



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PAPEL DE LAS PROTEINAS PARTICIPANTES EN LA MIGRACIÓN DEL  
INTERMEDIARIO DE HOLLIDAY EN LA CONVERSIÓN GÉNICA EN  
*Rhizobium etli*.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MILDRED CASTELLANOS ESCAMILLA**

**TUTOR:**

**DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA**

**CUERNAVACA, MORELOS. OCTUBRE, 2009.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INGENIERÍA  
GENÓMICA DEL CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, PERTENECIENTE A  
LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA TUTORÍA  
DEL DR. DAVID ROMERO CAMARENA.

*A MIS PADRES...*

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A David Romero, por darme la oportunidad de aprender de un investigador admirable.

A Patricia León por sus excelentes aportaciones en cada reunión.

A Jaime Martínez por estar siempre dispuesto a dar un buen consejo.

A Laura Cervantes y Javier Rivera por la ayuda técnica recibida.

A los sinodales de mi examen de grado, los doctores Carmen Gómez, Alicia González, Rafael Camacho y Guillermo Dávila, por su tiempo y disposición.

Al CONACYT por mantenerme comiendo durante estos 5 años.

A la UNAM por convertirse en otra casa para mi.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, por haberme guiado hasta este camino y porque simplemente no existen palabras que expresen TODO lo que son en mi vida.

A Iván, por tener la capacidad de hacer de nuestra relación, una fascinante y adictiva aventura y por convertirse en uno de los grandes pilares de mi vida.

A mis hermanos, a mi abue Ofe y a tooda la familia Escamilla, por tantos momentos juntos, por lo ejemplos dados, y sobre todo, por el amor que nos une.

A Susi Brom y David Romero, por ser grandes ejemplos de vida y porque más que la investigadora y el tutor, se convirtieron en consejeros y mejor aún, amigos invaluable.

A Edgardo y Ana, por todo el tiempo y vivencias compartidas que dieron como fruto una gran amistad.

A Cris, por vivir junto a mi grandes experiencias de vida que fortalecieron nuestra relación y abrieron nuestras visiones.

A Lau, por permitirme poseer la amistad de una gran persona que siempre tiene las palabras de aliento perfectas en los malos ratos.

A Are, May, Clau, Chuy y Day, por ser las amigas que siempre estarán ahí a pesar del tiempo y la distancia.

A Bren y Salvador, por todos los magníficos momentos compartidos y por los que vendrán.

A Pablo, por su amistad, confianza y apoyo en todo momento.

A Osam, por todo el tiempo trabajando codo a codo y por sus grandes enseñanzas sobre la situación de la economía mundial.

A los compañeros de lab, por las amenas pláticas en los pasillos, por los intercambios de ideas y por compartir gran parte de nuestras vidas en una segunda casa.

## RESUMEN.

La conversión génica es una consecuencia de la recombinación homóloga, en la que hay una transferencia no recíproca de información. La conversión génica puede generarse por cualquiera de los siguientes pasos: i) síntesis de DNA para reparar el segmento degradado, ii) migración de los intermediarios de Holliday, cuyo resultado sería la formación de segmentos heteroduplex, y iii) reparación de las bases mal apareadas en los heteroduplex. Existen al menos tres proteínas capaces de actuar en el paso (ii). Su participación ha sido analizada en cuanto a recombinación homóloga se refiere, sin embargo, no hay estudios sobre su papel directo en la conversión génica. En este trabajo, se demostró el efecto de mutaciones en *ruvB*, *recG* y *radA*, solas o en combinación, sobre la conversión génica en *Rhizobium etli*. El análisis se realizó utilizando una estrategia de cointegración previamente desarrollada en este laboratorio. Los resultados indican que RuvAB es un complejo muy eficiente para la conversión génica, ya que su ausencia causa que los segmentos convertidos sean más cortos que los de la cepa silvestre, así como un cambio en los sitios mayoritariamente convertidos. RecG posee un papel dual en la conversión génica. Su inactivación produce trectos de conversión más largos que los observados en la cepa silvestre, indicando que su actividad es antirrecombinogénica. No obstante, cuando es la única proteína presente en el sistema (como en una doble mutante *ruvBradA*) los segmentos de conversión no desaparecen, con lo que proponemos que RecG puede promover el evento de conversión génica. RadA participa en la conversión génica aunque menos eficientemente que RuvAB y RecG.

## ABSTRACT

Gene conversion, defined as the non-reciprocal transfer of DNA, is one result of homologous recombination. Three steps in this process could give rise to gene conversion: i) DNA synthesis for repair of the degraded segment, ii) Holliday Junction migration, leading to heteroduplex formation, and iii) repair of mismatches in the heteroduplex. There are at least three proteins (RuvAB, RecG and RadA) that participate in the second step. Their roles have been studied for homologous recombination, but evidence of their relative role in gene conversion is lacking. In this work, we showed the effect on gene conversion in *Rhizobium etli* of mutations in *ruvB*, *recG* and *radA*, either alone or in combination, using a cointegration strategy previously developed in our laboratory. The results indicate that the RuvAB system is highly efficient for gene conversion, since its absence provokes smaller gene conversion segments than in the wild type, as well as a shift in the preferred position of conversion tracts. The RecG system possesses a dual role for gene conversion. Inactivation of *recG* leads to longer gene conversion tracts than the wild type, indicating that its activity may hinder heteroduplex extension. However, under circumstances where it is the only HJ activity present (as in the *ruvBradA* double mutant) conversion segments can still be seen, indicating that RecG can also promote gene conversion. RadA is the least efficient system in *R. etli*, but is still needed for production of detectable gene conversion tracts.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
Definición de Recombinación Homóloga y Conversión Génica	10
Función e importancia de la Recombinación homóloga y la conversión génica	11
RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y CONVERSIÓN GÉNICA	11
Modelo de Holliday	12
Modelo de Meselson-Radding	12
Modelo de Reparación de Rupturas en Doble Cadena (DSBR)	14
PROTEINAS QUE PARTICIPAN EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN BACTERIAS	16
Procesamiento de cortes	16
1) RecBCD	17
2) El homólogo funcional de RecBCD: AddAB	18
3) La ruta RecFOR	19
Formación de los intermediarios	21
1) RecA	21
Procesamiento de los intermediarios	22
Migración:	22
1)RuvAB	22
2)RecG	24
3)Una más: RadA	26
Resolución:	26
1)RuvC	26
2)RusA	27
PROTEINAS QUE MIGRAN LOS INTERMEDIARIOS DE HOLLIDAY EN ARQUEAS Y EUKARIOTES	27
Arquea	28
Eucarya	28
PROCESOS BIOLÓGICOS EN LOS QUE INTERVIENEN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y LA CONVERSIÓN GÉNICA	32
La recombinación homóloga en la replicación	32
La conversión génica en eventos específicos	33
1) Cambio de tipo de apareamiento (Mating type)	34
2) Variación antigénica	35
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	37
<i>Rhizobium etli</i> y la conversión génica	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
RESULTADOS	39
THE EXTENT OF MIGRATION OF THE HOLLIDAY JUNCTION IS A CRUCIAL FACTOR FOR GENE CONVERSION IN <i>Rhizobium etli</i> .	
Introduction	
Experimental design	
Association of gene conversion to crossover events and gene conversion skew in mutants does not change with respect to that of the wild type.	

RadA is an inefficient system for gene conversion in <i>R. etli</i> .	
RecG plays a dual role in gene conversion.	
RuvB is the most efficient HJ migration system, and its absence causes a shift in the distribution of most converted sites.	
Discussion	
RESULTADOS ADICIONALES	49
Programación de cortes en doble cadena para analizar conversión Génica	49
Sobreexpresión de las proteínas que migran los intermediarios de Holliday	50
Complementación del análisis filogenético de <i>nifH</i> : ¿es la conversión génica el mecanismo que mantiene la identidad entre las familias multigénicas de <i>R. etli</i> ?	52
PERSPECTIVAS	53
Longitud de homología mínima para que haya recombinación homóloga en <i>Rhizobium etli</i>	53
¿Qué determina la direccionalidad de RuvAB <i>in vivo</i> ?	54
Caracterización bioquímica de RadA	55
Sistemas de reparación en <i>Rhizobium etli</i>	56
Resolvasas alternativas a RuvC	57
REFERENCIAS	58

## INTRODUCCIÓN.

### *Definición de Recombinación Homóloga y Conversión Génica.*

La recombinación homóloga es el proceso mediante el cual dos secuencias homólogas se encuentran espacialmente para llevar a cabo un intercambio de información. La frecuencia con la que ocurre este mecanismo está directamente relacionada con la longitud y el grado de identidad entre las secuencias que participan <sup>80</sup>. Algunas consecuencias de la recombinación homóloga son la generación de nuevas combinaciones alélicas, la conversión génica y los rearrreglos genómicos .

Los rearrreglos genómicos son resultado de entrecruzamientos entre las cadenas de DNA y estarán dictados por cómo se resuelvan los intermediarios de la recombinación. Por otro lado, la conversión génica es un mecanismo en el que hay un intercambio no recíproco de información, es decir, una de las secuencias participantes transmite su información a la otra, resultando dos moléculas idénticas de DNA. Además, la conversión puede existir independientemente de que haya un entrecruzamiento o no (Fig. 1).

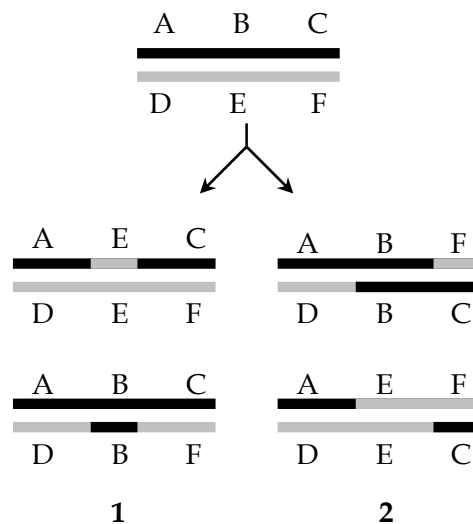


Fig. 1. Conversión génica asociada a entrecruzamiento (2), o independiente (1). Las letras mayúsculas significan polimorfismos a lo largo de las secuencias.

### ***Función e importancia de la Recombinación homóloga y la conversión génica.***

La recombinación homóloga es un proceso conservado en los organismos. Su gran importancia radica en las funciones que desempeña dentro de la célula.

Normalmente el genoma de un organismo está sujeto a sufrir cortes de doble cadena en el DNA. En algunas ocasiones dichos cortes son generados de manera programada, como ocurre durante la meiosis o en el proceso de cambio de tipo de apareamiento (*mating type*) en las levaduras; otras veces estos cortes son el resultado de los propios procesos celulares como la replicación y la respiración; y por último pueden ser el producto de factores extracelulares como la radiación y ciertos antibióticos. Una de las funciones biológicas de la recombinación es la reparación de estos cortes en doble cadena en el DNA. De esta forma, la recombinación juega un papel primordial en la reparación del DNA, manteniendo la integridad del genoma y por ende, la vida celular.

Finalmente, la recombinación homóloga participa en la diversificación de los genomas por medio de la adquisición de información genética a través de la transferencia horizontal. Sin embargo, contraponiéndose con el punto anterior, también puede mantener la identidad entre familias multigénicas por medio de la conversión génica, un proceso conocido como evolución concertada <sup>75</sup>.

## RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y CONVERSIÓN GÉNICA

En 1930, el científico alemán Hans Winkler introdujo el término conversión génica cuando observó que en tétradas de levadura existían segregaciones aberrantes de tipo 3:1 para algunos alelos heterocigotos, en lugar de 2:2 como era de esperarse. Treinta años después, en 1964, Robin Holliday explicó mecanísticamente cómo ocurría la conversión génica a través de la recombinación homóloga <sup>51</sup>.

### *Modelo de Holliday* <sup>39</sup>.

El modelo de Holliday sugiere que al encontrarse dos secuencias homólogas, debe ocurrir un corte en cadena sencilla en ambas secuencias (Fig. 2A), posteriormente cada hebra invade al duplex homólogo en busca de la complementaridad y después de ligarse forman una estructura en forma de X conocida como estructura de Holliday (Fig. 2B). Esta estructura es capaz de migrar mientras haya complementaridad en secuencia, dando lugar a la formación de secuencias heteroduplex simétricas, regiones donde pueden existir bases mal apareadas que serán blanco de sistemas de reparación (Fig. 2C). Si ambos apareamientos erróneos se corrigen hacia el mismo resultado entonces habrá conversión génica (Fig. 2.1 y 2.2). Por último, si la estructura de Holliday se resuelve de manera vertical producirá un entrecruzamiento de las secuencias iniciales (Fig. 2.1), si lo hace de manera horizontal, entonces habrá conversión génica sin entrecruzamiento (Fig. 2.2). Cabe dejar en claro, que según este modelo, la conversión génica será el resultado de la acción de los sistemas de reparación sobre las bases mal apareadas en los heteroduplex.

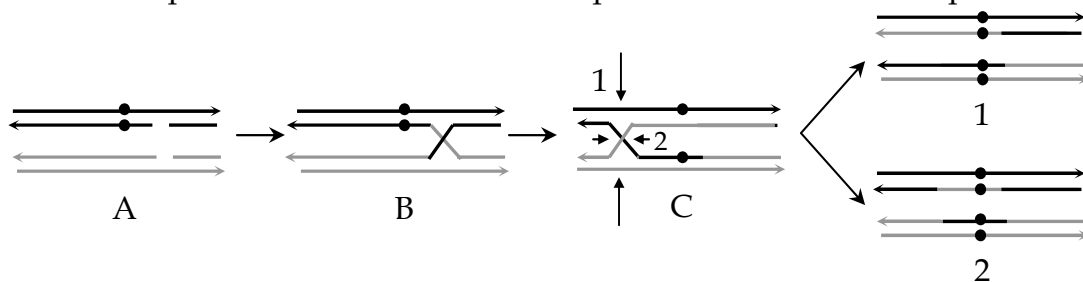


Figura 2. Modelo de Holliday. Los puntos negros significan polimorfismos en las secuencias. El par de flechas largas (1) representa el corte que producirá entrecruzamientos, el par de flechas cortas (2) representa sólo conversión génica sin entrecruzamiento.

### **Modelo de Meselson-Radding.**

El modelo de Holliday fue de gran importancia ya que era el primero que daba luz al mecanismo detallado de la conversión génica, además ya proponía la formación de la estructura de Holliday, de la cual se observaron imágenes por microscopio electrónico en los años setentas, demostrando su existencia <sup>68</sup>, convirtiéndose así en el intermediario central de la recombinación.

Sin embargo, diez años después de la propuesta del modelo, Matthew Meselson y Charles Radding sugirieron algunas modificaciones <sup>63</sup>. En el modelo de Holliday, los heteroduplex se forman, con la misma extensión, en ambas moléculas que están recombinando (heteroduplex simétricos, ver figura 2C); sin embargo, algunos resultados de la época no podían ser explicados de esta manera sino por medio de un modelo que predijera la formación de heteroduplex no simétricos, es decir, que el heteroduplex se formara con mayor extensión en una de las moléculas de DNA y no en ambas.

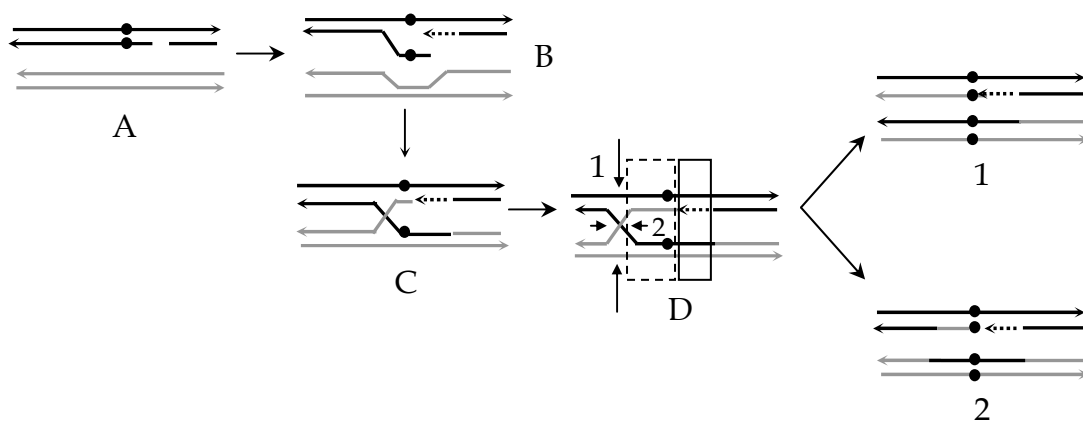


Figura 3. Modelo de Meselson-Radding. Los puntos negros significan polimorfismos en las secuencias. El par de flechas largas (1) representa la resolución que producirá entrecruzamientos, el par de flechas cortas (2) representa que habrá sólo conversión génica sin entrecruzamiento. El rectángulo con línea continua enmarca los heteroduplex asimétricos, mientras que el de línea punteada enmarca los heteroduplex simétricos.

Así, surgió el modelo de Meselson-Radding, el cual propone que hay un corte de cadena sencilla en una de las dos moléculas (Fig. 3A), en ese punto comienza la síntesis de DNA que tiene como consecuencia el desplazamiento de la hebra hacia el duplex homólogo, funcionando así como una “cadena

invasora" (Fig. 3B), en esta parte se forma un D-Loop debido a la búsqueda de la complementariedad por parte de la cadena invasora, que posteriormente induce un corte a partir del cual se degrada el D-loop (Fig. 3B). Al aparearse con el duplex homólogo, la cadena invasora será la fuente de un heteroduplex asimétrico. Después de estos pasos hay ligación y formación de la estructura de Holliday (Fig. 3C), la cual puede migrar mientras haya homología, extendiendo los heteroduplex de manera simétrica (Fig. 3D). La resolución del intermediario puede darse de igual forma que en el modelo de Holliday, con la oportunidad de producir entrecruzamientos también (Fig. 3.1). En este modelo, la conversión génica estará dictada por la acción de los sistemas de reparación sobre las bases mal apareadas de la región heteroduplex.

#### ***Modelo de Reparación de Rupturas en Doble Cadena (DSBR).***

El modelo de reparación de rupturas en doble cadena fue propuesto a inicios de los años ochenta y ha permanecido hasta la fecha como el modelo más aceptado. Las características que lo colocan como el modelo canónico son varias. La primera de ellas es que cortes en doble cadena estimulan la frecuencia de la recombinación mucho más que cortes en cadena sencilla. Además de lo anterior, este modelo da explicación a algunas observaciones experimentales que no podían explicarse por el modelo de Meselson-Radding. Estas observaciones estaban relacionadas con la localización de los entrecruzamientos relativa a los eventos de conversión génica, la paridad de la conversión para todas las clases de mutaciones y el hecho de que la hebra que sufre el corte, parece ser receptora de información genética <sup>84</sup>, no donadora como se infiere del modelo de Meselson Radding.

En este modelo la recombinación se da por la ruptura de las dos cadenas de DNA en uno de los dos duplex participantes (Fig. 4B). Las cadenas cortadas son degradadas en dirección 5'--3', generando cadenas sencillas con extremos 3' libres. Estos extremos invaden al duplex sin cortar (Fig. 4C), apareándose con la cadena complementaria, para formar la estructura de asa en D (D-loop), la cual se extiende por síntesis de DNA. El asa en D puede aparearse por

complementaridad con el duplex previamente cortado; y, a través de síntesis de DNA, da como resultado la reparación del segmento degradado. La ligación de las cadenas entrecruzadas de DNA lleva a la formación de dos estructuras de Holliday (Fig. 4C). Estas estructuras pueden migrar, ya sea para extender los heteroduplex de manera simétrica o para acortarlos dependiendo de las enzimas que entren en juego (Fig. 4D). Posterior a la migración de las estructuras vendrá el corte de ellas. Si la resolución de ambas se da en la misma orientación, dará como resultado conversión génica sin entrecruzamiento, pero si cada una se corta en diferente orientación el resultado será conversión génica asociada a entrecruzamiento. Cabe destacar que en este modelo la conversión génica puede generarse por síntesis del DNA degradado inicialmente y por migración de los intermediarios de Holliday, así como la subsecuente reparación de las bases mal apareadas.

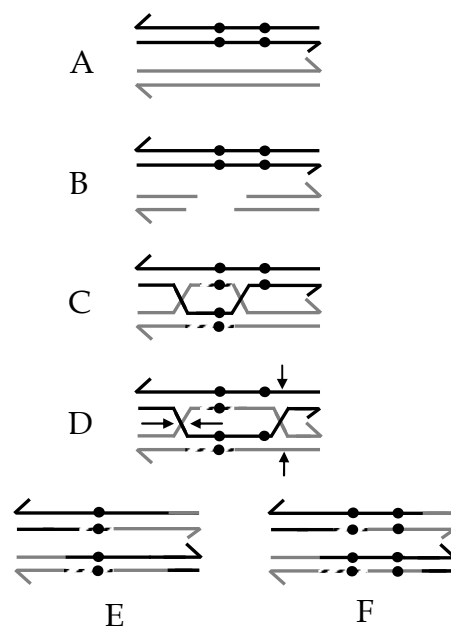


Figura 4. Modelo de Reparación de Rupturas en Doble Cadena. Los puntos negros representan polimorfismos. En esta imagen sólo se muestran los resultados hacia entrecruzamiento relacionados con conversión génica hacia la ganancia (F) y hacia la ganancia y pérdida (E) de los polimorfismos. Detalles en el texto.



## **PROTEINAS QUE PARTICIPAN EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN BACTERIAS.**

Ayudando a fortalecer los modelos de recombinación, se han encontrado diversas proteínas que participan en pasos específicos. Para un mejor entendimiento, dividiremos la participación de las diferentes proteínas en tres bloques:

- a) Procesamiento de cortes: involucra a las enzimas responsables de procesar los cortes en el DNA hasta la formación de cadenas sencillas con extremos 3' libres.
- b) Formación de los intermediarios: en este paso se describirá a RecA, proteína responsable de la invasión y búsqueda de la complementariedad en el duplex homólogo por parte de la hebra con extremo 3'.
- c) Resolución de los intermediarios: son los pasos finales desde la síntesis de DNA, la migración de las estructuras de Holliday hasta la resolución de éstas.

En cada uno de los bloques anteriores participan diferentes enzimas que en conjunto suman más de 20 proteínas. A continuación se definen las más importantes.

### ***Procesamiento de cortes.***

La recombinación homóloga puede iniciarse por dos tipos de corte en general; las posibilidades son cortes en doble cadena o cortes en cadena sencilla. Cada uno de ellos será abordado por conjuntos de proteínas diferentes, sin embargo, el objetivo de cada una de ellas es común: la generación de extremos 3' que son sustratos para RecA, proteína indispensable en la recombinación homóloga.

Los cortes en doble cadena son procesados por un complejo proteico conocido como RecBCD, mientras que los cortes en cadena sencilla son sustrato principal para la ruta RecFOR, sin embargo, como veremos adelante, RecFOR en conjunto con otras proteínas también tiene la capacidad de reparar cortes en doble cadena.

1) *RecBCD* <sup>83</sup>.

*RecBCD* (exonucleasa V), es un complejo heterotrimérico que posee actividades de exo y endonucleasa así como también de helicasa, y para poder generar los extremos 3' depende de una secuencia en el DNA conocida como Chi (Crossover Hotspot Instigator).

La subunidad *RecB* posee un dominio característico de helicasa que le confiere dicha actividad con dirección 3' a 5'. También tiene actividad de ATPasa dependiente de DNA de cadena sencilla. En el extremo carboxi-terminal posee dos dominios, uno de nucleasa y el otro, muy importante, es para interacción con *RecA*.

*RecC* está relacionada con el reconocimiento correcto de la secuencia Chi y además, su interacción con *RecB* estimula su afinidad por extremos en doble cadena. De esta manera, la enzima *RecBC* es una helicasa procesiva, sin embargo, carece de actividad de nucleasa, a pesar que *RecB* posee un dominio para esta actividad.

La proteína *RecD* es una ATPasa dependiente de DNA que al igual que *RecB* posee actividad de helicasa, sin embargo, su dirección es de 5' a 3', lo contrario a *RecB*. De esta manera el resultado neto de la interacción *RecBCD* es el movimiento del complejo en la misma dirección con respecto al corte en doble cadena. Además la interacción de *RecD* con *RecBC* produce una actividad de nucleasa muy fuerte, implicando que *RecD* activa el dominio de nucleasa de *RecB* y también aumenta la afinidad con que se une el complejo al extremo en doble cadena. Cabe destacar que la actividad de nucleasa del complejo es asimétrica, degradando principalmente la hebra con el extremo 3'.

La velocidad de desenrollamiento de la enzima es de 1000-1300 pb por segundo a 37°C. En un evento, *RecBCD* puede degradar hasta 30 kilobases. Sin embargo, la gran procesividad de esta enzima, parece contraponerse con la idea de que participa en la recombinación homóloga. Esta paradoja se resolvió tras el descubrimiento de la secuencia Chi.

Esta secuencia se encuentra sobrerrepresentada en el genoma de *E. coli*, encontrando 1009 secuencias en las 4.6 megapares de bases. Chi es una secuencia de 8 pb, 5'GCTGGTGG3', que tiene la capacidad de alterar las actividades de RecBCD después de su reconocimiento desde el extremo 3'.

Después de que RecBCD encuentra una secuencia chi, su actividad de nucleasa se invierte. La degradación de la hebra con extremo 3', que antes era más eficiente, se ve disminuída, mientras que la degradación de la hebra 5' se vuelve más rápida. Finalmente, y muy importante, es que el complejo gana la capacidad de unir a RecA con la hebra sencilla recientemente producida, generando el nucleofilamento, que será capaz de invadir al duplex homólogo en la búsqueda de la complementaridad.

## 2) El homólogo funcional de RecBCD: AddAB

RecBCD se encuentra ampliamente distribuido entre las bacterias, sin embargo, no es la única enzima responsable de procesar cortes en doble cadena, existe también su equivalente funcional: AddAB.

Un análisis reciente de la distribución filogenética de estos dos complejos <sup>22</sup>, reveló que de 513 genomas bacterianos secuenciados hasta la fecha, el 92% de ellos (474) poseen los genes de *recBCD* y/o *addAB*. En 292 genomas fueron encontrados *addAB* y en 206 hay genes para *recBCD*. Sólo 24 organismos poseen genes para ambos complejos. El hecho de que ambos complejos se encuentren en la mayoría de los genomas bacterianos, pero que muy pocas veces se encuentren los dos en un sólo organismo, apoya la idea de que son máquinas alternativas con la misma función.

AddA posee un dominio de helicasa y otro de nucleasa, recordando a las actividades de RecB. Además, la dirección de la helicasa es igual a la de RecB, de 3' a 5'. En cuanto a AddB, no parece ser muy similar a RecC o RecD pero posee, al igual que RecD, un dominio de helicasa inactivo. También tiene un motivo de ATPasa y otro dominio de nucleasa similar al de AddA. AddB es responsable de la

degradación de la hebra con extremo 5', mientras que AddA es quien degrada a la hebra con extremo 3'. En un escenario opuesto a RecBCD, AddAB degrada el DNA de manera simétrica, pero cuando el complejo reconoce una secuencia similar a chi (en *Bacillus subtilis* Chi<sub>Bs</sub> 5'AGCGG3'), la actividad de nucleasa con dirección 3' a 5' es disminuída resultando en la producción de una hebra sencilla 3' <sup>15</sup>.

### 3) La ruta RecFOR.

La ausencia de RecBCD produce una disminución en los niveles de recombinación homóloga, sin embargo, dicha caída no es mortal para la célula, lo cual hacía suponer la existencia de otro(s) gene(s) capaces de cubrir, al menos parcialmente, esta ausencia. Así se llegó a *recF*, un gen cuya inactivación genera que los niveles de recombinación homóloga disminuyan, y cuyo efecto se hace más drástico al generar dobles mutantes *recB recF* <sup>8, 40, 5, 98</sup>.

Además de lo anterior, se encontró que mutaciones en los genes *sbcB* o *sbcCD* (Supresor of RecBC) eran capaces de suprimir por completo el fenotipo producido por mutantes en *recBC*. La restauración del fenotipo silvestre es gracias a la ruta de RecFOR.

El gen *sbcB* codifica para la exonucleasa I, cuya dirección de degradación es de 3' a 5', es decir, degrada hebras sencillas con extremos 3' (los sustratos para RecA) <sup>49</sup>, mientras que SbcCD funciona también como exonucleasa con dirección 3'a 5' aunque actúa en DNA de doble cadena <sup>18</sup>, además también es una endonucleasa que rompe estructuras de tallo-asa y cruciformes <sup>19</sup>.

La recombinación homóloga en cepas con genotipos *recBCsbcB* ó *recBCsbcCD*, depende no sólo de RecFOR sino de la acción de otras enzimas como RecQ y RecJ <sup>54</sup>. Estas enzimas pueden procesar cortes en doble cadena. RecQ es una helicasa con polaridad 3' a 5', mientras que RecJ posee actividad de exonucleasa, degradando DNA de cadena sencilla con orientación de 5'a 3', de esta manera, ambas enzimas pueden producir los sustratos para RecA. Sin embargo, ni RecQ ni RecJ tienen la capacidad de unir RecA a la hebra sencilla, por lo que dicha

hebra debe evitar la formación de estructuras secundarias y lo hace por medio de otra proteína conocida como SSB (Single Strand Binding protein) <sup>65</sup>.

En este punto es donde entra RecFOR. Este complejo es necesario para romper la barrera termodinámica formada por la unión de SSB al DNA, permitiendo el desplazamiento de SSB y subsecuente unión de RecA a la hebra. Estudios bioquímicos indican que RecFOR reconoce partes del DNA justo donde la doble hebra termina y continúa una sola cadena (Fig. 5), <sup>73</sup>. El término de la doble cadena debe ser en 5', este sustrato es justamente el producido por RecJ. Al unirse el complejo a esta estructura, desestabiliza la unión SSB-DNA de cadena sencilla, permitiendo la unión de RecA. Más específicamente, el dímero RecOR es el responsable de romper la barrera termodinámica entre la hebra de DNA y las proteínas SSB, asistiendo la unión de RecA, mientras que RecF y RecR limitan la extensión de los filamentos <sup>89</sup>.

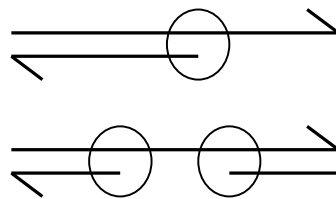


Figura 5. Ejemplos de DNA con transiciones de doble cadena a cadena sencilla. Sustratos para RecFOR.

Como hemos visto, la afirmación de que RecFOR sirve básicamente para reparar cortes en cadena sencilla no es del todo cierta, pues en conjunto con otras proteínas puede procesar también cortes en doble cadena, restaurando las deficiencias en recombinación vistas en mutantes de *recBC*.

Sin embargo, debido a su actividad, en efecto es la responsable de reparar cortes en cadena sencilla. Cuando ocurre un corte de este tipo, se produce una estructura como la reconocida por RecFOR, una parte en el DNA donde cambia de doble cadena a cadena sencilla, con el extremo 5'. De esta manera se une RecFOR permitiendo el ensamblaje y extensión del nucleofilamento por RecA.

### *Formación de los intermediarios.*

Como ya se mencionó, este paso corresponde básicamente a la unión de monómeros de la proteína RecA a una cadena sencilla con extremo 3' para formar un filamento. La polimerización de la proteína permite que el filamento invada al duplex homólogo y busque la complementaridad. A continuación se describen las características de RecA.

#### *1) RecA<sup>21,60</sup>.*

Inicialmente descubierta como una mutante que mostraba defectos en recombinación y sobrevivencia al daño causado por radiación UV, RecA es una proteína que cataliza un paso central e indispensable en la recombinación homóloga.

RecA inicia formando un nucleofilamento con forma de hélice alrededor de DNA de cadena sencilla; los monómeros de la proteína unidos a ATP, van ensamblándose de forma unidireccional, de 5' a 3'. A este evento se le ha llamado presinapsis. Posteriormente, en la sinapsis, el filamento es capaz de invadir al duplex homólogo, en donde se inicia un intercambio de hebras para buscar la complementaridad. Finalmente en la postsinapsis, la invasión inicial es extendida, por longitudes de hasta miles de pares de bases, en donde la hidrólisis del ATP es requerida, la cual además, le permite atravesar por regiones de heterología.

Referente a los dominios y motivos que esta proteína posee, encontramos que en el extremo carboxilo terminal, RecA posee dos regiones (Loop 1: residuos 157-164 y Loop2: residuos 195-209), que parecen ser las responsables de la unión a DNA de cadena sencilla y de doble cadena. En la parte más extrema (residuos 270 a 352) hay un dominio por el cual, el DNA de doble cadena accesa al centro del filamento inicial para iniciar el intercambio de hebras.

También se encuentran los motivos "Walker" A (residuos 63-73) y B (residuos 139-144), necesarios para la unión a ATP y a iones. Los residuos 42-65 forman el motivo MAW (por "make ATP work"), involucrado en "comunicar" los

cambios conformacionales inducidos por el ATP. Finalmente, el extremo amino terminal corresponde al dominio de interacción entre subunidades.

En condiciones normales de crecimiento se pueden encontrar en la célula de 8 000 a 10 000 monómeros, pero esta cantidad aumenta considerablemente (a 70 000) después del tratamiento con agentes que causan daño a DNA.

Tocante al daño a DNA, además de ser el pilar fundamental en el proceso de reparación por recombinación homóloga, RecA también funciona como regulador de la respuesta SOS.

LexA es un represor transcripcional de al menos 48 genes que conforman el regulón SOS. Cuando existe daño en el DNA, comienza la formación de nucleofilamentos de RecA, es aquí cuando LexA interacciona con RecA y adquiere la capacidad de autoproteasa. De esta manera, permite la expresión de los genes necesarios para reparar el daño.

#### ***Procesamiento de los intermediarios.***

Posterior a la invasión por RecA y consecuente formación de las estructuras de Holliday, intervienen otras enzimas en el proceso de recombinación, desde aquellas que pueden migrar a las estructuras de Holliday hasta otras que deben resolver los intermediarios para que no se acumulen y causen problemas en la célula.

#### ***Migración:***

##### ***1)RuvAB.***

RuvA y RuvB son proteínas que se asocian formando un complejo enzimático capaz de unirse a estructuras de Holliday y migrarlas a una tasa de 98pb/s y por regiones tan largas como 7 000 pb<sup>6</sup>. Sus genes se encuentran en un operón, el cual es parte del regulón SOS.

RuvA forma tetrámeros en solución, siendo éstos los responsables de la unión a estructuras de Holliday. Una de las superficies de los tetrámeros es

cóncava, posee cuatro surcos en donde se sitúan los brazos de la estructura de Holliday, manteniéndolos de forma planar. La mayor parte de esta cara del tetrámero está cargada positivamente, sin embargo hacia la parte central, cada subunidad posee un ácido glutámico y un ácido aspártico que aportan carga negativa formando entre los dos una especie de perno <sup>90</sup>. La presencia de estas protuberancias mantiene abierta a la estructura de Holliday y parece tener un papel modular en la procesividad del complejo formado por RuvABC <sup>41</sup>. (Fig. 6A).

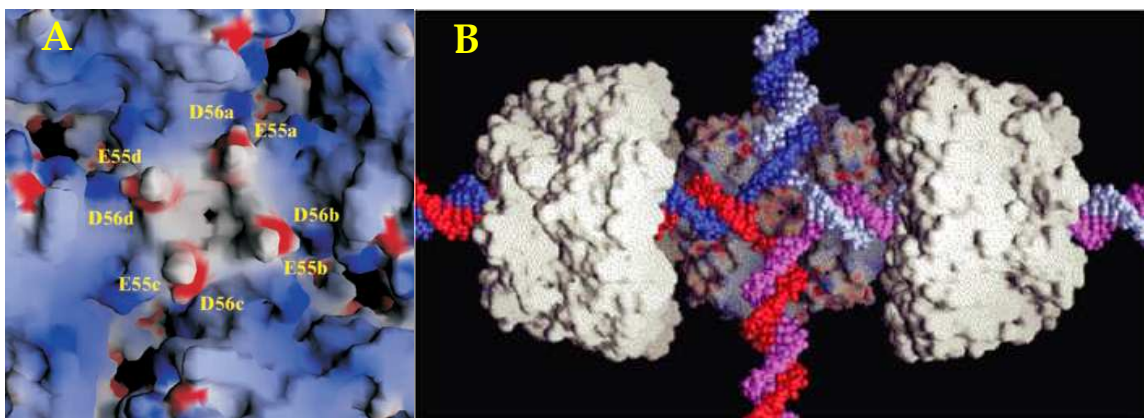


Figura 6. En la sección A (Tomada de <sup>27</sup>), se muestran los aminoácidos que forman los pedestales del tetrámero de RuvA en donde se mantiene abierta la estructura de Holliday. En B (tomada de <sup>50</sup>), el complejo RuvAB. En gris se muestran los anillos de RuvB unidos a los brazos heteroduplex. RuvA se muestra como la plataforma sobre la que está anclada la estructura de Holliday.

Se han observado dos especies de complejos RuvA-estructura de Holliday, en el primero sólo un tetrámero se une, mientras que en el complejo II, hay dos tetrámeros unidos en una especie de concha octamérica cuya función no se tiene clara. Se ha sugerido que podría proteger a la estructura de Holliday del corte prematuro por medio de RuvC (ver más adelante). Otra opción es que evite que la estructura de Holliday se desensamble mientras ocurre una reacción de migración dinámica, asegurando un alta procesividad del complejo RuvAB <sup>32</sup>, aunque el complejo I-RuvB-RuvC también puede migrar a los intermediarios de Holliday <sup>87</sup>.



También podría estabilizar los contactos entre RuvA y RuvB por medio del dominio III de RuvA; al haber dos dominios estabilizaría más el contacto, maximizando la actividad de RuvB <sup>32</sup>.

Como se ha dejado ver en el último párrafo, RuvA tiene la capacidad de cargar a RuvB al DNA <sup>67</sup>, además de estimular su actividad de ATPasa dependiente de DNA <sup>81</sup>.

RuvB forma anillos hexaméricos, los cuales funcionan como motores a través de los cuales pasan los brazos de la estructura de Holliday, teniendo como consecuencia el desenrollamiento de las cadenas y la formación de regiones heteroduplex. Para que haya una reacción eficiente, es necesaria la unión de dos anillos en los brazos opuestos de la estructura de Holliday <sup>95</sup>, a cada lado del tetrámero de RuvA. (Fig. 6B).

A este complejo se le ha asignado la función de ser recombinogénico, es decir, migra los intermediarios de Holliday lejos del punto donde se inició la recombinación, dando lugar a la formación de regiones heteroduplex largas.

## 2) RecG

RecG es una proteína que funciona como monómero, posee tres dominios dentro de los cuales, el dominio “cuña” es el responsable de la unión a estructuras de Holliday y probablemente de la procesividad de la helicasa <sup>10</sup> (Fig. 7), además la translocación de la proteína es dependiente de la energía obtenida a partir de la hidrólisis de ATP. Su velocidad se estima en 26 pb/s <sup>57</sup> y su número de copias es de alrededor de 10 en fase exponencial <sup>10</sup>.

En cuanto a la direccionalidad de esta proteína, se propone que tiene una polaridad de 3' a 5' <sup>93</sup>, con la cual causa, *in vitro*, que los intermediarios de recombinación generados por RecA se resuelvan hacia los productos iniciales, llevando a sugerir que tiene una actividad antirrecombinogénica <sup>92</sup>. Sin embargo, esta propuesta va en contra de resultados en *Escherichia coli*, donde mutaciones en

esta proteína disminuyen las frecuencias de recombinación, haciendo suponer que es recombinogénica como RuvAB <sup>52, 61</sup>.

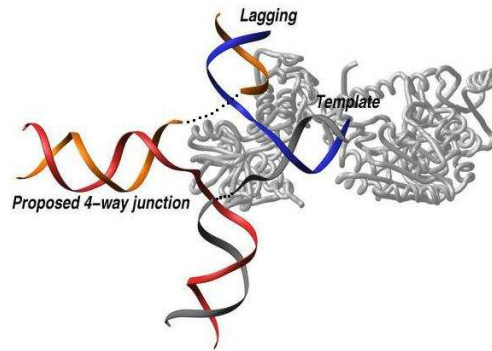


Figura 7. Estructura proteica de RecG unida a una estructura de Holliday. La parte de la proteína que se encuentra en medio de la estructura de Holliday es el dominio cuña, responsable de la procesividad.

Esta proteína ha sido muy relacionada al proceso de replicación. Los análisis han llevado a proponer que es necesaria para reactivar horquillas de replicación colapsadas. Se propone que en este caso, lleva al alineamiento de las hebras que se están sintetizando, para formar una estructura conocida como “pata de pollo” (“chickenfoot”, Fig. 10), de manera que la lesión en el DNA pueda ser removida o transpasada <sup>58, 59</sup>.

### 3) Una más: RadA

RadA se descubrió como una mutante que provoca sensibilidad a radiación y a otros agentes que causan daño a DNA <sup>28</sup>. Su secuencia posee un dedo de zinc en el extremo amino; hacia la parte central se encuentra muy relacionada con la secuencia de *recA*, y de hecho comparten las cajas “Walker” A y B, características de las ATPasas. Hacia el extremo carboxi-terminal la secuencia está relacionada con la proteasa Lon, encargada de regular la síntesis de polisacárido capsular y la respuesta SOS <sup>66</sup>.

Al mutar *radA* en combinación con otras proteínas que participan en la recombinación homóloga, específicamente *ruvA* o *recG*, se observó que las

frecuencias de recombinación disminuían aún más que aquellas vistas en las mutantes sencillas, e incluso una triple mutante (*ruvA recG radA*), disminuyó su frecuencia tanto como la de una *recA*<sup>7</sup>. Dichos resultados llevaron a proponer que *radA* muy probablemente está participando en el mismo paso en el que lo hacen *ruvAB* y *recG*, la migración de los intermediarios de Holliday.

### **Resolución:**

#### 1) *RuvC*

*ruvC* se encuentra río arriba del operón *ruvAB* y no es parte del regulón SOS. La proteína tiene actividad de endonucleasa y se une específicamente a estructuras de Holliday como dímero, donde provoca 2 cortes simétricos en las hebras con la misma polaridad<sup>42</sup>. El corte ocurre preferencialmente en la secuencia 5´A/T TT G/C3´<sup>78</sup>, entre la T y G/C. *RuvC* se une a *RuvAB*-estructura de Holliday y migra junto con el complejo, esto le proporciona la facilidad de encontrar los sitios específicos de corte<sup>91</sup>. Además *RuvB* estabiliza la unión de *RuvC* a la estructura y estimula su actividad de resolvasa<sup>88</sup>.

La resolución de los intermediarios de Holliday es muy importante en el proceso de la recombinación homóloga, ya que ella definirá si el resultado final es un entrecruzamiento o no. La orientación del corte por *RuvC* está dictada por la posición que tenga *RuvAB* respecto a la estructura de Holliday<sup>87</sup>.

Antes se ha mencionado que dos tetrámeros de *RuvA* se unen a la estructura de Holliday protegiéndola quizá del corte prematuro por *RuvC*, sin embargo, los datos no parecen sugerir que dímeros de *RuvC* puedan desplazar a uno de los tetrámeros de *RuvA* una vez formado el complejo octamérico, y más aún, sí existe la formación de complejos de un tetrámero de *RuvA* con un dímero de *RuvC* en la cara opuesta de la estructura de Holliday cuando ambas proteínas son agregadas consecutivamente<sup>27</sup>. Por otro lado, mutantes de *RuvA* en aminoácidos específicos que evitan la formación de octámeros, aunque siguen uniéndose a estructuras de Holliday, sólo parecen soportar la actividad de un

anillo hexamérico de RuvB <sup>69</sup>. Se requieren más datos para aclarar la unión y dinámica de estas proteínas a la estructura de Holliday *in vivo*.

## 2) *RusA*

RusA es una proteína codificada en un profago de *Escherichia coli*, en condiciones normales, el gene para esta proteína se encuentra pobremente expresado. Esta proteína fue encontrada a través de una mutante que suprimía el efecto de mutaciones en *ruvA*, *B* o *C* respecto a daño por luz UV, donde dicha supresión requería de la presencia de RecG <sup>55</sup>. La mutante tenía la inserción de una IS precediendo al gene *rusA*, lo que provocaba una mayor expresión de RusA. Análisis posteriores demostraron que RusA es una endonucleasa que se une a estructuras de Holliday y las resuelve, donde la manera en que produce los cortes es muy similar a la de RuvC <sup>79</sup>. Forma dímeros en solución y corta preferentemente secuencias CC en la parte 5' <sup>14</sup>.

## PROTEINAS QUE MIGRAN LOS INTERMEDIARIOS DE HOLLIDAY EN ARQUEAS Y EUCARIOTES.

Hemos descrito a la mayoría de las proteínas que participan en la recombinación homóloga en las bacterias, sin embargo, de todas las anteriores hay algunas que cobran especial interés si hablamos de conversión génica. Las proteínas que migran los intermediarios de Holliday parecen ser muy importantes, ya que serán las generadoras de sustratos para la posible aparición de conversión génica (revisar en Modelos de recombinación homóloga y conversión génica). Debido a esto, resulta interesante profundizar más acerca de la existencia de estas proteínas en los dos dominios de la vida restantes. ¿Acaso la migración de los intermediarios de Holliday es un fenómeno que se mantiene en todos los organismos?.

### *Arquea*

En el dominio de las arqueas la búsqueda ha arrojado una candidata. Apenas en el año 2005 se reportó una helicasa del hipertermófilo *Pyrococcus furiosus* a la cual llamaron Hjm (Por Holliday Junction Migration)<sup>30</sup>.

Hjm es una proteína dependiente de ATP, capaz de resolver, *in vitro*, estructuras de Holliday tanto sintéticas como formadas por RecA.

Su secuencia no es similar a la de *ruvB*, sin embargo posee dominios de helicasa en el extremo amino-terminal, mientras que en el extremo carboxilo podría haber una región de reconocimiento para estructuras específicas en el DNA o para interactuar con otra proteína. Es una secuencia altamente conservada en arqueas y al parecer tiene algunos homólogos en eucariotes.

A pesar de esto, en un análisis posterior<sup>31</sup> proponen, por medio de ensayos bioquímicos y de complementación, que Hjm podría estar actuando *in vivo* de manera muy similar a la helicasa RecQ.

### *Eucarya*

Se han identificado proteínas capaces de migrar estructuras de Holliday *in vitro*, y mejor aún, algunas de ellas parecen tener una actividad antirrecombinogénica *in vivo*, ya que evitan eventos de entrecruzamiento. Sin embargo, no todas realizan esta actividad precisamente por la migración de los intermediarios de Holliday.

Algunas de las proteínas con la actividad que nos atañe se han descrito como helicasas de la familia de *recQ*, entre ellas encontramos a RecQ1, BLM y WRN en humano (las últimas dos asociadas a enfermedades) mientras que Sgs1 es un homólogo en levadura.

RecQ1 es una proteína cuya afinidad es más fuerte por estructuras formadas de tres hebras que por estructuras de 4 hebras (Fig. 8), además posee una actividad de migración unidireccional con polaridad 3' a 5' <sup>11</sup>. De acuerdo con estas características, RecQ1 podría estar disociando el apareamiento dado entre un duplex y una hebra con extremo 5' (Fig. 9).

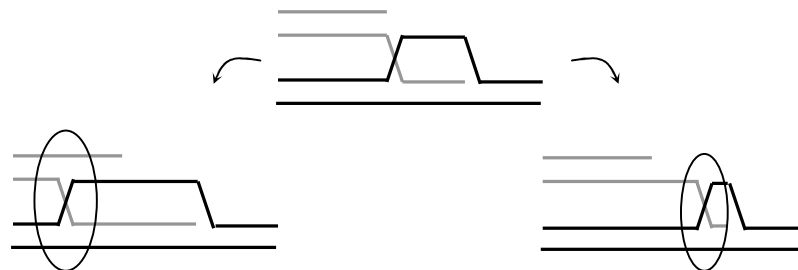


Figura 8. Después de la invasión de la hebra, la estructura de Holliday puede migrar hacia ambos lados, ya sea para estabilizarse formando una estructura con 4 hebras (lado izquierdo), ó migrar de reversa evitando un posible entrecruzamiento, con este movimiento, la consecuencia es la formación de la estructura con 3 hebras (lado derecho).

*BLM* es un gen cuya mutación es la causante del Síndrome de Bloom. Este desorden provoca inmunodeficiencia, baja estatura, infertilidad y gran propensión a varios tipos de cáncer. A nivel genómico se presenta una hiperrecombinación entre cromátidas hermanas y cromosomas homólogos. Dadas estas características, muy probablemente es BLM quien se encarga de evitar los eventos de

entrecruzamiento<sup>38</sup>. BLM es capaz de migrar estructuras de Holliday por medio de la hidrólisis de ATP y la interacción proteína-estructura es específica<sup>44</sup>. Además también se ha visto que en conjunto con otras proteínas (hTOPOIII $\alpha$  y BLAP75/RMI1) BLM puede resolver estructuras de Holliday dobles hacia los productos iniciales, evitando entrecruzamientos<sup>94, 71</sup>. También es capaz de intervenir en la horquilla de replicación, y lo hace alineando las hebras que se están sintetizando, lo cual tiene como consecuencia la formación de la conocida estructura “chicken foot”<sup>70</sup>. Finalmente BLM puede inhibir el intercambio de hebras producido por Rad51, una homóloga de RecA en eucariotes<sup>13</sup>.

De acuerdo con estas actividades, el mecanismo de acción de BLM puede ser: 1) en la replicación formando la estructura “chicken foot”, similar a la formada por RecG (Fig. 10), o bien en la recombinación homóloga, ya sea para 2) disolver las dos estructuras de Holliday formadas en un modelo como el de reparación de rupturas en doble cadena, impidiendo que se generen entrecruzamientos, o 3) evitar que el nucleofilamento de Rad51 se mantenga invadiendo al duplex homólogo provocando que la reparación sea por otro mecanismo como el de SDSA, (Fig. 9).

Respecto a WRN (Werner’s Syndrome Protein), es la causante de provocar el Síndrome de Werner, caracterizado por envejecimiento prematuro; además las células presentan grandes deleciones en el genoma, cortes en los cromosomas y translocaciones. Estos rearrreglos son indicativos de que existen eventos de recombinación homóloga aberrantes que son causados por la ausencia de la proteína WRN. *In vitro* esta proteína puede resolver los intermediarios de la recombinación formados por RecA, a través de la hidrólisis de ATP<sup>20</sup>. No obstante, posee una mayor afinidad por DNA de cadena sencilla, es reclutada en sitios donde la replicación está bloqueada e interacciona con proteínas de este mismo proceso como RPA. Por lo anterior no se piensa que la actividad de WRN *in vivo* sea similar a la de RuvAB, sino más bien, que tiene la habilidad de reconocer y

translocar varias estructuras secundarias y que posee un rol en el procesamiento de horquillas de replicación rotas.

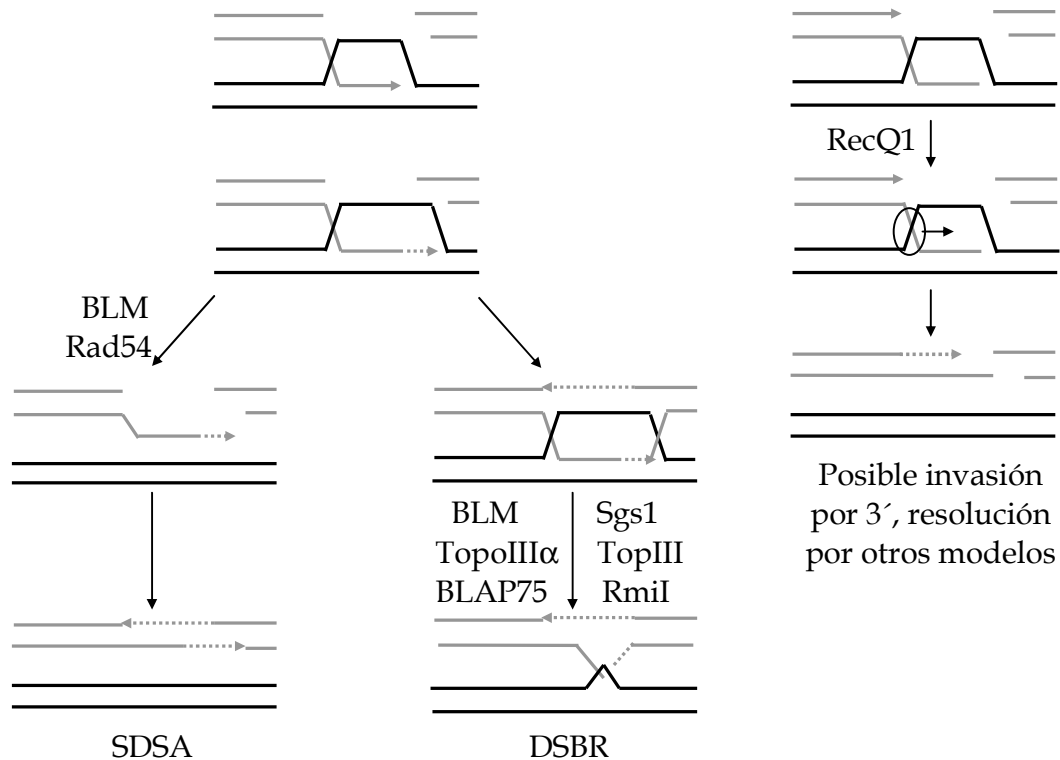


Figura 9. Participación de algunas proteínas pertenecientes a eucariotes que migran estructuras de Holliday. Las cabezas de flecha indican extremo 3'. Líneas punteadas indican síntesis de DNA. Modificado de Bugreev et al 2007; Bugreev et al 2008).

Sgs1 es la representante de estas proteínas en *Saccharomyces cerevisiae* y como veremos, es la contraparte de BLM en levadura. Independientemente de su actividad de helicasa, Sgs1 puede evitar eventos de entrecruzamiento así como producir tractos de conversión génica cortos<sup>53</sup>. Estos resultados han sido explicados por medio de un modelo en el que Sgs1 migra a las estructuras de Holliday dobles de regreso hasta provocar un encuentro entre ellas, resolviendo los intermediarios hacia no entrecruzamientos (Fig. 9). Además Sgs1 también se asocia con las proteínas TopIII y Rmi1 que son los homólogos de hTOPO IIIalpha y RMI1.



Existen otras proteínas capaces de migrar los intermediarios de Holliday *in vitro*, que no son de la familia de *recQ*, entre ellas podemos encontrar a Rad51C en mamíferos, que además de funcionar migrando los intermediarios también parece tener actividad de resolución aunque probablemente lo haga en compañía de otra(s) proteína(s) <sup>50</sup>. Rad54 también migra intermediarios de Holliday, sin embargo su afinidad es mayor por estructuras formadas de 3 hebras (Fig. 8), que de 4 y lo puede hacer de una manera bidireccional <sup>12</sup>. *In vivo* su sobreexpresión genera tractos de conversión génica cortos <sup>46</sup>, con lo que parece ser antirrecombinogénica.

Por último se encuentra una proteína que se conoce como Proteína de la Anemia Fanconi (FANCM) que está asociada a este desorden, el cual se identifica por inestabilidad cromosómica. FANCM participa en la monoubiquitinación de otras proteínas asociadas a la anemia de Fanconi en respuesta a problemas en la replicación y se localiza con proteínas como Rad51 en focos de reparación, sin embargo no tiene un rol preponderante en la reparación de cortes en doble cadena por recombinación homóloga. Migra estructuras de Holliday y de manera muy interesante este movimiento es dependiente de homología. Su mecanismo de acción se relaciona más con horquillas de replicación detenidas que en la recombinación homóloga <sup>33</sup>.

## PROCESOS BIOLÓGICOS EN LOS QUE INTERVIENEN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y LA CONVERSIÓN GÉNICA.

### *La recombinación homóloga en la replicación.*

La participación de la recombinación homóloga en la reparación de cortes en doble cadena durante la replicación es un evento de gran importancia. En ocasiones, las horquillas de replicación pueden detenerse debido a lesiones en el DNA, la reiniciación de su avance depende de proteínas como RecG, RuvAB e incluso RecFOR. Para los dos primeros casos, ya se ha mencionado que normalmente se unen y migran a las estructuras de Holliday, que suceden durante la recombinación homóloga pero en las horquillas de replicación colapsadas, RecG podría provocar la regresión y el alineamiento de las hebras líder y retrasada, que se están sintetizando, para formar la estructura conocida como “pata de pollo” (ó “*chicken foot*”) (Fig. 10A) <sup>58, 59</sup>, a partir de aquí pueden ocurrir dos eventos, uno es que la hebra líder sirva como plantilla para la síntesis de la hebra retrasada y de esta manera simplemente produzcan una desviación que permita eludir (*bypass*) la lesión del DNA. La otra opción es que la “pata de pollo” (que no es más que una estructura de Holliday), se corte por la mitad gracias a RuvABC (Fig. 10B) generando un corte en doble cadena que como veremos más adelante, es un instigador de la recombinación homóloga produciendo por medio de ésta, el reinicio de la replicación.

Respecto a RecFOR, se ha propuesto que reconoce y se une a la horquillas detenidas, de manera que las protege y provoca el reensamblaje de la holoenzima que tiene como consecuencia el reinicio de la replicación <sup>16</sup>. Análisis posteriores han demostrado, que una vez que se ha formado la estructura de la “pata de pollo”, RecF y R se unen a las hebras nacientes para mantenerlas y protegerlas de degradación por enzimas como RecQ y RecJ <sup>17</sup>.

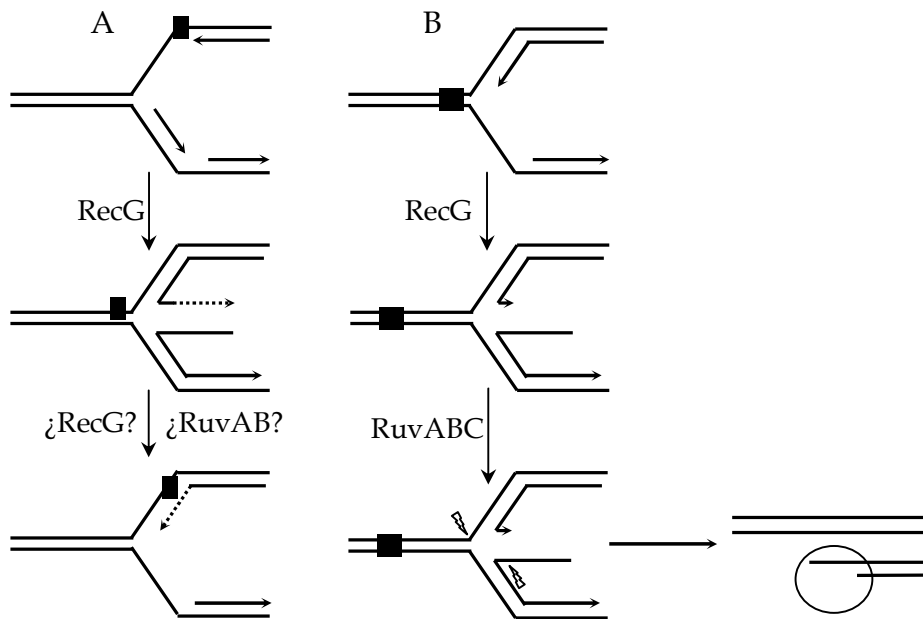


Figura 10. Participación de la recombinación homóloga en la replicación y formación de la "pata de pollo". Los rectángulos representan daños en el DNA, los triángulos representan un corte. En el círculo se muestra un corte en doble cadena. Ver detalles en el texto.

### *La conversión génica en eventos específicos.*

La conversión génica es un proceso que se presenta en varios fenómenos biológicos de manera programada. Ejemplificar algunos de ellos nos ayudará a entender su importancia.

#### 1) *Cambio de tipo de apareamiento (Mating type).*

*Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular que presenta formas tanto haploides como diploides. Ambas formas pueden reproducirse de manera asexual por medio de la gemación. Sin embargo, la forma haploide posee uno de dos posibles factores que se interpretan como el sexo de la célula, estos factores pueden ser **a** o **α**, los cuales son feromonas peptídicas expresadas por el gen *MAT* (*MATa* o *MATα*). Cuando dos células haploides de diferente sexo (a y α) se encuentran, se fusionan formando una célula diploide capaz de reproducirse sexualmente. Estas

células diploides forman un asca con 4 esporas haploides en su interior por medio de la meiosis.

En un escenario donde sólo hay células haploides de un tipo sexual, es posible que después de algunas generaciones se encuentren células del otro sexo y células diploides como consecuencia. Dicho fenómeno es posible debido a que una célula haploide puede cambiar de sexo por medio de conversión génica. Este cambio está regulado por el ciclo celular, de manera que una célula que ha cambiado de sexo no puede volver a hacerlo hasta que se divida nuevamente.

Además del gen *MAT*, en el mismo cromosoma hay dos copias extras que están silenciadas llamadas *HML* y *HMR*. La copia *HML* (que se encuentra a la izquierda de *MAT*), corresponde a la feromona tipo  $\alpha$ , mientras que *HMR* (cuya posición es a la derecha de *MAT*) al tipo a.

Para llevar a cabo el cambio de sexo, el gen *MAT* que se expresa (ya sea el alelo a o el  $\alpha$ ), sufre un corte en doble cadena por la endonucleasa HO, que se expresa sólo en la fase G1 del ciclo celular. Después del corte hay degradación de gran parte del gen y para reparar este daño, la copia *HMR* o *HML* es utilizada como plantilla para la síntesis del DNA. Debido a que este tipo de conversión génica no está asociado a eventos de entrecruzamiento, se han propuesto modelos como el de síntesis dependiente del alineamiento de la hebra (SDSA por sus siglas en inglés) <sup>36</sup>. En este modelo, una de las cadenas degradadas de *MAT* con extremo 3' invade a *HMR* o *HML*, donde se lleva a cabo la síntesis de DNA, posteriormente, esta nueva hebra es desplazada y sirve como plantilla para la síntesis de su cadena complementaria, (Fig. 11).

Generalmente la secuencia donadora es la opuesta a la que se está expresando en *MAT*, de manera que realmente se produzca un cambio de sexo. El evento se encuentra regulado por proteínas que se encargan silenciar a la secuencia que no será la donadora, además de que el lugar en donde se encuentran las copias (a la derecha o izquierda de *MAT*) también influye <sup>36</sup>.

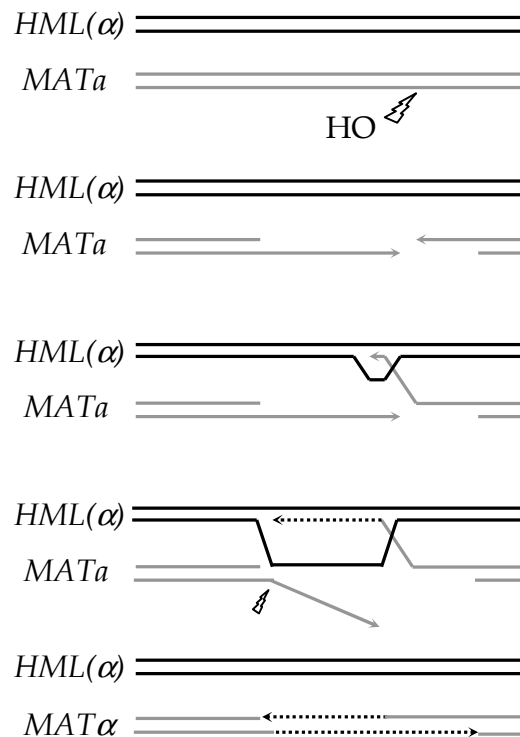


Figura 11. Conversión génica del gen *MATa* a *HML* por el modelo SDSA. HO genera un corte en doble cadena en el gen *MATa*, la hebra 3' invade al duplex homólogo y hay síntesis de DNA. La hebra recién sintetizada vuelve hacia su posición original y sirve como plantilla para sintetizar a su hebra complementaria, la cual ha sido eliminada previamente.

## 2) Variación antigénica.

Diversos organismos patógenos poseen proteínas expuestas en su superficie que funcionan como antígenos. Estos antígenos disparan la respuesta del sistema inmune del huésped, generándose anticuerpos específicos que evitan la infección exitosa por parte del microorganismo. Para contender con esto, algunos patógenos han evolucionado la posibilidad de cambiar los antígenos de superficie continuamente, evitando que el sistema inmune genere el anticuerpo necesario para un tipo de proteína en un determinado momento. Para lograr esta variación antigénica, existen diferentes mecanismos, entre los que se encuentra la conversión génica <sup>25</sup>.

Normalmente en el genoma del organismo invasor hay varios alelos del gen que codifica para la proteína antigénica. Una de estas copias se encuentra en una posición donde puede expresarse, mientras que las demás permanecen silenciadas. Para generar el cambio, la información de las copias silenciadas se transfiere hacia la copia que se expresa, ya sea la secuencia del gen completo o combinando secciones de diferentes copias, generando la posibilidad de expresar un gran número de antígenos.

Uno de los ejemplos mejor estudiados es el agente causante de la gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae* <sup>47</sup>. Esta bacteria gram-negativa, logra adherirse al epitelio urogenital en el humano por medio de estructuras conocidas como pili. La subunidad protéica (pilina) que forma estos apéndices, se expresa en el locus *pilE*. Para llevar a cabo la variación antigénica, este locus recibe información de copias conocidas como *pilS*, que carecen de promotores <sup>64</sup> y que por lo tanto no se expresan. La transferencia de información que ocurre entre estas regiones es no recíproca (conversión génica), lo que implica que las copias donadoras de información permanecen sin cambios <sup>97</sup>. El número de copias de *pilS* oscila entre 16 y 19, más aún, cada copia contiene 6 regiones variables llamadas minicassettes. La combinación del alto número de copias con la posibilidad de transferir 6 diferentes regiones puede producir una cantidad enorme de variantes (19<sup>6</sup> o alrededor de 47 millones) <sup>77</sup>.

El mecanismo por el que se lleva a cabo la conversión génica es dependiente de proteínas que participan en la recombinación homóloga como RecJ <sup>82</sup>, RecO, RecQ <sup>62</sup>, RecA <sup>48</sup>, RuvAB y RecG <sup>76</sup>. De manera muy interesante, recientemente se ha confirmado que el complejo RecBCD, participante en los pasos iniciales de la recombinación homóloga, aunque es necesario para la reparación del DNA en *N. gonorrhoeae*, no participa en la variación antigénica <sup>37</sup>.

Como *N. gonorrhoeae*, existen otras bacterias que generan variación antigénica por medio de conversión génica, entre ellas encontramos a *Borrelia burgdorferi* <sup>96</sup> y *Anaplasma marginale* <sup>9</sup>, sin embargo la lista no se limita a especies

bacterianas, ya que algunos protozoarios como *Trypanosoma brucei* <sup>3</sup>, *Babesia bovis* <sup>4</sup> y *Plasmodium falciparum* <sup>29</sup> también la llevan a cabo

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

### *Rhizobium etli* y la conversión génica.

*Rhizobium etli* es una  $\alpha$ -proteobacteria capaz de fijar nitrógeno en el frijol. Forma nódulos en la raíz en donde lleva a cabo la transformación del nitrógeno para que la planta pueda asimilarlo.

Posee un cromosoma circular de más de 4 megabases y seis megaplásmidos que van desde 180 hasta 640 kilobases aproximadamente. De manera muy interesante, tiene unas 200 familias de secuencias reiteradas, de las cuales 133 tienen una longitud de al menos 100 pares de bases con secuencia idéntica <sup>35</sup>. Esta característica las hace sustratos ideales para la recombinación homóloga <sup>80</sup>.

En uno de los plásmidos, conocido como plásmido d o plásmido simbiótico, se encuentra una región de 107 kilobases que es la responsable de codificar la mayoría de los genes involucrados en la nodulación y fijación de nitrógeno. En esta región está ubicada la familia multigénica de *nifH*, el gen que codifica para la nitrogenasa-reductasa, una metaloproteína parte del complejo que convierte el N<sub>2</sub> en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Esta familia está integrada por tres copias idénticas del gen, con longitud de 950 pb.

Se ha demostrado que entre los miembros de esta familia ocurren múltiples eventos de recombinación homóloga <sup>72</sup> y más aún, por medio de estudios filogenéticos se concluyó que la conversión génica es el mecanismo que mantiene la identidad entre esta familia (Sepúlveda E. and Romero D, datos sin publicar). La longitud promedio de los trectos de conversión en *nifH*, en una cepa silvestre de *R. etli*, es de aproximadamente 400 pares de bases y proteínas como MutS, que forma parte del sistema de reparación de bases mal apareadas en bacterias, es necesaria para que los trectos sean así de largos, ya que si está ausente provoca una disminución en la longitud <sup>74</sup>.

Con respecto a otras proteínas que podrían afectar directamente a la conversión génica (como RuvAB, RecG y RadA, responsables de la migración de



los intermediarios de Holliday), se han analizado mutantes de estas proteínas y su efecto en cuanto a frecuencias de recombinación <sup>56</sup>. Mutantes sencillas en *ruvB* o *radA* disminuyen las frecuencias de recombinación entre tres y nueve veces, sin embargo, una mutante en *recG* aumenta la recombinación unas cinco veces con respecto a la silvestre dependiendo del substrato empleado para caracterizar la recombinación. En mutantes dobles el efecto se va haciendo aditivo, mientras que una triple mutante disminuye las frecuencias casi al nivel de una *recA*. De acuerdo a los resultados observados, se propuso que RuvAB es la proteína con mayor participación en el sistema, RadA, por el contrario, tiene una participación minoritaria y RecG posee una actividad antirrecombinogénica, quizá debido a la regresión de las estructuras de Holliday. Si las conclusiones anteriores son ciertas, en un sistema donde se analizara la longitud de trectos de conversión génica, los resultados deberían ser como sigue: en una mutante en *ruvB*, habría trectos más cortos con respecto a la cepa silvestre. Una mutante en *recG* tendría trectos más largos y una mutante en *radA* resultaría en longitudes muy similares a las de la silvestre.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Cuál es el papel de las proteínas que migran los intermediarios de Holliday en la conversión génica de *Rhizobium etli*?

## **RESULTADOS**

Los resultados de este proyecto se encuentran publicados en la siguiente referencia:

Castellanos M., Romero D. 2009. The extent of the Holliday junction is a crucial factor for gene conversion in *Rhizobium etli*. J. Bacteriol. 191: 4987-4995.

## The Extent of Migration of the Holliday Junction Is a Crucial Factor for Gene Conversion in *Rhizobium etli*<sup>∇</sup>§

Mildred Castellanos and David Romero\*

Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

Received 26 January 2009/Accepted 27 May 2009

Gene conversion, defined as the nonreciprocal transfer of DNA, is one result of homologous recombination. Three steps in recombination could give rise to gene conversion: (i) DNA synthesis for repair of the degraded segment, (ii) Holliday junction migration, leading to heteroduplex formation, and (iii) repair of mismatches in the heteroduplex. There are at least three proteins (RuvAB, RecG, and RadA) that participate in the second step. Their roles have been studied for homologous recombination, but evidence of their relative role in gene conversion is lacking. In this work, we showed the effect on gene conversion of mutations in *ruvB*, *recG*, and *radA* in *Rhizobium etli*, either alone or in combination, using a cointegration strategy previously developed in our laboratory. The results indicate that the RuvAB system is highly efficient for gene conversion, since its absence provokes smaller gene conversion segments than those in the wild type as well as a shift in the preferred position of conversion tracts. The RecG system possesses a dual role for gene conversion. Inactivation of *recG* leads to longer gene conversion tracts than those in the wild type, indicating that its activity may hinder heteroduplex extension. However, under circumstances where it is the only migration activity present (as in the *ruvB radA* double mutant), conversion segments can still be seen, indicating that RecG can also promote gene conversion. RadA is the least efficient system in *R. etli* but is still needed for the production of detectable gene conversion tracts.

DNA may be the target of several intracellular and extracellular injuries that can either modify or break it. Many of these may cause, either directly or indirectly, single- or double-strand breaks, leading to replication fork collapses. Independent of their origin, breaks provoke the activation of several pathways that can repair the damage; homologous recombination is the most important of these because of its ability to repair without a loss of information. Besides its role in repair, homologous recombination helps the diversification of the genome through the acquisition of foreign DNA sequences. Paradoxically, recombination also participates in the maintenance of identity among multigenic families, a process known as concerted evolution (38).

Concerted evolution can be generated through gene conversion, an outcome of homologous recombination, which is defined as the nonreciprocal transfer of DNA between two or more homologous sequences. In bacteria, this nonreciprocal transfer of information usually entails sizable gene segments (400 to 600 bp are frequent) and occurs at frequencies higher than the mutation frequency (1, 38, 39). The mechanism of gene conversion has as a consequence the spread of sequence polymorphisms present in one of the two recombining homologs; these polymorphisms can be either maintained or eliminated in both sequences, thus giving rise to identity between homologs. The occurrence of gene conver-

sion in bacteria has been either demonstrated experimentally (3, 12, 21, 31; see reference 38 for a review) or inferred from the conservation pattern among repeated genes through phylogenetic analysis (5, 9, 14, 20, 24, 32, 34, 46; see reference 38 for a review).

The most accepted model that explains homologous recombination and gene conversion is the double-strand-break repair (DSBR) model (47). This model, characterized for the presence of double Holliday junctions (HJs) (Fig. 1), is flexible enough to explain gene conversion and its association with crossovers. In the DSBR model (Fig. 1), the length of gene conversion segments can be modulated by three separate events, namely (i) resynthesis of the degraded segment, using information from the uncut homolog (Fig. 1C); (ii) the extent of migration of the HJs (Fig. 1D); and (iii) mismatch repair in the resulting heteroduplex regions (Fig. 1E and F). Consistent with these predictions, inactivation of bacterial systems participating in the generation of the degraded segment, such as the RecBCD or AddAB system (1, 3), or in charge of mismatch repair, such as MutS (1, 39), provokes a reduction in the frequency and/or extent of gene conversion in bacteria. Oddly enough, the extent of migration of the HJs on gene conversion has been a poorly studied factor.

Movement of the HJs may be a crucial factor to determine the extent of gene conversion, because long heteroduplex regions can be processed afterwards by the mismatch repair system, generating extensive tracts of gene conversion. At least three systems (RuvAB, RecG, and RadA) participate in the migration of HJs in *Escherichia coli*. RuvA binds to HJs either as a homotetramer (16) or a double homotetramer (35), maintaining the HJs in a planar form; RuvA is also needed for the binding of the RuvB helicase to DNA (33). RuvB forms a

\* Corresponding author. Mailing address: Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas-UNAM, Apartado Postal 565-A, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. Phone: 52 (777) 3175867. Fax: 52 (777) 3175581. E-mail: dromero@cgc.unam.mx.

§ Supplemental material for this article may be found at <http://jbb.asm.org/>.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 5 June 2009.



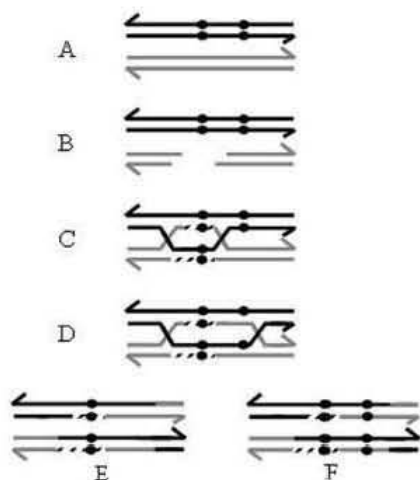


FIG. 1. Gene conversion under the DSB model. (A) Two homologous sequences are shown, differing by sequence polymorphisms (black circles). (B) A double-strand break in the recipient homolog is processed (by RecBCD or AddAB) to a gap, generating 3' tails. (C) After homolog invasion, DNA synthesis (discontinuous lines) fills the gap, and upon ligation, two HJs are formed. At the gap-filling step, gene conversion has occurred because the uncut sequence was the template for gap resynthesis (note the black circles in the cut homolog). (D) HJ migration (by RuvAB, RecG, or RadA) leads to heteroduplex formation. Mismatch repair in the heteroduplex region (mediated by MutS) dictates, depending on the orientation, whether further gene conversion occurs. (E) After HJ resolution, a crossover event with gene conversion to both the gain (black circles in both homologs) and loss of the polymorphisms is generated. (F) Another possible outcome is a crossover event with gene conversion to the gain of both polymorphisms. Only the resolution of HJs leading to crossovers is shown.

hexameric ring responsible for the migration of the HJs away from the initiation site through ATP hydrolysis.

The RecG helicase binds to HJs as a monomer; the so-called "wedge" domain in this protein is responsible for both strand separation and processivity (6). RecG was demonstrated *in vitro* to drive branch migration in the opposite direction of that of RecA (52); consequently, RecG may undo preformed HJs (an antirecombinogenic activity), but it also has recombinogenic activity (30). Although the third protein, RadA, has not been studied *in vitro*, mutations in the gene displayed genetic synthetic effects with both *ruvA* and *recG* mutations (4, 28), indicating that RadA participates in the migration of HJs.

Single mutations in *ruvB*, *recG*, or *radA* reduce homologous recombination to about the same extent in *Escherichia coli* (4, 22), an unexpected result given the differing *in vitro* activities for RuvB and RecG. The effect of these mutations on gene conversion has been studied only, to our knowledge, in the case of gonococcal pilin variation (a specialized gene conversion system), where mutations in either *ruvB* or *recG* equally reduce the frequency of gene conversion (40). As interesting as these data are, there are some doubts as to whether these phenotypes are applicable for all bacteria. For instance, in several bacteria, such as *Helicobacter pylori* (18, 19), *Acinetobacter baylyi* (15), and *Rhizobium etli* (27, 28), inactivation of *ruvB* re-

duces recombination markedly, but inactivation of *recG* enhances recombination. The role of RadA outside of *E. coli* has been studied only in *Bacillus subtilis* (7), where it affects chromosome segregation, and in *R. etli*, where *radA* mutants were only weakly affected in recombination (28). These data open up the possibility of differing contributions of RuvB, RecG, and RadA to gene conversion in bacteria other than *E. coli*.

One interesting system in this regard is in *Rhizobium etli*, a symbiotic nitrogen-fixing alphaproteobacterium. *R. etli* CFN42 has a multipartite genome of 6.53 Mb, harboring approximately 200 reiterated DNA families. More than 133 of these families are comprised of identical repeats longer than 100 bp (13), long enough to be substrates for homologous recombination (43). Sequence identity among members of repeated families in *R. etli* (at least for the nitrogenase multigene family) is maintained by multiple recombination events, including gene conversion (36). Phylogenetic analysis of the nitrogenase multigene family members in several *R. etli* isolates is fully consistent with the operation of gene conversion as a homogenizing mechanism (E. Sepúlveda, M. Castellanos, and D. Romero, unpublished results).

To gain insight into the mechanism of gene conversion in *R. etli*, we have studied the anatomies of tracts undergoing gene conversion in this organism (39). Our results revealed that (i) crossover events were almost invariably accompanied by a gene conversion event occurring nearby; (ii) gene conversion tract lengths ranged in size from 150 bp up to 800 bp; (iii) gene conversion events displayed a strong bias, favoring the preservation of incoming sequences; and (iv) the MutS mismatch repair system plays an important role in determining the length of gene conversion segments (39).

The differential roles of RuvB, RecG, and RadA in homologous recombination in this organism were described recently (28). Based on the effects of single and multiple mutations on recombination frequency, we proposed that RuvAB is the main system for migration of HJs, with RadA playing an ancillary role. RecG, in contrast, appears to inhibit recombination, perhaps due to HJ regression. Gene conversion would be an ideal system to test these proposals because it allows us to explore the length of converted segments, a factor highly related to HJ migration. In particular, we predict that in comparison to the wild type, (i) inactivation of *radA* should not affect gene conversion tract length, (ii) null mutations in *recG* should lead to longer gene conversion tracts, and (iii) absence of *ruvB* would instigate a marked reduction in the length of gene conversion segments, or even their disappearance. Evidence reported here fully confirms these predictions.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and media.** All *Rhizobium etli* strains were grown in peptone-yeast extract medium (39) at 30°C. *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C. Antibiotics were used in the following concentrations (in micrograms per milliliter): kanamycin (Km), 15; nalidixic acid (Nal), 20; spectinomycin (Sp), 100; and tetracycline (Tc), 5.

**Molecular analysis of transconjugants.** *Escherichia coli* S17-1 (F<sup>-</sup> *pro-82 thi-1 endA1 hsdR17 supE44 recA13*; chromosomally integrated RP-4-2 [Tc::Mu Km::Tn7]) (45) was used as a host for conjugative transfer of pJGus28 (39). The integrative plasmid pJGus28 harbors a kanamycin resistance gene, allowing convenient selection for its presence, and a derivative of the *nifH* gene modified to contain eight unique restriction sites (restriction fragment length polymorphisms [RFLPs]) spaced nearly every 100 bp (39). Biparental matings between *Escherichia coli* S17-1 harboring pJGus28 and the desired *R. etli* strains were set up on



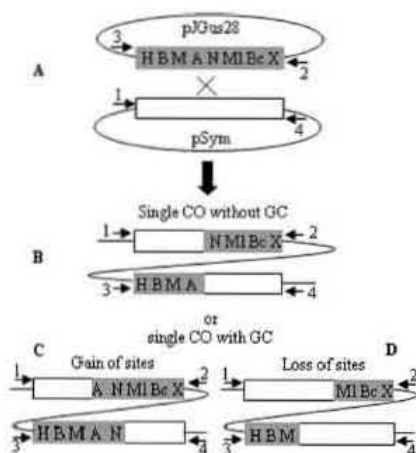


FIG. 2. Experimental strategy for analyzing gene conversion. (A) The modified *nifH* gene is represented by a gray rectangle, and capital letters indicate different restriction sites as follows: H, HindIII; B, BamHI; M, MaelIII; A, ApaI; N, NarI; MI, MluI; Bc, BclI; X, XbaI. The only wild-type *nifH* gene of the symbiotic plasmid of *R. etli* is depicted as a white rectangle. Upon recombination of pJGus28 and pSym (a cross between both *nifH* genes), we could expect a reciprocal recombination event (markers are just redistributed) (B), a nonreciprocal recombination event to a gain of sites (note the central markers A and N) (C), or a loss of sites (note that the central markers A and N have been lost in both parts of the cointegrate) (D). Arrows in all panels represent the specific primers used for amplifying each *nifH* gene in the cointegrate molecule.

solid peptone-yeast extract medium lacking antibiotics (Fig. 2 and see below); transconjugants were selected by their resistance to nalidixic acid (a naturally occurring trait in all *R. etli* strains) and kanamycin (selecting for the integration of pJGus28). To avoid the analysis of siblings, 10 different conjugation experiments were set up for each *R. etli* recipient strain, retaining not more than five single colonies from each experiment. Genomic DNA was isolated from 50 transconjugants from every recipient strain, and each one was analyzed by PCR using a Techgene thermal cycler and a conventional *Taq* DNA polymerase, with a regime of 31 cycles with denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 45°C (primers 1 and 2) (Fig. 2B) or 48°C (primers 3 and 4) (Fig. 2B) for 1 min, and extension at 72°C for variable times ranging from 1 to 1.5 min. To amplify both *nifH* products in the cointegrates, specific primers were employed (primers 1 and 2 for the upper part of the cointegrate; primers 3 and 4 for the lower part) (39) (Fig. 2). The resulting PCR products were purified by using Centri-Sep spin columns (Applied Biosystems) before digestion with appropriate restriction enzymes. Restriction enzymes were purchased from diverse companies and used according to the recommendations of the suppliers. Restricted products were separated on 1% agarose gels and visualized after staining with ethidium bromide.

**Construction of *R. etli* mutants.** To direct the integration of pJGus28 into a single *nifH* region, we took advantage of a deletion derivative from pSym (strain CFNX55) that lacks two of the three *nifH* genes from strain CFN42 (37). This strain was used as the wild-type strain. Strain CFNX55 was modified afterwards by allelic exchange with the *nuvB::loxP*Sp or *radA::loxP*Sp allele (28). To that end, plasmid pJMS3 (*nuvB::loxP*Sp) or pJMS15 (*radA::loxP*Sp) was mobilized separately from *E. coli* to *R. etli* by biparental matings; double recombinants were identified by their Nal<sup>r</sup> Sp<sup>r</sup> Km<sup>r</sup> phenotype, giving rise to strains CFNX728 (*nuvB::loxP*Sp  $\Delta$ *sym*) and CFNX730 (*radA::loxP*Sp  $\Delta$ *sym*).

For some mutant derivatives, deletion of the symbiotic region of *R. etli* was achieved by recombination enhancement by replication (RER) (50). In this system, activation of a supernumerary replication origin on pSym leads to the high-frequency generation of a deletion on pSym identical to the one in strain CFNX55 (39, 50). The *recG* mutant was generated by exchange with the *recG::loxP*Sp allele (pJMS11) on the CE3 strain, and after double recombination, the symbiotic region was removed by RER, leaving a single *nifH* gene (CFNX729).

To introduce further mutations, the *loxP*Sp cassette of strain CFNX729 (*recG::loxP*Sp  $\Delta$ *sym*) was first excised by using the Cre recombinase expressed from plasmid pJMS8 (28). Losses of the Sp marker, as well as of pJMS8, were selected by screening single-colony isolates for a Sp<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> phenotype. After that first step, strain *recG::loxP*  $\Delta$ *sym* was conjugated with pJMS15 (*radA::loxP*Sp allele). Double recombinants were selected by their Nal<sup>r</sup> Sp<sup>r</sup> Km<sup>r</sup> phenotype. This strain was called CFNX734 (*recG::loxP* *radA::loxP*Sp  $\Delta$ *sym*).

To construct *nuvB recG* and *nuvB radA* double mutants, the *nuvB::loxP*Sp allele (pJMS3) (27, 28) was introduced first by gene replacement in strain CE3. The Sp marker from the *loxP*Sp allele was excised by pop-out recombination mediated by the Cre recombinase as described above, and then either the *recG::loxP*Sp (pJMS11) or the *radA::loxP*Sp (pJMS15) allele was introduced in the *nuvB* background, selecting for double recombinants. In the case of *nuvB::loxP* *radA::loxP*Sp, the subsequent excision of the *loxP*Sp marker was obtained as for the *nuvB* allele. Once double mutants were obtained, deletions of the symbiotic region were generated either by RER (strain CFNX732; *nuvB::loxP* *recG::loxP*Sp  $\Delta$ *sym*) or spontaneously (strain CFNX733; *nuvB::loxP* *radA::loxP*Sp  $\Delta$ *sym*). The triple mutant (strain CFNX735; *nuvB::loxP* *recG::loxP* *radA::loxP*Sp) was obtained by introducing the *radA::loxP*Sp allele (pJMS15) in the *nuvB recG* background by the same strategy as described previously (28).

**Statistical analyses.** All the statistical analyses were done with Excel software (Microsoft Corp., Redmond, WA). Nonparametrical binomial tests were applied to those data divided in two excluding categories (i.e., cointegrates associated or not with gene conversion and gene conversion gain or loss) employing the absolute numbers for each category. The goal of these tests was to evaluate if proportions of the two categories under consideration were equal or not. Chi-square tests for seven independent samples were used for comparisons between strains; when the *P* values were significantly different at the 5% level, chi-square tests for paired samples were done, comparing the wild-type strain with every mutant strain.

## RESULTS

**Experimental design.** To evaluate the characteristics of gene conversion in each of the recombination mutants, we employed a strategy developed previously in our laboratory (39) (Fig. 2). This strategy is based on the use of a *Rhizobium etli* *nifH* gene derivative, differing from the wild-type gene in that it harbors eight unique RFLPs, spaced approximately every 100 bp along the gene. These RFLPs serve as convenient landmarks to evaluate the occurrence and extension of gene conversion events.

This modified *nifH* gene was cloned into a mobilizable plasmid that is able to replicate in *Escherichia coli* but does not replicate in *R. etli*. Upon introduction of this plasmid in *R. etli* derivatives possessing only a single copy of a wild-type *nifH* gene on a deleted pSym (264 kb), single-crossover recombination generates cointegrates between both plasmids, separated by *nifH* gene copies (Fig. 2A).

Both *nifH* sequences of the cointegrate molecule were amplified separately by using specific primer pairs for the nonhomologous regions flanking each nitrogenase gene. The PCR products were subjected to digestions with the eight different enzymes that recognize the introduced RFLPs. Of course, simple crossover recombination without gene conversion leads to a mere redistribution of the RFLP markers (Fig. 2B). In contrast, crossovers associated with gene conversion were easily identified by digestion of both *nifH* gene segments flanking the cointegrate with the same restriction enzyme(s) (gene convertants toward a gain of markers) (Fig. 2C) or by lack of restriction on both sides of the cointegrate (gene convertants toward a loss of markers) (Fig. 2D). Application of this strategy to a set of 50 independent cointegrates allowed the evaluation of occurrence, extension, and localization of gene conversion events in the wild-type strain (39).

In this work, we aimed to evaluate the differences in gene



TABLE 1. High association of cointegration with gene conversion in all the HJ migration mutants

Strain (relevant genotype)	No. of cointegrates with:		<i>P</i> value <sup>a</sup>
	Gene conversion	No gene conversion	
CFNX55 (wild type)	84	12	0
CFNX728 ( <i>ruvB::loxP</i> Sp)	37	13	$8 \times 10^{-11}$
CFNX729 ( <i>recG::loxP</i> Sp)	43	7	0
CFNX730 ( <i>radA::loxP</i> Sp)	40	10	0
CFNX732 ( <i>ruvB::loxP recG::loxP</i> Sp)	36	14	$9 \times 10^{-9}$
CFNX733 ( <i>ruvB::loxP radA::loxP</i> )	38	12	$2 \times 10^{-13}$
CFNX734 ( <i>recG::loxP radA::loxP</i> Sp)	42	8	0

<sup>a</sup> Probability that the observed distribution agrees with the null expectation (cointegrates with gene conversion being equal to cointegrates without gene conversion), evaluated by a nonparametrical binomial test. All *P* values are significant at the 5% level.

conversion architecture between the wild-type strain and seven mutant strains affected in HJ migration activity. To ensure that the observed changes were not due to statistical variability, we decided to analyze a new set of 50 cointegrates from the wild-type strain. In the course of this analysis, we discovered that a significant fraction of the convertants in our previous work was wrongly identified as having a conversion of the BamHI RFLP. This error was due to the unnoticed presence of a BamHI site on the plasmid sequence, which generated digestion patterns reminiscent of bona fide gene convertants for this RFLP. This error was corrected both in the previous data and in the new data set. Comparison of gene conversion parameters in both data sets by chi-square tests revealed the absence of significant differences, as expected (data not shown). For this reason, all subsequent statistical analyses (comparison of the wild type versus mutants) were done by pooling together data from both wild-type data sets, representing 96 cointegrates (see Fig. S1 in the supplemental material).

To evaluate the effect on the gene conversion of mutations in genes affecting HJ migration, 50 independent cointegrates were generated in each of six different mutants (the *ruvB*, *recG*, *radA*, *ruvB recG*, *ruvB radA*, and *recG radA* mutants) as described in Materials and Methods. It was not possible to analyze gene conversion in the *ruvB recG radA* triple mutant because its low recombination activity (28) precluded the isolation of cointegrates. The low recombination frequency observed in this triple mutant supports the view that RuvAB, RecG, and RadA are the main systems for HJ migration in *R. etli*. Detailed data on gene conversion for each mutant are shown (see Fig. S1 in the supplemental material).

**Association of gene conversion to crossover events and gene conversion skew in mutants does not change with respect to that of the wild type.** Previously (39), we have reported a strong association between cointegration and gene conversion in the *R. etli* wild-type strain (i.e., over 80% of the cointegrates have an associated gene conversion event). Here we found that in all the HJ migration mutants, over 70% of the cointegrates analyzed harbor a gene conversion event (Table 1). For all the strains, including the wild type, a nonparametrical binomial test revealed that the proportion of cointegrates with gene conversion was significantly larger than the proportion of cointegrates without gene conversion (Table 1). To ascertain if

TABLE 2. Gene conversion is biased toward gain of markers in all the HJ migration mutants

Strain (relevant genotype)	No. of gene conversion tracts with:		<i>P</i> value <sup>a</sup>
	Gain of markers	Loss of markers	
CFNX55 (wild type)	85	25	$9 \times 10^{-9}$
CFNX728 ( <i>ruvB::loxP</i> Sp)	28	9	0.0015
CFNX729 ( <i>recG::loxP</i> Sp)	43	4	$1 \times 10^{-8}$
CFNX730 ( <i>radA::loxP</i> Sp)	36	9	$5 \times 10^{-5}$
CFNX732 ( <i>ruvB::loxP recG::loxP</i> Sp)	29	11	0.0035
CFNX733 ( <i>ruvB::loxP radA::loxP</i> )	29	15	0.025
CFNX734 ( <i>recG::loxP radA::loxP</i> Sp)	40	8	$3 \times 10^{-6}$

<sup>a</sup> Probability that the observed distribution agrees with the null expectation (gene conversion toward gain of markers being equal to gene conversion toward loss of markers), evaluated by a nonparametrical binomial test. All *P* values are significant at the 5% level.

there were significant changes among the different strains in the number of cointegrates with a gene conversion versus the number of cointegrates lacking a gene conversion, a chi-square test for seven independent samples was applied. The calculated *P* value for this comparison was 0.1892; therefore, there were not significant differences among the strains. Thus, mutations in *ruvB*, *recG*, and *radA*, either alone or in combination, do not affect the association between gene conversion and homologous recombination.

We have reported previously (39) that gene conversion in *R. etli* is highly skewed toward the acquisition of markers located in the incoming plasmid (i.e., a gain of RFLPs in this case). To explain this skew, we have proposed an alternative, based on the DSBR model, in which the modified *nifH* gene in the incoming plasmid frequently functions as a template for repairing the degraded segment. In this way, we proposed that breaks happen preferentially in the resident wild-type *nifH* gene because it is inside *R. etli* all the time (39). This alternative has turned out to be more convincing than explanations based on the conventional Holliday model or its modifications, such as the Aviemore (Meselson-Radding) model (39). According to this proposal, the reason for this skewed distribution is events at the beginning of recombination and they should not be affected by modifications in later events (such as HJ migration). Supporting this proposal, all the HJ migration mutants tested were still strongly biased toward the gain of RFLPs (Table 2). This bias was highly significant in every strain, as evaluated by a nonparametrical binomial test (Table 2). As expected, a chi-square test for seven independent samples revealed that there were no significant differences among strains in this parameter (a calculated *P* value of 0.1036).

**RadA is an inefficient system for gene conversion in *R. etli*.** For evaluation of the effect of HJ migration systems on gene conversion, it can be anticipated, based on current models, that the most sensitive parameter would be the length of gene conversion segments. This is due to the fact that conversion length will be affected by the extent of heteroduplex migration. Thus, evaluation of this parameter will reveal the relative efficiency of each of the HJ migration systems.

As shown in Fig. 3, inactivation of *radA* does not have a



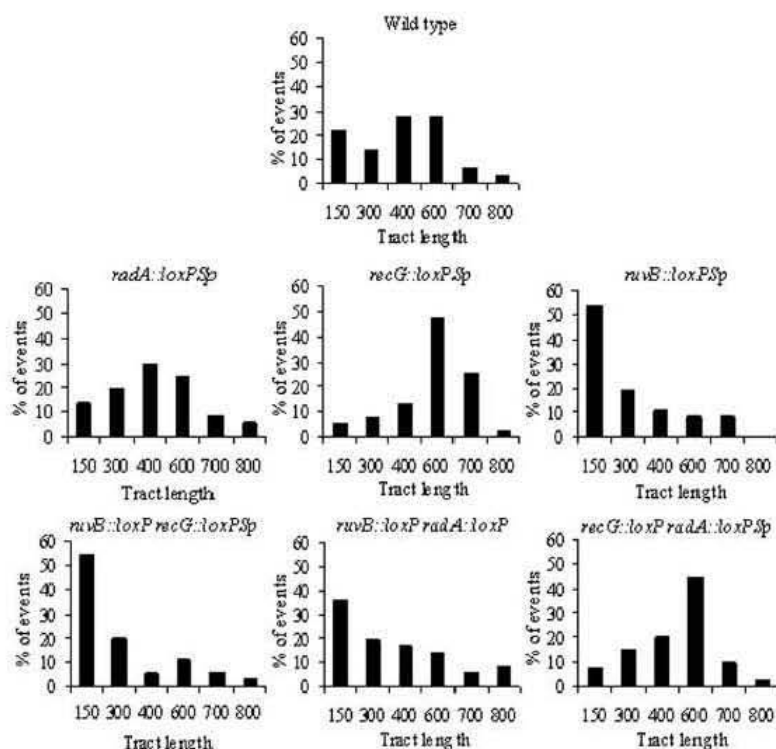


FIG. 3. Lengths of gene conversion tracts are modified in strains with mutations affecting HJ migration. Each panel shows the distribution of lengths of gene conversion tracts (excluding discontinuous events) in the indicated strains, derived from Fig. S1 in the supplemental material. To facilitate comparisons between the strains, data are presented as percentages, although the statistical analysis presented in the text was done using the actual values. Lengths of gene conversion tracts are shown in base pairs. Numbers of gene conversion tracts analyzed for each strain were as follows: wild type, 65; *radA::loxPSp*, 37; *recG::loxPSp*, 40; *ruvB::loxPSp*, 37; *ruvB::loxP recG::loxPSp*, 35; *ruvB::loxP radA::loxP*, 36; and *recG::loxP radA::loxPSp*, 40.

strong effect on gene conversion tract length. The length of gene conversion segments in this strain shows a unimodal distribution centered at 400 bp, similar to that in the wild-type strain. Comparisons of the length distribution in the wild type versus the distribution in the *radA* mutant revealed that the differences were not significant (chi-square test; a *P* value of 0.87). Thus, these results suggest that RadA is a relatively inefficient system for gene conversion in an otherwise wild-type strain.

To support this interpretation, analysis of the length of gene conversion segments in a *ruvB recG* mutant was instructive. In this mutant, two of the three main HJ migration systems were removed, allowing us to evaluate the participation of RadA on gene conversion in a more direct way. In this mutant (Fig. 3), the gene conversion tract length was severely affected, displaying segments with a modal length of just 150 bp. This difference was highly significant compared to the wild-type strain (chi-square test; a *P* value of 0.006). Therefore, these results confirm the participation of RadA in gene conversion, although its efficiency is very low.

RecG plays a dual role in gene conversion. Inactivation of *recG* has a striking effect on the length of gene conversion segments. The modal length of gene conversion tracts (Fig. 3)

was longer in the *recG* mutant (600 bp) than in the wild-type strain (400 bp). In fact, in the *recG* mutant, about 75% of the segments were longer than 600 bp, compared to less than 40% for the wild-type strain. These differences were highly significant as evaluated by a chi-square test (*P* = 0.003). The observed increase in gene conversion tract length in the *recG* mutant is fully consistent with the proposed antirecombinogenic role of RecG in *R. etli* (28), as has been demonstrated *in vitro* in *E. coli* (52).

To evaluate if RecG in *R. etli* is also able to migrate HJ away from the recombination start point (recombinogenic role), the gene conversion tract length was analyzed for the *ruvB radA* mutant strain. As shown in Fig. 3, although this double mutant showed a distribution of conversion lengths with a mode of 150 bp, the overall distribution was not significantly different from the distribution found in the wild-type strain (chi-square test; a *P* value of 0.241). Even though many of the tracts in this mutant fell in the 150-bp size class, 45% of the segments were longer than 400 bp, similar to the case in the wild-type strain (65%, Fig. 3). Thus, these results indicate that RecG in *R. etli* plays a dual role, having both recombinogenic and antirecombinogenic activities.



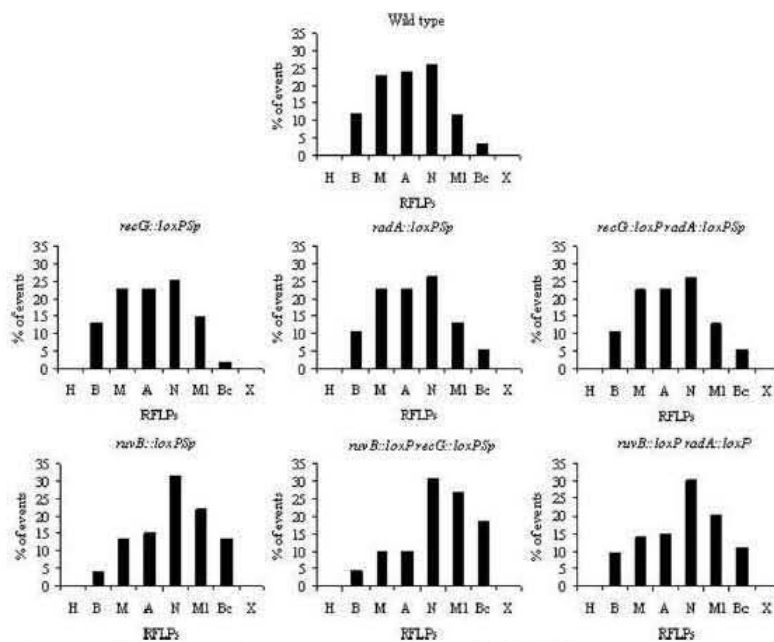


FIG. 4. Distribution of converted sites in continuous gene conversion tracts in the wild-type and HJ mutant strains. For each panel, the percentage of events in which the corresponding site appears converted (either for gain or for loss) in the indicated strain is shown. Data are derived from Fig. S1 in the supplemental material (excluding discontinuous events). For clarity, data are presented as percentages, although the statistical analysis presented in the text was done using the actual values. Capital letters on the *x* axis represent each RFLP introduced along the *nifH* gene, oriented from the 5' end to the 3' end of *nifH*. H, HindIII; B, BamHI; M, MaeIII; A, ApaLI; N, NarI; Ml, MluI; Bc, BclI; X, XbaI.

**RuvB** is the most efficient HJ migration system, and its absence causes a shift in the distribution of most converted sites. As shown in Fig. 3, inactivation of the RuvB protein causes a notable reduction in gene conversion lengths. The modal length for gene conversion segments (150 bp) was, in fact, the shortest of those observed among the single-HJ migration mutants. Comparison of the length distribution for this mutant with the wild-type distribution revealed highly significant differences (chi-square test; a *P* value of 0.005). Simultaneous inactivation of the RecG and RadA systems allowed us to analyze the activity of the RuvB system alone. In this double mutant, the observed modal length was 600 bp (Fig. 3); although the differences in the length distribution in this double mutant were not significant from the distribution in the wild-type strain (chi-square test; a *P* value of 0.27), it is clear that this mutant displays the longest tract length mode among the double mutants. These results support the interpretation that the RuvB protein is the most efficient system for gene conversion in *R. etli*.

Our approach allows us to explore the location of the most highly converted sites. As shown in Fig. 4, the most highly converted RFLPs in the wild-type strain showed a symmetrical distribution, centered in the ApaLI site. This was expected because the interval spanning the ApaLI and NarI sites (200 bp) is the longest segment in the *nifH* gene lacking RFLPs. One consequence of this distribution is that the MluI and BclI RFLPs were converted in a minority of the cases. This distribution was maintained in the *recG*, *radA*, and *recG radA* mu-

tants (chi-square test; *P* values of 0.83, 0.54, and 0.28, respectively). Notably, in the set of mutations where the RuvB system is inactive (*ruvB*, *ruvB recG*, *ruvB radA*) (Fig. 4), the distribution of the most converted sites was shifted toward sites located to the right of the ApaLI RFLP. Instead of a symmetrical distribution centered on the ApaLI site, these mutants showed a highly skewed distribution, favoring conversion of the NarI RFLP. Moreover, the MluI and BclI RFLPs were also significantly converted in these strains, being converted at a frequency twice as high as the one observed in the other strains (Fig. 4). These differences were highly significant, as evaluated by a chi-square test (*P* ≤ 0.001). Possible reasons for this skewed distribution, based on the preferred role of RuvB in gene conversion, will be presented in Discussion.

## DISCUSSION

For the interpretation of the data reported in this paper, it is important to stress that RuvAB, RecG, and RadA appear to be the main systems responsible for HJ migration in *R. etli* (28). The main evidence in favor of this interpretation is the very low recombination frequency in a *ruvB recG radA* triple mutant, which is as low as the one observed in a *recA* mutant (28). It has been reported that topoisomerase III may also promote HJ migration and resolution in *E. coli*; this resolution pathway, however, can produce only gene conversion not associated with crossovers (23). As mentioned in Results, all the gene convertants analyzed here require the presence of a prior



crossover; therefore, the contribution of a topoisomerase III pathway is judged to be negligible under our conditions.

The main conclusions obtained here, namely that (i) inactivation of *radA* does not affect gene conversion tract length, (ii) null mutations in *recG* lead to longer gene conversion tracts, and (iii) the absence of *ruvB* instigates a marked reduction in the length of gene conversion segments, fully agree with previous proposals that RuvAB is the main system for HJ migration while RecG promotes HJ regression (but also migration away from the recombination start site) and that RadA has a minor role in HJ migration. These conclusions, based on the analysis of single-gene mutations, are also fully consistent with the results found with multiple-gene mutations.

In this regard, we have explored here four different scenarios after formation of HJs. In both the wild-type and *radA* genetic backgrounds, RuvAB and RecG must be acting, competing with HJs, and originating gene conversion tracts of about 400 bp on average. The second scenario is that in which either RuvAB (in the *recG radA* mutant) or RuvAB-RadA (in the *recG* mutant) is active. In these cases, migration of HJs by RuvAB proceeds without interference by RecG, leading to the production of long gene conversion tracts; tract length is further extended by a small but significant contribution by RadA. The third scenario is where RecG (in the *ruvB radA* mutant) or RecG-RadA (in the *ruvB* mutant) is present; in these cases, upon elimination of the main HJ migration activity (RuvAB), HJ migration should be relatively restricted as a result of the relative contribution of the recombinogenic and antirecombinogenic activities of RecG, leading to the generation of short gene conversion tracts. Interestingly, the fact that the range of tract lengths was wider for cases in which RecG was the only active system than for the situations where both RecG and RadA were functioning suggests the intriguing possibility that RadA may potentiate the antirecombinogenic activity of RecG. The last scenario is where RadA is the only system migrating HJs (in the *ruvB recG* mutant) and thereby producing very short gene conversion tracts.

Based on published data on the *in vitro* activities of at least some of these systems in *E. coli* as well as their relative abundance in the cell, it is possible to make a rough approximation of how big the antirecombinogenic effect of RecG should be *in vivo*. The *E. coli* RuvAB enzyme shows *in vitro* preferential migration of HJs away from the initiation site (48), a high level of processivity ( $98 \pm 3$  bp  $s^{-1}$ ) (2), and high intracellular abundance (200 protein copies per cell or, considering the multimerization state, roughly 35 active copies per cell) (44, 51). RecG, in contrast, exhibits an *in vitro* preference in *E. coli* for regression of HJ intermediates, although it also promotes its migration away from the initiation site (30, 52). This fact, coupled with RecG's lower level of processivity (26 bp  $s^{-1}$ ) (29) compared to that of RuvAB and low intracellular abundance (less than 10 copies per cell) (6), militates in favor of an inhibitory role of this system in gene conversion.

Assuming, for simplicity, that RecG's effects are mostly inhibitory, the relative effect on HJ migration in a wild-type strain can be shown as follows: [(effect of the RuvAB system) – (effect of the RecG system)  $\times$  100]. Since the processivity of RecG is roughly one quarter of that seen for RuvAB and its abundance is 3.5 times lower, the length of gene conversion segments in a wild-type strain should be just 7% shorter than

the length that would be observed in a *recG* mutant. The predicted modest effect of *recG* elimination in *E. coli* agrees with published data where *recG* mutants displayed weak reductions in recombination frequency (22) except in systems such as adaptive mutagenesis, where inactivation of RecG provokes a marked increase in the frequency of this interesting phenomenon (11, 17). This behavior contrasts with the 50% increase in the modal gene conversion tract length observed in *R. etli* (from 400 bp to 600 bp) upon *recG* inactivation. These differences in the *in vivo* behavior of *R. etli* versus that of *E. coli* lead us to suggest that RecG parameters should differ between these species in abundance, processivity, or even preference for HJ regression. These possible differences should be explained by our proposal that RadA potentiates the antirecombinogenic activity of RecG. Experimental support for these proposals, including an exploration of how general they can be to explain gene conversion in bacteria, should have to wait for the *in vivo* quantification, purification, and kinetic characterization of RuvAB, RecG, and RadA in *R. etli*.

A relatively unexpected feature of our data is the shift in the position of gene conversion tracts toward the 3' end of the *nifH* gene whenever RuvB is absent. Although this shift might be explained by invoking a differential association of HJ proteins with repair systems, our previous data militate against such an explanation (39). In fact, an analysis of preferred converted markers in a *mutS* derivative failed to reveal such a shift (39). However, two non-mutually exclusive alternatives can be postulated, namely (i) preferential HJ migration toward the 3' end of the gene by RecG and RadA and (ii) a preferential association of the RuvC HJ endonuclease with RuvAB coupled with the association of RecG and RadA with a different HJ resolvase.

Regarding the first alternative, it has been reported that RuvAB (49) and RecG (52, 53) are helicases with opposing strand polarities on RecA-coated substrates. These opposing polarities impose different migration abilities, which may translate into different positions for gene conversion tracts. It was previously proposed that the RuvAB system extends 3' end invasions, while the RecG system unwinds this intermediate, and that the reverse happens with a 5' end invasion intermediate (17). Both 3' and 5' invading ends occur in the DSB model (Fig. 1). Invasions employing a 3' end are commonly regarded as preferred alternatives for gene conversion because this kind of invasion may give rise to gene convertants either through limited DNA synthesis or by heteroduplex extension. According to the previous proposal (17), extension in this circumstance occurs efficiently by the RuvAB system, aided by its high copy number and significant processivity. Invasions using the 5' end, in contrast, may generate only gene convertants through extension, which occurs in this case by using the less-efficient RecG or RadA system. According to this proposal (Fig. 5), in the wild-type situation, gene convertants may be generated either in the 5' half or the 3' half of the gene by the combined action of these two helicases (and perhaps through the action of RadA). However, in the absence of the RuvAB system, convertants should be generated by the action of RecG and RadA, with a preferential location toward the 3' half of the gene.

A second alternative is to postulate the presence of preferred resolution sites depending on the HJ migration system



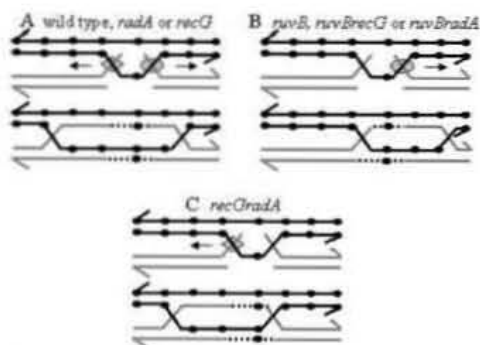


FIG. 5. Proposal to explain shifting of the most converted sites in HJ mutants. In all panels, two recombining homologs are shown, as well as 3' ends (half-arrowheads), RFLPs (small black circles), RuvAB (gray diamonds), RecG or RadA (gray circles), and the direction of movement of HJ migration proteins (arrows). (A) HJ migration and gene conversion in the wild type and *recG* or *radA* mutant strain. At the top of panel A, 3' end invasions are processed by RuvAB, while 5' end invasions are processed by RecG or RadA. These intermediates migrate preferentially in the direction indicated by the small arrows. Given the high processivity of RuvAB, migration toward the 5' end spans a larger extension than migrations toward the 3' end. The product of both migration events encompasses a sector located in the middle of the gene. (B) HJ migration and gene conversion in the absence of *ruvB* (the *ruvB*, *ruvB recG*, or *ruvB radA* mutant strain). Under these circumstances, 3' end invasions are not processed, leaving only the processing of 5' invasions by RecG or RadA. Preferential movement of these intermediates toward the 3' end (top) instigates gene conversion events shifted toward the 3' end of the gene (bottom). (C) HJ migration and gene conversion in the absence of both *recG* and *radA*. In this case, processing of 3' end invasions by RuvAB provokes the movement of HJs (and hence gene conversion) mostly toward the 5' end, although migration covering the 3' end is yet possible, given the high processivity of this complex.

used. There is clear evidence, both *in vitro* and *in vivo* (10, 42), that the RuvAB complex associates with the HJ-specific endonuclease RuvC. RecG-loaded HJs, in contrast, are thought to be resolved by another unrelated endonuclease, called RusA (26). *E. coli* RuvC depicts clear preferences for sites with the sequence A/TTTG/C (41); RusA, in contrast, shows somewhat less-stringent sequence requirements, favoring cleavage at the 5' end of a CC dinucleotide at the point of crossover of the HJ (8, 25). Interestingly, potential RuvC resolution sites are twice as frequent (eight versus four) in the 5' half than in the 3' half of the *nifH* gene. This suggests that RuvAB migrating complexes have an increased probability of being resolved on the 5' half of *nifH*. Since there are no clear *rusA* orthologs in the *R. etli* genome, RecG migrating complexes should be resolved by another RusA analogous activity in this organism. Identification of this putative endonuclease and elucidation of its participation in gene conversion constitute an interesting avenue for future research.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Verónica Rohen for insightful advice with the statistical analysis. We gratefully acknowledge Paul Gaytán and Eugenio López (Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México) for help in oligonucleotide synthesis, Jaime Martínez-Salazar and César Ro-

driguez for help in strain construction, and Javier Rivera and Laura Cervantes for skillful technical assistance.

Partial financial support was provided by grant no. 31753 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México). M.C. was supported during the Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México).

#### REFERENCES

- Abdulkarim, F., and D. Hughes. 1996. Homologous recombination between the *tuf* genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **260**:506-522.
- Amit, R., O. Gileadi, and J. Stavans. 2004. Direct observation of RuvAB-catalyzed branch migration of single Holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:11605-11610.
- Amundsen, S. K., J. Fero, L. M. Hansen, G. A. Cromie, J. V. Solnick, G. R. Smith, and N. R. Salama. 2008. *Helicobacter pylori* AddAB helicase-nuclease and RecA promote recombination-related DNA repair and survival during stomach colonization. *Mol. Microbiol.* **69**:994-1007.
- Beam, C. E., C. J. Saveson, and S. T. Lovett. 2002. Role for *radA*/*smi* in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:6836-6844.
- Bergholz, T. M., C. L. Tarr, L. M. Christensen, D. J. Betting, and T. S. Whittam. 2007. Recent gene conversions between duplicated glutamate decarboxylase genes (*gadA* and *gadB*) in pathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **24**:2323-2333.
- Briggs, G. S., A. A. Mahdi, Q. Wen, and R. G. Lloyd. 2005. DNA binding by the substrate specificity (wedge) domain of RecG helicase suggests a role in processivity. *J. Biol. Chem.* **280**:13921-13927.
- Carrasco, B., M. C. Cozar, R. Lutz, J. C. Alonso, and S. Ayora. 2004. Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of Holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J. Bacteriol.* **186**:5557-5566.
- Chan, S. N., L. Harris, E. L. Bolt, M. C. Whitty, and R. G. Lloyd. 1997. Sequence-specificity and biochemical characterization of the RusA Holliday junction resolvase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**:14873-14882.
- Cho, N. H., H. R. Kim, J. H. Lee, S. Y. Kim, J. Kim, S. Cha, S. Y. Kim, A. C. Darby, H. H. Fuxelius, J. Yin, J. H. Kim, J. Kim, S. J. Lee, Y. S. Koh, W. J. Jang, K. H. Park, S. G. Andersson, M. S. Choi, and I. S. Kim. 2007. The *Orizania tsutsugamushi* genome reveals massive proliferation of conjugative type IV secretion system and host-cell interaction genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:7981-7986.
- Eggleston, A. K., A. H. Mitchell, and S. C. West. 1997. *In vitro* reconstitution of the late steps of genetic recombination in *E. coli*. *Cell* **89**:607-617.
- Foster, P., J. M. Trimarchi, and R. A. Maurer. 1996. Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **142**:25-37.
- Gentry, D. R., and D. J. Holmes. 2008. Selection for high-level telithromycin resistance in *Staphylococcus aureus* yields mutants resulting from an *rplB*-to-*rplV* gene conversion-like event. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1156-1158.
- González, V., R. I. Santamaría, P. Bustos, I. Hernández-González, A. Medrano-Soto, G. Moreno-Hagelsieb, S. C. Janga, M. A. Ramírez, V. Jiménez-Jacinto, J. Collado-Vides, and G. Dávila. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:3834-3839.
- González-Escalona, N., J. Romero, and R. T. Espejo. 2005. Polymorphism and gene conversion of the 16S rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**:213-219.
- Gore, J. M., F. A. Ran, and L. N. Ornston. 2006. Deletion mutations caused by DNA strand slippage in *Acinetobacter baumannii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5239-5245.
- Hargreaves, D., D. W. Rice, S. E. Sedelnikova, P. J. Artymuk, R. G. Lloyd, and J. B. Rafferty. 1998. Crystal structure of *E. coli* RuvA with bound DNA Holliday junction at 6 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **5**:441-446.
- Harris, R. S., K. J. Rosst, and S. M. Rosenberg. 1996. Opposing roles of the Holliday junction processing systems of *Escherichia coli* in recombination-dependent adaptive mutation. *Genetics* **142**:681-691.
- Kang, J., and M. J. Blaser. 2008. Repair and antirepair DNA helicases in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **190**:4218-4224.
- Kang, J., D. Tavakoli, A. Tschumi, A. R. Aras, and M. J. Blaser. 2004. Effect of host species on *recG* phenotypes in *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**:7704-7713.
- Kondrashov, F. A., T. A. Gurbich, and P. K. Vlasov. 2007. Selection for functional uniformity of *bif* duplicates in  $\gamma$ -proteobacteria. *Trends Genet.* **23**:215-218.
- Lindroos, H., O. Vinnere, A. Mira, D. Repsilber, K. Naslund, and S. G. Andersson. 2006. Genome rearrangements, deletions, and amplifications in the natural population of *Bartonella henselae*. *J. Bacteriol.* **188**:7426-7439.
- Lloyd, R. G., and C. Buckman. 1991. Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J. Bacteriol.* **173**:1004-1011.
- Lopez, C. R., S. Yang, R. W. Deibler, S. A. Ray, J. M. Pennington, R. J.

- DiGate, P. J. Hastings, S. M. Rosenberg, and E. L. Zechiedrich. 2005. A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol. Microbiol.* **58**:80–101.
24. Ma, L., J. S. Jensen, L. Myers, J. Burnett, M. Welch, Q. Jia, and D. H. Martin. 2007. *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol. Microbiol.* **66**:220–236.
25. Macmaster, R., S. Sedelnikova, P. J. Baker, E. L. Bolt, R. G. Lloyd, and J. B. Rafferty. 2006. RuvA Holliday junction resolvase: DNA complex structure: insights into selectivity and specificity. *Nucleic Acids Res.* **34**:5577–5584.
26. Mahdi, A. A., G. J. Sharples, T. N. Mandal, and R. G. Lloyd. 1996. Holliday junction resolvases encoded by homologous *rusA* genes in *Escherichia coli* K-12 and phage 82. *J. Mol. Biol.* **257**:561–573.
27. Martínez-Salazar, J. M., and D. Romero. 2000. Role of the *ruvB* gene in homologous and homeologous recombination in *Rhizobium etli*. *Gene* **243**:125–131.
28. Martínez-Salazar, J. M., J. Zuñiga-Castillo, and D. Romero. 2009. Differential roles of proteins involved in migration of Holliday junctions on recombination and tolerance to DNA damaging agents in *Rhizobium etli*. *Gene* **432**:26–32.
29. Martínez-Senac, M. M., and M. R. Webb. 2005. Mechanism of translocation and kinetics of DNA unwinding by the helicase RecG. *Biochemistry* **44**:16967–16976.
30. Meddows, T. R., A. P. Savory, and R. G. Lloyd. 2004. RecG helicase promotes DNA double-strand break repair. *Mol. Microbiol.* **52**:119–132.
31. Miller, K., A. J. O'Neill, M. H. Wilcox, E. Ingham, and I. Chopra. 2008. Delayed development of linezolid resistance in *Staphylococcus aureus* following exposure to low levels of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1940–1944.
32. Morris, R. T., and G. Drouin. 2007. Ectopic gene conversions in bacterial genomes. *Genome* **50**:975–984.
33. Müller, B., I. R. Tsaneva, and S. C. West. 1993. Branch migration of Holliday junctions promoted by the *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins. I. Comparison of RuvAB- and RuvB-mediated reactions. *J. Biol. Chem.* **268**:17179–17184.
34. Nystedt, B., A. C. Frank, M. Thollesson, and S. G. Andersson. 2008. Diversifying selection and concerted evolution of a type IV secretion system in *Bartonella*. *Mol. Biol. Evol.* **25**:287–300.
35. Privezentzev, C. V., A. Keeley, B. Sigala, and I. R. Tsaneva. 2005. The role of RuvA octamerization for RuvAB function in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**:3365–3375.
36. Rodríguez, C., and D. Romero. 1998. Multiple recombination events maintain sequence identity among members of the nitrogenase multigene family in *Rhizobium etli*. *Genetics* **149**:785–794.
37. Romero, D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M. L. Girard, R. Palacios, and G. Dávila. 1991. Amplification and deletion of a *nod-sif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* **173**:2435–2441.
38. Santoyo, G., and D. Romero. 2005. Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:169–183.
39. Santoyo, G., J. M. Martínez-Salazar, C. Rodríguez, and D. Romero. 2005. Gene conversion tracts associated with crossovers in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **187**:4116–4126.
40. Sechman, E. V., K. A. Kline, and H. S. Seifert. 2006. Loss of both Holliday junction processing pathways is synthetically lethal in the presence of gonococcal pilin antigenic variation. *Mol. Microbiol.* **61**:185–193.
41. Shah, R., R. Cosstick, and S. C. West. 1997. The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts. *EMBO J.* **16**:1464–1472.
42. Sharples, G. J., F. E. Benson, G. T. Illin, and R. G. Lloyd. 1990. Molecular and functional analysis of the *rus* region of *Escherichia coli* K-12 reveals three genes involved in DNA repair and recombination. *Mol. Gen. Genet.* **221**:219–226.
43. Shen, P., and H. V. Huang. 1986. Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics* **112**:441–457.
44. Shurvinton, C. E., and R. G. Lloyd. 1982. Damage to DNA induces expression of the *rus* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **185**:352–355.
45. Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vivo* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196**:413–416.
46. Stewart, F. J., and C. M. Cavanaugh. 2007. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in bacteria. *J. Mol. Evol.* **65**:44–67.
47. Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, and F. W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**:25–35.
48. Tsaneva, I. R., B. Müller, and S. C. West. 1992. ATP-dependent branch migration of Holliday junctions promoted by the RuvA and RuvB proteins of *E. coli*. *Cell* **69**:1171–1180.
49. Tsaneva, I. R., B. Müller, and S. C. West. 1993. RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1315–1319.
50. Valencia-Morales, E., and D. Romero. 2000. Recombination enhancement by replication (RER) in *Rhizobium etli*. *Genetics* **154**:971–983.
51. West, S. C. 1997. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* **31**:213–244.
52. Whithy, M. C., L. Ryder, and R. G. Lloyd. 1993. Reverse branch migration of Holliday junctions by RecG protein: a new mechanism for resolution of intermediates in recombination and DNA repair. *Cell* **75**:341–350.
53. Whithy, M. C., S. D. Vincent, and R. G. Lloyd. 1994. Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J.* **13**:5220–5228.



## RESULTADOS ADICIONALES.

### *Programación de cortes en doble cadena para analizar conversión génica.*

Uno de nuestros resultados, que de hecho, se mantuvo con respecto a un análisis anterior <sup>74</sup>, es que la conversión génica está altamente asociada a entrecruzamientos y que además el tipo de conversión es hacia ganancia de la información entrante. El modelo que mejor se ajusta para dar explicación a esto, es el de reparación de rupturas en doble cadena. Como la conversión génica es hacia ganancia de la información que entra, propusimos que el corte en doble cadena ocurre en el *nifH* silvestre, y esto es simplemente porque al estar permanentemente dentro de *R. etli*, esta secuencia tiene más oportunidad de sufrir un corte. Así, el *nifH* que posee los RFLP's sirve como plantilla para sintetizar el DNA degradado en el *nifH* silvestre, copiándose los sitios de restricción.

En busca de probar esta propuesta, decidimos insertar un sitio para una enzima que produce cortes en doble cadena dentro del *nifH* que posee los RFLP's. El propósito es observar que la conversión génica se invierte y ahora es hacia pérdida de los sitios de restricción.

Se utilizará la misma estrategia aplicada anteriormente, con excepción de que el pJGus28 tendrá el sitio para la meganucleasa ISce-I, y que además ésta se encontrará presente al momento en que se conjugue el plásmido para poder efectuar el corte. ISce-I reconoce una secuencia de 18 pares de bases y proviene de *Saccharomyces cerevisiae*.

Hasta este momento se han intentado algunas estrategias para lograr insertar el sitio, sin éxito. Entre ellas se encuentran la clonación convencional de un adaptador que contiene al sitio y PCR reversa.

Actualmente estamos realizando intentos por medio de una técnica con la cual es posible insertar DNA lineal, generando un reemplazamiento alélico (Fig. 12), en un blanco específico en *E. coli* con ayuda de los genes *exo*, *beta* y *gam* del fago  $\lambda$  <sup>23, 24</sup>.

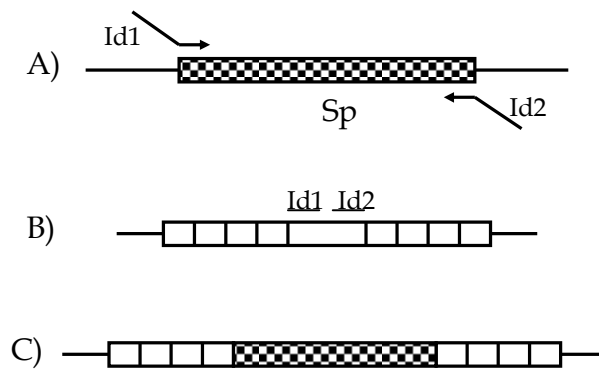


Figura 12. Estrategia de clonación por medio de los genes de  $\lambda$ . En A) se representan los oligos con flechas y las 42 pb idénticas (Id 1 y 2) al sitio donde se desea introducir el cassette. En B) la secuencia a donde se insertará el cassette de resistencia, en este caso *nifH* con los RFLP's (líneas verticales). Id 1 y 2 representan las secuencias idénticas. C) Después de la expresión de Exo, Beta y Gam, se muestra la construcción obtenida.

Gam es una proteína que inhibe a RecBCD evitando la degradación del DNA foráneo. Exo es una exonucleasa que produce extremos 3' libres para que Beta al reconocerlos, pueda alinearlos con su sitio blanco en el genoma de *coli*. Un requisito básico de esta metodología es que el DNA que se va a insertar (generalmente un PCR), tenga al menos 35 pares de bases, en ambos extremos, idénticos al sitio donde se desea introducir.

### ***Sobreexpresión de las proteínas que migran los intermediarios de Holliday.***

Otro aspecto interesante derivado del proyecto inicial es la sobreexpresión de las proteínas que migran los intermediarios de Holliday en *Rhizobium etli*, esto debido a que sabemos que en otros organismos existen diferencias significativas en el número de copias protéicas, afinidad y procesividad entre las enzimas y creemos que dichos parámetros podrían verse reflejados usando una metodología como la aplicada en este proyecto para analizar conversión génica. Debido a la actividades concluidas para cada enzima, gracias a los resultados en este proyecto, de inicio, nos interesa conocer los efectos que tendría la sobreexpresión de RecG y RadA ya que no son ni las más procesivas, ni con mayor número de copias en la célula, al

menos en *Escherichia coli*. Los genotipos en los que resulta conveniente generar la sobreexpresión son: para RecG, la cepa silvestre, las mutantes *ruvBradA* y *ruvB*, mientras que para RadA la cepa silvestre, *ruvBrecG* y *ruvB*.

Se ha logrado la clonación de *recG* y *radA* en un vector replicable en *Rhizobium etli* que además es inducible y regulable con IPTG <sup>45</sup>. Así también se logró la introducción de esta construcción, por medio de conjugación, a las cepas de *R. etli* con los genotipos antes mencionados.

Para proseguir con la estrategia y lograr analizar conversión génica en las cepas que sobreexpresan nuestras proteínas, comenzamos con las cruzas de la cepa silvestre que sobreexpresa *recG* (con 1mM de IPTG) con el pJGus28.

Las frecuencias de cointegración de 5 cruzas son similares a las de la cepa silvestre sin sobreexpresión:  $10^{-7}$ , sin embargo al hacer las PCRs para analizar la conversión génica de los cointegrados, no obtenemos producto en varias colonias (en la primera cruce, de 25 colonias analizadas, sólo 2 generan producto). Esto sólo ocurre en las cruzas con la cepa que posee el vector de sobreexpresión. La explicación a lo anterior reside en que tanto el vector de sobreexpresión (pSRKGm) como el pJGus28 poseen secuencias idénticas de aproximadamente 200 pb correspondientes a *lacZ*. La identidad y longitud de estas secuencias puede provocar que el pJGus28 recombine con el pSRKGm y no con el *nifH* silvestre del pSym. A pesar de lo anterior, hasta este momento ya se han encontrado 17 cointegrados cuya recombinación ocurrió a través de las secuencias de *nifH*. Algunas de las características de la conversión génica en estos cointegrados no varían sustancialmente en comparación con la cepa silvestre en la que no se sobreexpresa RecG: la conversión génica está altamente asociada a los eventos de entrecruzamiento y las longitudes de los tractos no parecen verse afectadas, sin embargo, un dato contrastante es que la conversión génica es en su mayoría hacia la pérdida de los sitios. El último resultado abre la posibilidad de que RecG interactúe con los sistemas de reparación, sin embargo es necesario finalizar el

análisis de los 50 cointegrados para realizar las comparaciones estadísticas y conocer si los cambios observados son significativamente diferentes.

***Complementación del análisis filogenético de nifH: ¿es la conversión génica el mecanismo que mantiene la identidad entre las familias multigénicas de R. etli?***

La evolución concertada es un proceso por medio del cual las copias de un gen se mantienen idénticas a lo largo del tiempo, el mecanismo por el cual se puede dar explicación a la evolución concertada es la conversión génica. Dentro de *R. etli*, existen varias familias multigénicas cuyas copias son idénticas o muy parecidas entre sí, como por ejemplo *nifH*. Con el fin de descartar una duplicación reciente y saber si hay un mecanismo interno (conversión génica) que mantiene la identidad entre las copias, se realizó un análisis de polimorfismos para la familia de *nifH*. La hipótesis que se planteó es: si las copias de *nifH* son idénticas o muy parecidas entre diferentes cepas de *Rhizobium etli*, entonces ha habido una duplicación reciente y no ha habido tiempo para divergir, sin embargo, si las copias son más parecidas o incluso idénticas intracepa, entonces la conversión génica está manteniendo esta evolución concertada. Los resultados de ese estudio fueron que las copias intracepa eran más parecidas entre sí, que comparadas con otras cepas, concluyendo que la conversión génica es el mecanismo que está evolucionando concertadamente estos genes (E. Sepúlveda, tesis de Licenciatura). Sin embargo, este análisis tropezó con el problema de una baja diversidad en las secuencias analizadas (posiblemente debido a selección purificadora), lo cual dificulta la detección de evolución concertada.

Para tratar de solucionar estas dificultades, se pretende extender el análisis a otra familia multigénica: *nifK*. Un análisis preliminar de algunas cepas de *Rhizobium etli* que se están secuenciando, indica que en efecto, también hay más parecido intracepa que intercepa en *nifK* (Fig. 13). Si los resultados de todas las cepas a analizar se mantienen igual, nuestras conclusiones de que la conversión génica es un proceso que genera la evolución concertada serán más contundentes,



además de que podríamos concluir que es un proceso muy activo en *Rhizobium etli*, que ocurre al menos en dos diferentes familias.

Los genes de *nifK* se encuentran duplicados. Se están generando PCRs de ambas copias de 10 diferentes cepas de *R. etli*, incluyendo a las que se usaron para el análisis de *nifH*. Después de tener los juegos completos, se mandarán a secuenciar para realizar el análisis de polimorfismos.

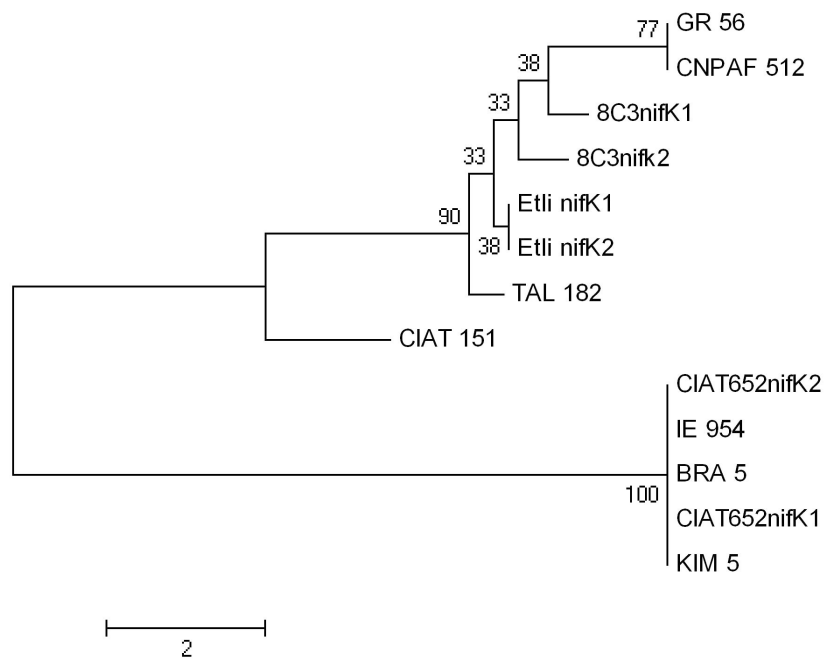


Figura 13. Árbol de los genes *nifK* de algunas cepas de *R. etli*. El alineamiento fue realizado con las secuencias nucleotídicas utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

## PERSPECTIVAS

### *Longitud de homología mínima para que haya recombinación homóloga en Rhizobium etli.*

Es bien sabido que la longitud de la homología afecta directamente las frecuencias de recombinación, al igual que el grado de heterología entre las secuencias <sup>80, 34</sup>. En *E. coli* son necesarias al menos 27 pares de bases idénticas para que haya frecuencias de  $10^{-4}$ ; dichos valores aumentan conforme aumenta la longitud teniendo que con longitudes de 166 pb, las frecuencias son de  $10^{-2}$ , sin embargo cuando a esta longitud se le introduce un 8% de heterología, las frecuencias disminuyen 10 veces aproximadamente <sup>80</sup>. No obstante, en *Rhizobium etli* las cosas parecen ser diferentes. Por medio de la estrategia utilizada en el presente proyecto, observamos que una heterología del 1.6% disminuye las frecuencias de recombinación unas 1000 veces. Más aún, experimentos en donde se cointegra un plásmido que posee una secuencia idéntica de 400 pb al genoma de *R. etli*, las frecuencias que se obtienen son de alrededor de  $10^{-7}$ .

Detallar los requerimientos del proceso en *Rhizobium etli*, además de contribuir con información básica diferente a *E. coli*, contribuiría a desarrollar mejores herramientas para la ingeniería genómica de *R. etli*.

### *¿Qué determina la direccionalidad de RuvAB in vivo?*

RuvAB es una helicasa con dirección 5' a 3', esto fue analizado *in vitro* utilizando como sustrato DNA lineal de cadena sencilla que en ambos extremos posee secciones cortas (24 a 40 pb) de doble cadena, de manera que la dirección del movimiento es con respecto a la hebra sencilla <sup>85</sup>. Sin embargo como sabemos, RuvAB se une a estructuras de Holliday y es capaz de migrarlas. Por experimentos *in vivo* donde las frecuencias de recombinación y la reparación de DNA se ven afectadas, se ha sugerido que esta proteína es recombinogénica de manera que alargaría los heteroduplex. A pesar de lo anterior, *in vitro* se ha demostrado que puede mover a los intermediarios de Holliday formados por

RecA bidireccionalmente, tanto hacia delante donde alargaría los heteroduplex, como de regreso, teniendo como resultado los sustratos iniciales <sup>86</sup>. Lo anterior es debido a que la estructura de Holliday es simétrica y el par de anillos de RuvB (quien es el motor para el movimiento), tienen dos opciones de unión: ya sea en los duplex parentales (donde funcionaría migrando de reversa) o en los heteroduplex (donde funcionaría migrando hacia delante, alargando estas regiones) <sup>26</sup>.

De acuerdo a los resultados de este proyecto, eliminar la actividad de RuvB lleva a que haya trectos de conversión más cortos que en la cepa silvestre, lo cual es una evidencia de que *in vivo* esta proteína está alargando los heteroduplex en su mayoría, sin embargo, ¿qué determina que los anillos de RuvB se unan mayoritariamente a los brazos heteroduplex? Podría ser que apenas comienza la invasión por el nucleofilamento de RecA, y recién se forma la estructura de Holliday, RuvAB se ancle reconociendo la invasión 3' de manera que se observe su dirección de helicasa, sin embargo probablemente esto provocaría el desplazamiento de RecA <sup>1</sup>, evitando que concluya la búsqueda de la homología.

¿Acaso la heterología juega un papel importante en esta situación? Estudios han demostrado que RuvAB cambia su dirección cuando encuentra heterologías de 370 pb aproximadamente <sup>43</sup>, mientras que otros proponen que aunque sí tiene actividad de reversa, logra atravesar regiones heterólogas (inserciones-deleciones) en cierto grado y dependiendo de la longitud <sup>2</sup>. En nuestro caso, las heterologías son de máximo 3 pares de bases por lo que no influirían en producir la regresión de la enzima, cosa que en efecto no se observó ya que los trectos son largos gracias a RuvAB.

¿Es (son) otra(s) proteína(s) la(s) que dirige(n) la unión de RuvAB? o ¿Quizás sea un efecto topológico?.

### ***Caracterización bioquímica de RadA.***

RadA es una proteína de la que poco se sabe, la mayoría del conocimiento sobre ella proviene de experimentos genéticos en donde se ha

demostrado que participa en la recombinación homóloga y más aún en la conversión génica, a nivel de migración del intermediario de Holliday. Sin embargo, ¿su afinidad es específica por estructuras de Holliday? ¿cuál es la forma activa de la proteína? ¿cuáles son los dominios importantes para su actividad? ¿interacciona con otras proteínas de la recombinación, con otras proteínas en general? ¿podría tener un papel en la replicación? ¿cuáles son sus parámetros cinéticos? Es claro que la purificación y análisis de esta proteína es un objetivo de gran interés.

### ***Sistemas de reparación en *Rhizobium etli*.***

De acuerdo a los resultados obtenidos por Santoyo *et. al*, 2005, y en este proyecto, el tipo de conversión es, en su mayoría, hacia ganancia de los RFLP's. Explicamos esto, por medio del modelo de reparación de rupturas en doble cadena, en donde el DNA que se sintetiza lo hace copiando la información del plásmido entrante. Con ello es posible explicar una parte de la conversión hacia ganancia, la cual dependería del tamaño del segmento que se degrada, sin embargo, como se sugiere en este proyecto, también existe la formación de segmentos heteroduplex, deducido ésto por el cambio en las longitudes de conversión génica en cada una de las mutantes *ruvB*, *recG* y/o *radA*. De esta manera, al parecer, aún en los heteroduplex la reparación es hacia la cadena del DNA externo.

La reparación de las bases mal apareadas en *E. coli* se genera por sistemas como MutSL. Este sistema está caracterizado como un sistema de reparación libre de errores (*error-proof*), es decir, que tiende a arreglar los apareamientos erróneos hacia la secuencia endógena.

En *R. etli*, se ha comprobado que MutSL participa en la conversión génica. Al mutar *mutS*, los trectos de conversión resultan más pequeños, lo que quiere decir que probablemente al quitar una de las actividades de reparación dentro del sistema, un porcentaje de las bases mal apareadas se mantienen así y después de la replicación cada duplex fija un polimorfismo <sup>74</sup>.

Con los resultados y explicaciones anteriores, podríamos pensar que en *R. etli*, MutSL está funcionando a la inversa que en *E. coli*, manteniendo la secuencia del DNA externo; esta sería desde luego una suposición contradictoria para la operación de un sistema de reparación. Sin embargo, hay que enfatizar que MutSL no parece ser el único sistema de reparación, ya que aunque los trectos de conversión en una mutante *mutS* se acortan, no son excesivamente cortos y menos aún desaparecen, además de que siguen manteniendo el patrón de ganancia de los sitios. Para lo anterior hay dos posibles explicaciones, una es que los segmentos de conversión que observamos en una cepa *mutS* son sólo el resultado del segmento degradado, con lo cual siempre veríamos conversión hacia ganancia con el modelo DSBR. Aunque esta es una explicación razonable, esto implicaría que RuvAB, RecG y RadA tendrían una participación minoritaria en la formación de heteroduplex, implicación que vá en contra de los resultados observados aquí. Alternativamente, propongo la existencia de otros sistemas de reparación de heteroduplex, los cuales podrían actuar en conjunto con las proteínas que migran el intermediario de Holliday. ¿Que otro(s) sistema(s) de reparación está(n) funcionando en *Rhizobium*?. Además la(s) proteína(s) que pueda(n) estar participando en este punto alternativa(s) a MutSL también tienden a introducir la secuencia externa.

En *E. coli*, además de MutSL existen otros sistemas que reparan bases mal apareadas o dañadas. Sistemas como UvrABC, glicosilasas y metilasas participan en estos procesos reconociendo y escindiendo los daños. ¿Podrían participar en *R. etli* para la reparación de los heteroduplex?.

### ***Resolvasas alternativas a RuvC.***

Uno de los resultados observados durante este proyecto fue que en mutantes donde está ausente RuvB, los sitios que más se convierten tienden a ser hacia la mitad 3' del gen. Una de las dos posibilidades que proponemos para explicar esto es que haya una resolvasa alternativa a RuvC, que no es

## REFERENCIAS

1. Adams DE, Tsaneva IR, West SC. 1994. Dissociation of RecA filaments from duplex DNA by the RuvA and RuvB DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9901-5.
2. Adams DE, West SC. 1996. Bypass of DNA heterologies during RuvAB-mediated three- and four-strand branch migration. *J Mol Biol.* 263:582-96.
3. Aline RF Jr, Stuart K. 1985. The two mechanisms for antigenic variation in *Trypanosoma brucei* are independent processes. *Mol Biochem Parasitol.* 1:11-20.
4. Al-Khedery B, Allred DR. 2006. Antigenic variation in *Babesia bovis* occurs through segmental gene conversion of the ves multigene family, within a bidirectional locus of active transcription. *Mol Microbiol.* 2:402-14.
5. Alonso JC, Tailor RH, Lüder G. 1988. Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 170:3001-7.
6. Amit R, Gileadi O, Stavans J. 2004. Direct observation of RuvAB-catalyzed branch migration of single Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11605-10.
7. Beam CE, Saveson CJ, and Lovett ST. 2002. Role for *radA/sms* in Recombination Intermediate Processing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 184:6836-6844.
8. Bedbrook JR, Ausubel FM. 1976. Recombination between bacterial plasmids leading to the formation of plasmid multimers. *Cell.* 9:707-16.
9. Brayton KA, Palmer GH, Lundgren A, Yi J, Barbet AF. 2002. Antigenic variation of *Anaplasma marginale msp2* occurs by combinatorial gene conversion. *Mol Microbiol.* 5:1151-9.
10. Briggs GS, Mahdi AA, Wen Q, Lloyd RG. 2005. DNA binding by the substrate specificity (wedge) domain of RecG helicase suggests a role in processivity. *J Biol Chem.* 280:13921-7.
11. Bugreev DV, Brosh RM Jr, Mazin AV. 2008. RECQ1 possesses DNA branch migration activity. *J Biol Chem.* 283:20231-42.
12. [Bugreev DV](#), [Mazina OM](#), [Mazin AV](#). 2006. Rad54 protein promotes branch

migration of Holliday junctions. *Nature*. 442:590-3.

13. Bugreev DV, Yu X, Egelman EH, Mazin AV. 2007. Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev.* 21:3085-94.
14. Chan SN, Harris L, Bolt EL, Whitby MC, Lloyd RG. 1997. Sequence specificity and biochemical characterization of the RusA Holliday junction resolvase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 272:14873-82.
15. Chedin F and Kowalczykowski SC. 2002. A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram+ bacteria: insights into the initiation of DNA recombination. *Mol Microbiol*. 43:823-34.
16. Courcelle J, Carswell-Crumpton C, and Hanawalt PC. 1997. *recF* and *recR* are required for the resumption of replication at DNA replication forks in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:3714-3719.
17. Courcelle J, Donaldson JR, Chow K, Courcelle Ch. 2003. DNA Damage-Induced Replication Fork Regression and Processing in *Escherichia coli*. *Science*. 299: 1064-1067.
18. Connelly JC, de Leau ES, Leach DR. 1999. DNA cleavage and degradation by the SbcCD protein complex from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 27:1039-46.
19. Connelly JC, Kirkham LA and Leach D. 1998. The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:7969-7974.
20. Constantinou A, Tarsounas M, Karow JK, Brosh RM, Bohr VA, Hickson ID, West SC. 2000. Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday Junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep*. 1:80-84.
21. Cox MM. 2003. The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu. Rev. Microbiol*. 57:551-77.
22. Cromie G.A. 2009. Phylogenetic ubiquity and shuffling of the bacterial RecBCD and AddAB recombination complexes. *J Bacteriol*. 191:5076-84.
23. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A. 97:6640-5.
24. Datta S, Costantino N, Court DL. 2006. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene*. 379:109-15.
  25. Deitsch KW, Lukehart SA, Stringer JR. 2009. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 7:493-503.
  26. Dennis C, Fedorov A, Käs E, Salomé L, Grigoriev M. 2004. RuvAB-directed branch migration of individual Holliday junctions is impeded by sequence heterology. *EMBO J*. 23:2413-22.
  27. Dickman MJ, Ingleston SM, Sedelnikova SE, Rafferty JB, Lloyd RG, Grasby JA, Hornby DP. 2002. The RuvABC resolvosome. *Eur J Biochem*. 269:5492-501.
  28. Diver WP, Sargentini NJ, Smith KC. 1982. A mutation (*radA100*) in *Escherichia coli* that selectively sensitizes cells grown in rich medium to x- or u.v.-radiation, or methyl methanesulphonate. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 42:339-46.
  29. Frank M, Kirkman L, Costantini D, Sanyal S, Lavazec C, Templeton TJ, Deitsch KW. 2008. Frequent recombination events generate diversity within the multi-copy variant antigen gene families of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2008. 10:1099-109.
  30. Fujikane R, Komori K, Shinagawa H, Ishino Y. 2005. Identification of a novel helicase activity unwinding branched DNAs from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*. 280:12351-12358.
  31. Fujikane R, Shinagawa H and Ishino Y. 2006. The archaeal Hjm helicase has *recQ*-like functions, and may be involved in repair of stalled replication fork. *Genes cells*. 11:99-110.
  32. Fujiwara Y, Mayanagi K, Morikawa K. 2007. Functional significance of octameric RuvA for a branch migration complex from *Thermus thermophilus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 366:426-31.
  33. Gari K, Décaillet C, Stasiak AZ, Stasiak A, Constantinou A. 2008. The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks. *Mol Cell*. 29:141-8.



34. Gonda DK, Radding CM. 1983. By searching processively RecA protein pairs DNA molecules that share a limited stretch of homology. *Cell*. 34:647-54.
35. González V, Santamaría RI, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramírez MA, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J, Dávila G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 3834-9.
36. Haber JE. 1998. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*. 32:561-99.
37. Helm RA, Seifert HS. 2009. Pilin antigenic variation occurs independently of the RecBCD pathway in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. En prensa.
38. Hickson I and Wu L. 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*. 426: 18-25.
39. Holliday R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res Camb*. 5:282-304.
40. Horii Z, Clark AJ. 1973. Genetic analysis of the *recF* pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. *J Mol Biol*. 80:327-44.
41. Ingleston SM, Sharples GJ, Lloyd RG. 2000. The acidic pin of RuvA modulates Holliday junction binding and processing by the RuvABC resolvase. *EMBO J*. 19:6266-74.
42. Iwasaki H, Takahagi M, Shiba T, Nakata A, Shinagawa H. 1991 *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *EMBO J*. 10:4381-9.
43. Iype LE, Inman RB, Cox MM. 1995. Blocked RecA protein-mediated DNA strand exchange reactions are reversed by the RuvA and RuvB proteins. *J Biol Chem*. 270:19473-80.
44. Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID. 2000. The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:6504-8.

45. Khan SR, Gaines J, Roop RM 2nd, Farrand SK. 2008. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol.* 74:5053-62.
46. Kim PM, Paffett KS, Solinger JA, Heyer WD, Nickoloff JA. 2002. Spontaneous and double-strand break-induced recombination, and gene conversion tract lengths, are differentially affected by overexpression of wild-type or ATPase-defective yeast Rad54. *Nucleic Acids Res.* 30:2727-35.
47. Kline KA, Sechman EV, Skaar EP, Seifert HS. 2003. Recombination, repair and replication in the pathogenic *Neisseriae*: the 3 R's of molecular genetics of two human-specific bacterial pathogens. *Mol Microbiol.* 1:3-13.
48. Koomey M, Gotschlich EC, Robbins K, Bergström S, Swanson J. 1987. Effects of *recA* mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genetics.* 3:391-8.
49. Kushner SR, Nagaishi H, Templin A, Clark AJ. 1971. Genetic recombination in *Escherichia coli*: the role of exonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68:824-7.
50. Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC. 2004. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science.* 303:243-6.
51. Liu Y and West S. 2004. Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday Junction. *Nature reviews.* 5:937-944.
52. Lloyd R and Buckman Carol. 1990. Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J Bacteriol.* 173: 1004-1011.
53. Lo YC, Paffett KS, Amit O, Clikeman JA, Sterk R, Brenneman MA, Nickoloff JA. 2006. Sgs1 regulates gene conversion tract lengths and crossovers independently of its helicase activity. *Mol Cell Biol.* 26:4086-94.
54. Lovett ST, C Luisi-DeLuca, and RD Kolodner. 1988. The Genetic Dependence of Recombination in RecD Mutants of *Escherichia Coli*. *Genetics.* 120: 37-45.
55. Mandal TN, Mahdi AA, Sharples GJ, Lloyd RG. 1993. Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* mutations. *J Bacteriol.* 175:4325-34.

56. Martínez-Salazar JM, Zuñiga-Castillo J, Romero D. 2009. Differential roles of proteins involved in migration of Holliday junctions on recombination and tolerance to DNA damaging agents in *Rhizobium etli*. *Gene*. 432:26–32.
57. Martínez-Senac MM, and Webb MR. 2005. Mechanism of translocation and kinetics of DNA unwinding by the helicase RecG. *Biochemistry*. 44: 16967-16976.
58. McGlynn P, Lloyd RG, Marians KJ. 2001. Formation of Holliday junctions by regression of nascent DNA in intermediates containing stalled replication forks: RecG stimulates regression even when the DNA is negatively supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8235-40.
59. McGlynn P, Lloyd RG. 2001. Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8227-34.
60. McGrew DA and Knight KL. 2003. Molecular design and functional organization of the RecA protein critical. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 38:385–432.
61. Meddows TR, Savory AP, Lloyd RG. 2004. RecG helicase promotes DNA double-strand break repair. *Mol Microbiol*. 52:119-32.
62. Mehr IJ, Seifert HS. 1998. Differential roles of homologous recombination pathways in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair. *Mol Microbiol*. 4:697-710.
63. Meselson MS, Radding CM. 1975. A general model for genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:358-61.
64. Meyer TF, Billyard E, Haas R, Storzbach S, So M. 1984. Pilus genes of *Neisseria gonorrhoeae*: chromosomal organization and DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19:6110-4.
65. Muniyappa K, Shaner SL, Tsang SS, Radding CM. 1984. Mechanism of the concerted action of RecA protein and helix-destabilizing proteins in homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:2757-61.
66. Neuwald AF, Berg DE, Stauffer GV. 1992. Mutational analysis of the *Escherichia coli* serB promoter region reveals transcriptional linkage to a

downstream gene. *Gene*. 120:1-9.

67. Parsons CA, West SC. 1993. Formation of a RuvAB-Holliday junction complex *in vitro*. *J Mol Biol*. 232:397-405.
68. Potter H, Dressler D. 1976. On the mechanism of genetic recombination: electron microscopic observation of recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:3000-4.
69. Privezentzev CV, Keeley A, Sigala B, Tsaneva IR. 2005. The role of RuvA octamerization for RuvAB function *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*. 280:3365-75.
70. Ralf C, Hickson ID, Wu L. 2006. The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J. Biol. Chem*. 281:22839-22846.
71. Raynard S, Bussen W, Sung P. 2006. A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem*. 281:13861-4.
72. 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.
73. Sakai A, Cox MM. 2009. RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J Biol Chem*. 284:3264-72.
74. Santoyo G, Martínez-Salazar JM, Rodríguez C, Romero D. 2005. Gene conversion tracts associated with crossovers in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol*. 187:4116-26.
75. Santoyo G, Romero D. 2005. Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes. *FEMS Microbiol Rev*. 29:169-83.
76. Sechman EV, Kline KA, and Seifert HS. 2006. Loss of both Holliday Junction processing pathways is synthetically lethal in the presence of gonococcal pilin antigenic variation. *Mol Microbiol*. 1: 185-193.
77. Serkin CD, and Seifert HS. 1998. Frequency of pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol*. 180: 1955- 1958.
78. Shah R, Bennett RJ, West SC. 1994. Genetic recombination in *E. coli*: RuvC

- protein cleaves Holliday junctions at resolution hotspots *in vitro*. *Cell*. 79:853-64.
79. Sharples GJ, Chan SN, Mahdi AA, Whitby MC, Lloyd RG. 1994. Processing of intermediates in recombination and DNA repair: identification of a new endonuclease that specifically cleaves Holliday junctions. *EMBO J*. 13:6133-42.
  80. Shen P, Huang HV. 1986. Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics*. 112:441-57.
  81. Shiba T, Iwasaki H, Nakata A, Shinagawa H. 1991. SOS-inducible DNA repair proteins, RuvA and RuvB, of *Escherichia coli*: functional interactions between RuvA and RuvB for ATP hydrolysis and renaturation of the cruciform structure in supercoiled DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8445-49.
  82. Skaar EP, Lazio MP, Seifert HS. 2002. Roles of the recJ and recN genes in homologous recombination and DNA repair pathways of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. 4:919-27.
  83. Spies M and Kowalczykowski SC. 2004. Homologous Recombination by the RecBCD and RecF pathways.
  84. Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*. 33:25-35.
  85. Tsaneva IR, Müller B, West SC. 1993. RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:1315-9.
  86. Tsaneva IR, Müller B, West SC. 1992. ATP-dependent branch migration of Holliday junctions promoted by the RuvA and RuvB proteins of *E. coli*. *Cell*. 69:1171-80.
  87. van Gool AJ, Hajibagheri NM, Stasiak A, West SC. 1999. Assembly of the *Escherichia coli* RuvABC resolvosome directs the orientation of Holliday junction resolution. *Genes Dev*. 13:1861-70.
  88. van Gool AJ, Shah R, Mézard C, West SC. 1998. Functional interactions between the Holliday junction resolvase and the branch migration motor of *Escherichia coli*. *EMBO J*. 17:1838-45.

89. Webb BL, Cox MM, Inman RB. 1997. Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. *Cell*. 91:347-56.
90. West SC. 1997. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu Rev Genet*. 31:213-44.
91. Whitby MC, Bolt EL, Chan SN, Lloyd RG. 1996. Interactions between RuvA and RuvC at Holliday junctions: inhibition of junction cleavage and formation of a RuvA-RuvC-DNA complex. *J Mol Biol*. 264:878-90.
92. Whitby MC, Ryder L, Lloyd RG. 1993. Reverse branch migration of Holliday junctions by RecG protein: a new mechanism for resolution of intermediates in recombination and DNA repair. *Cell*. 75:341-50.
93. Whitby MC, Vincent SD, Lloyd RG. 1994. Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J*. 13:5220-8.
94. Wu L, Bachrati CZ, Ou J, Xu C, Yin J, Chang M, Wang W, Li L, Brown GW, Hickson ID. 2006. BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:4068-73.
95. Xiong Yu, Stephen C. West and Edward H. Egelman. 1997. Structure and Subunit Composition of the RuvAB-Holliday Junction Complex. *J Mol Biol*. 266:217-222.
96. Zhang JR, Norris SJ. 1998. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infect Immun*. 8:3698-704.
97. Zhang QY, DeRyckere D, Lauer P, Koomey M. 1992. Gene conversion in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for its role in pilus antigenic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12:5366-70.
98. Zuñiga-Castillo J, Romero D, Martínez-Salazar JM. 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*. 186:7905-13.

RusA, que pudiera tener una secuencia específica de corte, preferencialmente en la mitad 3', y que participara junto con RecG o RadA.

Resulta interesante en principio, hacer una mutante en *ruvC*, y observar cómo decaen las frecuencias de recombinación. Si el efecto en la mutación no es tan drástico como aquel en una mutante *recA*, probablemente haya(n) otra(s) proteína(s) que participen como resolvasas y que sean funcionales. Caracterizar a esta(s) posible(s) proteína(s) en caso de que exista(n), contribuiría a soportar nuestra propuesta, además de que posiblemente sería(n) proteína(s) desconocida(s) tanto en *R. etli* como en otros organismos.