidad de reparación y recombinación (Clark, 1973). Este efecto es debido a que promueve una eficiente invasión del 3'-OH-ssDNA y un adecuado apareamiento de las cadenas (Cox, 1991).

Dentro del proceso de recombinación homóloga diferentes enzimas participan alternativamente en una misma etapa, algunas de ellas son estructuralmente diferentes pero con actividades enzimáticas similares. En la pre-sinápsis, las enzimas RecBCD, RecFOR, RecQJ y RecE actúan alternativamente en la generación del 3'-OH-ssDNA; mientras que la migración del heterodúplex es promovida por RuvAB y RecG; finalmente la resolución de la estructura de Holliday es realizada por RuvC y Rus (Fig. 2).

Vías de recombinación homóloga en bacterias.

Los estudios pioneros de recombinación conjugacional revelaron que en *E. coli* existen tres vías de recombinación: vía RecBCD, vía RecFOR y vía RecE, nombradas así por los principales genes que participan en cada una (Horii y Clark 1973; Clark y Sandler, 1994). Los estudios genéticos y bioquímicos indican que estas enzimas están implicadas en la etapa pre-sináptica (formación del 3'-OH-ssDNA) de diferentes sustratos a recombinar DSBs, DNA lineal (dsDNA), SSGs y DNA circular cerrado (Kowalczykowski *et al*, 1994).

En una cepa silvestre, la vía RecBCD es la responsable de reparar DSBs y recombinar dsDNA presente en los eventos de transducción, conjugación y transformación (Cox, 2001; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kowalczykowski, 2000) (Fig. 2). En contraste, la vía RecFOR recombina y repara DNA con SSGs y moléculas de DNA circular cerrado (plásmidos), y

sólo contribuye en 1% a la recombinación conjugacional (Fig. 3) (Bork *et al.*, 2001; Cohen y Laban, 1983; James *et al.*, 1982; Laban y Cohen, 1981; Morimatsu y Kowalczykowski, 2003; Umezú *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999).

En ausencia de RecBCD y de la exonucleasa I (*sbcBC*), las moléculas con DSBs son recombinadas por la vía RecFOR reclutando otras proteínas con actividad de helicasa (RecQ) y exonucleasa de ssDNA (RecJ) que generan el 3'-OH-ssDNA (Fig. 2) (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kuzminov, 1999). La vía RecE, presente en algunas cepas de *E. coli* es activada por una mutación (*sbcA*) que provoca la expresión de los genes *recE* (exo VIII) y *recT* (recombinasa de cadena sencilla) codificados por el profago críptico Rac. Estas enzimas promueven la reparación de DSBs y SSGs, así como en la recombinación de dsDNA y de plásmidos (Cohen y Laban, 1983; James *et al.*, 1982; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Laban y Cohen, 1981; Luisi-DeLuca *et al.*, 1989). RecE complementa la ausencia de las proteínas RecBCD y RecJ, mientras que RecT reemplaza la ausencia de RecA (Kowalczykowski *et al.*, 1994).

En la bacteria Gram-positiva *B. subtilis* se han descrito un número de genes de recombinación similar al de *E. coli* (Tabla 2). Aunque en esta bacteria no se han definido vías de recombinación, los estudios basados en los fenotipos de reparación y recombinación han permitido organizar a los genes en cinco grupos epistáticos (α , β , γ , ε y ξ) (Alonso *et al.*, 1988; Alonso *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 2000). De estos cinco grupos, los α y

β son la contraparte de las vías RecBCD y RecFOR en *E. coli*, respectivamente (Fernández *et al.*, 2000).

Mecanismo de formación del 3'-OH-ssDNA (pre-sinápsis).

En bacterias, los DSBs y SSGs son los sitios de inicio de recombinación homóloga. El procesamiento de estas lesiones genera el extremo 3'-OH-ssDNA, sustrato recombinogénico clave para el inicio de la recombinación homóloga. En *E. coli* el extremo es generado por la enzima RecFOR a partir de SSGs, esta enzima se ha encontrado en la mayoría de las eubacterias; mientras que el extremo generado a partir de DSBs es procesado por RecBCD en *E. coli* (Gram-negativas) o por AddAB en *B. subtilis* (Gram-positivas) (Chédin y Kowalczykowski, 2002).

Procesamiento de SSGs.

El mecanismo bioquímico de formación del extremo invasor a partir de SSGs requiere de la participación del complejo RecFOR, helicasas y exonucleasas. Las proteínas RecFOR delimitan la zona a recombinar a través de su unión en el extremo 5' de la discontinuidad en donde existe dsDNA y ssDNA (Fig. 3). Se ha propuesto que las actividades de RecQ (helicasa) y RecJ (exonucleasa) promueven la formación del extremo 3'-OH-ssDNA. Esto permite que la proteína RecA se polimerice sobre el

ssDNA y promueva la invasión y apareamiento de la cadena homóloga (sinápsis) (Fig 3). Posteriormente la discontinuidad es rellenada por la DNA polimerasa I (Morimatsu y Kowalczykowski, 2003).

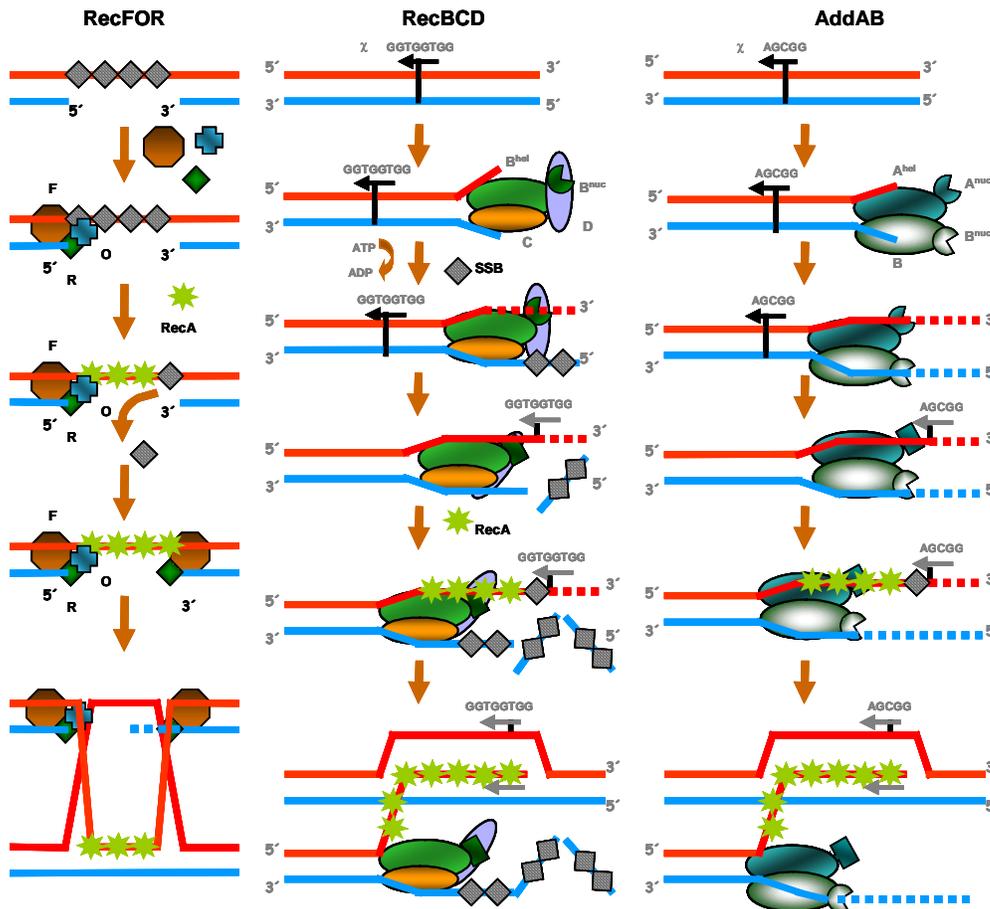


Figura 3.- Mecanismo enzimático para RecFOR, RecBCD y AddAB en la formación del extremo 3'-OH-ssDNA a partir de SSGs y DSBs. Figuras tomadas de Spies y Kowalczykowski, 2004; Quiberoni *et al.*, 2001a.

Cabe mencionar que la inactivación del complejo RecFOR no afecta la viabilidad celular seriamente, aunque la reparación recombinacional de SSGs y el re-inicio de horquillas de replicación detenidas por dímeros de timina está gravemente comprometida, así como la recombinación de plásmidos (Cohen y Laban, 1983; Cox, 2001; James *et al.*, 1982;

Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kowalczykowski, 2000; Kuzminov, 1999; Laban y Cohen, 1981; Luisi-DeLuca *et al.*, 1989).

Procesamiento de DSBs

En *E. coli*, los DSBs son procesados por el complejo RecBCD y en *B. subtilis* éstos dependen del complejo AddAB (Fernández *et al.*, 2000; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Kuzminov, 1999). En general, ambas enzimas tienen mecanismos y actividades (helicasa/exonucleasa) similares que de manera coordinada y regulada generan el extremo 3'-OH-ssDNA (Chédin y Kowalczykowski, 2002; Quiberoni *et al.*, 2001a). De hecho, se ha demostrado que la expresión ectópica de los genes *addAB* puede complementar una mutante *recBCD* de *E. coli* (Kooistra *et al.*, 1993).

El mecanismo bioquímico del procesamiento de DSBs comprende:

- la apertura del dsDNA mediante la actividad de helicasa;
- la degradación de ssDNA 3'-5' generado durante la apertura de cadenas;
- el reconocimiento de la secuencia Chi (χ , Cross-over hotspot instigador) especie-específica, la cual induce la pérdida de la actividad de exonucleasa 3'-5' pero no la de helicasa, ambos eventos generan el 3'-OH-ssDNA y
- la polimerización de la proteína RecA sobre el 3'-OH-ssDNA e invasión de la cadena homóloga (sinápsis) (Fig. 3).

Aunque ambas enzimas pertenecen a la misma familia de proteínas y desempeñan la misma actividad bioquímica sobre DSBs, existen claras diferencias que los definen como proteínas distintas. RecBCD posee dos actividades de helicasa que actúan como dos motores moleculares con distinta capacidad, una lenta (RecB) y otra rápida (RecD) (Dillingham *et al* 2003; Taylor y Smith, 2003). En contraste AddAB a pesar de poseer motivos de helicasa en ambas subunidades, sólo la de AddA es indispensable para recombinar/ reparar DSBs (Haijema *et al.*, 1996; Kooistra *et al.* 1997).

La enzima AddAB de *B. subtilis* posee en ambas subunidades las actividades de nucleasa que participan en la degradación simétrica del dsDNA y cuando la enzima encuentra a χ solo la actividad de nucleasa 3'-5' de AddA es atenuada (Fig. 3) (Chédin *et al.*, 1988; Chédin *et al.*, 2000; Quiberoni *et al.*, 2001; Quiberoni *et al.*, 2001a). Con respecto a RecBCD, las subunidades RecB y RecD presentan motivos de nucleasa que participan en la degradación asimétrica del dsDNA (Jockovich y Myers, 2001; Korangy y Julin, 1992; Quiberoni *et al.*, 2001a; Yu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Se ha observado que cuando RecBCD interacciona con χ se genera un cambio conformacional que inactiva la nucleasa 3'-5' pero no la actividad de helicasa de RecB permitiendo la generación del extremo 3'-OH-ssDNA (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1995).

En *E. coli* el reconocimiento de RecBCD depende de la orientación de la secuencia χ (5'-GGTGGTGG-3', Lam *et al.*, 1974), la cual está

localizada en la cadena 5'-3' para modificar la actividad de exonucleasa de RecB (Bianco y Kowalczykowski, 1997). En contraste en *B. subtilis*, la secuencia χ (5'-AGCGG-3', Chédin *et al.*, 1998) es reconocida por AddAB independientemente de en que cadena se localiza (Biswas *et al.*, 1995; Chédin *et al.*, 2000; El Karoui *et al.*, 1999). Además de *E. coli* y *B. subtilis*, la secuencia χ se ha reportado en *Lactococcus lactis* y *Haemophilus influenzae* (Biswas *et al.*, 1995; El Karoui *et al.*, 1998; Sourice *et al.*, 1998). Las secuencias χ descritas varían de 5 a 8 pares de bases, son ricas en GC y el efecto de activación de recombinación decrece con la distancia (no promueven recombinación en zonas a más de 10 kb) (El Karoui *et al.*, 1999; Smith, 2001).

Fenotípicamente, la inactivación de los genes *recB* o *recC* afecta severamente la viabilidad y la capacidad recombinogénica; en contraste, la inactivación del gen *recD* provoca un fenotipo hiperrecombinogénico, sin efecto en la viabilidad celular (Kowalczykowski *et al.*, 1994). En *B. subtilis* la inactivación de los genes *addA* y *addB* provoca un fenotipo similar al observado en las mutantes *recB* o *recC* de *E. coli* (Alonso *et al.*, 1988; Alonso *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 2000; Haijema *et al.* 1996; Kooistra *et al.*, 1988; Kooistra *et al.* 1997).

Generalidades de las Rhizobiaceas.

El nitrógeno es un elemento importante para los organismos. En la naturaleza los nitratos (NO_3) y el amonio (NH_4) (principales fuentes de nitrógeno asimilable por los organismos) pueden obtenerse del N_2 atmosférico por: a) las descargas eléctricas en tormentas atmosféricas y b) enzimáticamente por microorganismos durante la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Martínez-Romero, 2000). Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* establecen una simbiosis específica con raíces de plantas leguminosas. Las rhizobias invaden e inducen la diferenciación del tejido vegetal de la raíz para formar un nódulo, estructura especializada en donde se lleva a cabo la reducción enzimática del N_2 (Martínez-Romero, 2000).

Los géneros *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (familia *Rhizobiaceae*; orden Rhizobiales; clase α -proteobacteria) (Martínez-Romero, 2000) se caracterizan por tener moléculas de DNA extra-cromosomales de alto peso molecular (plásmidos). El número (1 a 11) y tamaño (150 a 1,683 kb) es variable dentro de las especies y constituyen hasta un 50 % del genoma (Romero y Brom, 2004). En los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, la mayor parte de los genes involucrados en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno se encuentran en un plásmido, denominado plásmido simbiótico (pSim) cuyo tamaño varía desde 180 kb

hasta 1.35 Mb; sin embargo, una eficiente interacción planta-bacteria requiere de la participación de genes presentes en otros plásmidos (Romero y Brom, 2004). En contraste, en los géneros *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* la información simbiótica se localiza en una región del cromosoma (isla simbiótica, 502 kb). El análisis del contenido de GC y el uso de codones del sector simbiótico y del genoma sugieren que en algunas especies la región pudo haberse adquirido por transferencia horizontal. En *Mesorhizobium loti*, se ha demostrado que la isla simbiótica se puede movilizar de una cepa a otra y el evento de integración esta mediado por transposones conjugativos sitio-específicos (Hahn y Hennecke, 1987; Göttfer *et al.*, 2001; Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1998).

Dinámica del genoma de las rhizobias.

En general las rhizobias poseen una alta cantidad de secuencias repetidas localizadas en los plásmidos y en el cromosoma, aunque la mayoría son secuencias de inserción (IS, insertion sequences) es posible encontrar genes específicos (Romero y Palacios, 1997; Romero *et al.*, 1999). Las secuencias repetidas pueden generar rearrreglos genéticos como deleciones, amplificaciones, inversiones y cointegraciones, vía recombinación homóloga. Por ejemplo en el pSim de *R. etli*, el amplicón *nod-nif* flaqueado por los genes *nifHDK* (codifican para la enzima nitrogenasa) experimenta deleciones y duplicaciones de una región de 120

kb que contiene muchos de los genes simbióticos a una alta frecuencia (10^{-4}) (Romero *et al.*, 1991). Los amplicones también se han descrito en otras rizobias, así como en otros genomas bacterianos (Flores *et al.*, 1993; Mavingui *et al.*, 2002). También en *R. etli* se han descrito eventos de co-integración de dos plásmidos, el pCFN42b (biosíntesis de lipopolisacáridos) y el pSim (Brom *et al.*, 1991); o el pCFN42a (auto-transferible) y el pSim (Brom *et al.*, 2004; Tun-Garrido *et al.*, 2003). Recientemente en *Rhizobium* NGR234 se han descrito co-integraciones plásmido-plásmido y entre el plásmido-cromosoma (Mavingui *et al.*, 2002).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los ejemplos anteriormente mencionados, muestran que en las *Rhizobiaceas* existe una gran dinámica genómica. Esta plasticidad ha motivado el estudio de los mecanismos y de los sistemas enzimáticos que participan en la formación de los rearrreglos genómicos. Empleando como modelo a *R. etli*, se han descrito los mecanismos de formación de deleciones, amplificaciones, cointegraciones y conversión génica en este organismo, eventos dependientes del gen *recA* (Martínez-Salazar *et al.*, 1991; Martínez-Salazar y Romero, 2000; Rodríguez y Romero, 1998; Romero *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 1995; Valencia-Morales y Romero, 2000). Otros genes de recombinación homóloga estudiados en esta bacteria son los genes *ruvA*, *ruvB* y *recG* (Martínez-Salazar y Romero, 2000; Martínez-Salazar *et al.*, en preparación) que participan en la etapa de migración del heteroduplex; sin embargo se desconoce que enzimas de la maquinaria de recombinación homóloga llevan a cabo la pre-sinápsis o inicio de recombinación.

En bacterias, las enzimas RecF y RecBCD/AddAB participan activamente en la pre-sinápsis del proceso de recombinación homóloga. Tanto en *E. coli* como en *B. subtilis* estas enzimas definen dos principales vías de recombinación homóloga. La enzima RecF repara y recombina SSGs, mientras que DSBs son procesados por las enzimas RecBCD/AddAB.

El objetivo principal del presente trabajo es identificar y aislar los genes de recombinación homóloga que participan en la etapa de pre-sinápsis del proceso de recombinación homóloga y que caracterizan las vías de recombinación. Además evaluar la participación de estas enzimas en la reparación del DNA, así como en eventos de recombinación homóloga. Un especial interes es evaluar la recombinación de plásmidos grandes que ha sido poco estudiada.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se reportaron en el artículo: Zuñiga-Castillo J., Romero D., and Martínez-Salazar J.M. (2004) The recombination genes *addAB* are not restricted to Gram-positive bacteria: Genetic analysis of the recombination initiation enzymes RecF and AddAB in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **186**:7905-7913, el cual se presenta a continuación.

Además se incluye una sección de resultados adicionales que amplían los estudios de las enzimas RecF y AddAB en *Rhizobium etli*.

RESULTADOS ADICIONALES

En el artículo se describe la presencia en α -proteobacterias de los genes *recF*, *addA* y *addB* involucrados en las vías de reparación-recombinación RecF y AddAB. Los análisis genéticos realizados en *R. etli* revelaron su participación en los procesos de reparación y recombinación homóloga. De los datos presentados se desprende que los genes *addA* y *addB* se encuentran en bacterias Gram-positivas y –negativas, mientras que su equivalente funcional, *recB*, *recC* y *recD* sólo se ha descrito en Gram-negativas. Este hecho nos estimula a realizar un análisis para conocer el posible origen filogenético de los genes *addA* y *addB* de α -proteobacterias, el cual es descrito en la presente sección. Además se incluyen otros aspectos no considerados en el artículo que ayudarán a determinar la participación de estas dos vías en *R. etli*.

Análisis bioinformático de la proteína RecF.

La conservación de regiones y/o motivos en las proteínas es relevante debido a que generalmente desempeñan una función biológica importante. Por ello se realizó un análisis bioinformático con las proteínas RecF de bacterias Gram-negativas (28) y –positivas (12) previamente reportadas. El alineamiento múltiple empleando el programa ClustalW (Thompson, 1994) reveló la presencia de cuatro regiones conservadas

dentro de las proteínas (Fig. 4A). El motivo P-loop (**GXXGXGKT**) ubicado en el extremo N-terminal es indispensable para la actividad de ATPasa y unión al dsDNA aunque no para la disociación del mismo (Griffin IV y Kolodner, 1990; Umezu *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999). Este motivo también se ha encontrado en otras proteínas como RecN en procariontes y SMC (de mantenimiento cromosomal) en eucariontes (Hirano, 1998). Los tres motivos restantes aunque no poseen función asignada se han propuesto que son necesarios para las interacciones con las proteínas RecR y RecO (Bork *et al.*, 2001; Umezu *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999).

Para establecer las relaciones filogenéticas de las proteínas RecF de α -proteobacterias en eubacterias, se construyó un árbol filogenético con el programa PHYLIP (Felsenstein, 1995) a partir del alineamiento múltiple realizado con ClustalW y visualizado con el programa Treeview (Page, 1996) (Fig. 4B). Se observó que las proteínas RecF de α -proteobacterias forman un solo clado que se agrupa con otros de bacterias Gram-negativas. La distribución filogenética observada es consistente con los estudios previamente reportados, en donde se muestra la amplia distribución del gen *recF* en bacterias (Eisen y Hanawalt, 1999).

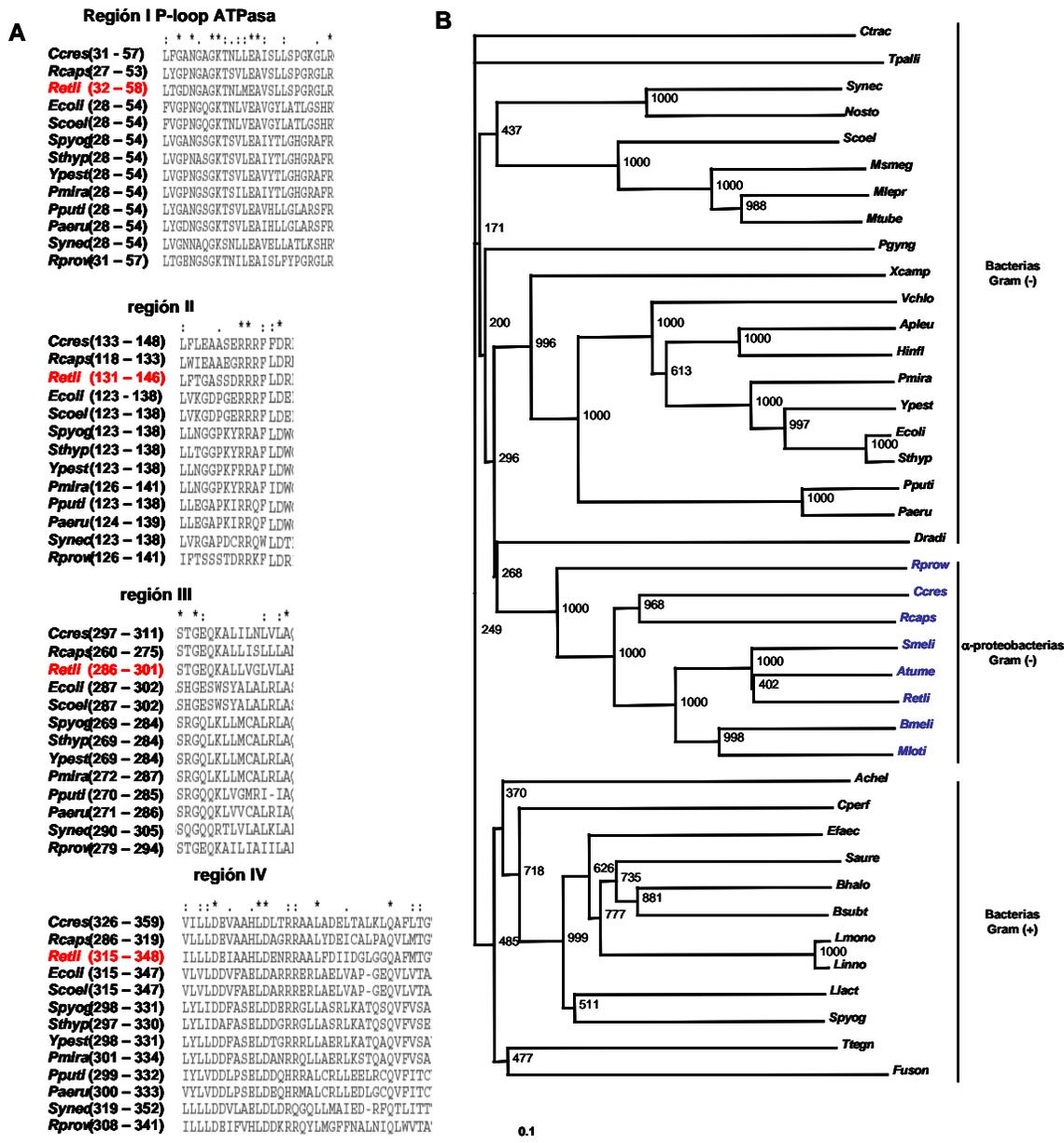


Figura 4.- Regiones conservadas y filogenia de las proteínas RecF. (A) Los aminoácidos conservados están indicados con asteriscos, mientras que los aminoácidos de la misma naturaleza química con dos puntos. (B) Cladograma Neighbour-Joining construido con PHYLIP, utilizando un alineamiento múltiple de las proteínas RecF de α -proteobacterias, RecF de Gram-negativas y RecF de Gram-positivas. Los valores correspondientes al bootstrap están indicados en la parte lateral de cada clado. Bacterias Gram-negativas: Ctrac (*Chlamydia trachomatis*), Dradi (*Deinococcus radiodurans*), Syneq (*Synechocystis* sp), Nosto (*Nostoc* sp), Scoel (*Streptomyces coelicolor*), Msmeg (*Mycobacterium smegmatis*), Mlepr (*Mycobacterium leprae*), Mtube (*Mycobacterium tuberculosis*), Pgyng (*Porfiromonas gingivalis*), Rprov (*Rickettsia prowazekii*), Ccres (*Caulobacter crescentus*), Rcaps (*Rhodobacter capsulatus*), Smeli (*Sinorhizobium meliloti*), Atume (*Agrobacterium tumefaciens*), Retli (*Rhizobium etli*), Bmeli (*Brucella melitensis*), Mloti (*Mesorhizobium loti*), Xcamp (*Xhantomonas campestris*), Vchlo (*Vibrio chloreae*), Apleu (*Actynomices pleuroneumoniae*), Hinfl (*Haemophilus influenzae*), Pmira (*Proteus mirabilis*), Ypest (*Yersinia pestis*), Ecoli (*Escherichia coli*), Sthyp (*Salmonella*

typhi), Avine (*Azotobacter vinelandii*), Pputi (*Pseudomonas putida*), Paero (*Pseudomonas aeruginosa*). Bacterias Gram-positivas: Tpal (*Treponema pallidum*), Cperf (*Clostridium perfringens*), Efaec (*Enterococcus faecalis*), Saure (*Staphylococcus aureus*), Bhalo (*Bacillus halodurans*), Bsubt (*Bacillus subtilis*), Lmono (*Lysteria monocitogenes*), Linno (*Lysteria innocua*), Llact (*Lactococcus lactis*), Spneu (*Streptococcus pneumoniae*), Spyog (*Streptococcus pyogenes*); Fuso (*Fusobacterium nucleatum*), Ttegc (*Thermoanaerobacter tengcongensis*).

Análisis bioinformático de las proteínas AddA y AddB.

Las subunidades AddA y RecB, a pesar de no compartir una alta homología, conservan 7 motivos de helicasa y uno de nucleasa (Kooistra *et al.*, 1988; Kooistra *et al.*, 1997; Haijema *et al.*, 1996; Fig 1B, Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004). En contraste, las subunidades AddB y RecC aunque no conservan motivos son similares en tamaño y comparten poca homología; sin embargo, un motivo funcional de nucleasa presente en las proteínas AddB de Gram-positivas, también se localizó en las AddB de las α -proteobacterias (Quiberoni *et al.*, 2001; Fig. 1C Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004).

Se determinaron las relaciones filogenéticas de las proteínas AddB de α -proteobacterias mediante la construcción de un árbol filogenético. Para ello primero, se generó un alineamiento múltiple ClustalW (Thompson, 1994) entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas AddB de α -proteobacterias y bacterias Gram-positivas, y las secuencias RecC de bacterias Gram-negativas. Se observó que el clado de las α -proteobacterias está más cercano al de las bacterias Gram-positivas que al clado de bacterias Gram-negativas (Fig. 5). Esta distribución filogenética

de las proteínas AddB de α -proteobacterias es similar a la observada para las proteínas AddA (Fig 1A Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004).

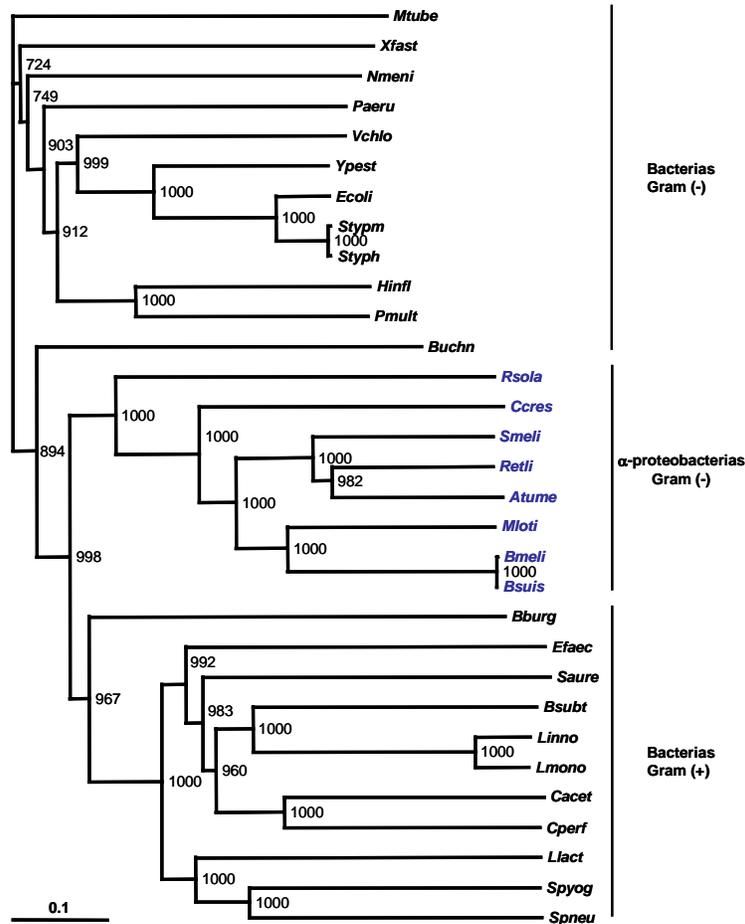


Figura 5.- Relaciones filogenéticas de las proteínas AddB de α -proteobacterias. El cladograma Neighbour-Joining fue construido con PHYLIP, utilizando un alineamiento múltiple de las proteínas AddB de α -proteobacterias, RecC de Gram-negativas y AddB de Gram-positivas. Los valores correspondientes al bootstrap están indicados en la parte lateral de cada clado. Bacterias Gram-negativas: Mtube (*Mycobacterium tuberculosis*), Xfast (*Xylella fastidiosa*), Nmeni (*Neisseria meningitidis*), Paeru (*Pseudomonas aeruginosa*), Vchlo (*Vibrio cholerae*), Ypest (*Yersinia pestis*), Ecoli (*Escherichia coli*), Stypm (*Salmonella typhimurium*), Styph (*Salmonella typhi*), Hinfl (*Haemophilus influenzae*), Pmult (*Pasteurella multocida*), Buchn (*Buchnera spp.*), Rsola (*Ralstonia solanacearum*), Ccres (*Caulobacter crescentus*), Smeli (*Sinorhizobium meliloti*); Retli (*Rhizobium etli*); Atume (*Agrobacterium tumefaciens*); Mloti (*Mezorhizobium loti*); Bmeli (*Brucella melitensis*); Bsuis (*Brucella suis*). Bacterias Gram-positivas: Bburg (*Borrelia burgdorferi*), Efaec (*Enterococcus faecalis*), Saure (*Staphylococcus aureus*), Bsubt (*Bacillus subtilis*), Linno (*Lysteria innocua*), Lmono (*Lysteria monocitogenes*), Cacet (*Clostridium acetobutylicum*), Cperf (*Clostridium perfringes*), Llact (*Lactococcus lactis*), Spyog (*Streptococcus pyogenes*), Spneu (*Streptococcus pneumoniae*).

Origen evolutivo de los genes *addA* y *addB*.

Los estudios previamente realizados consideran que los genes *addA* y *addB* están restringidos sólo a las bacterias Gram-positivas, mientras que los genes *recB*, *recC* y *recD* en bacterias Gram-negativas (Chédin and Kowalczykowski, 2002). El encontrar en α -proteobacterias (bacterias Gram-negativas) genes con motivos, filogenia y homología a los *addA* y *addB* descritos en *B. subtilis* (bacterias Gram-positivas) nos estimula a determinar el posible origen filogenético.

Generalmente cuando un gen es adquirido mediante cualquiera de los mecanismos de transferencia horizontal (conjugación, transformación o transducción), éste posee características diferentes a las del genoma receptor. El análisis de composición de GC, porcentaje de dinucleótidos, frecuencia de uso de codones y sintenia, aportan criterios para determinar si el gen en cuestión ha evolucionado con el organismo o es de reciente adquisición (Lawrence y Ochman, 1998). En las siguientes secciones se describen los análisis de contenido de GC, frecuencia de uso de codones y sintenia de los genes *addA* y *addB* presentes en α -proteobacterias.

Análisis del contenido de GC de addAB.

El análisis comparativo del contenido de GC de los genes *addA* y *addB* en las especies Gram-negativas (α -proteobacterias y *R.*

solanacearum) y Gram-positivas (Firmicutes) no presentó diferencia con respecto al valor promedio de su respectivo genoma (Tabla 3). Este resultado es similar al observado para los genes *recA* y *recF* también involucrados en recombinación y de amplia distribución filogenética. Finalmente, los porcentajes de GC para *addAB* de las bacterias Gram-negativas analizadas (61-73%) son diferentes a los encontrados en las especies de bacterias Gram-positivas (28-49%). Estos resultados sugieren que en α -proteobacterias el sector del genoma que contiene a los genes *addAB* no parece ser de origen externo.

Tabla 3 Contenido de GC de los genes *addA*, *addB*, *recA* y *recF* en eubacterias ^a.

Organismo	Contenido de GC				
	Genoma	<i>addA</i>	<i>addB</i>	<i>recA</i>	<i>recF</i>
α-proteobacteria					
<i>M. loti</i>	60.63	67.26	69.13	63.88	68.07
<i>C. crescentus</i>	67.20	70.63	73.09	64.14	70.63
<i>S. meliloti</i>	62.10	67.06	67.55	60.63	67.83
<i>A. tumefaciens</i>	58.13	61.67	63.59	57.45	61.52
<i>B. melitensis</i>	57.00	61.44	62.56	57.14	61.46
<i>B. suis</i>	57.25	61.47	63.02	54.36	61.46
<i>B. japonicum</i>	64.10	68.35	69.00	64.00	70.00
<i>R. etli</i>	61.27	64.05	63.38	60.51	65.06
β-proteobacteria					
<i>R. solanacearum</i>	69.90	73.00	73.00	64.00	70.14
Firmicutes					
<i>C. perfringens</i>	26.95	29.00	28.00	34.00	24.00
<i>E. faecalis</i>	27.40	38.53	38.88	42.62	37.78
<i>S. pneumoniae</i>	39.60	43.45	43.02	42.01	34.34
<i>L. lactis</i>	33.75	32.40	31.91	39.79	33.15
<i>B. subtilis</i>	43.50	48.00	49.00	46.00	45.00

a. Valor promedio en porcentaje del contenido de GC.

Frecuencia de uso de codones de addAB.

Con respecto al análisis del uso de codones, los patrones de frecuencia de uso de codones de los genes *addA* y *addB* son similares al promedio observado en sus respectivos genomas, tanto en las especies de α -proteobacterias (Fig 6 A-D) como en *B. subtilis* y *L. lactis* (Gram-positivas) (Fig. 6 E y F). Además la frecuencia de uso de codones de los genes *addA* y *addB* muestra un comportamiento parecido entre las especies de α -proteobacteras analizadas, pero diferente al observado en Gram-positivas. Estos datos sugieren que las especies filogenéticamente cercanas tienen un uso similar de codones.

Análisis de sintenia de los genes addAB.

Por lo general, cuando ocurren procesos de transferencia horizontal se mueven segmentos del cromosoma de diferentes tamaños, los cuales pueden incluir unidades transcripcionales (operones). Se ha encontrado que genes involucrados en una determinada función celular tienden a mantenerse unidos en forma de operones o se agrupan en sectores del genoma (Lawrence y Ochman, 1998). El análisis de la sintenia de las regiones ayuda a determinar un posible origen, ya que el genoma receptor puede tener una organización genética similar al genoma donador.

En las α -proteobacterias así como en *R. solanacearum* la sintenia presenta una organización conservada que incluye los genes *galF-like*, *addB*, *addA* y *trxA*. En la region 5' de *addB* existe un gen que codifica para una nucleotidil transferasa (*galF-like*, no involucrada con procesos de recombinación o reparación); mientras que en la región 3' de *addA* existe el gen *trxA* (el cual codifica para una tioredoxina involucrada en la regulación del estrés oxidativo) (Fig. 7). Con respecto a las bacterias Gram-positivas la sintenia se restringió solo a los genes *addA* y *addB*, en todos los casos descritos el gen *addB* precede a *addA* (Fig. 7) (El Karoui *et al.*, 1998; Kooistra *et al.*, 1988; Kooistra y Venema, 1991). En el caso de Gram-negativas los genes *recBCD* se han localizado en una región en donde *recC*, *recB* y *recD* pueden estar adyacentes como en *P. aeruginosa* o bien *recC* separado de *recB* y *recD* como en *E. coli* (Kowalczykowski *et al.*, 1994).

Los datos obtenidos del análisis del contenido de GC, frecuencia de uso de codones y sintenia no permiten determinar el origen evolutivo de los genes *addA* y *addB* de α -proteobacterias y de *R. solanacearum*, y tampoco se puede considerar a éstos genes como foráneos. Sin embargo, la filogenia de las proteínas AddA y AddB (Zúñiga-Castillo, *et al.*, 2004 y Fig. 5) indican que existe una relación cercana entre las α -proteobacterias y las bacterias Gram-positivas.

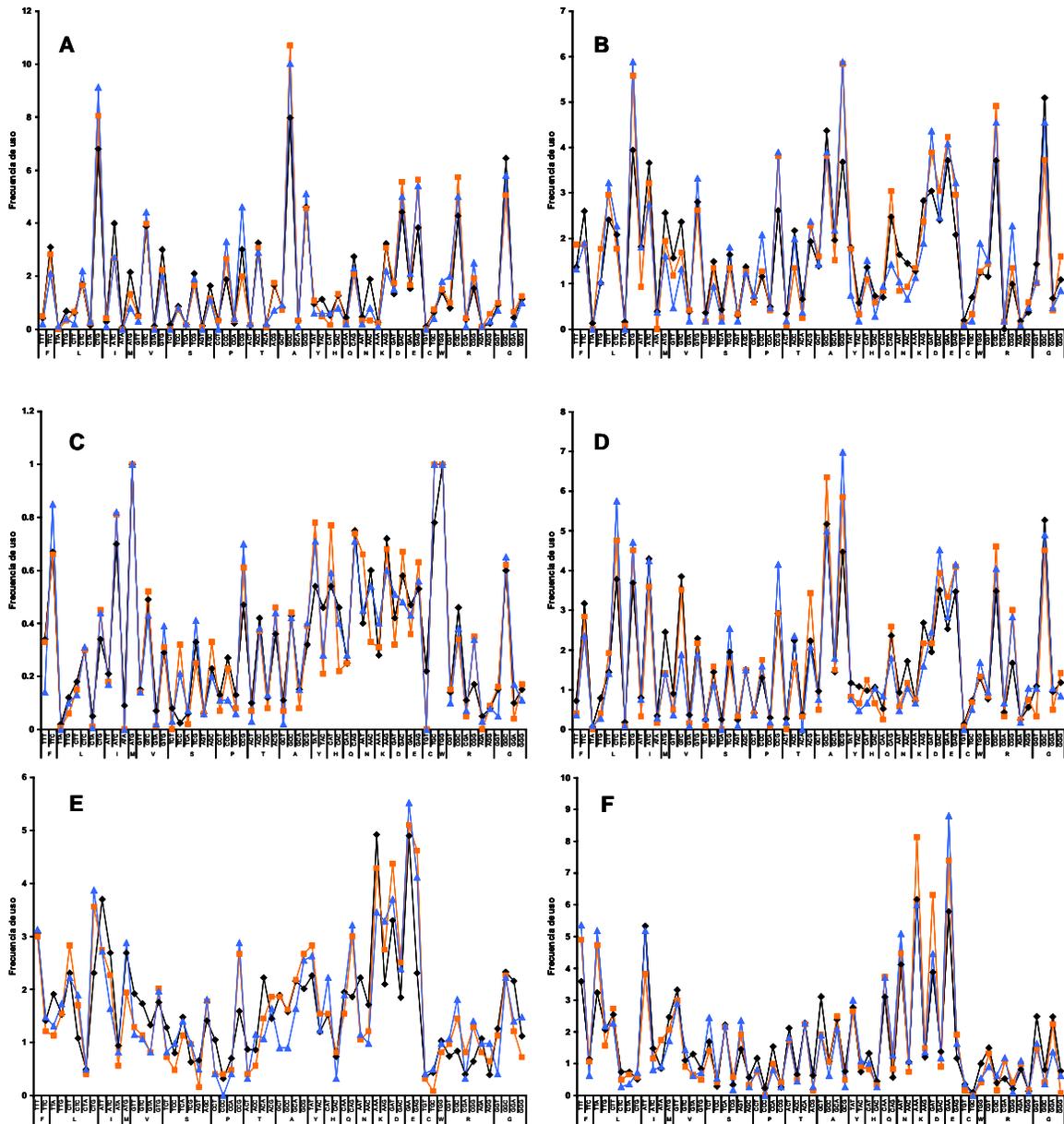
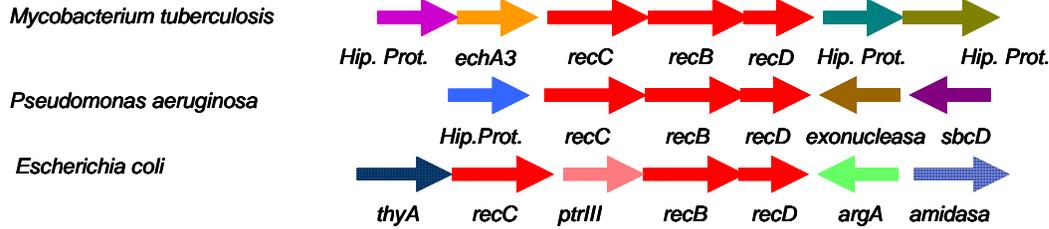
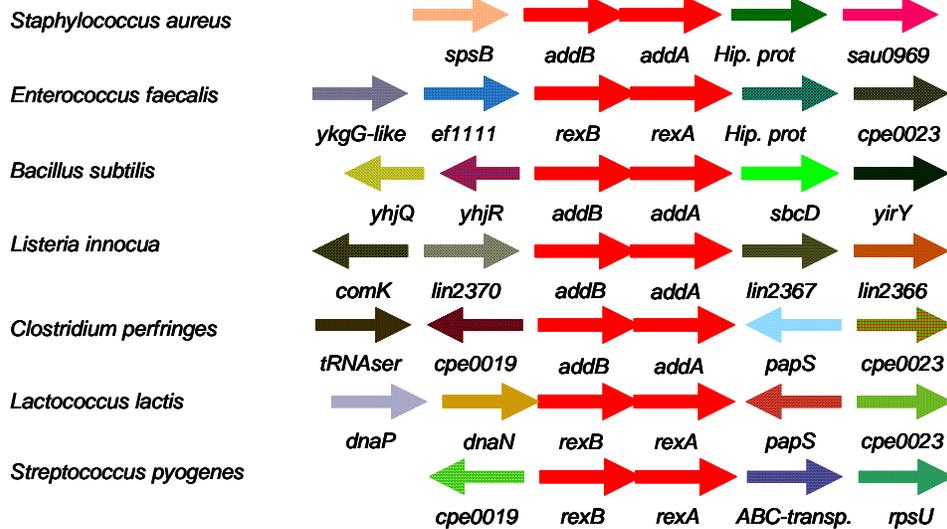


Figura 6.- Análisis comparativo de la frecuencia de uso de codones del genoma (♦), *addA* (■) y *addB* (▲) de *C. crescentus* (A), *B. melitensis* (B), *R. etli* (C), *S. meliloti* (D), *B. subtilis* (E) y *L. lactis* (F). Los valores de frecuencia de uso de codones fueron obtenidos de la base de datos TIGR (www.tigr.org); excepto para *R. etli* en donde las frecuencias de uso de codones se obtuvieron a partir de la secuencia nucleotídica con el programa CUSP (www.pasteur.fr)

γ -proteobacterias (Gram-negativas)



Firmicutes (Gram-positivos)



α -proteobacterias (Gram-negativas)

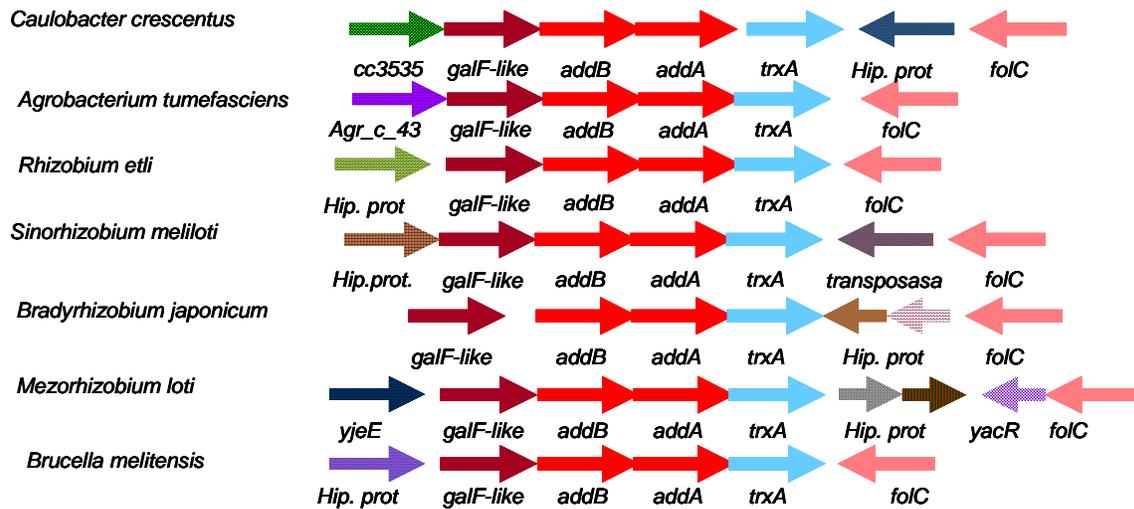


Figura 7.- Representación gráfica de los locus genómicos de los genes *addA* y *addB* o *recB*, *recC* y *recD*. La información correspondiente a cada especie fue obtenida de la base de datos TIGR (www.tigr.org), excepto para *R. etli* en donde la información proviene de la secuencia genómica (González *et al*, no publicado).

Caracterización molecular de las mutantes de *R. etli*.

Las mutantes *recF::loxPSp* (CFNX693), *addA::loxPSp* (CFNX694), Δ *addAB::loxPSp* (CFNX695) y *recFloxP-addA::loxPSp* (CFNX697) construidas por eventos de reemplazamiento genético (Fig. 8) se caracterizaron a nivel molecular por medio de hibridaciones tipo Southern, utilizando como detectores los plásmidos pJZC2, pJZC4 y pJZC16 (Tabla 1 Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004). Además, cada mutante fue evaluada en su viabilidad, morfología y sensibilidad a mutágenos.

En las cepas CFNX693 y CFNX694 se observó un incremento de 2.0 kb en el tamaño del fragmento EcoRI de 3.0 (*recF*) y 6.0 (*addA*) kb, debido a la presencia del interposón *loxPSp* (Fig. 9A, carril 2 y 9B, carril 2, respectivamente); en el caso de la cepa CFNX694 los fragmentos EcoRI de 2.5 (*addB*) y 6.0 (*addA*) kb desaparecieron, debido a que la delección/sustitución de los genes *addAB* elimina un sitio EcoRI y genera un fragmento EcoRI de 6.3 kb que comprende el extremo 3' de *addB*, el interposón *loxPSp* y el extremo 5' de *addA* (Fig 9C, carril 2). La hibridación de la cepa CFNX697 con el pJZC4 (*addA::loxPSp*) presenta dos señales positivas para el interposón *loxPSp* que corresponden a los fragmentos EcoRI de *addA::loxPSp* (8.0 kb) y de *recF::loxP* (3.2 kb) (Fig 9D, carril 2). Cuando esta misma cepa es hibridizada con el pJZC2 (*recF::loxPSp*) el patrón es el mismo al observado en la hibridación anterior (Fig 9E, carril 2).

Con respecto a la viabilidad y morfología celular, las cepas CFNX694 y CFNX695 y CFNX697 están afectadas en viabilidad (70-80% con respecto a la cepa silvestre; dato no mostrado), presentan una fuerte sensibilidad a mutágenos como mitomicina C, radiación UV y ácido nalidíxico (Fig. 2 y 3 Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004); sin embargo, en ninguna de ellas se observó el fenotipo de filamentación celular que presentan mutantes involucradas en la reparación y segregación de cromosomas dañados (Kuzminov, 1999). En contraste, la cepa CFNX693 está ligeramente afectada en viabilidad (10-20% con respecto a la cepa silvestres), es sensible a radiación UV y mitomicina C (Fig. 2 y 3 Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004) y su morfología celular no presentó alteración significativa con respecto a la cepa silvestre (dato no mostrado).

Estos resultados indican que el interposón *loxP*Sp está interrumpiendo los genes *recF* y *addA*, que causa un efecto en la viabilidad y sensibilidad a agentes que dañan el DNA.

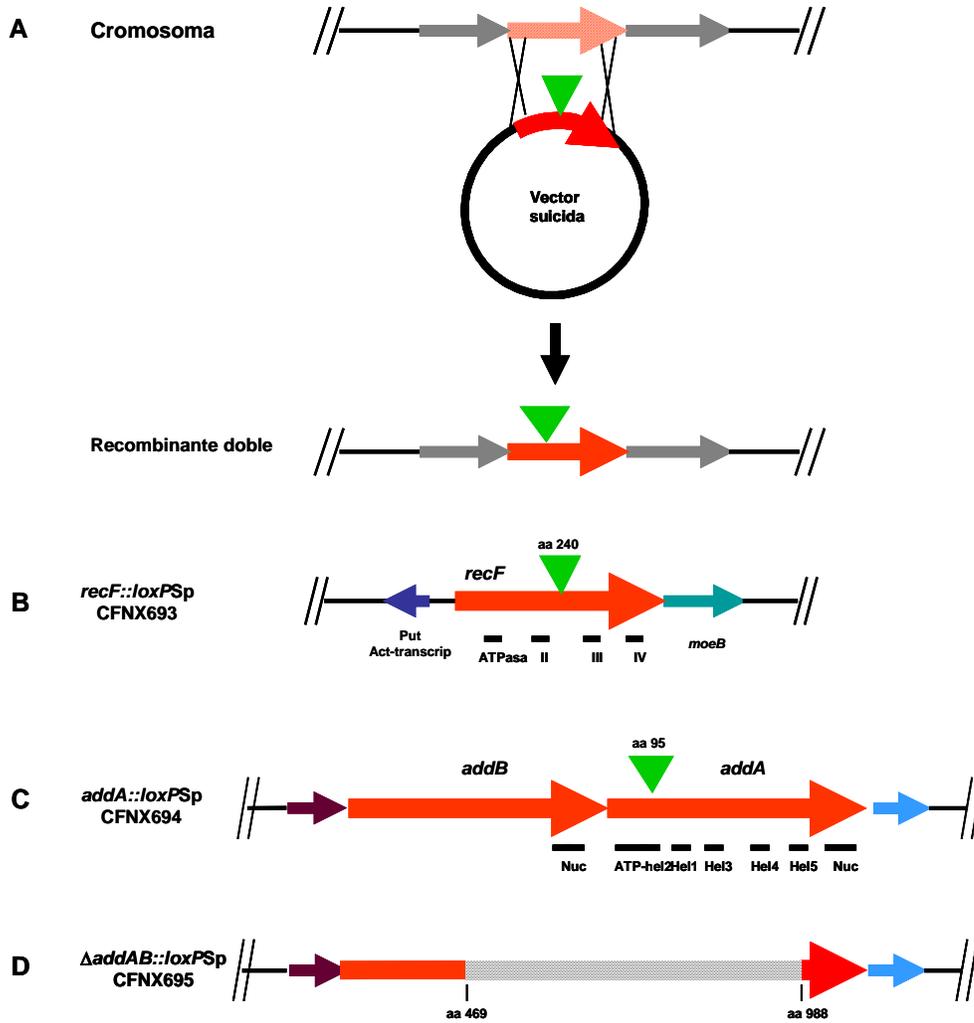


Figura 8.- Estrategia de mutagenesis en *R. etli*. Representación gráfica del reemplazamiento genético (A), diagrama del locus *recF::loxPSp* (B), *addA::loxPSp* (C) y Δ *addAB::loxPSp* (D). El triángulo verde invertido indica la localización de la inserción. Los motivos importantes (barras negras) están señalados en cada uno de los genes. La región con tramado indica la zona deletada de los genes *addB* y *addA*.

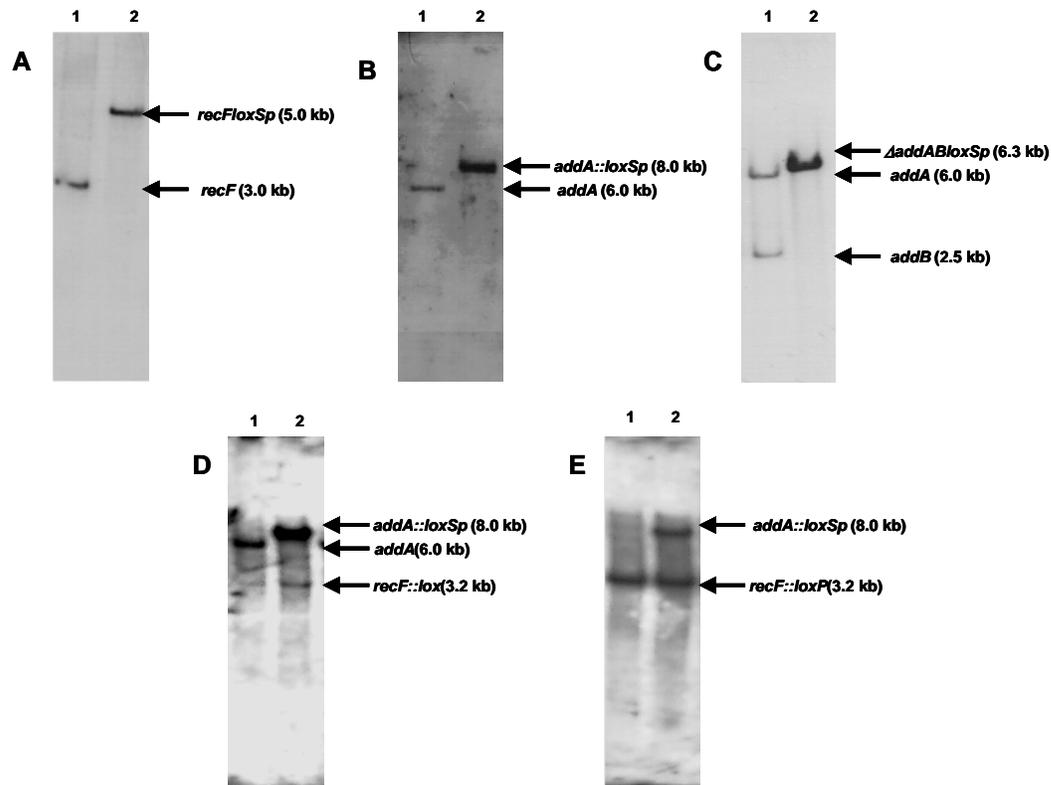


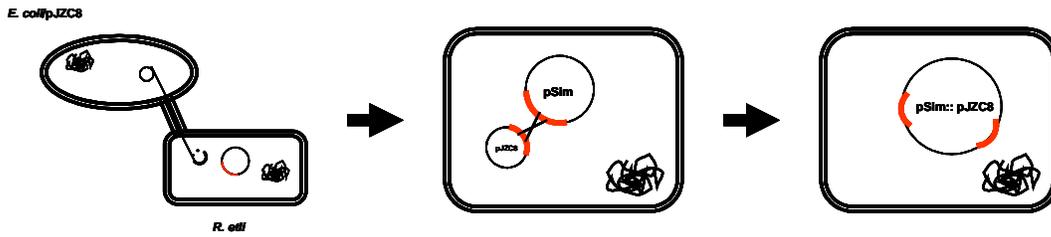
Figura 9.- Caracterización de las mutantes de *R. etli*. Autorradiografías de las hibridaciones tipo Southern de los DNA's totales digeridos con *EcoRI*. (A) CFNX693 (*recF::loxP*) hibridizada con pJZC2; (B) CFNX694 (*addA::loxP*) hibridizada con pJZC6; (C) CFNX695 (Δ *addAB::loxP*) hibridizada con pJZC16; CFNX697 (*recF::loxP-addA::loxP*) hibridizada con pJZC2 (D) y pJZC6 (E). Las condiciones de hibridación fueron de alta severidad (buffer comercial Amersham, 65°C).

La recombinación postconjugacional es independiente de RecF y AddAB.

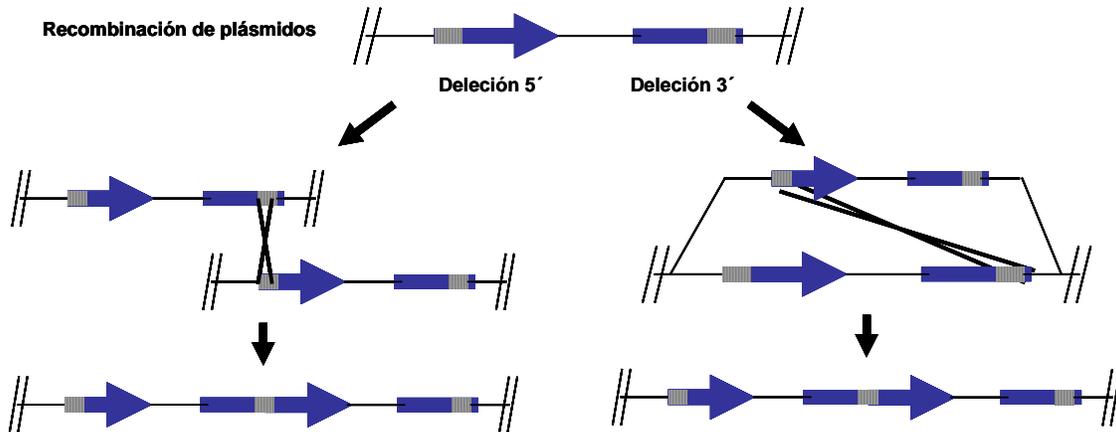
Los eventos de integración tipo Campbell descritos en Zúñiga-Castillo *et al.*, 2004 ocurren por recombinación homóloga mediada por *recA*, y mostraron sólo una ligera dependencia de AddA y RecF. Debido a que en *E. coli* y *B. subtilis* las proteínas RecF y AddAB participan en la etapa de pre-sinápsis, los resultados obtenidos en *R. etli* llevan a los

siguientes cuestionamientos: a) ¿la poca dependencia de RecF y AddAB se debe a que la integración tipo-Campbell requiere solo de RecA para asistir al ssDNA y promover la sinápsis?; b) ¿existen características propias del sitio que favorece la recombinación, como topología, replicón, etc.? y c) ¿existe otra vía de recombinación que promueva este tipo de evento?. Para evaluar que el evento es independiente del sitio de integración se evaluaron las frecuencias de recombinación en tres sitios (Fig. 10 y Tabla 4). Se observó que las frecuencias de recombinación tipo Campbell para los plásmidos pJMS4 (*nifH*), pJQ200::*fixL* y pJQ200::*fnr* (que se integran en el pSim, en el pCFN42f y al cromosoma, respectivamente) fueron similares, sin presentar una fuerte dependencia por los genes *recF* y *addAB*. Mientras que la frecuencia de recombinación del pJZC8 (banda BamHI 56) que se integra en el pSim incrementó ligeramente en las mutantes. Estos resultados demuestran que la integración tipo Campbell es independiente de los genes *recF* y *addA*, y que no es afectada por el sitio de integración, sugiriendo la existencia de otras actividades que participan en la integración Campbell en ausencia de los genes *recF* y *addA*.

A Post-conjugacional (Campbell)



B Recombinación de plásmidos



C Delección

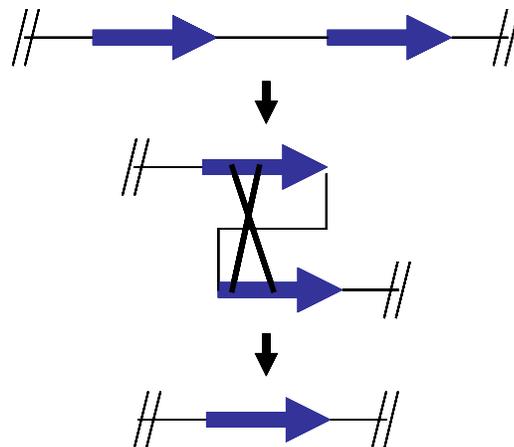


Figura 10. Representación gráfica de los eventos de recombinación homóloga evaluados en *R. etli*. Integración tipo Campbell (A), recombinación de plásmidos (B) y delección (C). Los sectores con tramados representan las regiones de homología.

Tabla 4 La integración tipo Campbell es independiente de RecF y AddAB de *R. etli*.^a

Genotipo	Sitio de integración			
	Plásmido		Cromosoma	
	<i>nifH</i> , pSim pJMS4 (x 10 ⁻⁴) ^b	B56, pSim pJZC8 (x 10 ⁻⁴) ^c	pCFN42F pJQ200:: <i>fixL</i> (x 10 ⁻⁶) ^d	pJQ200:: <i>fnr</i> (x 10 ⁻⁵) ^e
CE3 (WT) (Rif ^R)	3.60 ± 0.19 (1.00)	1.17 ± 0.86 (1.00)	4.17 (1.00)	1.82 ± 1.12 (1.00)
CE3 <i>recF</i> :: <i>loxP</i> (Rif ^R)	2.30 ± 0.72 (0.63)	5.63 ± 1.13 (4.81)	5.03 (1.20)	0.69 ± 0.36 (0.38)
CE3 <i>addAB</i> :: <i>loxP</i> (Rif ^R)	4.58 ± 0.83 (1.27)	5.50 ± 2.40 (4.70)	5.19 (1.24)	4.73 ± 1.05 (2.59)
CE3 <i>recF</i> - <i>addAB</i> :: <i>loxP</i> (Rif ^R)	1.87 ± 0.82 (0.51)	1.84 ± 1.47 (1.57)	3.83 (0.92)	1.94 ± 0.22 (1.06)
CFNX101 (<i>recA</i>)	0.0015 ± 0.0010 (0.00041)	0.00026 ± 0.00015 (0.00022)	----- -----	0.0029 ± 0.0026 (0.0016)

a. Los valores reportados son el promedio de tres experimentos independientes con desviación estándar, excepto los valores en el plásmido pCFN42f los cuales son representativos de un experimento. Los números entre paréntesis corresponden a las frecuencias relativas a la cepa silvestre.

b. El sitio de integración corresponde al gen *nifH* del plásmido simbiótico (pSim) de *R. etli*. La frecuencia de recombinación es el número de colonias gentamicina-resistentes divididas entre el número total de colonias viables.

c. El sitio de integración corresponde a la banda BamHI 56 del plásmido simbiótico de *R. etli*. La frecuencia de recombinación es el número de colonias gentamicina-resistentes divididas entre el número total de colonias viables.

d. El sitio de integración corresponde al gen *fixL* del plásmido pCFN42F de *R. etli*. La frecuencia de recombinación es el número de colonias espectinomomicina-resistentes divididas entre el número total de colonias viables.

e. El sitio de integración corresponde al gen *fnr* del cromosoma de *R. etli*. La frecuencia de recombinación es el número de colonias gentamicina-resistentes divididas entre el número total de colonias viables.

Expresión genética de los genes *addAB* de *R. etli*.

En *R. etli* la región que contiene a los genes *addAB* comprende los marcos abiertos de lectura (orf, open reading frame) de los genes *orf30*, *orf55*, *galF-like*, *addB*, *addA* y *trxA*. Además de tener la misma dirección de transcripción, el espacio intergénico entre ellos es reducido, por ejemplo los *orf30* (posible histidin-cinasa) y *orf55* están sobrepuestos, en tanto que hay 15 pb entre el *orf55* y *galF-like*, y 7 pb entre *galF-like* y

addB. Estos datos sugieren que estos genes pueden formar una unidad transcripcional. Así mismo se ha observado en las α -proteobacterias reportadas que la sintenia de los genes *galF-like*, *addB*, *addA* y *trxA* se conserva (Fig. 7).

En base a lo anterior se evaluó la posible unidad transcripcional. Para ello se diseñaron vectores suicidas (derivados del pK18) con una región intragénica de cada uno de los tres genes localizados en la región 5' de *addB*. Las inserciones en cada uno de los genes fué analizada mediante la sensibilidad a metil-metanosulfonato y ácido nalidíxico.

De las tres inserciones, sólo la interrupción del gen *galF-like* (4350) causó una alta sensibilidad al ácido nalidíxico y metil-metanosulfonato, presentando valores similares a los observados en las mutantes *addA* y Δ *addAB* (Fig. 11). Este efecto polar sobre los genes *addAB* sugiere que los genes *galF-like*, *addB*, *addA* constituyen un operón y que la expresión depende del promotor de *galF-like*. La expresión ectópica de los genes *addAB* (pJZC11) en la cepa *galF-like::pK18gal* restauró la resistencia a los agentes mutagénicos indicando que *galF-like* no está involucrado en los procesos de reparación.

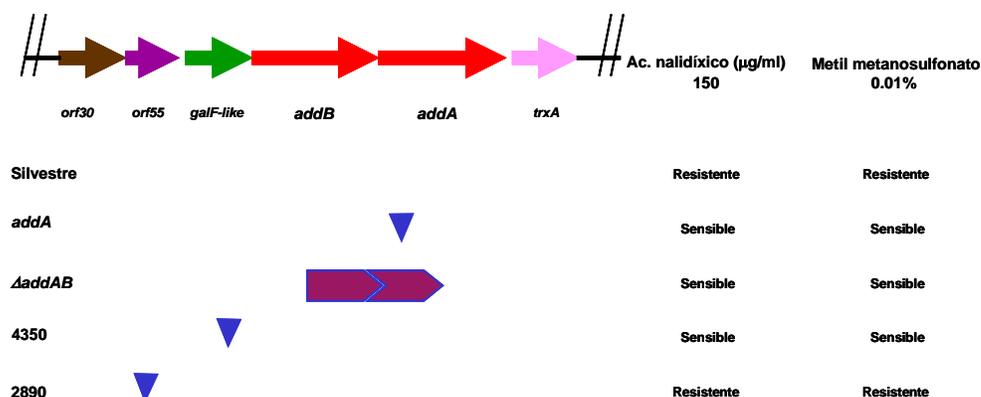


Figura 11- Determinación de la región promotora de los genes *addAB* de *R. etli*. La región mostrada corresponde a la región de 12 kb del cromosoma de *R. etli*. Los sitios de inserción 4350 y 2890 están localizados dentro de los genes *galF-like* y *orf55*, respectivamente. Las concentraciones de ácido nalidixico y metil-metanosulfonato utilizadas para evaluar sobrevivencia de las mutantes de *R. etli* corresponde a las determinadas en las curvas de sobrevivencia para cada mutágeno.

Se ha reportado que cepas de *E. coli* mutantes en *recBCD* son complementadas en su capacidad de reparación y recombinación mediante la expresión ectópica de los genes *addAB* de *B. subtilis* o *rexAB* de *Lactococcus lactis* (El Karoui *et al.*, 1998; Kooistra *et al.*, 1993; Miranda y Kuzminov, 2003). Con la intención de evaluar si los genes *addA* y *addB* de *R. etli* pueden complementar las funciones biológicas de RecBCD, se construyó un plásmido que contiene a los genes *addAB* de *R. etli* y cuya expresión depende del promotor del gen *lacZ* del vector (pJZC11, Zúñiga-Castillo *et al.*, 2004). Este plásmido en la mutante de *R. etli* CFNX695 (delección/sustitución *addAB*) es capaz de restaurar la viabilidad celular, la resistencia al ácido nalidixico y radiación UV. El plásmido pJZC11 se transfirió a la mutante JC5519 (*recBC*) de *E. coli* y se evaluaron los fenotipos: a) propagación del fago T4g2 y b) resistencia a radiación UV.

Los fagos que infectan a *E. coli* (λ , T4, P22, etc.) para poder replicarse codifican para inhibidores (γ , G2, Abc, etc.) de exonucleasas, incluyendo la exonucleasa RecBCD (Poteete *et al.*, 1988). El fago T4g2 tiene una mutación en el gen 2 que es incapaz de inhibir la enzima RecBCD y por ende ser sensible a degradación (Biswas *et al.*, 1995; El Karoui *et al.*, 1998; Kowalczykowski *et al.* 1994, Miranda y Kuzminov, 2003), este sistema se ha utilizado para determinar *in vivo* la actividad de exonucleasa de las enzimas RecBCD y AddAB. En ausencia de las enzimas el fago se propaga y forma placas de lisis que pueden cuantificarse, mientras que cuando la enzima esta presente el título de placas de lisis disminuye dramáticamente (El Karoui *et al.*, 1998; Miranda and Kuzminov, 2003).

En la Fig. 12 se observa que los genes *addAB* de *R. etli* localizados en plásmido fueron incapaces de restaurar la resistencia a radiación UV y la propagación del fago T4g2. A diferencia de lo observado con los genes *rexAB* de *L. lactis* que son capaces de complementar la misma mutante *recBC* de *E. coli* (El Karoui *et al.*, 1998). Estos datos podrian deberse a que AddAB no es funcional, no se expresa en *E. coli* o la expresión produce un efecto tóxico.

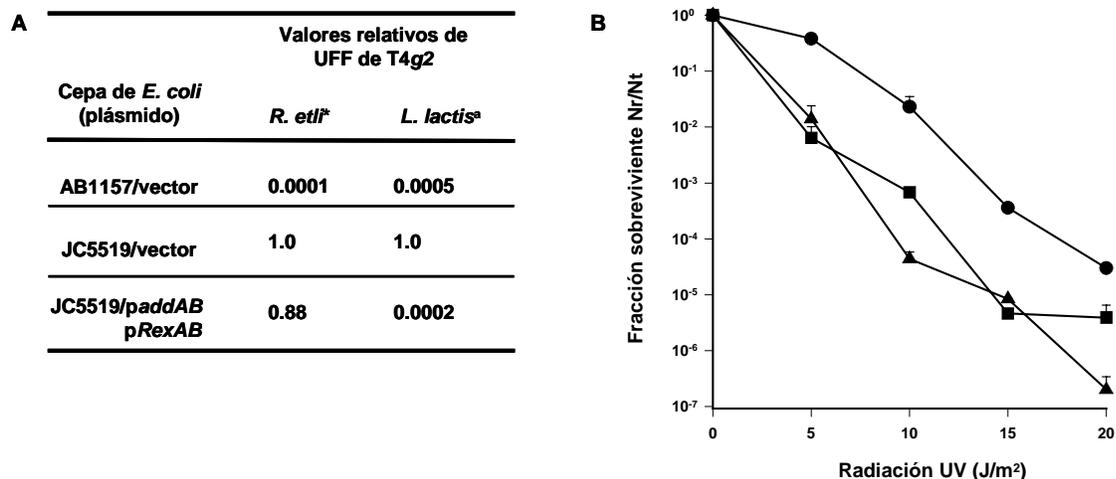


Figura 12. Caracterización fenotípica de la mutante *recBC* de *E. coli* con los genes *addA* y *addB* de *R. etli*. (A) Eficiencia de plating del fago T4g2 en cepas de *E. coli* AB1157 (silvestre), JC5519 (*recBCD*) y JC5519/*pJZC11* (*paddAB*). Los datos presentados son el promedio de tres experimentos independientes. * Los valores de unidades formadoras de fago (UFF) son relativos al obtenido en la cepa JC5519 (*recBC*) (3.42×10^8 uff/ml). ^a datos tomados de El Karoui *et al.*, 1998. (B) Curva de sobrevivencia a radiación UV. La fracción sobreviviente es el número de bacterias sobrevivientes después del tratamiento divididas entre el número de bacterias viables sin tratamiento. Símbolos: AB1157/vector (●), JC5519/vector (■) y JC5519/*paddAB* (▲).

DISCUSION Y PERSPECTIVAS

Impacto biológico de los genes *addAB* en bacterias Gram-negativas.

En el presente trabajo se ha descrito el aislamiento y caracterización de los genes *recF* y *addAB* de *R. etli*, así como su participación en los procesos de reparación y recombinación homóloga. Estudios previos indican que, en bacterias, la reparación recombinacional de SSGs es procesada por la enzima RecFOR (Morimatsu y Kowalczykowski, 2003), mientras que los DSBs por la enzima RecBCD en Gram-negativas y AddAB en Gram-positivas (Chédin y Kowalczykowski, 2002). Ambas enzimas participan en la formación del extremo 3'-OH-ssDNA durante la pre-sinápsis del proceso de recombinación homóloga (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2000). El hecho de encontrar los genes *addAB* en bacterias Gram-negativas rompe la marcada división filogenética previamente observada (Chédin y Kowalczykowski, 2002). Considerando ahora que los genes *addAB* están distribuidos en ambos grupos (Gram-positivas y α -proteobacterias), en tanto que sus equivalentes funcionales *recBCD* se han descrito en especies de Spiroquetas, Clamidias, Sulfobacterias, Actinobacterias, β - y γ -proteobacterias (Gram-negativas). Este hallazgo, amplía el panorama y puede dar lugar a la búsqueda de los genes *addAB* en otros linajes bacterianos.

A pesar de que el análisis del porcentaje de GC, uso de codones y sintenia indican que los genes *addAB* de α -proteobacterias y *R. solanacearum* tienen características propias de la especie que no sugieren un determinado origen evolutivo (Tabla 3, Fig. 5 y 7 resultados adicionales), la filogenia de las proteínas AddA y AddB demuestra que existen una alta similitud con las proteínas de las especies Gram-positivas (Fig 1A Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004; Fig. 6 resultados adicionales). En base a los resultados, no es fácil saber el origen evolutivo de los genes *addAB* en α -proteobacterias. Una hipótesis derivada de las filogenias de AddA y AddB podría ser que durante la separación de los linajes bacterianos la proteína precursora helicasa/exonucleasa AddAB se diversificó en las bacterias Gram-positivas y en las α -proteobacterias.

Reparación recombinacional del DNA en α -proteobacterias.

Los estudios iniciales revelaron que las mutantes en recombinación homóloga, también eran sensibles a radiación UV y agentes mutagénicos (Horii y Clark, 1973), implicando que la recombinación homóloga participaba en la reparación del DNA (reparación recombinacional). En *R. etli* los genes de recombinación que han sido inactivados (*recA*, *ruvB* y *recG*) también han mostrado una mayor sensibilidad a agentes mutagénicos (Martínez-Salazar *et al.*, 1991; Martínez-Salazar y Romero, 2000; Martínez-Salazar *et al.*, en preparación). En Zúñiga-Castillo *et al.*,

2004, se observa que la inactivación de *recF* provocó una fuerte sensibilidad a mutágenos que producen mayoritariamente SSGs (radiación UV y mitomicina C) (Kuzminov, 1999), mientras que las mutantes en *addA* fueron sensibles al ácido nalidíxico (inductor de DSBs, Sugino *et al.*, 1977), así como a la radiación UV y mitomicina C. Por último, la doble mutante *recF-addA* mostró efectos aditivos para los mutágenos evaluados (Fig 2A-C, Zúñiga-Castillo *et al.*, 2004). Estos resultados son congruentes con los fenotipos observados en *E. coli* y *B. subtilis*, implicando al gen *recF* en la reparación de SSGs y *addAB* en DSBs (Fernández *et al.*, 2000; Kowalczykowski *et al.*, 1994, Kuzminov, 1999).

La enzima AddAB de R. etli podría ser regulada por una secuencia χ .

En *R. etli*, la enzima AddAB tiene un papel relevante en la reparación recombinacional de DSBs (lesiones altamente tóxicas), sin embargo no desempeña un papel importante en los eventos de recombinación homóloga examinados. Curiosamente el evento postconjugacional, recombinación tipo Campbell, no se afectó en las mutantes *addAB*. Este evento en otros sistemas es dependiente de RecBCD en *E. coli* o de AddAB en *B. subtilis* (Alonso *et al.*, 1988; Dermic y Trgovcevic, 1999). Es posible que la presencia de otra vía de recombinación promueva este evento, o bien que los sustratos utilizados no cuenten con la secuencia χ de *R. etli*.

En *E. coli* y *B. subtilis* la secuencia χ es capaz de activar recombinación homóloga en sus alrededores, debido a que modifica las actividades enzimáticas de RecBCD o AddAB (Bianco y Kowalczykowski, 1997; Biswas *et al.*, 1995; Chedin *et al.*, 1998; Chédin *et al.*, 2000; El Karoui *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1995; Sourice *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la incorporación de la secuencia χ a un sistema de recombinación provoca un incremento en la frecuencia de recombinación en *E. coli* y *L. lactis* (El Karoui *et al.*, 1998; Zaman y Boles, 1996). En nuestro caso, es probable que la poca dependencia de AddAB observada pueda deberse a que el vector utilizado en el ensayo o el fragmento del genoma de *R. etli* clonado carezcan de la secuencia χ de *R. etli*.

A la fecha la secuencia χ se ha reportado en las especies de *E. coli*, *B. subtilis*, *H. influenzae* y *L. Lactis* (Lam *et al.*, 1974, Chédin *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 1995; Sourice *et al.*, 1998). Cabe mencionarse que en *E. coli* y *H. influenzae* se han reportado varias secuencias con diferente actividad, generalmente estos cambios son de uno o dos nucleótidos (Sourice *et al.*, 1998). Por último, la secuencia χ de *E. coli* puede ser reconocida por enzimas presentes en enterobacterias, pero no por las de otras especies como *P. aeruginosa*, *A. tumefaciens*, *S. meliloti* y *B. amyloliquefaciens* (Schultz y Smith, 1986). Lo anterior sugiere que la hipotética secuencia χ de *R. etli* es diferente, lo cual hace atractiva la idea de identificarla para determinar si la proteína AddAB de *R. etli* responde a esta secuencia permitiendo la activación de recombinación homóloga.

Una de las estrategias que podría utilizarse en la búsqueda de la posible secuencia χ de *R. etli* es analizar la secuencia nucleotídica del genoma de *R. etli* (González *et al.*, no publicado) con programas de computo que permitan buscar secuencias pequeñas (5 -11 pb) con una riqueza en GC y frecuentes en el genoma, características comunes en todas las secuencias χ hasta hoy descritas (El Karoui *et al.*, 1999). Una vez identificadas, podrían clonarse en algunos de los sistemas utilizados en la caracterización de las mutantes de *R. etli* y evaluar su capacidad para activar recombinación homóloga.

Una de las actividades de las enzimas RecBCD/AddAB es la degradación de dsDNA lineal, a menos que éste se encuentre protegido por la secuencia χ . Se ha descrito un sistema que permite evaluar la capacidad de protección de la secuencia χ sobre el dsDNA lineal, el sistema emplea plásmidos con replicación tipo circulo rodante en *H. influenzae*, *L. lactis* y otras bacterias (Biswass *et al.*, 1995; El Karoui *et al.*, 1998; Sourice *et al.*, 1998). Brevemente, los plásmidos tipo circulo rodante cuando replican generan multímeros que se resuelven por recombinación intramolecular. Además, el plásmido contiene el gen *nuc* que codifica para una nucleasa extracelular que permite la detección de colonias que contienen multímeros mediante un ensayo en placa con el medio de cultivo azul de toluidina-DNA. Cuando una colonia produce la nucleasa, el DNA degradado provoca la aparición de un halo rosa debido a un cambio en el pH del medio, el tamaño del halo es directamente proporcional al

tamaño del multímero. Se podrían clonar fragmentos de tamaño regular (400-500 pb) del genoma de *R. etli* y evaluar si en algunas clonas ocurre protección. Debido a que los plásmidos tipo círculo rodante no se replican en *R. etli* (dato no mostrado) pero si en *E. coli*, se propone realizar este tipo de experimentos en una cepa de *E. coli recBCD* transformada con el vector de expresión pAddAB.

¿Qué otros elementos de la maquinaria de recombinación de *R. etli* participan en la pre-sinapsis?

Los estudios realizados en *E. coli* y *B. subtilis* demuestran que la recombinación de plásmidos depende de la vía ReFOR (Alonso *et al.*, 1988; Cohen y Laban, 1983; James *et al.*, 1982; Laban y Cohen., 1981); mientras que la recombinación postconjugacional procede por la vía RecBCD en *E. coli* y AddAB en *B. subtilis*. Además, una doble inactivación *recB-recF* (*E. coli*) y *addA-recF* (*B. subtilis*) provoca una fuerte disminución de la capacidad recombinogénica (Alonso *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 2000; Kowalczykowski *et al.*, 1994). En *R. etli* la inactivación de *recF* causó una disminución en la recombinación de plásmidos, pero no en los eventos postconjugacionales; en tanto que la inactivación de *addA* afectó ligeramente la capacidad de recombinación. En el caso de la recombinación postconjugacional tipo Campbell y la delección se observó que no fueron afectadas después de inactivar ambas vías (Tabla 2 Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que otros elementos de la

maquinaria de recombinación de *R. etli* están involucrados en estos eventos. En *E. coli* se ha observado que existe una alta redundancia funcional (Horii y Clark, 1973), al menos existen 13 exonucleasas (RecJ, SbcB, SbcCD, PolA, etc) y 4 helicasas (UvrD, Hel II, Hel IV y RecQ) que podrían complementar la ausencia de la enzima RecBCD (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Shevelev y Hübscher, 2002). Una posibilidad, como se ha demostrado en *E. coli* es la presencia de mutaciones supresoras, las cuales activan la expresión de genes que complementen la carencia de RecBCD (*sbcA* y el profago críptico *Rac*) o en caso contrario como ocurre en la mutación supresora *sbcB* la inactivación de la exonucleasa I estabiliza la presencia de algún intermediario de recombinación que puede ser procesado por otra proteína como RecF.

Diferentes estrategias pueden ser utilizadas para identificar otros genes: a) un análisis bioinformático del genoma de *R. etli* permitirá identificar los genes ortólogos de *B. subtilis* y/o *E. coli.*, además aquellos que presenten motivos de exonucleasa, helicasa, etc. Posterior a esto, se podrían construir mutantes dobles o triples y evaluar los fenotipos de sensibilidad y de recombinación homóloga con los distintos sistemas de recombinación utilizados en este trabajo; b) Otro enfoque experimental considera la realización de una mutagénesis generalizada de la cepa mutante *recF-addA* para identificar genes que participan en la pre-sinapsis, utilizando como criterio el decremento de la frecuencia de integración Campbell aunado a la sensibilidad a mutágenos.

¿Los genes *addAB* de *R. etli* son ortólogos funcionales de *E. coli* y *B. subtilis*?

La expresión ectópica de los genes *addAB* y *rexAB* de *B. subtilis* y *L. lactis*, complementan la viabilidad y la capacidad recombinogénica de una mutante *recBCD* de *E. coli* (Kooistra *et al.*, 1993; El Karoui *et al.*, 1998; Miranda y Kuzminov, 2003); sin embargo, los genes *addAB* de *R. etli* no complementan esta misma mutación (Fig. 10, resultados adicionales). Una posibilidad es que las proteínas de *R. etli* no sean funcionales (debido a un plegamiento inapropiado), su presencia genera un efecto tóxico, o no se expresan en *E. coli*. Con la intención de expresar los genes *addAB* en un fondo *recBCD* de *E. coli*, se propone la construcción de un vector de expresión que tenga promotor para la RNA polimerasa y sitio de unión a ribosoma de *E. coli*. Además, de utilizarse en experimentos de complementación, el vector podría utilizarse en la búsqueda del probable sitio χ de *R. etli* (ver arriba), en la caracterización de la actividad de exonucleasa de dsDNA lineal aún no determinada (propagación del fago T4g2) y purificación de las proteínas AddAB para la caracterización bioquímica de las mismas. Adicionalmente, los genes *recBCD* de *E. coli* y *addAB* de *B. subtilis* podrían expresarse en *R. etli* y conocer si estos son capaces de complementar la mutante en *addAB* en la capacidad de reparación y recombinación.

¿En dónde más participa RecF y AddAB de *R. etli*?

A pesar de que las mutantes *recF* y *addAB* están afectadas en la reparación, la recombinación tipo Campbell y la delección presentan frecuencias de recombinación similares a la cepa silvestre. Estos últimos resultados que puede deberse a otras actividades (ver arriba), nos hacen cuestionarnos sobre el papel de RecF y AddAB en otros eventos de recombinación de *R. etli*. Recientemente en *Streptococcus pneumoniae* se ha reportado que las proteínas RexAB (homólogas de AddAB) no participan en la recombinación cromosomal y plasmídica, aunque si en eventos de conversión génica (Halpern *et al.*, 2004). En *R. etli* se ha reportado conversión génica entre los miembros de la familia multigénica *nifH* del pSim (Rodríguez y Romero, 1998), y el fenómeno RER (Recombination Enhancement by Replication) en el cual la activación de replicación incrementa la frecuencia de delecciones en el pSim (Valencia-Morales y Romero, 2000). Aunque el mecanismo genético por el cual operan estos rearrreglos ha sido determinado, se desconocen las proteínas de recombinación (además de RecA) que participa en cada uno, una propuesta es la evaluación de estos eventos en los fondos mutantes en *recF*, *addA* y *recF-addA*.

En *R. etli* las delecciones de 13 kb en el pSim fueron independientes de *recF*, *addAB*, y *recA* (Tabla 2 Zuñiga-Castillo *et al.*, 2004). Por otro lado se ha reportado que la delección de 120 kb, (que contiene la información necesaria para la simbiosis) generada por recombinación entre dos

secuencias repetidas directas (genes *nifH*, 5.0Kb) en este mismo plásmido dependen de RecA (Martínez-Salazar *et al.*, 1991). En *E. coli* las deleciones de regiones pequeñas también ocurren de forma independiente a *recA* (Lovett *et al.*, 1993; Lovett *et al.*, 1994). En este caso se ha sugerido que se realizan por el mecanismo de recombinación Single Strand Annealing, el cual es independiente de RecA y solo requiere la participación de una exonucleasa de ssDNA y de una helicasa (Fig. 1, Introducción). En *E. coli* se ha demostrado que la recombinación intramolecular puede ocurrir por la vía RecE, aunque los genes que participan en esta vía son codificados por un fago de limitada distribución entre las cepas de *E. coli* (James *et al.*, 1982; Laban y Cohen 1983; Luisi-DeLuca *et al.*, 1989). Este mecanismo podría estar operando en *R. etli*, por lo que buscar genes de profagos sería interesante.

Recombinación homóloga en otros sistemas bacterianos.

Los sistemas de recombinación homóloga bacterianos más estudiados de *E. coli* y *B. subtilis* (Alonso *et al.*, 1991; Kowalczykowski *et al.*, 1994) han permitido conocer su distribución en otras bacterias. Hoy en día, varios genomas bacterianos han sido secuenciados y los genes homólogos han sido identificados por análisis bioinformático, sin embargo en pocos casos se han estudiado, ejemplos recientes son *R. etli* y *S. pneumoniae* (Halpern *et al.*, 2004; Zúñiga-Castillo *et al.*, 2004). Un análisis comparativo entre los sistemas de recombinación de *E. coli*, *B. subtilis*, *S.*

pneumonie y *R. etli* con respecto a los genes *recF* y *addAB*, y su participación en eventos de recombinación permite identificar algunas semejanzas y diferencias. Una de las similitudes es que en *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *R. etli* y *E. coli* las proteínas AddAB/RecBCD, participan en la reparación de DSBs, mientras que las proteínas *recF* en la de SSGs. Con respecto a la recombinación postconjugacional, las proteínas AddAB y RecBCD en *B. subtilis* y *E. coli* tienen un papel activo en el procesamiento del dsDNA lineal, la inactivación de los genes *addAB/recBCD* afecta seriamente la frecuencia de recombinación (Alonso *et al.*, 1991; Miesel y Roth, 1996); en contraste en *S. pneumoniae* y *R. etli*, las frecuencias de recombinación son similares a las cepas silvestres (Halpern *et al.*, 2004; Zúñiga-Castillo *et al.*, 2004). Lo anterior sugiere que en estas dos últimas bacterias otras proteínas podrían participar en este tipo de eventos.

La recombinación de plásmidos pequeños ha sido estudiada ampliamente en *E. coli* (Cohen y Laban, 1983; James *et al.*, 1982; Laban y Cohen, 1981; Luisi-DeLuca *et al.*, 1989), mientras que en *B. subtilis* y *S. pneumoniae* debido a la carencia de sistemas ésta no se ha evaluado. En *R. etli*, se observó que sin importar el tamaño del plásmido la inactivación del gen *recF* provocó una disminución de 100 veces en la frecuencia de recombinación, disminución similar a la observada en mutantes *recF* de *E. coli*. Aunque la recombinación en plásmidos mayores a 100 kb ha sido poco explorada en *E. coli* (Martínez-Salazar y Gómez-Eichelmann., 1987). Este último dato es de gran aporte para el área de la recombinación debido a que se pensaba que los plásmidos de alto peso molecular se

comportaban como un cromosoma, en donde la recombinación cromosomal depende de ambas vías como en *Salmonella thypimurium* (Galitski y Roth, 1997).

Por último, en *E. coli* y *B. subtilis* la doble inactivación *recF-recB* y *recF-addA* provoca un abatimiento de la capacidad recombinogénica, mientras que en *R. etli* el bloqueo de ámbas vías muestra una capacidad recombinogénica cercana a la cepa silvestre. Lo anterior, hace interesante a nuestro sistema biológico porque su maquinaria de recombinación no se comporta como la de las bacterias consideradas hasta hoy como modelos.

CONCLUSIONES

- 1.- *R. etli* tiene homólogos de los genes *recF*, *addA* y *addB* de recombinación homóloga.

- 2.- Los genes *addA* y *addB* no están restringidos a las bacterias Gram-positivas. Están presentes en miembros del grupo de las α -proteobacterias y *R. solanacearum* (bacterias Gram-negativas).

- 3.- En *R. etli* los daños generados por la radiación UV y mitomicina C requieren de las enzimas RecF y AddAB; mientras que el daño provocado por el ácido nalidíxico sólo requiere de AddAB.

- 4.- La recombinación de plásmidos chicos y de alto peso molecular depende de la vía RecF de *R. etli*.

- 5.- Las deleciones de 13 kb entre secuencias repetidas fueron independiente de los genes *recF*, *addAB* y *recA*.

- 6.- La integración tipo Campbell es independiente de los genes *recF* y *addAB*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Alonso J.C., Tailor R.H., and Lüder G. (1988) Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **170**:3001-3007.
- 2.- Alonso J.C., Lüder G., and Tailor R.H. (1991) Characterization of *Bacillus subtilis* recombinational pathways. *J Bacteriol* **173**:3977-3980.
- 3.- Bianco P.R., and Kowalczykowski S.C. (1997) The recombination hotspot Chi is recognized by the translocating RecBCD enzyme as the single strand of DNA containing the sequence 5'GCTGGTGG-3'. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:6706-6711.
- 4.- Biswas I., Magin E., Erlich S.D., and Gruss A. (1995) A 7-base-pair sequence protects DNA from exonucleolytic degradation in *Lactococcus lactis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:2244-2248.
- 5.- Bork J.M., Cox M.M., and Inman R.B. (2001) The RecOR proteins modulate RecA protein functions at the 5'-ends of single-strand DNA. *EMBO J* **20**:7313-7322.
- 6.- Brom S.A., García de los Santos A., Girard M.L., Dávila G., Palacios R., and Romero D. (1991) High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli plasmids. *J Bacteriol* **173**:1344-1346.
- 7.- Brom S., Girard M.L., Tun-Garrido C., Garcia-de los Santos A., Bustos P., Gonzalez V., and Romero D. (2004) Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**:7538-48.

-
- 8.- Camerini-Otero D.R., and Hsieh P. (1995) Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Genetics* **29**:509-552.
 - 9.- Clark A.J. (1973) Recombination-deficient mutants of *E. coli* and other bacteria. *Annu Rev Genet* **7**:67-86.
 - 10.- Clark A.J., and Sandler S.J. (1994) Homologous genetic recombination. The pieces begin to fall into place. *Crit Rev Microbiol* **20**:124-142.
 - 11.- Chédin F., Noirot P., Biaudet V., and Erlich S.D. (1998) A five-nucleotide sequence protects DNA from exonucleolytic degradation by AddAB, the RecBCD analogue of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **29**:1369-1377.
 - 12.- Chédin F., Erlich S.D., and Kowalczykowski S.C. (2000) The *Bacillus subtilis* AddAB helicase/nuclease is regulated by its cognate Chi sequence In Vitro. *J Mol Biol* **298**:7-20.
 - 13.- Chédin, F., and Kowalczykowski S.C. (2002) A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram-positive: insights into the initiation of DNA recombination. *Mol Microbiol* **43**:823-834.
 - 14.- Cohen A., and Laban A. (1983) Plasmidic recombination in *Escherichia coli* K-12: the role of *recF* gene function. *Mol Gen Genet* **189**:471-474.
 - 15.- Cox M.M. (1991) The RecA protein as a recombinational repair system. *Mol Microbiol* **5**:1295-1299.
 - 16.- Cox M.M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **35**:53-82.

-
- 17.- Dermic D., and Trgovcevic Z. Specific effects of a *recB* mutation on the HfrH strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:1334-1337.
- 18.- Dillingham M.S., Spies M., and Kowalczykowski S.C. (2003) RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase. *Nature* **423**:893-897.
- 19.- Eisen J.A., and Hanawalt P.C. (1999) A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins and process. *Mut Res* **435**:171-213.
- 20.- El Karoui M., Erlich S.D., and Gruss A. (1998) Identification of the lactococcal exonuclease/recombinase and its modulation by the putative Chi sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:626-631.
- 21.- El Karoui M., Biaudet V., Schbath S., and Gruss A. (1999) Characteristics of Chi distribution on different bacterial genomes. *Res Microbiol* **150**:579-587.
- 22.- Felsenstein J. (1995) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- 23.- Fernández S., Ayora S., and Alonso J.C. (2000) *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products. *Res Microbiol* **151**: 481-486.
- 24.- 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 amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:4932-4936.

-
- 25.- Galitski T., and Roth J.R. (1997) Pathways for homologous recombination between chromosomal direct repeats in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **146**:751-767.
- 26.- Griffin IV T.J., and Kolodner R.D. (1990) Purification and preliminary characterization of the *Escherichia coli* K-12 RecF protein. *J Bacteriol* **172**:6291-6299.
- 27.- Göttfer M., Röthlisberger S., Künding C., Beck C., Marty R., and Hennecke H. (2001) Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J Bacteriol* **183**:1405-1412.
- 28.- Hahn M., and Hennecke H. (1987) Mapping of a *Bradyrhizobium japonicum* DNA region carrying genes for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. *Appl Environ Microbiol* **53**:2247-2252.
- 29.- Haijema B.J., Hamoen L.W., Kooistra J., Venema G., and Sinderen D. (1995) Expresión of the ATP-dependent deoxyribonuclease of *Bacillus subtilis* is under competente-mediated control. *Mol Microbiol* **15**:203-211.
- 30.- Haijema B.J., Meima R., Kooistra J., and Venema G. (1996) Effects of lysine-to-glycine mutations in the ATP-binding consensus sequences in the AddA and AddB subunits on the *Bacillus subtilis* AddAB enzyme activities. *J Bacteriol* **178**:5130-5137.
- 31.- Halpern D., Gruss A., Claverys J-P., and El Karoui M. (2004) *rexAB* mutants in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **150**:2409-2414.

- 32.- Hirano T. (1998) SMC protein complexes and higher-order chromosome dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **10**:317-22.
- 33.- Horii Z., and Clark A.J (1973) Genetic analysis of the RecF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: Isolation and characterization of mutants. *J Mol Biol* **80**:327-344.
- 34.- James A.A., Morrison P.T., and Kolodner R. (1982) Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: analysis of the effect of recombination-deficient mutations on plasmid recombination. *J Mol Biol* **160**:411-430.
- 35.- Jokovich M.E. and Myers R.S. (2001) Nuclease activity is essential for RecBCD recombination in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**:949-962.
- 36.- Kooistra J., Vosman B., and Venema G. (1988) Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* transcription unit involved in ATP-dependent nuclease synthesis. *J Bacteriol* **173**:3644-3655.
- 37.- Kooistra J., and Venema G. (1991) Cloning, sequencing and expression of *Bacillus subtilis* genes involved in ATP-dependent nuclease synthesis. *J Bacteriol* **173**:3644-3655.
- 38.- Kooistra J., Haijema B.J., and Venema G. (1993) The *Bacillus subtilis* *addAB* are functional in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **7**:915-923.
- 39.- Kooistra J., Haijema B.A., Hesselting-Meinders A., and Venema G. (1997) A conserved helicase motif of the AddA subunit of the *Bacillus subtilis* ATP-dependent nuclease (AddAB) is essential for DNA repair and recombination. *Mol Microbiol* **23**:137-149.

- 40.- Korangy F., and Julin D.A. (1992) Enzymatic effects of a lysine-to-glutamine mutation in the ATP-binding consensus sequence in the RecD subunit of the RecBCD enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**:1733-1740.
- 41.- Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggelston A.K., Lauder S.D., Rehrauer W.M. (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**:401-465.
- 42.- Kowalczykowski S.C. (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* **25**:156-165.
- 43.- Kuzminov A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:751-813.
- 44.- Laban A., and Cohen A. (1981) Interplasmidic and intraplasmidic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **184**:200-207.
- 45.- Lam S.T., Stahl M.M., McMilin K.D., and Stahl F.W. (1974) Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. II. A mutation which causes hot spot activity. *Genetics* **77**:425-433.
- 46.- Lawrence J.G., and Ochman H. (1998) Molecular archeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9413-9417.
- 47.- Little .W.J., and Mount D.W. (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**:11-22.
- 48.- Lovett S.T., Drapkin P.T., Sutera V.A.Jr., and Gluckman-Peskin T.J. (1993) A sister-strand exchange mechanism for *recA*-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* **135**:631-642.

- 49.- Lovett S.T., Gluckman T.J., Simon P.J., Sutura V.A.Jr., and Drapkin P.T. (1994) Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a *recA*-independent, proximity-sensitive mechanism. *Mol Gen Genet* **245**:294-300.
- 50.- Luisi-DeLuca C., Lovett S.T., and Kolodner R.D. (1989) Genetic and physical analysis of plasmid recombination in *recB recC sbcB* and *recB recC sbcA Escherichia coli* K-12. *Genetics* **122**:269-278.
- 51.- Martínez-Romero E. (2000) Dinitrogen-fixing prokaryotes, p1-12. In Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., and Schleifer K.H. (ed.), The Prokaryotes: an electronic resource for the microbiological community. Springer-Verlag, Berlin, Germany (<http://links.springer-ny.com/link/service/books/10125/index.html>).
- 52- Martínez-Salazar J.M., and Gómez-Eichelmann C. (1987) Molecular rearrangements between two different plasmids of the FII incompatibility group in different recombination-deficient *Escherichia coli*. *Plasmid* **18**:237-245.
- 53.- Martínez-Salazar J.M., Romero D., Girard M.L., and Dávila G. (1991) Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J Bacteriol* **173**:3035-3040.
- 54.- Martínez-Salazar J.M., and Romero D. (2000) Role of *ruvB* gene in homologous and homeologous recombination in *Rhizobium etli*. *Gene* **243**:125-131.
- 55.- Mavingui P., Flores M., Guo X., Dávila G., Perret X., Broughton W.J., and Palacios R. (2002) Dynamic of genome architecture in *Rhizobium sp* strain NGR234. *J Bacteriol* **184**:171-176.

- 56.- Miesel L., and Roth J.R. (1996) Evidence that SbcB and RecF pathway functions contribute to RecBCD-dependent transductional recombination *J Bacteriol* **178**:3146-3155.
- 57.- Miranda A., and Kuzminov A. (2003) Chromosomal lesion suppression and removal in *Escherichia coli* via linear DNA degradation. *Genetics* **163**:1255-1271.
- 58.- Morimatsu K., and Kowalczykowski S.C. (2003) RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: A universal step of recombinational repair. *Mol Cell* **11**:1337-1347.
- 59.- Myers R.S., Kuzminov A., and Stahl F.W. (1995) The recombination hot spot χ activates RecBCD recombination by converting *Escherichia coli* to a *recD* mutant phenocopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:6244-6248.
- 60.- Norbury C., and Hickson I.D. (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:367-401.
- 61.- Page R.D.M. (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**, 357-358.
- 62.- Poteete A.R., Fenton A.C., and Murphy K.C. (1988) Modulation of *Escherichia coli* RecBCD activity by the bacteriophage I and P22 *Abc* functions. *J Bacteriol* **170**:2012-2021.
- 63.- Quiberoni A., Biswas I., El Karoui M., Rezaïki L., Tailliez P., and Gruss A (2001) In vivo evidence of two active nuclease motifs in the double-strand break repair enzyme RexAB of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **183**:4071-4078.

- 64.- Quiberoni A., Rezaïki L., El Karoui M., Biswas I., Tailliez P., and Gruss A. (2001a) Distinctive features of homologous recombination in an "old" microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol* **152**:131-139.
- 65.- Rodríguez C., and Romero D. (1998) Multiple recombination events maintain sequence identity among members of the nitrogenase multigene family in *Rhizobium etli*. *Genetics* **149**:785-794.
- 66.- Romero D., and Brom S. (2004) The symbiotic plasmids of the Rhizobiaceae Chapter 12, pages 271-290. In *Plasmid Biology* Funnell B.A., and Phillips G.J. (editors). ASM press, Washington, D. C., USA.
- 67.- Romero D., Brom S., Martínez-Salazar J.M., Girard M.L., Palacios R., and Dávila G. (1991) Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J Bacteriol* **173**:2435-2441.
- 68.- Romero D., Martínez-Salazar J.M., Girard M.L., Brom S., Dávila G., Palacios R., Flores M., and Rodríguez C. (1995) Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. *J Bacteriol* **177**:973-980.
- 69.- Romero D., Martínez-Salazar J.M., Ortiz E., Rodríguez C., and Valencia-Morales E. (1999) Repeated sequences in bacterial chromosomes and plasmids: a glimpse from sequenced genomes. *Res Microbiol* **150**:735-743.
- 70.- Romero D., and Palacios R. (1997) Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet* **31**:91-111.
- 71.- Shevelev I., and Hübscher U. (2002) The 3'-5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:364-375.

- 72.- Schutlz D., and Smith G.R. (1986) Conservation of Chi cutting activity in terrestrial and marine enteric bacteria. *J Mol Biol* **189**:585-595.
- 73.- Smith G.R. (2001) Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views. *Annu Rev Genet* **35**:243-274.
- 74.- Spies M., and Kowalczykowski S.C. (2004) Homologous recombination by the RecBCD and RecF pathways. In "The bacterial chromosome". ASM press, Washington D.C., USA. (*in press*).
- 75.- Sourice S., Biaudet V., El Karoui M., Erlich S.D., and Gruss A. (1998) Identification of the Chi site of *Haemophilus influenzae* as several related to the *Escherichia coli* Chi site. *Mol Microbiol* **27**:1021-1029.
- 76.- Sugino A., Peebles C.L., Kreuzer K.N., and Cozzarelli N.R. (1977) Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:4767-4771.
- 77.- Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., and Ronson C.W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:8985-8989.
- 78.- Sullivan J.T., and Ronson C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into the *phe-tRNA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:5145-5149.

- 79.- Taylor F.A., and Smith G.R. (2003) RecBCD enzyme is a DNA helicase with a fast and slow motors of opposite polarity. *Nature* **423**:889-893.
- 80.- Thompson J.D., Higgins D.G., and Gibson T.J. (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**:4673-4680.
- 81.- Tun-Garrido C., Bustos P., Gonzáles V., and Brom S. (2003) Conjugative transfer of the p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by a quorum sensing. *J Bacteriol* **185**:1681-1692.
- 82.- Umezu K., Chi N.W., and Kolodner R.D. (1993) Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3875-3879.
- 83.- Valencia-Morales E., and Romero D. (2000) Recombination Enhancement by Replication (RER) in *Rhizobium etli*. *Genetics* **154**:971-983.
- 84.- Walker G.C. (1996) The SOS response of *Escherichia coli* pages 1400-1416. In *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. Neidhart *et al* (Ed.). ASM Press, Washington, D.C. USA.
- 85.- Wang J., Chen R., and Julin D.A. (2000) A single nuclease active site of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme catalyzes single-stranded DNA degradation in both directions. *J Biol Chem* **275**:507-513.

- 86.- Webb B.L., Cox M.M., and Inman R.B. (1997) Recombinational DNA repair: The RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA Gaps. *Cell* **91**:347-356.
- 87.- Webb B.L., Cox M.M., and Inman R.B. (1999) ATP hydrolysis and DNA binding by the *Escherichia coli* RecF protein. *J Biol Chem* **274**:15367-15374.
- 88.- Weller G.R., Kysela B., Roy R., Tonkin L.M., Scalan E., Della M., Devine S.K., Day J.P., Wilkinson A., Di Fagagna F.d'A., Devine K.M., Bowater R.P., Jeggo P.A., Jackson S.P., and Doherty A.J. (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* **297**:1686-1689.
- 89.- West S.C. (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu Rev Biochem* **61**:603-640.
- 90.- Yu M., Souaya J., and Julin D.A. (1998) The 30-kDa C-terminal domain of the RecBCD protein is critical for the nuclease activity, but not the helicase activity, of the RecBCD enzyme from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:981-986.
- 91.- Zaman M.M., and Boles T.C. (1996) Plasmid recombination by the RecBCD pathway of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:3840-3845
- 92.- Zuñiga-Castillo J., Romero D., and Martínez-Salazar J.M. (2004) The recombination genes *addAB* are not restricted to Gram-positive bacteria: Genetic analysis of the recombination initiation enzymes RecF and AddAB in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **186**:7905-7913.

