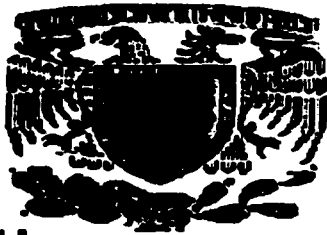


03072



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y  
HUMANIDADES**

**AISLAMIENTO DE MUTANTES *recA* DE  
*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Y  
EVALUACION DE SU EFECTO EN LA  
FRECUENCIA DE UN REARREGLO GENICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A:**

**MA. DEL SOCORRO MARTINEZ PRIETO**

Cuernavaca, Morelos.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **MIEMBROS DEL JURADO**

**Presidente: Dra. Gloria Soberón Chávez**

**Secretario: Dr. Alejandro Alagón Cano**

**Vocal: Dra. Amelia Farrés González Sarabia**

**Suplente: Dra. Guadalupe Espín Ocampo**

**Suplente: Dr. Enrique Merino Pérez**

**Este trabajo de tesis se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la supervisión de la Doctora Gloria Soberón-Chávez.**

**A mi familia, Eduardo, Marian, Ximena y Diana por su apoyo, su ánimo y el haber compartido y padecido mis deseos de superación.**

**A Socorrito por su amoroso y continuo apoyo a mi familia**

**A mi papá, su recuerdo siempre me motiva e impulsará.**

**A mi mamá y hermanos por su cariño y por compartir ese deseo de aportar lo realmente importante.**

**A mis maestros, compañeros y amigos del Instituto de Biotecnología.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Después de diez años de haber estado alejada de actividades científicas, decidí regresar, reincorporarme y recuperarme. Esto fue posible gracias a muchas personas del Instituto de Biotecnología que al confiar en mí, me dieron la oportunidad para continuar formándome, pero especialmente quiero agradecer a la Dra. Gloria Soberón Ch. por siempre haberme apoyado, impulsado y dirigido durante estos años muy valiosos en mi formación académica y como persona.**

**Al la Dra. Guadalupe Espín y al Dr. Enrique Merino por el interés y apoyo a mi trabajo**

**A los miembros del jurado por la revisión de este trabajo.**

**A todos mis maestros por sus enseñanzas y apoyo.**

**A Beatriz Palmeros muy especialmente, por su valiosa amistad y por su constante apoyo, asesoramiento académico y técnico.**

**A Rebeca Nájera por su amistad y apoyo técnico.**

**A Rosalba Sánchez por su cariño, amistad y apoyo.**

**A Georgina Estrada, siempre dispuesta a ayudarme.**

**A Eduardo y Maricela que con su trabajo diario nos ayudan a salir adelante.**

**A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio y de estudio.**

# INDICE

## RESUMEN

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i></b>	<b>1</b>
1.1- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	1
1.2- GOMA XANTANA	3
<b>2.- REARREGLOS GÉNICOS</b>	<b>6</b>
2.1- RECOMBINACIÓN GENÉTICA	7
2.2- RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN PROCARIONTES	8
2.2.1- MECANISMOS PROPUESTOS EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	9
<b>3.- <i>RecA</i> UNA PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL</b>	<b>14</b>
3.1- CARACTERIZACIÓN DE <i>RecA</i>	14
3.2- ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA <i>RecA</i>	16
3.2.1- <i>RecA</i> EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	16
3.2.2- SU PAPEL EN REPARACIÓN DE DNA Y EN LA REGULACIÓN DE genes	19
3.2.3- SU PAPEL EN MUTAGÉNESIS	21
3.2.4- <i>RecA</i> EN LA REPLICACIÓN DE DNA	21
3.3- EL GEN <i>recA</i> EN LA FILOGENIA MOLECULAR	22
3.3.1- ACTIVIDADES REPORTADAS PARA PROTEÍNAS ANÁLOGAS A <i>RecA</i>	27
<b>II.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>31</b>
<b>III.- OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>IV.- PRESENTACIÓN ARTÍCULO</b>	<b>37</b>
<b>V.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>VI.- PERSPECTIVAS</b>	<b>41</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

Durante la realización de este trabajo se construyeron, aislaron y caracterizaron mutantes *recA* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* por un evento de recombinación homóloga doble con el gen *recA* de *Rhizobium etli*. Este gen *recA* de *Rhizobium etli*, contenido en el plásmido pMS26 que lleva los genes *sacBR*, está interrumpido por un gen que codifica para resistencia a espectinomicina (*Spc<sup>r</sup>*), de modo que nos permitió aislar dobles recombinantes de *X. campestris* que supuestamente tendrían el gen *recA* interrumpido. Con la caracterización de las dos mutantes aisladas, se determinó que ambas presentan una reducción de tres ordenes de magnitud en la frecuencia de recombinación genética homóloga así como en su capacidad de reparación del DNA con respecto a la cepa silvestre. Además, ambas mutantes son sensibles tanto a metil metano sulfonato como a radiaciones ultravioleta.

Se evaluó el efecto de la mutación en el gen *recA*, sobre un rearrreglo genético de *Xanthomonas campestris* que según está reportado, tiene efecto sobre la virulencia de dicha bacteria, la producción de la goma xantana y el fenómeno de quimiotáxis y se determinó que este rearrreglo es *recA*-independiente.

Por otra parte, las cepas *recA*<sup>-</sup> obtenidas se complementaron en trans con el gen *recA* silvestre de *R. etli* y se observó que dichas mutantes son menos virulentas en plantas que la cepa silvestre.



# I.- INTRODUCCION

## 1.- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

### 1.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, es una bacteria clasificada dentro del género *Xanthomonas* de la familia *Pseudomonadaceae* (Krieg, N., y Holt, J., 1984), sus células tienen forma de bacilo cuyo tamaño se encuentra entre el rango de 0.4 a 0.7 micras de ancho por 0.7 a 1.8 micras de largo, gram negativas y se mueven por medio de un flagelo polar único. Sus colonias son amarillas de aspecto suave, brillante o viscosa. Sus pigmentos son muy característicos, polienos aril brominados o "xanthomonadinas" (Figura 1). Son aeróbicos obligados con un tipo de metabolismo respiratorio en donde el oxígeno es el aceptor terminal de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25°C y 30°C

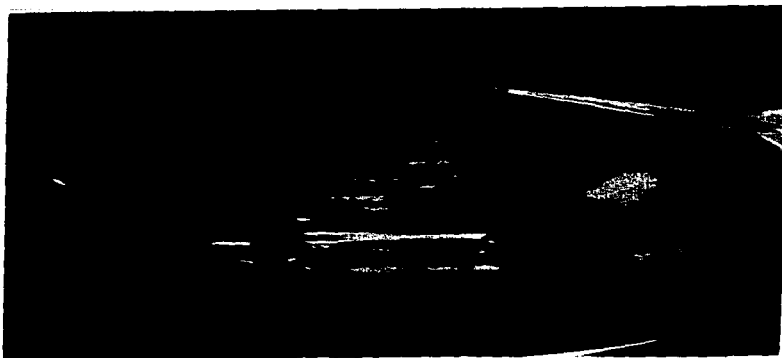


FIGURA 1. Cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* al igual que todos los organismos incluidos en su género, es una bacteria fitopatógena. Se ha determinado que es el agente causal de algunas patologías en: *Brassica* spp., *Capsella bursa-pastoris*, *Lepidium sativum*, *Mathiola* spp., *Raphanus sativus*, *Rorippa amara* de la familia *Cruciferae* y *Boerhaavia erecta* de la familia *Nyctaginaceae* (Krieg, N.R., Holt, J.G., 1984). Secreta diferentes enzimas como: proteasas, poligalacturonato-lyasa, endoglucanasa y  $\alpha$ -amilasas que le ayudan a colonizar a las plantas susceptibles; las mutantes de estas enzimas son defectuosas en patogenicidad (Daniels, M.J. y col., 1984; Thome, L. y col., 1989; Hu, N. y col., 1992).

Cuando este organismo fitopatógeno es examinado directamente en el tejido vegetal o de cultivos muy viejos se ve de forma y tamaño irregular, pero si son analizados provenientes de medios de propagación o crecimiento, los bacilos son razonablemente uniformes y de puntas redondeadas.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* es productora de cantidades abundantes de polisacáridos extracelulares (EPS) comúnmente conocido como goma xantana, cuando se crece en medios con carbohidratos asimilables; estos compuestos le dan a las colonias un aspecto mucoso y viscoso (Figura 1). La producción de EPS afuera de la pared celular es común en muchos géneros de bacterias y éstos se organizan en cápsulas o glicocaliz alrededor de la célula (Coplin, D.L. y Cook, D., 1990; Kamoun, S. y Kado, C., 1990).

La estructura de la pared celular es similar a la de otras bacterias gram-negativas. Los lipopolisacáridos de la pared celular son heteropolisacáridos enlazados covalentemente a lípidos y se ha observado la presencia de enlaces beta-1',6 de disacáridos glucosaminados con dos grupos fosfatos uno con un enlace éster y el otro en un enlace glicosilado. Existen además largas cadenas de ácidos grasos unidos por enlaces ester y amida, además en *X. campestris* se ha identificado la presencia de cadenas ramificadas de ácido D-3-hidroxi-9-metildecanoico, D-3-hidroxi-11-metildecanoico y pequeñas cantidades de 2-hidroxi-9-metildecanoico (Krieg, N.R., Holt, J.G., 1984).

Son bacterias quimiorganotróficas, capaces de usar diferentes carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbón. Al igual que en otras especies de *Xanthomonas*, como el reportado en *X.c* pv *oryzae*, en este microorganismo se puede observar el fenómeno de quimiotaxis. Este comportamiento se observa en medios sintéticos y en exudados acuosos de plantas de arroz susceptibles a la bacteria, sugiriendo que la quimiotaxis juega un papel muy importante en el proceso de invasión de las hojas de la planta a atacar (Kamoun, S. y Kado, C., 1990). En observaciones realizadas directamente en plantas infectadas por *X. campestris* pv. *campestris* se aprecia una bacteria no móvil y no flagelada; cuando se encuentra en el fluido del xilema, se mueve solo por difusión. El fenómeno de quimiotaxis se puede observar en cajas semisólidas con sacarosa y extracto de levadura, donde surgen bacterias quimiotácticas y deficientes en producción de goma xantana. La bacteria por medio de un "interruptor genético" se transforma de productora de EPS y no quimiotáctica, a un tipo seco no mucoso deficiente en la

producción de EPS y quimiotáctica. Estas cepas quimiotácticas no mucoides presentan revertantes al fenotipo de la cepa silvestre días después en los medios de cultivo utilizados (Martínez-Salazar, J. y col., 1993).

## 1.2. GOMA XANTANA

La goma xantana es un heteroexopolisacárido aniónico de alto peso molecular. Es un polímero de unidades repetidas de un pentasacárido compuesto de glucosa, manosa y ácido glucurónico en una proporción molar de 2:2:1 (Harding, N.E. y col., 1993).

En solución acuosa la goma modifica su viscosidad y propiedades espectroscópicas, debido a un cambio en la configuración molecular. La xantana es un polímero especial cuyas propiedades han sido estudiadas en forma extensiva por el Northern Regional Research Center; entre las propiedades principales destaca el que este polisacárido hidrosoluble puede reemplazar otras gomas obtenidas a partir de plantas y algas.

El U.S. Northern Regional Research Center aisló a *X. campestris* NRRL B1459 (Jeanes, A. y col., 1961), cepa que produce la goma xantana con tres características que le hacen muy valiosa:

- 1) Alta viscosidad a bajas concentraciones
- 2) Pseudoplasticidad
- 3) Estabilidad en un rango muy amplio de temperatura, pH y concentración de electrolitos (Thome, L. y col. 1989).

Debido a estas propiedades reológicas, y por ser no tóxica para el hombre y animales, la goma xantana es usada extensivamente en la industria de alimentos como estabilizante, viscosificante, emulsificante. También se usa en la industria de cosméticos, de productos farmacéuticos, manufactura de papel, pintura, textiles, adhesivos, en la producción de petróleo, recuperación terciaria de aceite, en la agricultura y otras aplicaciones más (Ekateriniadou, L.V. y col., 1994; Fu, J. y col., 1992; Hötte, B., y col., 1990).

Usualmente la goma xantana es producida por fermentación usando glucosa o sacarosa como fuente de carbón (Fu, J., y col., 1992).

La región que codifica para la síntesis de EPS de la cepa NRRL-B1459 fue secuenciada por el grupo de M. Capage de Synergen, Inc., Boulder, Co. Ellos encontraron por lo menos 12 marcos de lectura abierta los cuales designaron como *gumB* hasta *gumM* (Figura 2) (Coplín, D.L. y Cook, D. 1990).

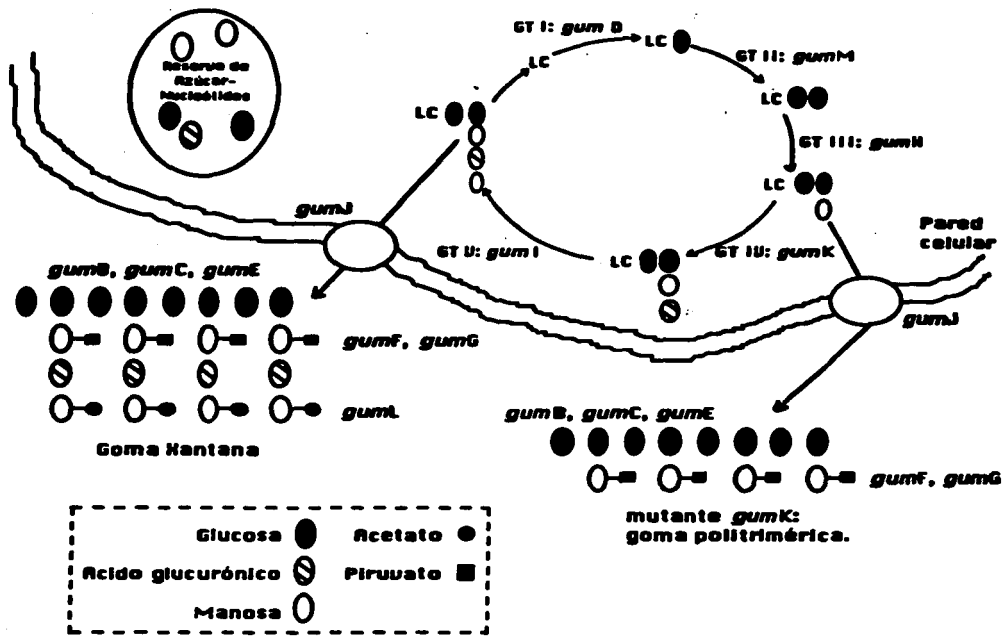


FIGURA 2. Modelo simplificado de la biosíntesis de la goma xantana. Los oligosacáridos unidos a lípidos son enlazados intracelularmente a partir de los azúcar-nucleótidos de la célula y polimerizadas. Abreviaciones: GT, glicosiltransferasa; LC, transportador de naturaleza lipídica (Coplin, D. L. y Cook, D., 1990).

La estructura y biosíntesis de la goma xantana es un proceso algo complejo y en la que se requiere de:

a) La síntesis de precursores UDP-glucosa, UDP-ácido glucurónico y GDP-manosa (Fig 3).

- b) La transferencia secuencial de unidades de lípidos fosfatados para el ensamble de las subunidades de pentasacáridos unidos a una molécula transportadora de isopentenil pirofosfato.  
 c) La adición de grupos acetilos y piruvatos con la subsecuente polimerización de las unidades repetidas formando la goma xantana (Harding, N. y col., 1993; Coplin, D.L. y Cook, D., 1990).

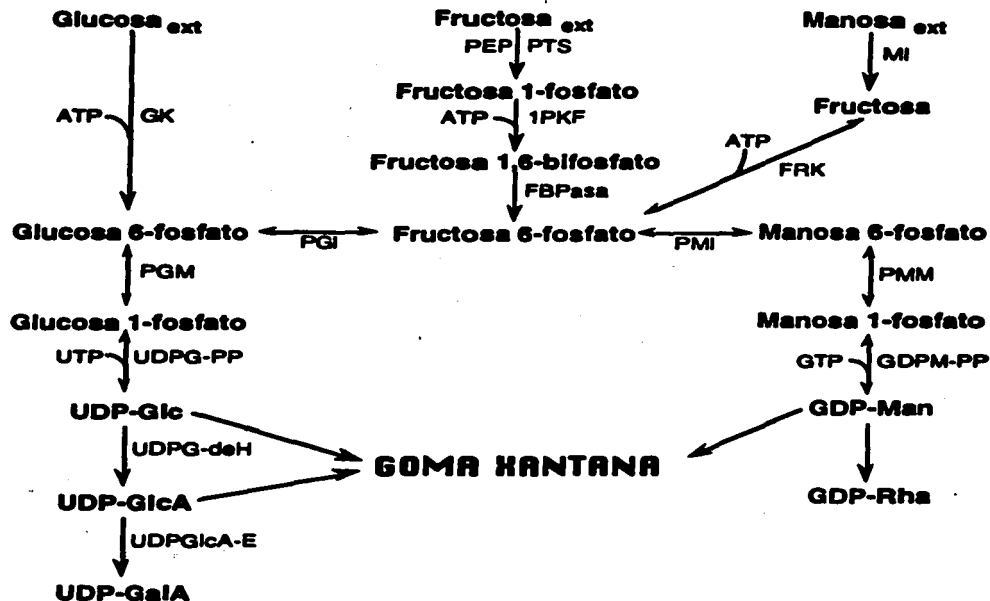


FIGURA 3. Biosíntesis e interconversión de precursores de goma xantana. Abreviaciones utilizadas: ext, del exterior de la célula; Glc, glucosa; GlcNac, N-acetilglucosamina; GlcA, ácido glucurónico; Gal A, ácido galacturónico; Man, manosa; 1PFK, 1-fosfofructocinasa; FBPasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; FRK, fructocinasa; GK, glucocinasa; UDPGlcA-E, UDP-GlcA-4-epimerasa; Rha, rhamnosa (Harding, N.E. y cols., 1993).

Los diferentes grupos de genes para la síntesis de la goma xantana siguen siendo objeto de estudio por varios grupos de investigadores.

El grupo de genes requerido para el ensamble de las unidades repetidas unidas a lípidos fue identificado y denominado como *xpsI* (xanthan polysaccharide synthesis) por los grupos de Barrere, G. y col. (1986) y Thome, L. y col. (1987).

Hötte, B. y cols., en 1990, identificaron una región nueva de DNA de 35.5 kb, organizada en por lo menos doce grupos de complementación, la cual está involucrada en la biosíntesis del exopolisacárido. Al realizar un análisis de mutantes en dicha región, se observó un efecto pleiotrópico en los componentes de la envoltura bacteriana.

Köplin, R. y cols. (1992) por medio de experimentos bioquímicos, de complementación y secuenciación sugirieron la presencia de dos genes nuevos, uno que codifica una enzima bifuncional con actividad de fosfogluocosamutasa (PGM) y de fosfomanosamutasa (PMM), y otro que codifica para otra enzima bifuncional con actividades de fosfomanosaisomerasa (PMI) y de guanosín 5'-difosfomanosa (GDPM-PP).

El grupo de Harding, N.E. (1993) identificó y analizó las regiones de DNA denominadas como *xpsIII*, *IV* y *V*. La región *xpsIII* codifica una enzima involucrada en la síntesis de UDP-glucosa, GDP-manosa y UDP-ácido glucurónico. La *xpsIV* la enzima UDPG-pirofosforilasa y la *xpsV* la UDPG-deshidrogenasa.

## 2.- REARREGLOS GÉNICOS

Las diferentes especies microbianas, así como los demás organismos vivos, transmiten a sus descendientes sus características particulares al pasar una copia fiel de su información genética. De este hecho depende la estabilidad a largo plazo de la información genética que se encuentra codificada en la doble hélice del DNA. Sin embargo, para comprender el mecanismo de la evolución y en particular al referirse a las diferentes especies microbianas, es importante conocer los diferentes sistemas genéticos que existen en la naturaleza y por medio de los cuales se dan innumerables combinaciones genéticas que producen la variabilidad dentro de las poblaciones microbianas.

La formación de nuevos rearreglos en los genes se da dentro y entre especies, por medio de mecanismos que provocan la formación de nuevos genotipos reuniendo y reordenando genes de diferentes organismos. Entre los mecanismos conocidos que originan variabilidad bacteriana encontramos: la recombinación homóloga, la transposición, deleciones, inversiones, translocaciones o duplicaciones. A estos mecanismos de reorganización de nucleótidos se les conoce como recombinación genética (Bi, X. y col. 1995).

## 2.1. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

La recombinación genética es un proceso común en todos los organismos vivos e involucra el intercambio de secuencias de DNA entre dos cromosomas o moléculas de DNA. El intercambio origina nuevas combinaciones de genes y, en consecuencia, diversidad genética (Camerini-Otero, R. y col. 1995). La recombinación genética fue por primera vez identificada en *Drosophila* en la primera parte del siglo XX y posteriormente fue ampliamente estudiada en hongos, pero las bases moleculares de la recombinación fueron realmente definidas con el descubrimiento de la recombinación en bacterias y bacteriófagos.

La recombinación genética se puede dividir en dos categorías:

1.- Legítima u homóloga *recA* dependiente

2.- Ilegítima { Sitio específica (Conservative site-specific recombination)  
Transposición

1.- Recombinación homóloga. Esta se presenta al intercambiarse fragmentos de DNA que comparten secuencias largas u extensas con homología. El intercambio puede darse en cualquier punto entre las regiones de DNA homólogos, seguido por la acción de proteínas que catalizan el proceso de recombinación. Primero se da un alineamiento o sinapsis de las secuencias homólogas de DNA parentales, luego el desdoblamiento de los duplex de DNA, la ruptura y finalmente la reunión, originando nuevas moléculas de DNA por el intercambio de segmentos homólogos reorganizando así su información genética (Stent, G.S., Calendar, R., 1971).

2.1.- La recombinación sitio específica. En esta categoría se dan rearrreglos entre segmentos de DNA que no tienen regiones extensas con homología. Este tipo de eventos está limitado a sitios específicos en los DNAs que están en proceso de recombinación y es mediado por un sistema de proteínas específico e independiente de la maquinaria utilizada en la recombinación homóloga. Participa una recombinasa específica que reconoce una pequeña secuencia homóloga, dándose el intercambio precisamente en el punto de ruptura y unión sin haber pérdida o síntesis de DNA, con recombinación recíproca. Ejemplos de esta categoría los tenemos en la integración del fago lambda al cromosoma de *E. coli* y las inversiones (Figura 4).

2.2.- La transposición que se da al originarse un movimiento de un gen de un cromosoma a otro o de un sitio a otro diferente en el mismo cromosoma. La transposición no requiere de secuencias de nucleótidos homólogas, sino de elementos genéticos móviles o sea genes capaces de moverse entre sitios no homólogos de DNA, los transposones. Los transposones son pequeños segmentos de DNA, que incluyen un gen para una proteína, la transposasa, que promueve que el transposón brinque a una posición diferente a la original en cualquier sitio del

materias genético. Estos elementos pueden causar mutaciones al interrumpir la secuencia codificada en un gen determinado (Camerini Otero, D. y Hsieh, P. 1995; Craig, N.L. 1988).

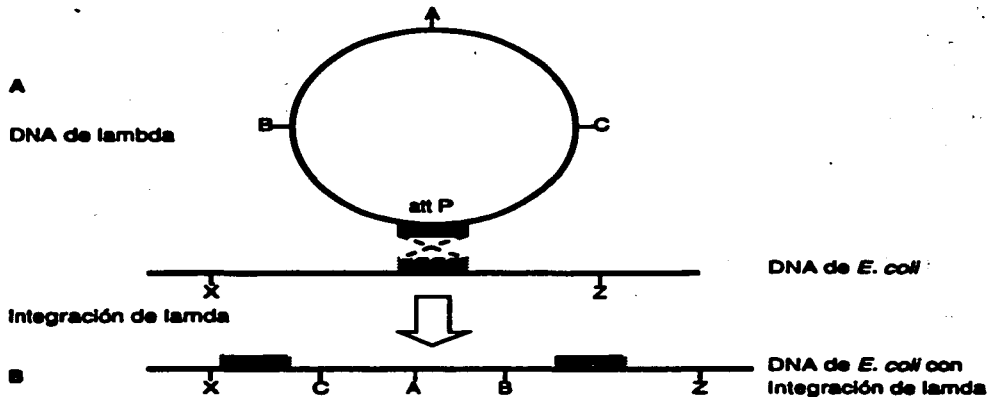


FIGURA 4. Recombinación sitio específica. Integración del bacteriófago lambda en el cromosoma de *E. coli*. A) El DNA de lambda se representa como una molécula circular y el DNA bacteriano en forma lineal. El sitio de acoplamiento en el DNA viral y bacteriano se remarca en negro, sitio en el que se realiza el intercambio simple. B) El cromosoma de *E. coli* tiene integrado el genoma de lambda flanqueado por los sitios híbridos.

## 2.2. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN PROCARIONTES.

La recombinación homóloga es la que con mayor frecuencia se presenta en bacterias y se puede dar por uno de los tres procesos naturales de transferencia de genes: la transformación, la conjugación o la transducción (Damell, J., 1990; Smith, G., 1988).

1.- La transformación es el proceso de transferencia de material genético entre los organismos por medio de fragmentos extracelulares de DNA. El microorganismo receptor al adquirir



un DNA desnudo y por medio de recombinación genética, intercambia parte de la molécula transformante con su DNA cromosomal; como consecuencia, su genotipo se altera.

2.- La conjugación es el proceso de transferencia de genes que requiere de contacto celular entre el donador y receptor de la biomolécula. El intercambio genético es unidireccional, no recíproco, y es mediado por un plásmido transferible, como puede ser el llamado factor de fertilidad (F), presente en la célula donadora. Después del contacto se forma un puente celular que conecta físicamente ambas células, por donde se da la transferencia. Posteriormente ocurre la recombinación genética en los segmentos homólogos. A los receptores se les denomina transconjugantes.

3.- La transducción es el proceso de transferencia de genes entre cepas bacterianas mediado por un bacteriófago. La capacidad de los fagos es limitada ya que el DNA transferido es menos del 1% del cromosoma bacteriano. En la transducción generalizada, cualquier gen bacteriano puede ser accidentalmente incorporado, ya que regiones del DNA donador son empaquetadas, al azar o casi al azar, en las cápsides del fago y transferido a la bacteria receptora. En la transducción especializada, el material se transfiere por fagos temperados como  $\lambda$  y en donde los profagos se asocian a un sitio del cromosoma bacteriano. Aquí el fago transductor se genera por la ruptura anormal del profago del cromosoma huésped, por lo que el profago incluye genes bacterianos.

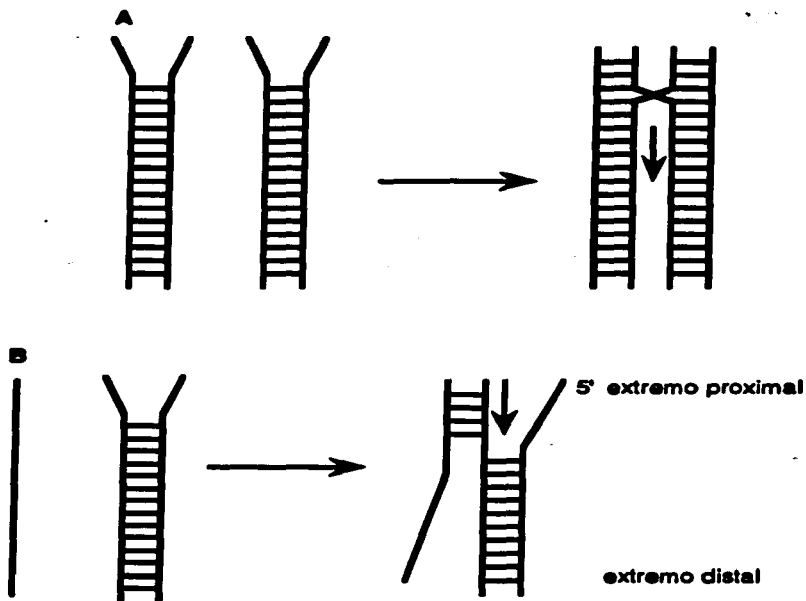
## 2.2.1. MECANISMOS PROPUESTOS EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

Para explicar este evento de recombinación recíproca, han sido propuesto diferentes modelos; en la literatura hay dos tipos de mecanismos diametralmente diferentes.

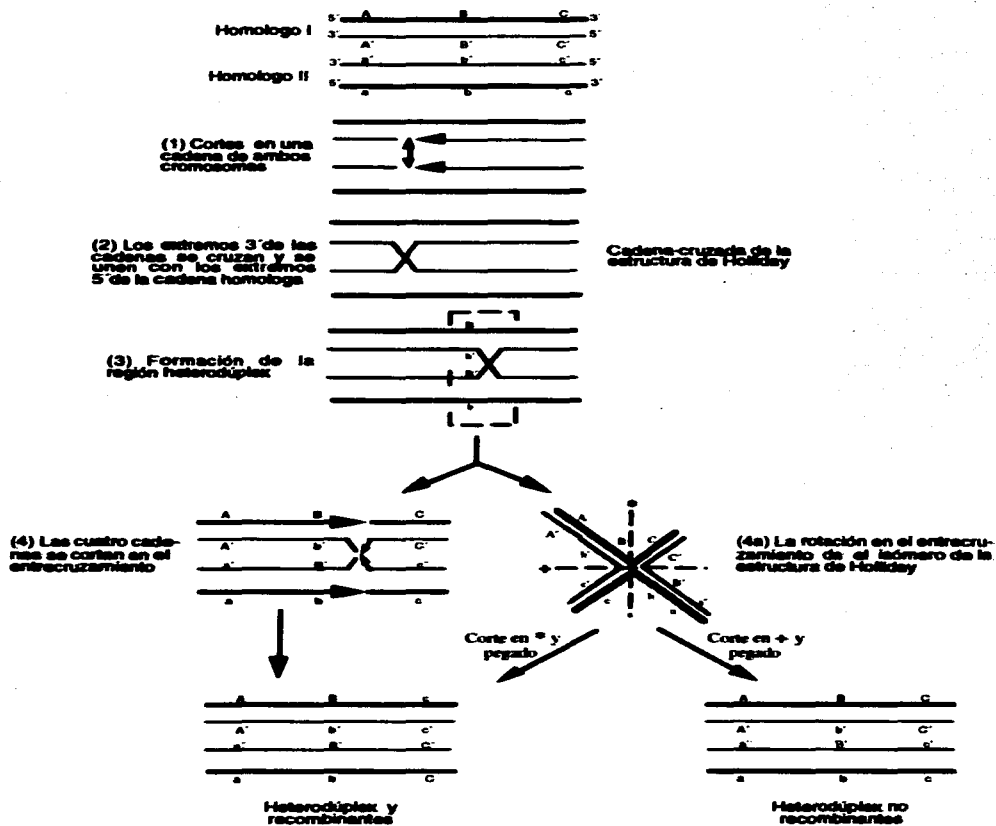
1.- El primer mecanismo se conoce como "separación de las hebras antes del apareamiento o unión" y, postula que las proteínas que actúan como mediadoras del reconocimiento homólogo, abren localmente el sitio de la doble hélice de DNA a interactuar y luego ayudan a la formación de los puentes de hidrógeno Watson-Crick entre la hebra que llega y las dos moléculas de DNA (Figura 5).

Ejemplos del primer mecanismo es el propuesto por Robin Holliday en 1964 (Figura 6), que explica muy bien la resolución de la estructura de unión de moléculas con homología del DNA, y el de Matthew Meselson y Charles Radding de 1975 (Figura 7), el cual explica cómo la parte terminal libre de una molécula actúa como la hebra invasora en el apareamiento en una región

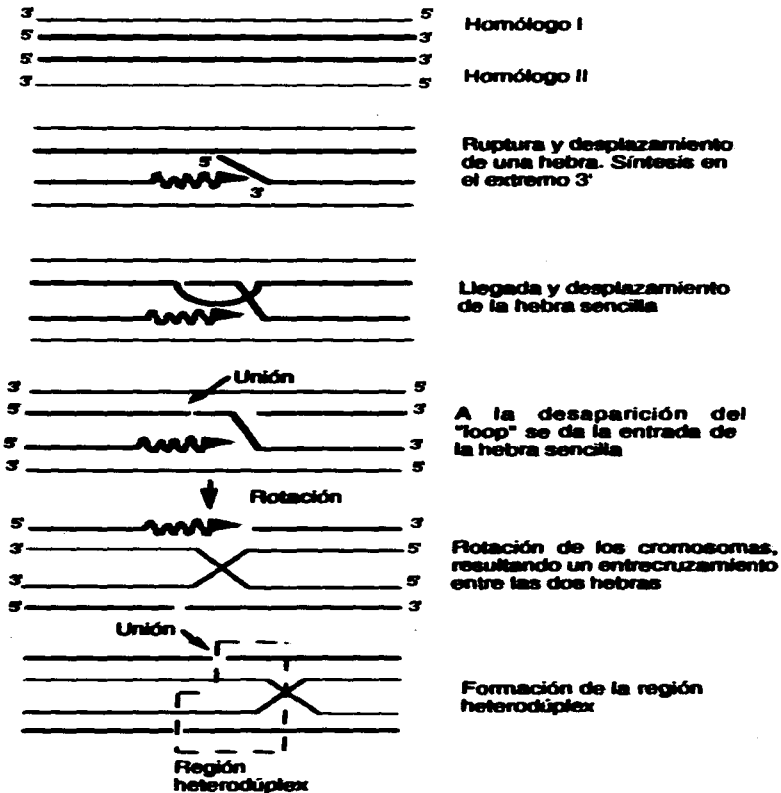
abierta de la otra molécula.



**FIGURA 5.** Vías hipotéticas de apareamiento e intercambio de hebras. A) Separación local en ambas cadenas de dsDNA a interactuar y formación de regiones duplex intermoleculares. Las dos moléculas de DNA con las hebras parcialmente intercambiadas forman una estructura de tipo Holliday. Las proteínas que intervienen en la recombinación permiten la migración del punto de entrecruzamiento completando así el intercambio total de las hebras. B) En la doble cadena de DNA hay una separación local de la hebra aunque ya haya interacción con una molécula homóloga de ssDNA. Abreviaciones utilizadas: ds, hebra doble; ss, hebra sencilla (Stasiak, A., 1992).



**FIGURA 6. Modelo de Holliday sobre recombinación genética. Los cromosomas homólogos genéticamente distintos se marcan en rojo y azul; los genes alelos se marcan en letras mayúsculas y minúsculas y las hebras complementarias se marcan en líneas gruesas y delgadas (Darnell, J. y cols., 1990).**



**FIGURA 7. Modelo de Meselson-Radding. Los cromosomas homólogos se marcan en color rojo y azul; las hebras complementarias se marcan en líneas gruesas y delgadas. (Darnell, J. y cols 1980)**

2.- El segundo mecanismo se conoce como "apareamiento o unión antes de la separación de hebras", ya que propone que los dúplexes con bases apareadas formen adicionalmente uniones de hidrógeno con una hebra sencilla (ssDNA) o doble de DNA (dsDNA) con homología (Figura 8).

En ambos casos las proteínas que median la recombinación homóloga primero ayudan a la formación de una estructura de tres o cuatro hebras de DNA y después resuelven esta estructura en una clásica doble hebra en donde se realiza el intercambio.

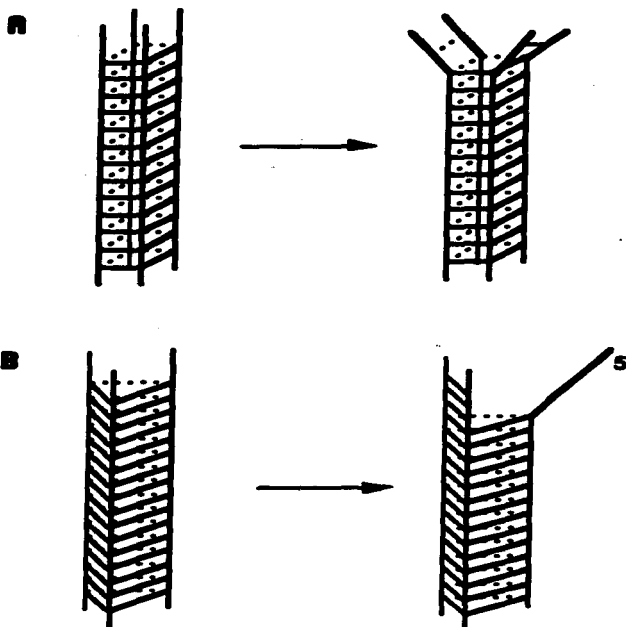


FIGURA 8. Mecanismos propuestos de recombinación homóloga. A) Formación de una estructura tipo McGavin de cuatro hebras. B) Se forma una estructura de tres hebras estabilizada por puentes de hidrógeno entre un ssDNA homólogo y una molécula de dsDNA (Stasiak, A., 1992).

El modelo de Mc Gavin (1971-1977) entra dentro de la segunda categoría y propone la formación de cuatro hebras de DNA al unirse las moléculas. Este es conceptualmente mas difícil y probablemente muy revolucionario, pero la propuesta de una tétrada homóloga está respaldada en la observación de cristales formados como simples derivados de un par de bases GC y AT.

Sin entrar en una discusión mas profunda sobre los diferentes mecanismos propuestos para el proceso de recombinación general en bacterias, en especial en *E. coli*, así como en otras especies bacterianas, éste depende de los genes *rec* y la proteína responsable en primera instancia, para que se efectúe la recombinación homóloga del DNA en las bacterias, es RecA.

### 3.- RecA UNA PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL

El producto del gen *recA* es una enzima multifuncional distribuida ampliamente en procariontes (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990). Este gen, el primero de acuerdo a su nivel de importancia en el proceso de recombinación en *Escherichia coli*, fue identificado en 1965 por Clark y Margulies en bacterias sensibles a luz ultravioleta y defectuosas en recombinación. En análisis subsiguientes, también en *E. coli*, se observó que cepas mutadas en este gen, presentan un fenotipo pleiotrópico, ya que, a diferencia de la cepa silvestre, son defectuosas en transducción por bacteriófagos, muy sensibles a luz ultravioleta, agentes alquilantes y rayos X, con una disminución de la viabilidad por mutagénesis con luz u.v., incapacidad de propagación de profagos y disminución en la viabilidad celular (Horii, T. y cols., 1980; Smith, G., 1988).

Dado el carácter multifuncional de esta proteína, en los últimos años se han realizado gran diversidad de estudios sobre ella, incluyendo uno que define su estructura tridimensional (Story, R. y col., 1992). Otros han permitido su identificación, clonación, y secuenciación del gen (Figura 9), así como la caracterización de la proteína. Además han sido identificado genes análogos en otras especies, encontrando que RecA está ampliamente distribuida y altamente conservada tanto en organismos procariontes como eucariontes, lo que ha permitido definir los procesos en los cuales participa y como funcionan tanto RecA como sus análogas (Miller, R. y Kokjohn, T. 1988, 1990).

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DE RecA

En *E. coli* la región que codifica la proteína RecA (Figura 9) consta de 1059 nucleótido que codifican un producto de 353 aminoácidos (Horii, T. y cols., 1980).

La proteína RecA fue caracterizada en *Escherichia coli* como una molécula de 38,000 Da, que cristaliza como un filamento helicoidal con giro a la derecha con seis monómeros por vuelta (Nguyen, T.T. y cols., 1993) y se identifica como un polipéptido multifuncional que dirige y participa en diferentes actividades celulares. Está compuesta de diferentes dominios para actividad de recombinación y actividad proteolítica, además de existir la evidencia de un dominio sobrelapado con actividad de coproteasa en la región C-terminal (Laminat, F. y cols., 1992; Fernánde de H., A. y cols., 1991; Miller, R. y Kokjohn, T. 1990).

```

-100
TGCTTCAGCGGGCAGCGGTGATCGGGTGGCTGGTCAGGCTACTGCGGTATGCTTGCAGACCITGGCAACAAATTTCTACAAAACACTTGAATACTGTATGAUCATACAGTAIAANTTGCCTTCAACAGAACATATT

-50
GACTATCCGGTATTACCCGGCATGCACGGAGTAAAAAATGGCTATCGACGAAACAAACAGAAAGCGITGGCGGCACACTGGGCCAGATTCAGAAACAAATTTGGTAAGGCTCCACTATCGCCCTGGGTGAA
+50
TPTATAIOLIEASDGIUASNLVSGINLVSALOLEUAIOLAIOALOLEUGIYGINIIIEGLULYSGLINHPHGIVLVSGLYSERIIEMETAROLEUGIYGIU
+100
GACCTTCCATGGATETGGAAACCACTCTACEGQITGECCTTCACTGGATATCCGGCTGGGGAGGTTGGTCTCCGATGGCCGTATCGTGGAAATACGGACCGGAACTCTCCGGTAAAACACGGCTG
+150
ASDARGSERIHTASDVAIGIUTHRIIESETRHGVLSERLEUSERLEUASPIIEALOLEUGIYAIOLGIYGLVLEUPROLETGIYARGIIEVOIGIUIIETRYGIVPROGIUSERSERGIYLYSTHRTHRLEU
+200
ACCTTCAGCTGATCCGGCGAGCCGCGCTGAAGTAAPACCTGTGGTTTAATCGATGCTGAACACGGCGCTGGACCCAATCTACCCAGCTAACTGGGGCTCGATATCGCAACCTGCTGTGCTCCCGACGG
+250
THRLEUGINVAIIEALOLAIOALOGINARPGIUGIYLVSTHRCVSAIOPHEIIEASDALOUIHISALOLEUASDPROIIETRYAIORGLVLSLEUGIIVVAISPIIEASDASNLEUASDGVYSERGINPRO
+300
GACACCGGCGAGCAGCACTGGAAATCTGTCGACGCCCTGGGCGTCTGGCCAGTAGACGTTATCGTGGTTGACTCCGTGGCGGCACTGACGCCGAAGCGGAAATCGAAGCGGAAATCGGCACTCTCAC
+350
ASDTHRGIVGIUGINAIOLAOLEUGIUIIECVSASDALOEUAIORPSERGIVAIQVALASNVOLIEVOIIVASPSERVOIAIOLAOLEUTHRPROLVSALOGIUIIEGLIUGIYGIUIIEGLVYASPSERIIIS
+400
ATGGDECTTGGCGCAGTATGATGAGCCAGGGGATGCGTAAGCTGGCGGTAACCTGAAGCACTCAACACCGCTGCTGATCTCATCAACAGATCCGATGAAATATGGTGTGATGTYTCGGTAAACCGGAA
+450
TGTGLVLEUAIOLAIOARPEIPEIETSERGINAIOIETARNLVSLEUAIOLGIYASNLEULVSGINSEASNTHRLEUUIIETHEIIEASNGINIIEARPEIPEIIEGLIYVOMETPHEGLVYASNPROGIU
+500
ACLEACTACCGGTGATAACCGCTGAAATCTACCGCTCTGTTCGTCTCGACATCCGTCGATCGGGCCGGTGAACGAGGGCGAAAACGTTGGTGGGTAGCGAACCCTCGCTGAAGTGGTGAAGAACAAAATC
+550
THRTHRTRGVLYASNALOLEULYSNHETRYAIOSERVOIAROLEUASPIIEARPARGLIEGLIYAIQVALYSGIUGIYGLVWASNVAIIVAGIYSERGIUTHIRARVVAIIVLYSVAIIVOLLYSASNLYSIIIE
+600
GELGECGGTTTAAACAGGCTGAATTCAGATCTCTACGGCGAAGGTATCAACITCTACGGCGAAGCTGTTGACTGGGGTAAAGAGAAGCTGATCGCAAAACCGAGGCGGIGCTACAGCTACAAGCT
+650
ALRITRPROTHELYSGINAIOLGIUHPHGIIIELEUTRYGIVGIUGIYIIIEASNHPHETRYGIVGIULEUVAIISDLEUGIYVAIIVLYSGLIULYSLEUIIEGLIULYSALOGIYAIOTRTRYSERTRYLYSGIV
+700
GAAAGATCGGTTAGGGTAAAGCGAATCCGACTGCTGGCTGAAAGATAACCCGGAAACCGCGAAGAGATCGAAGAAAGTACGTGAGTTGCTGCTGAGCAACCCGAACTCAACCGCGGATTTCTGTGTA
+750
GILYSLIEGLIYGINGLVLSAIDQAPLOTFRATOTRLEULYSASDASNPROGIUTHRAIOLYSGIUIIEGLIULYSLYSVAIARFGLIULEULEUSERASNPROASNPHESERV
+800
EATGATAGCGAAGCGCATGCCAACAACATPACGAAGATTTTAAATCGTCTTGTGTGATACACAGGGCGCATCTGGCGCCCTTTTGGTTTTTAAAGTGTAAAGGATATGCCATGACAGAATCAACATCCCGCTG
+850
ASDASPSERGIUGIYVAIOLAIOGIUTHRASHIQUASDPHE
+900
+950
+1000
+1050
+1100
+1150
+1200

```

FIGURA 9. Secuencia de nucleótidos del gen *recA* de *E. coli* y la secuencia de aminoácidos deducida. La numeración de la secuencia de DNA comienza en el sitio de inicio de la transcripción determinado *in-vitro* (Horii, T. y cols 1980).

Esta proteína presenta un sitio de unión a ATP, identificado como un péptido de 24 aminoácidos (residuos 257 a 280), el cual está altamente conservado entre bacterias entéricas. En éste, se identifica a la Tyr 264 como el sitio de unión al ATP, aminoácido que se encuentra en todas las proteínas análogas a RecA excepto para una cyanobacteria. El dominio en el que se da la hidrólisis del ATP se ha definido entre los residuos 90 a 129 y en éste, se han identificado los residuos de cisteínas (Cys 90, Cys 116 y Cys 129 ), para los cuales existe controversia sobre el papel que juegan en la catálisis (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

La región amino terminal está asociada con su papel de autoensamble o interacción RecA-RecA, de unión al ssDNA y de la formación de filamentos de nucleoproteína helicoidal (con giro a la derecha) que median el apareamiento homólogo e intercambio de hebras en presencia de ATP y ssDNA; además, la región amino terminal es importante en la reparación de DNA (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

La ubicación de la zona que participa específicamente en la recombinación homóloga ha sido difícil de definir por la dificultad de asignar una función específica a las diferentes regiones de las moléculas, ya que diversas mutaciones en la proteína eliminan la posibilidad de participar en el proceso; además, es una proteína extremadamente plástica y su interacción con diferentes efectores moleculares, como ATP, ADP, ssDNA y dsDNA, provoca alteraciones estructurales significativas (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

## 3.2. ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA RecA

La proteína Rec A, como ya hemos mencionado, participa en diferentes procesos celulares que a continuación enumeramos:

- a) En recombinación homóloga.
- b) En la reparación de lesiones del DNA en forma directa.
- c) En la activación de los sistemas de reparación del DNA (SOS y *umuDC*).
- d) En la proteólisis de LexA y UmuD provocando la desrepresión de los genes de reparación y del sistema SOS entre otros.
- e) En la inducción de profagos.
- g) En el inicio de la replicación del DNA y división cromosomal.

### 3.2.1. RecA EN LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La clonación y la sobreproducción de la proteína, seguidas del estudio de reacciones de



recombinación en sistemas *in vitro* bien controlados, han proporcionado la bioquímica de dichos eventos. Se ha demostrado su papel central en la recombinación homóloga ya que la proteína forma un filamento de nucleoproteína que cataliza el reconocimiento, el apareamiento e intercambio de cadenas entre dos moléculas de DNA homólogo, adenosina 5'-trifosfato(ATP)-dependiente (Hoori, T., 1989; Miller, R. y Koljohn, T., 1990; Story, R. y cols., 1993).

Se sabe que el reconocimiento homólogo, seguido por el intercambio de hebras, ocurre entre una región de hebra sencilla de una molécula y la región duplex homóloga de la segunda molécula de DNA. Aunque hay autores que sugieren que el intercambio de hebras puede suceder en la región de los dos duplex (Stasiak, A., 1992). La extensión de la secuencia homóloga de nucleótidos requerida para que ocurra el proceso de recombinación es aproximadamente de 40 a 50 pb (Smith, G., 1988).

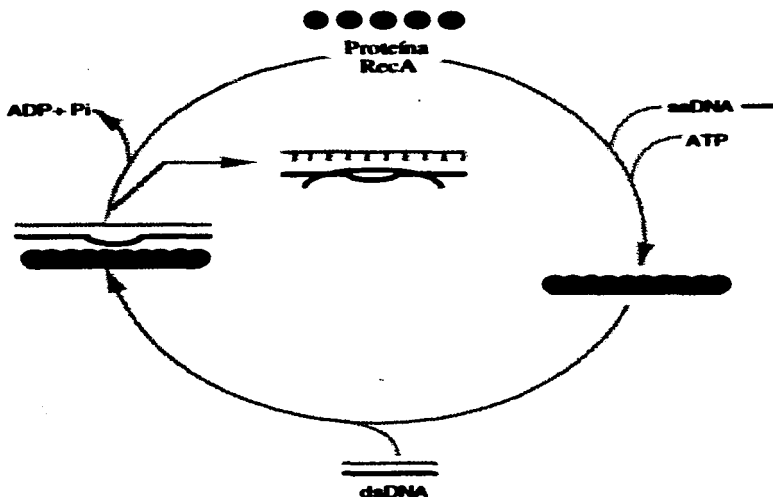


FIGURA 10. Modelo de acción de RecA. La proteína RecA de *E. coli*, en presencia de ATP, se une a una cadena sencilla de DNA. Esta estructura promueve la inserción y unión en la región homóloga de una cadena doble de DNA.

Utilizando la proteína purificada y por medio de estudios de microscopía electrónica se ha encontrado el complejo RecA-DNA, formado por una hebra doble de DNA y RecA polimerizada en el DNA, que resultan en filamentos helicoidales muy regulares de 95 Å y 110 Å de diámetro (Di Capua, E. y cols., 1982).

Por otro lado el grupo de Koller (1983) y el de Flory (1984) demostraron que una hebra sencilla de DNA forma con RecA una hélice extendida con parámetros similares a los observados en el dúplex de DNA acomplejada con RecA.

Estos estudios, junto con los datos bioquímicos y genéticos obtenidos hasta ese momento permitieron a Howard-Flanders en 1984, proponer un modelo molecular de la acción de RecA. De acuerdo a este modelo, la recombinación entre ssDNA-dsDNA promovida por RecA requiere la formación de un complejo presináptico RecA-ssDNA, donde el ssDNA no se oculta sino mas bien está expuesto para lograr el contacto con el dsDNA libre de proteína (Figura 10).

Para facilitar el reconocimiento homólogo entre las moléculas de DNA que interactúan, se postula que cada RecA tiene dos sitios expuestos cerca del complejo helicoidal. El primer sitio ayuda a la proteína a polimerizarse en el ssDNA y el segundo es un sitio de unión al DNA el cual lleva al DNA dúplex cerca del ssDNA ya enlazada al primer sitio. Un filamento de RecA alrededor de una ssDNA se une en proporción estequiométrica de un monómero de 38 kDa por cuatro nucleótidos (Figura 11).



FIGURA 11. Unión del ssDNA a la proteína RecA. A) La cadena sencilla de DNA se une a RecA. B) Búsqueda de la región homóloga en un dúplex de DNA. C) El DNA de cadena sencilla se aparea con la hebra complementaria en la zona blanco del dúplex. (Stryer, L., 1988).

Cuando se habló de los mecanismos por medio de los cuales se lleva a cabo la recombinación homóloga, se mencionó un segundo mecanismo alternativo conocido como "apareamiento o unión antes de la separación de hebras" basado en el modelo de McGavin. Este propone la formación de puentes de hidrógeno adicionales entre el dúplex intacto y la hebra sencilla restante. Esto supondría la unión de un dsDNA de secuencias no homólogas las cuales serían inestables, lo que permitiría una unión no homóloga que por lo mismo se disociaría y sería remplazada continuamente por otro segmento hasta que el contacto ocurriese en la zona homóloga. El contacto estable se continúa con las dos moléculas en un movimiento en forma de "zipper", recubriendo al dúplex en un complejo presináptico RecA-ssDNA. El complejo sináptico resultante que aquí se propone contiene un ssDNA homólogo alineado y un segmento dsDNA formando un arreglo co-axial de tres hélices, en donde el apareamiento de las regiones homólogas es debido a la formación de la triple hélice en el complejo de hélice RecA-DNA.

Sea cual fuere el mecanismo en la recombinación homóloga el papel que efectúa RecA, producto del gen *recA*, es central ya que cataliza la reacción de recombinación usando como fuerza motriz la hidrólisis del ATP.

El papel central de esta proteína se demostró en diversas investigaciones en las cuales se ha encontrado que la frecuencia de recombinación es  $10^4$  veces menor en mutantes *recA* con respecto a la cepa silvestre (Xu, B., y cols., 1988).

### 3.2.2. SU PAPEL EN REPARACIÓN DE DNA Y EN LA REGULACIÓN DE GENES.

La proteína además de intervenir en el proceso de recombinación como previamente se ha mencionado, participa en reparación de DNA. En células normales de *E. coli* encontramos algunos cientos de copias de la proteína RecA, nivel que se incrementa cientos de veces cuando ocurre un daño en el DNA. Al ocurrir el daño al DNA, ya sea por la exposición a diversos agentes como la radiación de luz ultravioleta, quinolonas (ácido nalidíxico), rápidamente se induce la síntesis de más de 50 proteínas que intervienen en la reparación del DNA, haciendo funcionar la maquinaria de reparación conocida como sistema SOS (Figura 12).

Bajo condiciones normales las proteínas de reparación se encuentran en niveles bajos y a que la síntesis del RNA mensajero se encuentra bloqueada por la proteína represora LexA. La esencia de la respuesta SOS es la ruptura de dicha proteína. La hebra sencilla originada del DNA dañado actúa o funciona como una especie de gatillo al unirse a la proteína RecA.

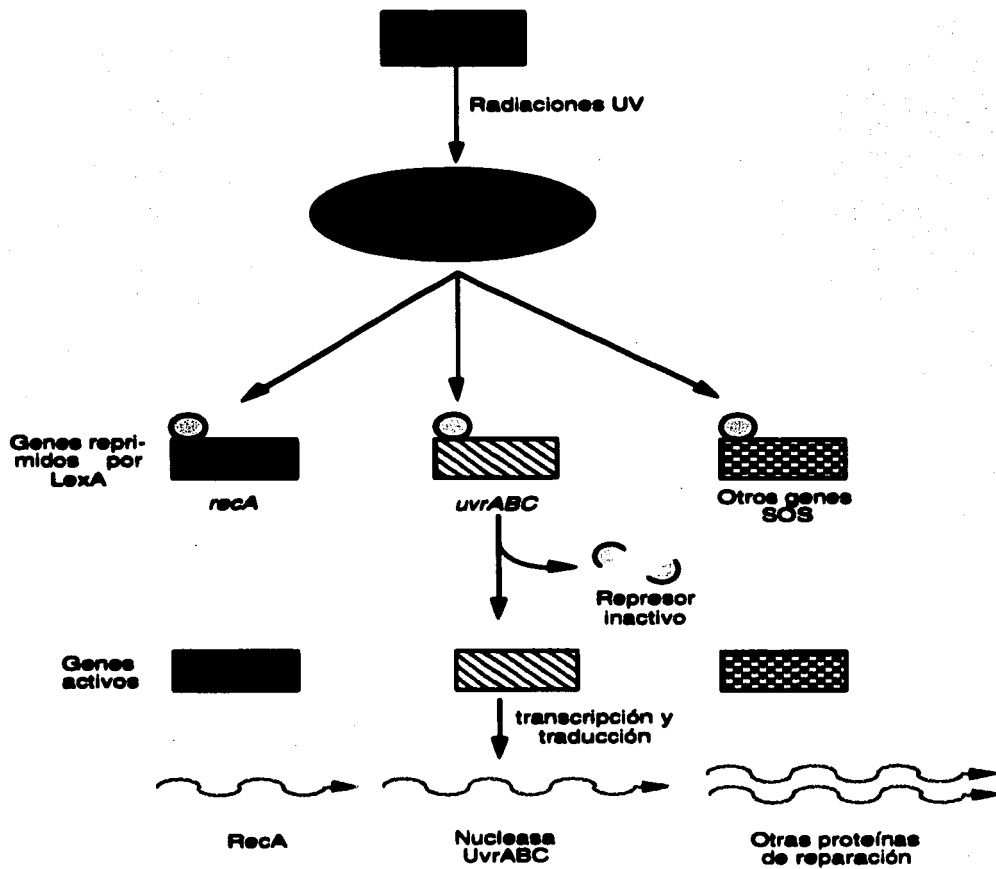


FIGURA 12. Papel de la proteína RecA en la respuesta SOS, al exponer una bacteria a radiaciones UV (Darnell, J. y cols., 1990).

El complejo ssDNA-RecA hidroliza un enlace Ala-Gly en la proteína LexA, lo cual bloquea su capacidad de impedir la transcripción de muchos genes involucrados en la reparación del DNA. RecA actúa como proteasa ya que rompe varios represores (incluyendo al producto de *lexA*) iniciando una reacción en cascada que induce más de 20 genes del sistema SOS de reparación conocidos como "damage-inducible" (*din*), lo que nos indica que RecA y LexA están controlando la respuesta SOS (Lloyd, A. y Sharp, P., 1993; Riera, J. y col., 1994).

La proteína LexA con un peso molecular de 22,700 Da, es el represor común de por lo menos 18 genes, incluyendo *recA* y *lexA*. El represor LexA se une al sitio de transcripción de los operadores SOS (SOS box) con la secuencia taCTGTatata-a-cAGta. La proteína RecA es convertida reversiblemente a proteasa en el momento que se origina la señal después de que ocurre el daño al DNA. Bajo estas condiciones diferentes actividades celulares se incrementan, como la habilidad de reparación, inhibición de la división celular, además de incrementarse la síntesis de RecA y LexA. Una vez reparados las lesiones del DNA, la señal de inducción no se da más y RecA se inactiva y el balance entre LexA y RecA activado se pierde por lo que el represor LexA se acumula y entonces los genes SOS se reprimen nuevamente (Fernández de H., A. y cols., 1991).

El gen *recA* también participa en la inducción de profagos. En células con profagos como  $\lambda$  y  $\phi$ 80, la activación de la proteína RecA promueve la ruptura del represor CI de lambda iniciando la inducción del profago y la replicación estable del DNA (Venkatesh, T.V. y Das, H.K.1992; Fernández de H., A. y cols., 1991). Además actúa como recombinasa, con actividad ATPasa.

### 3.2.3. SU PAPEL EN MUTAGÉNESIS.

En *E. coli*, RecA es requerida para el proceso de mutagénesis en respuesta a agentes que dañan al DNA. Como parte del sistema SOS, la proteína es requerida en la represión del operón *umuDC*. RecA ejerce un control postranscripcional o postraduccional sobre la mutagénesis al promover el procesamiento o ruptura de la proteína UmuD, proteína esencial en este proceso. Además, participa directamente en la modificación del replisoma SOS, permitiendo un paso de incorporación errónea o la inhibición de la actividad de la DNA polimerasa III en la corrección. La proteína también es requerida para activar otras proteínas o inactivar otros represores (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

### 3.2.4. RecA EN LA REPLICACIÓN DE DNA.

Se ha sugerido la posibilidad de que la proteína RecA también esté involucrada en procesos básicos de la célula como la replicación del DNA, ya que células de *E. coli* deficientes en proteína RecA, con frecuencia contienen un número anormal de cromosomas después de que se efectúa la replicación (Zyskind, J. y cols., 1992).

Se ha observado que en más del 10% de células mutadas en RecA no contienen DNA. Estas células anucleadas se originan al ocurrir la división del DNA en una de las células hijas y no en la otra célula, proponiendo por lo tanto que RecA además es requerida para una repartición equitativa del material genético en las dos células hijas.

Diversos autores sugieren que la proteína se requiere cuando inicia el proceso de replicación en sitios distintos a *oriC*, sitio que normalmente usa *E. coli* como origen de replicación, además de ser necesaria para que la replicación sea estable, ya sea constitutiva o inducida.

La replicación constitutiva inicia en un sitio de origen secundario que funciona en ausencia de RNasaH, mientras que la inducida inicia en un sitio de origen secundario que funciona en respuesta al sistema SOS y en ausencia de síntesis de proteínas. RecA también es requerida para la viabilidad si otro sitio de origen reemplaza a *oriC* y es insertado en el cromosoma a una cierta distancia de la localización normal de *oriC*. El requerir a RecA involucra la formación de un complejo RecA con un horquilla de replicación evitando un sitio de terminación *ter* en un sitio de enlace *tus*. Se han localizado cinco sitios *ter* en la región terminal del cromosoma y son sitios de unión para las proteínas Tus (Figura 13). El complejo Tus-Ter proteína-DNA impide el movimiento de la horquilla por lo que inhibe la actividad de la helicasa (Zyskind, J. y cols., 1992).

### 3.3. EL GEN *recA* EN LA FILOGENIA MOLECULAR

En los organismos procariontes la taxonomía molecular se deriva predominantemente de la comparación de secuencias entre las subunidades 16S y 5S de los RNAs ribosomales (rRNAs). Así, estos organismos se dividen en dos grandes grupos: eubacteria y archaebacteria. El grupo de eubacteria es muy grande, por lo cual los estudiosos de las líneas de evolución en procariontes han incrementado su interés en los alineamientos de proteínas comunes.

Como ya mencionamos, RecA es una proteína multifuncional primordial en la recombinación homóloga, reparación del DNA y en la respuesta SOS. Está presente en todas las eubacterias y es la más conservada entre los organismos bacterianos (Karlin, S. y cols., 1995) teniendo entre un 56 a un 100% de identidad en sus secuencias (Story, R. y cols., 1993).

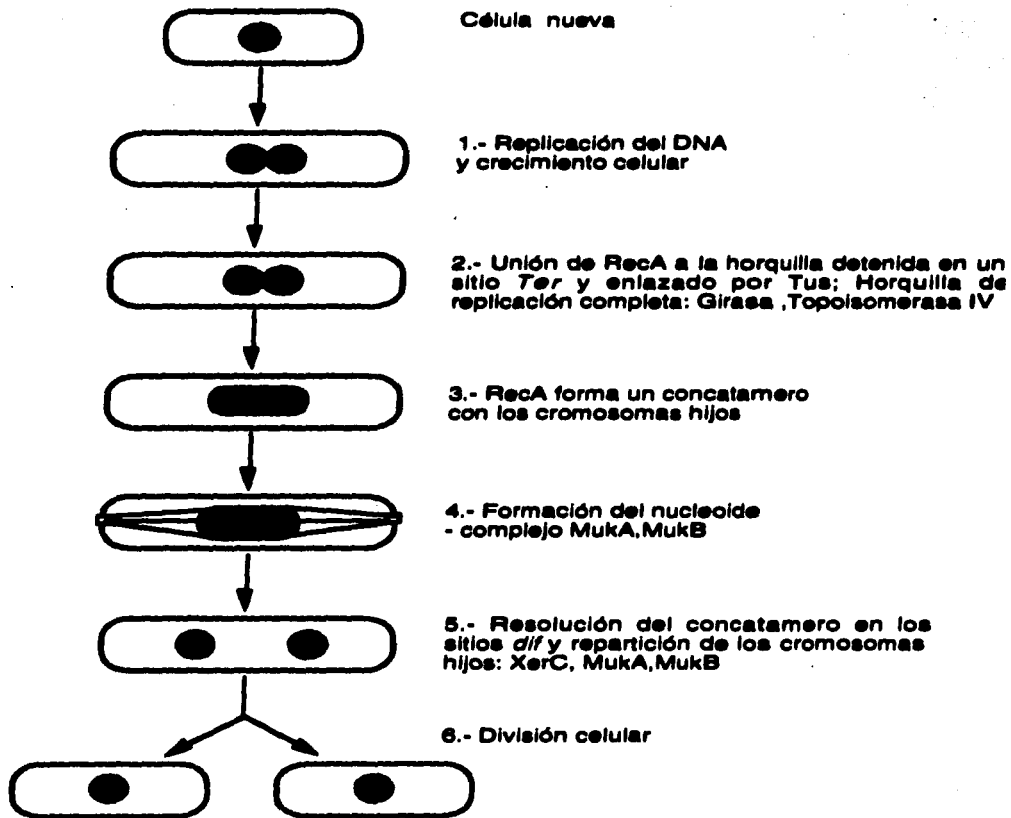


FIGURA 13. Modelo de partición y segregación del cromosoma (Zyskind, J., 1992).

Al observar y analizar las secuencias primarias entre RecAs de bacterias, proteínas de *S. cerevisiae* RecA-relacionadas (DMC1), la proteína UvsX del bacteriophago T4 (con aproximadamente un 20% de identidad) y otras proteínas con actividades similares pero no idénticas a las reportadas para RecA de *E. coli*, se encuentra una relación en su estructura terciaria. Dicha comparación nos sugiere que todas estas proteínas comparten el mecanismo para unir e hidrolizar ATP, el cual está acoplado a los cambios conformacionales e involucrados en la habilidad de hacer filamentos. Entre los 156 residuos altamente conservados en las proteínas RecAs bacterianas, 87 (56%) están conservados en UvsX y 64(41%) en DMC1. En ambos casos muchos de estos residuos están en el sitio de unión a ATP y en la zona hidrofóbica de la proteína (Figura 14). Este análisis permite argumentar que estas proteínas son miembros de un grupo que deriva de un ancestro común existente antes de la divergencia ocurrida entre procariontes y eucariontes (Story, R.M. y cols., 1993; Karlin, S. y cols., 1995).

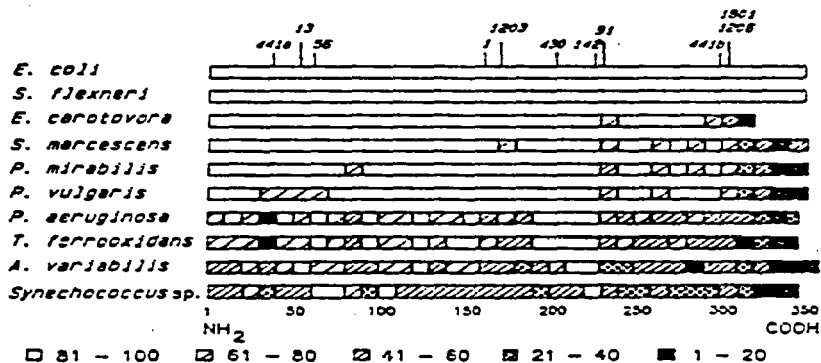


FIGURA 14. Comparación del grado de identidad en la secuencia de aminoácidos de 10 proteínas RecA (Miller, R. y Kokjohn, T. 1990).



El intercambio de material genético entre especies bacterianas, como entre *E. coli* y *S. typhimurium*, enfrenta diferentes barreras, una de las principales es el nivel o grado de recombinación homóloga que pueda darse entre el DNA de la célula donadora y la receptora. Para que ocurra la recombinación, es necesario no solo cierto grado y extensión de homología entre los DNAs implicados, sino que este sea reconocido por las enzimas que intervienen en la recombinación y reparación de hebras de DNA. De lo anterior se desprende que en el proceso de especiación bacteriana (evolución de especies), los sistemas SOS y de reparación son claves y por ende la proteína RecA juega un papel muy importante (Matic, I. y cols., 1995).

Además de estas evidencias, se ha reportado la existencia de respuestas similares en otras especies diferentes a *E. coli* cuando ocurre un daño en el DNA y se ha demostrado una complementación funcional interespecie en mutantes *recA* de *E. coli* como las que ocurren con 30 diferentes especies de las familia de Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Vibrionaceae, Neisseriaceae, Rhodospirillaceae y Azotobacteraceae, que son capaces de reprimir e incluir al gen *recA* de *E. coli*, en ausencia y en presencia de un agente que daña el DNA (Fernández de H., A. y cols., 1991; Miller, R. y Kokjohn, T., 1988).

RecA ha sido utilizada en estudios de filogenia molecular ya que al ser una molécula ampliamente distribuida y con un nivel alto de conservación, inclusive en microorganismos que evolutivamente se encuentran distanciados (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990), representa una amplia y valiosa información que pueden ayudar a resolver el problema de la clasificación en bacteria.

Lloyd, A. y Sharp, P. en 1993 compararon 25 secuencias de RecA y hay una fuerte concordancia entre su filogenia y la que resulta al usar la secuencia del rRNA 16S.

Por otro lado el grupo de Karlin, S. en 1995, al comparar la secuencia de proteínas RecA de 62 diferentes eubacterias, y basado en un método llamado "significant segment pair alignment" o SSPA encontró que las  $\gamma$ -proteobacteria se pueden clasificar en dos grandes subgrupos, uno en la que la mayoría son huéspedes de vertebrados y en el otro se encuentran habitantes del suelo. Las  $\alpha$ -proteobacterias también se dividen en dos grupos distintos, mientras la clasificación de las  $\beta$ -proteobacterias es más compleja. Las bacterias gram+ quedan divididas en seis grupos, tres con bajo y tres con alto contenido G+C (Tabla 1).

Así, la clasificación bacteriana resultante de la comparación de secuencias de RecA resulta válida y consistente aunque siempre habrá puntos a discutir con la obtenida por la secuenciación del rRNA 16S.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RecA POR EL METODO DE SSPA BASANDOSE EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS.

Grupo*	Sub-grupo*	Secuencias evaluadas	Valores SSPA	Descripción	Otras clasificaciones
C1		10	73-95		Púrpura $\gamma$ -proteobacteria
	C1e	7	83-95	Enterobacteria	$\gamma$ 1
	C1v	2	87	Cepas de <i>Vibrionaceae</i>	$\gamma$ 2
	C1h	1	—	<i>H. influenzae</i>	$\gamma$ 3
C2		5	74-91		
	C2p	4	85-91	<i>Pseudomonas/Azotobacter</i>	Púr. $\gamma$ -proteobacteria y 4
	C2a	1	—	<i>Acinetobacter</i>	y 5
B1		6	70-87		
	B1m	3	78-87	Methylobacteria/ <i>Legionella</i>	$\gamma$ 2 ( <i>Legionella</i> )
	B1x	1	—	<i>Xanthomonas</i>	
	B1b	2	82	<i>Burkholderia/Bordetella</i>	
A1		7	73-93	Rhizobacteria/ <i>Agrobacteria</i>	Púrpura $\alpha$ -proteobacteria
A2		2	82	<i>Rhodobacter</i>	Púrpura $\alpha$ -proteobacteria
A3		1	—	<i>Rickettsia</i>	Púrpura $\alpha$ -proteobacteria
E		2	80	<i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter</i>	Púrpura $\epsilon$ -proteobacteria
P1		2	73	<i>Staphylococcus / Bacillus</i>	Gram+ / Bajo cont. G+C
P2		1	—	<i>C. perfringens</i>	Gram+ / Bajo cont. G+C
P3		2	71	<i>Leptococcus / Streptococcus</i>	Gram+ / Bajo cont. G+C
P4		3	91-95	<i>Streptomyces</i>	Gram+ / Alto cont. G+C
P5		2	90	<i>Mycobacterium</i>	Gram+ / Alto cont. G+C
P6		1	—	<i>Corynebacterium</i>	Gram+ / Alto cont. G+C
DT		3	64-93	<i>D. radiodurans / Thermus sp</i>	Grupo <i>Deinococcus-Thermus</i>
S		3	74-79	Cyanobacteria	

\* Los grupos y subgrupos se formaron en base a los valores SSPA.

### 3.3.1. ACTIVIDADES REPORTADAS PARA PROTEÍNAS ANÁLOGAS A RecA.

Entre los diversos ejemplos de genes clonados, con homología en función y estructura a la proteína RecA de *E. coli*, encontramos :

#### 1) EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

##### a) Familia *PSEUDOMONADACEAE*

Después de *E. coli* el gen *recA* de *Pseudomonas aeruginosa* es probablemente el mejor estudiado dentro de las bacterias gram-negativas. En *Pseudomonas aeruginosa* PAO el producto del gen *recA* es una proteína de peso molecular aparente de 47,000 Da que presenta una reacción antigénica cruzada con el antisuero anti-*E.coli* RecA y es un efector de la expresión de los genes inducible por estrés, capaces de mediar la respuesta tipo SOS y en respuesta a agentes que dañan el DNA. Se observó que el gen *recA* es inducible y autoregulado y se localiza cerca de la región *pyoAP41-argF-argG* del cromosoma de PAO (Sano, Y., 1993; Miller, R. y Kokjohn, T., 1988) e interviene al igual que *recA* de *E. coli* en recombinación homóloga y otros procesos. Se llegó a determinar con mutantes *recA* que el mecanismo genético responsable en la biosíntesis inestable de alginatos se muestra como un evento *recA*-independiente (Ohman, D. y cols., 1985).

El gen *recA* de *Pseudomonas fluorescens* OE28.3 fue aislado por complementación del fenotipo *Fac<sup>c</sup>* del fago  $\lambda$  EMBL3 en cepas *RecA<sup>-</sup>* de *E. coli*. Este gen *recA* heterólogo es capaz de recuperar la resistencia a la exposición de UV y MMS en mutantes *recA<sup>-</sup>* de *E. coli*. La secuencia del DNA revela que la proteína consta de 352 aminoácidos y presenta un alto grado de homología a la proteína RecA de *P. aeruginosa* (87.8 % de identidad) y *A. vinelandii* (84.3 % de identidad) (De Mot, R. y cols., 1993).

Se han identificado y donado los genes *recA* de *Acinetobacter calcoaceticus*, *P. putida* y *P. syringae* por que son capaces de restaurar la resistencia a MMS, luz UV, además de que complementan un fenotipo deficiente en recombinación en mutantes *recA* de *E. coli* (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

Se aisló el gen *recA* de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y cuando se expresó en *E. coli* se produce una proteína de 40 kDa que presenta una reacción cruzada con el anticuerpo anti-RecA de *E.coli*. Esta proteína tiene la habilidad de complementar cepas *recA<sup>-</sup>* de *E. coli* defectuosas en actividad de reparación del DNA (Rabibhadana, S. y cols., 1993).

##### b) Familia *ENTEROBACTERIACEAE*

La expresión de proteínas extracelulares, como la de una nucleasa extracelular en *Serratia*

*marcesans*, requiere del gen *recA* funcional. La secuencia del DNA de este gen es muy similar al gen *recA* de *E. coli* y presenta un posible sitio de unión a LexA casi idéntico al de la proteína de *E. coli* (Ball, T.K. y cols., 1990).

Los experimentos de complementación interespecies dentro de esta familia han identificado este mismo gen en *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* y *Yersinia pestis* (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

c) Familia **RHIZOBIACEAE** (Especies consideradas dentro del grupo  $\alpha$  de proteobacterias)

El gen *recA* de *Rhizobium phaseoli* fue clonado por complementación del fenotipo Fec<sup>c</sup> del fago  $\lambda$  recombinante en *E. coli recA*<sup>-</sup>. Este gen es capaz de restaurar la resistencia a la irradiación a luz UV y a agentes alquilantes como el MMS, además de promover en *E. coli* la recombinación homóloga. La proteína RecA es codificada por 1080 nucleótidos y consta de 360 aminoácidos con una masa molecular calculada de 38.61 kDa (Michiels, J. y cols., 1991; Martínez, J. y cols., 1991). Además, al analizar la inestabilidad del plásmido pSym por medio de la pérdida de producción de melanina, se determinó a éste como un evento *recA*-dependiente mientras que la pérdida en sí del pSym se determinó como un evento *recA*-independiente.

Dentro de esta familia se ha clonado análogos a *recA* de *Agrobacterium tumefaciens* C58 y *Rhizobium melloti*, *R. japonicum* y *R. leguminosarum* (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

d) Familia **VIBRIONACEAE**

Por medio de complementación el gen *recA* también se ha identificado en *Vibrio cholerae*, *V. anguillarum* y *Aeromonas caviae* (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

En *Vibrio cholerae*, la proteína RecA es de 39 kDa y es esencial para la amplificación del gen que codifica para la toxina del cólera (Goldberg, I. y cols., 1986).

e) Familia **NEISSERIACEAE**

En *Neisseria gonorrhoeae*, la expresión del pilus antigénico resulta por rearrreglos internos en el DNA dentro del gen estructural del *pilI* (Subunidad pilus). Lo anterior indica que la recombinación genética, y por lo tanto el producto del gen *recA*, juega un papel primordial en el proceso de aparición de cepas con pilus en lugar de cepas variantes sin él en fase de transición (Koohey, J. y cols., 1987).

f) Familia **AZOTOBACTERIACEAE**

*Azotobacter vinelandi* miembro de esta familia es un organismo poliploide cuya mutante *recA* presenta un fenotipo similar a las mutantes *recA* de *E. coli* (Venkatesh, T.V. y Das, H.K. 1992).

## OTRAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

El gen *recA* de *Campylobacter jejuni* spp. codifica una proteína con una masa molecular calculada en 37,012 Da con un nivel alto de similitud con otras proteínas RecA. Mutantes en este gen muestran una sensibilidad incrementada a la luz UV y son defectuosas en recombinación generalizada. Lo anterior se refleja en una disminución en la frecuencia de transformación natural, característica única de este enteropatógeno. La posibilidad de incorporar DNA exógeno la hace susceptible a la reversión de cepas atenuadas usadas en vacunas; mutantes *recA* han sido utilizadas para minimizar dicho problema. Se ha demostrado que estas cepas también son capaces de colonizar y dar protección a conejos usados como modelos y además de no observar o detectar cepas transformadas en las cepas *recA* demostrándose que dicho evento es dependiente de la proteína RecA (Guerry, P. y cols., 1994).

En otras bacterias gram negativas que pertenecen a familias diferentes a las mencionadas con anterioridad como *Bacteroides fragilis*, *Methylophilus methylotrophus*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Haemophilus influenzae* y *Legionella pneumophila*, también se ha reportado la donación e identificación de este gen por medio de complementación de cepas deficientes en recombinación homóloga, en reparación de DNA, en sensibilidad a luz UV y otras funciones inherentes a RecA (Miller, R. y Kokjohn, T., 1990).

## 2) EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

### a) Familia BACILLACEAE

La proteína RecE de *B. subtilis* es similar a la proteína RecA de *E.coli* (Smith, G., 1988). Se cree que en este microorganismo existen múltiples vías de recombinación al observar que la recombinación intramolecular es independiente de *recA* (Alonso, J. y cols., 1992). Existen 11 genes diferentes conocidos en este microorganismo asociados a reparación de DNA y recombinación.

### b) Familia LACTOBACILLACEAE

Se identificó el gen *recA* en *Streptococcus pneumoniae* y se determinó que participa tanto en la reparación de DNA como en la recombinación. En mutantes *recA* de esta bacteria, la cual es naturalmente transformable, se reduce de manera drástica su frecuencia de transformación con plásmidos.

En el inicio del proceso de competencia en este organismo, la cual se refiere a su habilidad para tomar e introducir DNA exógeno durante su fase exponencial de crecimiento, la expresión de *recA* se incrementa varias veces. Aparece un transcrito *recA*-específico de aprox 5.7 kb de longitud lo que indica que *recA* es parte de un operón inducible durante la competencia (competence-inducible [*cin*]). Dicho operón también es inducido cuando existe algún daño como el ocurrido al tratar las células con mitomicina C.

Además, al tratar cepas lisogénicas *recA* con mitomicina-C no se da la inducción a profagos y la lisis de células, hecho que se da en lisogénicas *recA*<sup>-</sup>. Todo esto nos demuestra que *RecA* controla la inducción lisogénica y nos indica la existencia de un sistema de reparación SOS (Martín, B. y cols., 1995).

En otro miembro de la familia, *Streptococcus pyogenes*, al analizar mutantes en *recA* se muestra que este gen participa en el proceso de reparación y en su capacidad de aceptar DNA lineal durante el proceso de transformación. El fragmento donado y secuenciado nos muestra que *recA* de este microorganismo tiene una alta homología con *S. pneumoniae* (Tao, L. y cols., 1995).

Dentro de las bacterias Gram-positivas se ha reportado la identificación del gen en bacterias pertenecientes a diversas familias como *Streptomyces fradiae*, *Gloeocapsa alpicola*, *Synechococcus sp.*, *Anabaena variabilis* (Miller, R. y Kokjohn, T. 1990).

## II.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, como ya se mencionó, pertenece a un grupo de bacterias fitopatógenas que afectan a diferentes plantas de importancia económica. Ésta, en particular ha sido identificada como el agente causal de la putrefacción en plantas de la familia *Cruciferae*, la col y la coliflor (Williams, P., 1980; Rabibhadana, S. y cols., 1993). Es productora de un polisacárido extracelular, la goma xantana, la cual pudiera servirte como barrera protectora en contra de condiciones medio ambientales adversas a las que pudiese estar expuesta, además de facilitar la colonización al ayudarla a adherirse a la superficie de la planta en las fases tempranas de la infección (Daniels, M.J. y cols., 1984; Thome, L. y cols., 1989; Ramírez, M. y cols., 1987, 1988, Coplin, D.L. y Cook, D., 1990). Sin embargo, se han aislado cepas con mutaciones que afectan genes esenciales en la síntesis de la goma xantana y la virulencia de los microorganismos está levemente afectada (Crecy-Lagard de V. y cols., 1990; Daniels, M. y cols., 1984).

Esta bacteria al igual que otras bacterias Gram-negativas, secreta extracelularmente varias enzimas a través de la vía Xps (Lory, S., 1992; Pugsley, A.P., 1990), como son  $\alpha$ -amilasa, poligalacturonato liasa, proteasa y endoglucanasa, característica también asociada a su carácter fitopatógeno ya que se han aislado mutantes no patógenos que no secretan dichas enzimas (Crecy-Lagard de V. y cols., 1990; Thome, L. y cols., 1989; Liu, Y. y cols., 1990; Dums F. y cols., 1991; Hu, N. y cols., 1992; Daniels, M. y cols., 1984).

La xantana es un polímero especial, de amplias aplicaciones industriales y cuyas propiedades han sido estudiadas en forma extensiva por el Northern Regional Research Center (Jeanes, A. y cols., 1961); en especial han encontrado que este polisacárido hidrosoluble puede reemplazar otras gomas obtenidas a partir de plantas y algas. Bajo condiciones controladas de fermentación, generalmente, se obtiene un producto constante y de calidad reproducible. Sin embargo, existen reportes de que bajo condiciones de fermentación continua se desarrollan formas variantes de la cepa productora provocando una disminución en el rendimiento en la producción del polisacárido, además de que se obtiene un polisacárido de composición y propiedades diferentes del original (Thome, L., 1987; Cadmus, M.C. y cols., 1976; Martínez, J. y cols., 1993).

El mecanismo de esta variación, debido a la importancia económica que implica ha sido tratado por diferentes autores, por lo que se encuentran en la literatura diversas opiniones y evidencias que tratan de explicar el fenómeno aquí mencionado.

Por un lado, hay autores que sugieren que *X. campestris* es genéticamente inestable y presenta una frecuencia alta de rearrreglos genómicos como serían deleciones y amplificaciones (Kidby, D. y cols., 1977; Cadmus, M. y cols., 1976).

Por otro lado, en *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* se ha reportado una frecuencia alta de variación fenotípica, además de la presencia de secuencias de DNA repetidas con una frecuencia considerable y un sistema de recombinación general muy activo. La vía de esta recombinación es mediada por una proteína tipo RecA, y a ésta se le involucra en el mecanismo probable de la variación, sin embargo en el reporte no se dan evidencias claras para concluir lo anterior (Rabibhadana, S. y cols. 1993).

Existen reportes en donde la producción de otros exopolisacáridos se da también en forma inestable. Un ejemplo es la producción de alginato por otra bacteria gram negativa, *P. aeruginosa*, y en donde la causa de la variación se debe a la existencia de una secuencia en el DNA que de alguna forma ejerce un control de tipo encendido-apagado sobre la expresión de un gen regulador. Otro es el caso de *P. atlántica* en donde la causa de la disminución en la producción de estos exopolisacáridos es debido a la inactivación de los genes por transposición de elementos de inserción o por otros rearrreglos génicos (Martínez J. y col., 1993).

Alternativamente a la identificación de variantes fenotípicas se ha identificado, en *X. campestris*, la existencia de un "switch" fenotípico que afecta o modifica su capacidad quimiotáctica, la producción de goma xantana y virulencia del microorganismo (Kamoun, S. y Kado I., 1990); este mecanismo pudiera explicar la aparición frecuente de variantes fenotípicas de la cepa silvestre, deficientes en la producción de EPS y quimiotácticas. Cadmus, M. y col. (1976) también reportan la aparición de variantes morfológicas, y de revertantes al fenotipo normal.

En ninguno de los reportes analizados con respecto a *X. campestris* se demuestra realmente que en esta bacteria exista un fenómeno de inestabilidad genética. Sin embargo, la estabilidad genética de la cepa NRRL B1459 en la producción de la goma xantana, queda demostrada en los experimentos realizados por el grupo de la Dra. Soberón, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En estos trabajos, con un transposón derivado del Tn5-B12S, transposón capaz de cuantificar deleciones y amplificaciones genómicas en bacterias gram negativas, se determina que *X. campestris* NRRL B1459 tiene un bajo nivel de rearrreglos genéticos comparado con el nivel de rearrreglos reportados para otras bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *R. phaseoli*. Se concluye que esta baja frecuencia no se debe a niveles disminuidos de recombinación genética homóloga ya que ésta se da a un nivel similar al de otras Gram-negativas, además de no darse una correlación clara entre los rearrreglos genéticos y la frecuencia de recombinación homóloga. Lo anterior indica que la inestabilidad en la producción de goma no es debido a inestabilidad genética ni tampoco a la existencia del switch quimiotáctico ya que la frecuencia con que se dan estos eventos es muy baja como para explicar la caída en la producción de la xantana durante la fermentación y más bien se pueda deber ésta a la asociación o probable contaminación de la cepa productora de la goma con otros microorganismos en los procesos de fermentación (Martínez, J. y cols., 1993).

Por las características antes descritas, actualmente esta cepa es usada extensivamente a nivel industrial, y por lo mismo ha sido objeto de diferentes estudios de análisis genético como



sería aquellos relacionados a la biosíntesis de la goma y a su capacidad secretora de enzimas entre otros (Hotte, B., 1990).

Esta bacteria, debido a sus características, ha sido utilizada como organismo huésped para la producción de una lipasa recombinante aislada de *Pseudomonas aeruginosa*, quedando demostrado su capacidad de expresar proteínas heterólogas codificados en plásmidos recombinantes (Leza, A. y cols., 1996). Aquí *Xanthomonas campestris* IBT 148 es capaz de producir y secretar una lipasa alcalina codificada en el plásmido recombinante pBP13 derivado del vector pMMB22 derivado a su vez del RSF1010 del grupo de incompatibilidad Q, que se encuentra bajo el control del promotor *tac* (Bagdasarian, M. y cols., 1983), inducible por IPTG o lactosa, replicable en bacterias Gram-negativas y con resistencia a carbenicilina. Dentro del mismo grupo de la Dra. Soberón existen antecedentes (García, J. y col., 1995) que nos indican que el plásmido pBP13 es muy estable en *X. campestris* ya que al medir la resistencia al antibiótico en la cepa huésped, se observa que entre el 95% y 98% de la población evaluada conservan dicha resistencia (Leza, A. y cols., 1996) o sea que la cepa tiene una frecuencia muy baja de segregación del plásmido, hecho que representa una gran ventaja para ser utilizada en fermentaciones a nivel industrial.

A pesar de la estabilidad de dicho plásmido en el microorganismo, se observó que la capacidad de expresar la lipasa disminuye rápidamente, debido probablemente a una alta frecuencia de rearrreglos en el plásmido por inestabilidad estructural, perdiéndose la expresión de la enzima al subcultivar dicho microorganismo por mas de tres veces o sea que no deben de haber más de 15 generaciones para que se pueda obtener una máxima producción de la lipasa y más de 35 generaciones para detectar actividad lipolítica (Leza, A. y col., 1996).

En la utilización de diferentes microorganismos manipulados genéticamente para la producción a través de un proceso de fermentación de diversos bioproductos, ha sido reportado por varios autores que uno de los problemas críticos es la inestabilidad de los plásmidos involucrados (Ryu, y Lee, 1988; Pierce y Gutteridge 1985) lo que nos lleva a la necesidad de desarrollar cepas huéspedes que proporcionen una mayor estabilidad genética.

En realidad, actualmente, poco se conoce acerca de las diferentes funciones celulares involucradas en la inestabilidad estructural de los plásmidos, por esta razón las funciones de recombinación en nuestro organismo huésped son de nuestro interés, ya que existe el reporte en el que se observa una mayor estabilidad en un plásmido pGp1 en una cepa de *Bacillus subtilis* con una mutación en *recE4*, proteína análoga a RecA (Peijnenburg, A. y col., 1989).

Por las características ya mencionadas, *X. campestris* representa una alternativa viable para la expresión y secreción de proteínas heterólogas. En este caso, una mutante recombinante negativa de este organismo resulta ventajosa, ya que permitirá utilizarla para manipulación genética, como huésped de diversos plásmidos recombinantes evitando la recombinación inter e intramolecular en éstos. Además de facilitamos un análisis genético y funcional de diferentes genes y permitir evaluar algunos eventos o procesos dependientes de *recA* como son la

presencia del switch que afecta la producción de goma y su grado de virulencia.

### **III.- OBJETIVO GENERAL**

**OBTENCIÓN DE MUTANTES *recA* DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B1459 Y EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA RecA EN EL INTERRUPTOR GENÉTICO QUE AFECTA LA QUIMIOTAXIS Y LA PRODUCCIÓN DE GOMA XANTANA.**

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) MUTAGÉNESIS SITIO ESPECIFICA DEL GEN *recA* de *X. campestris* pv. *campestris***
- 2) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES *recA* OBTENIDAS.**
- 3) CARACTERIZAR EL EFECTO DE LA MUTACIÓN *recA* EN EL PROCESO DE QUIMIOTAXIS**

#### **IV.- PRESENTACION ARTICULO**

**Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B1459 *recA* mutants and evaluation of the role of RecA protein in the genetic switch affecting chemotaxis, plant virulence and xanthan gum production.**

**Nota: Artículo en revisión en la revista *Molecular Plant Microbe Interactions*.**

**Title:** Isolation of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* NRRL B1459 *recA* mutants and evaluation of the role of RecA protein in plant virulence and in the genetic switch affecting chemotaxis, plant virulence and xanthan gum production.

**Running**

**title:** Characterization of *X. campestris* *recA* mutants

**Key words:** *recA*, *Xanthomonas campestris*, *recA*-independent genetic rearrangement.

**Authors:** Socorro Martínez, Jaime Martínez-Salazar\*, Alberto Camas, Rosalba Sánchez and Gloria Soberón-Chávez\*

**Address:** Departamento de Microbiología Molecular. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, México.

\* Corresponding author. Telephone: (52-73) 291634 Fax: (52-73) 172388. E-mail: gloria@ibt.unam.mx

\* Present address: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. AP 565-A, Cuernavaca Morelos México.

**ABSTRACT**

*Xanthomonas campestris* pv *campestris* NRRL B1459 *recA* mutants were isolated by recombination with an interrupted *Rhizobium etli* *recA* gene and selection of double recombinants. The mutants thus selected, were found to be impaired in homologous genetic recombination and in DNA repair as judged by their sensitivity to methyl-methane-sulfonate and to UV irradiation, these defects are complemented in trans by the *R. etli* *recA* gene. *X. campestris* NRRL B1459 plant virulence is considerably diminished by the *recA* mutation.

We evaluated the effect of *recA* mutation in a genetic rearrangement, previously reported for this bacterium, which affects chemotaxis, plant virulence and xanthan gum production, and found that the frequency of its appearance is not affected by the *recA* mutation.

## INTRODUCTION-

*Xanthomonas campestris* pv *campestris* is a gram-negative phytopathogenic bacteria which produces the exopolysaccharide xanthan gum; this biopolymer has several commercial applications due to its high viscosity and pseudoplastic behavior under a wide range of pHs, temperatures and salt concentrations (Galindo, 1994) .

*X.campestris* strain NRRL B1459, selected by the U.S. North Regional Research Center (Jeanes *et al.*, 1961), is commonly used for xanthan gum production. Under certain growth conditions this strain was reported to give rise at a high frequency to morphological variants which were defective in xanthan gum production (Cadmus *et al.*, 1976; Kidby *et al.*, 1977). *Xanthomonas campestris* was thus supposed to be genetically unstable (Kidby *et al.*, 1977), but in a previous paper we reported that this bacterium is remarkably stable and that the "morphological variants" are not true *Xanthomonas* (Martinez-Salazar *et al.*, 1993). *Xanthomonas oryzae*, a rice pathogen, has also been reported to have a high frequency of phenotypic variation, but the mechanism of this variation is not clear (Rabibhadana *et al.*, 1993).

Kamoun and Kado (1990) reported a genetic switch in *Xanthomonas campestris* which affected chemotaxis, xanthan gum production and plant virulence. We have previously shown that *X. campestris* NRRL



B1459 presented this so called "chemotactic switch" and that this bacterium was proficient in homologous genetic recombination (Martínez-Salazar *et al.*, 1993).

In 1965 Clark and Margulies isolated *Escherichia coli* mutants which were completely defective in homologous genetic recombination, these mutants defined the *recA* locus. RecA protein was later found to be a multifunctional polypeptide having a central role not only on recombination, but also on DNA repair, and acting as coprotease in the cleavage of a number of transcription repressor molecules (Cox and Lehman, 1987; Smith 1988). In the last years numerous studies have identified and characterized *recA* like genes in a wide variety of prokaryotic and eukaryotic organisms (Miller and Kokjohn, 1990; Karlin *et al.*, 1995). The prokaryotic *recA* like genes have a high degree of sequence homology and the phylogenetic trees derived from the sequence of 25 of these genes have broad concordance with those derived from 16S ribosomal RNA sequence (Lloyd and Sharp, 1993; Karlin *et al.*, 1995).

Programmed genetic rearrangements which affect the expression of specific genes, and are mediated by genetic recombination, have been found on a wide variety of microorganisms and are thought to be of importance for the adaptation of these organisms to different

environmental changes (Dybvig, 1993). The role of the RecA protein has been studied only in some of these genetic rearrangements.

The *Vibrio cholera* operon coding for cholera toxin undergoes amplification and deletion events at a high frequency, both deletion and amplification events are completely eliminated in *recA* mutants (Goldberg and Mekalanos, 1986). Pilus antigenic variation and phase transition between pillated and nonpillated strains in *Neisseria gonorrhoea* are also eliminated in *recA* mutants (Koohey *et al.*, 1987). *Hemophilus influenza* type b capsule production is genetically unstable, this instability is due to *recA*-dependent recombination between two copies of a 18-kilobases tandem repeat (Hoiseh *et al.*, 1986). In contrast to these cases, in Enterobacteriaceae different phenotypic switches have been described which are *recA*-independent, these include site specific inversions which affect Mu phage host range and phase variation in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, these inversions are catalyzed by a family of related invertases (Plasterk and van de Putte, 1984).

The *recA* gene from *Xanthomonas oryzae* has been cloned, but its role in the phenotypic variation of this bacterium has not been evaluated (Rabibhadana *et al.*, 1993).

In the present paper we isolate and characterize *X. campestris* pv

*campestris* NRRL B1459 *recA* mutants and determined that the "chemotactic switch" is a *recA*-independent genetic rearrangement.

## RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and characterization of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* *recA* mutants. The RecA protein is one of the most highly conserved proteins among eubacteria (Karlin *et al.*, 1995). Among the sequence of 25 RecA proteins, deduced from the sequence of the corresponding *recA* genes, from different bacterial species, the higher divergence found between two species (a gram-positive bacteria and a cyanobacteria) was 38% identity (Lloyd and Sharp, 1993). The sequence of the *recA* genes from bacteria belonging to the protobacteria is highly conserved (Lloyd and Sharp, 1993; Karlin *et al.*, 1995). *Rhizobium phaseoli* RecA protein contains 65% identical amino acids to the corresponding *E. coli* protein (Michiels, *et al.*, 1991).

Based on the high degree of sequence conservation between *recA* genes from protobacteria, we predicted that the *recA* genes from *X. campestris* pv *campestris* and from *Rhizobium etli* (previously called *Rhizobium phaseoli*) could recombine, rendering a functional hybrid gene, and that by recombination with the interrupted *R. etli* *recA* gene an *X. campestris* *recA* mutant could be selected.

In order to obtain an *X. campestris* pv *campestris* *recA* mutant we selected recombinants with an interrupted *R. etli* *recA* gene contained in plasmid pMS26 (Table 1, Martínez-Salazar *et al.*, 1991) and double

recombinants were later selected. The *recA* gene in plasmid pMS26 is interrupted by a gene coding for spectinomycin resistance, and the vector (plasmid pSUP202) tetracycline resistant gene is interrupted by a 5.7-kb fragment containing *sacRB* genes which confers sucrose sensitivity to gram-negative bacteria (Hynes *et al.*, 1989) and another gene conferring kanamycin resistance.

Plasmid pMS26 was introduced by conjugation from *E. coli* S17-1 to *X. campestris* IBT148 (Table 1), rifampicin, spectinomycin and kanamycin resistant transconjugants were selected with a frequency of  $1 \times 10^{-6}$ , these bacteria are expected to be single recombinants between plasmid pMS26 and the *X. campestris* chromosomal *recA* gene, containing a functional hybrid *recA* gene and an interrupted copy of this gene. We determined that these transconjugants were due to recombination between *recA* genes, determining that the plasmid vector pSUP202 was transferred to strain IBT148 with a frequency lower than  $5 \times 10^{-10}$ , measured by Ap<sup>r</sup> and Tc<sup>r</sup> transfer.

Double recombinants, and presumably *recA* mutants, were selected as sucrose resistant derivatives with a frequency of 4% and were later shown to be kanamycin sensitive. The second recombination event is expected to be dependent on the functionality of the hybrid, non-interrupted *recA* gene, and to delete all sequences homologous to the

vector plasmid pSUP202. We present here the characterization of two of these putative double recombinants, strains IBT R2 and IBT R3 (Table 1).

Both strains IBT R2 and IBT R3 are extremely sensitive to MMS. At a concentration of 0.02%, both have a reduction in viability of three orders of magnitude (Fig 1). We also determined that both putative *recA* mutants have an increased sensitivity to irradiation with UV light (Fig 2).

In order to measure the frequency of homologous recombination we used plasmid pBX404-7 (Table 1), which contains two non-overlapping truncated genes derived from a gene conferring kanamycin-resistance. Homologous recombination between the two truncated genes can generate a functional copy. The frequency of kanamycin resistant derivatives from a bacterium carrying plasmid pBX404-7 reflects its efficiency to recombine homologous DNA sequences. Both strains have a reduction in homologous recombination frequency of more than three orders of magnitude (Table 2).

The above mentioned results strongly suggest that strains IBT R2 and IBT R3 contain a non-functional *recA* gene which was inactivated by recombination with the interrupted *R. etli recA* gene present in plasmid pMS26.

In order to determine that the *recA* mutation was indeed due to the insertion of the gene coding for spectinomycin resistance, we measure the genetic linkage between the *Spc<sup>r</sup>* phenotype of strains IBT R2 and IBT R3 and their sensitivity to MMS and UV irradiation. Plasmid pJB3JI (Table 1) was introduced to both *recA* mutants in order to mobilize their *Spc<sup>r</sup>* phenotype to strain IBT150 (Table 1) and the MMS sensitivity of the corresponding transconjugants was determined. We found that 25 out of 27 transconjugants tested from the cross between IBT R2 and IBT150 were unable to grow in the presence of 0.03% MMS, and that 9 out of 11 transconjugants tested from the cross between IBT R3 and IBT150 were also sensitive to this mutagen. These data strongly suggest that the *X. campestris recA* mutation is caused by a double recombination event with the interrupted *recA* gene present in plasmid pMS26. The UV sensitivity of one transconjugant of each cross was determined (strains IBT R20 and IBT R30, Table 1, Fig 2) and, as expected, both were found to be sensitive.

Both *recA* mutants were analyzed at the molecular level by Southern blot hybridization using the following probes (Fig 3): plasmid pSUP202 (Table 1) which was the vector in which *R. etli recA* gene was cloned; plasmid pMS26, which carries the interrupted *R. etli recA* gene; and plasmid pCR3, which carries the *E. coli recA* gene (Table 1, Horii *et al.*

1980). This analysis shows that strain IBT148 and all the *recA* mutants tested have a 4 kb DNA fragment homologous to *R. etli* and *E. coli recA* genes (Fig 3 A and B), this result suggests that the hybridizing fragment contains only a fragment of the *X. campestris recA* gene, and that the part of the *recA* gene where the spectinomycin cassette was inserted, as the product of recombination, could not be detected by hybridization with *R. etli* and *E. coli recA* genes. The spectinomycin resistant cassette seems to hybridize with a 1.9 kb DNA fragment (Fig 3 A), this is the approximate size of spectinomycin cassette itself, so the *recA* gene fragment where it is inserted is expected to be so small that it is not detected using non-homologous *recA* genes as probes for hybridization. Southern blotting using DNA restricted with *EcoR1* endonuclease and the plasmids pCR3 and pMS26 as probes was done under less stringent conditions. These plasmids revealed the presence of a 11.5 kb band in strains IBT R2 and IBT R3 which contains both *recA* homologous sequences and the spectinomycin cassette (data not shown). The most plausible explanation for the  $\text{RecA}^-$  phenotype of strains IBT R2, IBT R20 and IBT R30 is that the *recA* gene is interrupted by the spectinomycin cassette as a product of a double recombination event, but we cannot rule out from the Southern blot analysis, that another genetic rearrangement linked to the



spectinomycin cassette is responsible for the inactivation of this gene.

The Southern blot analysis shows that strain IBT R3 contains a fragment of plasmid pSUP202 (Fig. 3 C). Strain IBT R3 seem to be a product of a deletion which removed some of the plasmid sequence, since it is resistant to sucrose and sensitive to kanamycin. The RecA<sup>-</sup> phenotype of this strain might be due to a small deletion which inactivates the RecA protein and which is not apparent in the Southern blot analysis, or to the interaction of the truncated RecA protein, produced by the interrupted gene, with the functional hybrid RecA protein. The inactivation of wild type RecA proteins by truncated forms of the same protein has been shown for *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* (Miller and Kokjohn, 1988; Yarranton and Sedwick, 1982).

Strain IBT R30 which is the product of the genetic transfer of the spectinomycin resistance from strain IBT R3 to strain IBT150, does not present sequences homologous to plasmid pSUP202 (Fig 3 C), the most plausible explanation is that the *recA* gene of strain IBT150 was substituted by the interrupted *recA* gene from strain IBT R3 and that the adjacent plasmid sequences were not co-transferred. The co-inheritance of the spectinomycin resistance with the RecA<sup>-</sup> phenotype in strain IBT R30, without the transfer of other changes in sequence present in strain IBT R3, strongly suggest that the *recA* mutation is

caused by the substitution of the *X. campestris recA* gene by the interrupted *recA* gene present in plasmid pMS26 and not by some other genetic rearrangement.

To further confirm that the phenotype of IBT R2 mutant was due to the inactivation of the RecA protein, its complementation by the *R. etli recA* gene was analyzed. This was achieved by selecting a cointegrate between plasmid pMS16, which carries a functional *R. etli recA* gene, but is unable to replicate in *Xanthomonas* (Table 1), and the self transmissible plasmid pJB3JI (Table 1). As shown in Fig. 1 mutant IBT R2 is fully complemented by the cointegrated plasmids pMS16 and pJB3JI with respect to its resistance to MMS. IBT R2 UV sensitivity was also complemented by the *R. etli recA* gene (data not shown). These results clearly show that the IBT R2 mutant phenotype is due to a deficiency in RecA protein function.

**Effect of the *recA* mutation in the "chemotactic switch."** In a previous paper (Martínez-Salazar *et al.*, 1993), we studied the genetic stability of strain NRRL B1459 and reported that:

1.- This strain presented a genetic rearrangement which causes the change from a non-chemotactic, xanthan gum-producer bacteria to a chemotactic and non-mucoid derivative, and that this genetic rearrangement reverted with a frequency of  $2 \times 10^{-4}$ .

2.- Strain NRRL B1459 is proficient in homologous genetic recombination and in the presence of 0.02% MMS the frequency of recombination is increased by two orders of magnitude, this increment is due to the SOS response.

3.- The frequency of reversion of the "chemotactic switch" is not affected by exposure to 0.02% MMS .

The SOS response-independence of the "chemotactic switch" suggests that this genetic rearrangement is *recA*-independent. In order to confirm that this is the case, we determined in the present paper whether *recA* mutants presented the "chemotactic switch".

Both strains IBT R2 and IBT R3 gave rise to variants which were chemotactic and non-mucoid. The frequency of reversion of one chemotactic derivative from each *recA* mutant and from the wild type strain are of the same order of magnitude (Table 3). These data clearly show that the "chemotactic switch" is a *recA*-independent genetic rearrangement.

The nature of the genetic change involved in the "chemotactic switch" remains to be determined, both the reversibility and the *recA*-independence of this rearrangement are compatible with a "change of phase" type of change similar to the one presented in some Enterobacteriaceae (Plasterk and van de Putte, 1984), but this model

remains to be experimentally validated.

**Effect of the *recA* mutation in plant virulence** In order to determine whether the plant virulence of *X. campestris* pv *campestris* was influenced by the *recA* mutation, cabbage leaves were inoculated by the different mutants isolated in this work. We used as a control the chemotactic derivatives isolated by us which have been reported to be less virulent. The results presented in Table 4 and Fig. 4 show that the *recA* mutation considerably diminished the plant virulence of this bacterium.

This RecA effect in *X. campestris* plant virulence might be indirect, reflecting growth rate or other general metabolic characteristic of the *recA* mutants, and not the direct involvement of the RecA protein in plant pathogenesis. This explanation might also apply to strain IBT150 (IBT148 Ery<sup>r</sup> spontaneous mutant) which we found to be slightly less virulent than its parental strain IBT148 (Table 4, Fig 4).

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and plasmids**The bacterial strains and plasmids used in this work are shown in Table 1.

**Microbiological procedures.** *A.K. campestris* pv *campestris* strains were grown on NYGB medium (Daniels *et al.*, 1984), and *E. coli* strains were cultured on LB medium (Miller, 1972). Xanthan gum production was determined using Burk's medium (Newton *et al.*, 1953); liquid cultures were supplemented with 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ . Bacterial chemotaxis was determined as reported by Kamoun and Kado, 1991, using medium M925 with 0.05% sucrose and 0.3% agar. Sucrose resistant derivatives were isolated on NYGB medium supplemented with 5% sucrose.

The antibiotic concentrations used (in  $\mu\text{g/ml}$ ) were as follows: ampicillin 200, erythromycin 100, kanamycin 60, rifampicin 50, spectinomycin 100. The sensitivity to irradiation with UV light was done as described by Miller (1972).

Matings were done by plating a 1:1 mixture of the donor and recipient strains on NYGB medium, and incubating overnight at 30° C; the mixture was serially diluted and plated onto selective medium.

Xanthan gum-producing revertants from chemotactic variants were selected by visual screening of isolated colonies grown in Burk's

medium (Newton *et al.*, 1953), as described previously (Martínez-Salazar *et al.*, 1993).

**Determination of plant virulence.** The virulence of different *K. campestris* strains was evaluated on *Brassica oleracea* (cabbage) leaves as described by Kamoun *et al.* (1992). Three leaves of plants at the six-leaf stage (five week old plants) were inoculated with a saturated suspension of bacteria (approximately  $3 \times 10^9$  bacteria/ml) in sterile saline solution by injection of 1  $\mu$ l of the suspension in the middle of the leaf (three injections/leaf). The control plant inoculated with sterile saline solution did not showed any lesion, typical lesions were seen after a week on the plants inoculated with the bacterial suspension, and the results presented here were measured after two weeks of inoculation (Table 4 and Fig. 4).

**Nucleic acid procedures.** DNA manipulation, Southern blotting and nick translation procedures were carried out as described by Sambrook *et al.*, (1989). High stringency conditions were used for the hybridization procedure shown in Figure 3 and the Southern blot done with *EcoR1* restricted DNA was done under relaxed conditions.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

**We thank Rebeca Nájera for her technical assistance. We also acknowledge Guadalupe Espín for critical reading of the manuscript.**

**LITERATURE CITED**

- Brewin, N. J., Beringer J. E. and Johnston A. W. B. 1980. Plasmid-mediated transfer of host range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 120: 413-420.
- Cadmus, M. C., Rogowin, S. P., Burton, K. A., Pittsley, J. E., Knutson, C. A., and Jeanes, A. 1976. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 and characterization of the polysaccharide from a variant. Can J Microbiol 22: 942-948.
- Clark, A. J., and Margulies, A. D. 1965. Isolation and characterization of recombination deficient mutants of *Escherichia coli* K12. Proc Natl Acad Sci USA 53: 451-459
- Cox, M., and Lehman, I. R. 1987 Enzymes of general recombination. Annu Rev Biochem 56: 229-254.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Tumer, P. C., Clearly, W. G., and Sawczyk, M. K. 1984. Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* showing altered pathogenicity. J Gen Microbiol 130: 2447-2450.
- Dybvig, K. 1993. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. Mol Microbiol 10: 465-471.
- Galindo, E. 1994. Aspects of the process for xanthan production. Trans. I. Chem. E. (c) 72: 227-237.
- Goldberg, I., and Mekalanos, J. J. 1986. Effect of *recA* mutation on



- cholera toxin gene amplification and deletion events. *J Bacteriol* 165: 723-731.
- Holseth, S. K., Moxon, E. R., and Silver, R. P. 1986. Genes involved in *Hemophilus influenzae* type b capsule expression are part of an 18-kilobase tandem duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1106-1110.
- Horii, T., Ogawa, T., and Ogawa H. 1980. Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 313-317
- Hynes, F. M., Quandt, J., O'Connell, P. M., and Pühler, A. 1989. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sac B* gene. *Gene* 78: 111-120.
- Jeanes, A., Pittsley, J. E., and Senti, F. R. 1961. Polysaccharide B-1459 a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *J Appl Polym Sci* 5: 519-526.
- Kamoun, S., and Kado, C. I. 1990. Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microbiol* 56: 3855-3860.
- Kamoun, S, Kandar, H. V., Tola, E, and Kado C. I. 1992. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. *Mol. Plant-Microb Interact.* 5: 22-33

- Karlin, S., Weinstock, G. M., and Brendel, V. 1995. Bacterial classification derived from RecA protein sequence comparison. *J Bacteriol* 177: 6881-6893.
- Kidby, D., Sanford, P., Herman, A., and Cadmus, M. 1977. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Appl Environ Microbiol* 33: 840-845.
- Koomey, M., Gotschlich, E. M., Robbins, K. Bergström, S. and Swanson J. 1987. Effects of *recA* mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoea*. *Genetics* 117: 391-398.
- Lloyd, A. T., and Sharp, P. M. 1993. Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J Mol Evol* 37: 399-407.
- Martínez-Salazar, J. M., Palacios A. N., Sánchez R., Caro A. D., and Soberón-Chávez G. 1993. Genetic stability and xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* NRRL B1459. *Mol Microbiol* 8: 1053-1061.
- Martínez-Salazar, J. M., Romero, D., Girard, M. L., and Dávila, G. 1991. Molecular cloning and characterization of the *rec A* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *rec A* mutants. *J Bacteriol* 173: 3055-3040.
- Michiels, J., Broek, A. V. and Vanderleyden, J. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Rhizobium phaseoli* *recA* gene. *Mol Gen*

- Genet 228: 486-490.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor New York.
- Miller, R. V., and Kokjohn, T. A. 1988. Expression of the *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO is inducible by DNA-damaging agents. *J Bacteriol.* 170: 2385-2387.
- Miller, R. V., and Kokjohn, T. A. 1990. General microbiology of *recA*, environmental and evolutionary significance. *Annu Rev Microbiol* 44: 365-394.
- Newton, J. W., Wilson, P. W., and Burris, R. H. 1953. Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J Biol Chem* 204: 445-451.
- Plasterk, R. H. A., and van de Putte, P. 1984. Genetic switches by DNA inversions in prokaryotes. *Biochem Biophys Acta* 782: 111-119.
- Rabibhadana, S., Chanmongpol, S., Trempy, J. E., Ambulos, N. P., Jr. and Mongkolsul S. 1993. Isolation and expression in *Escherichia coli* of a *Xanthomonas oryzae recA*-like gene. *Gene* 132: 113-118.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith, G. R. 1988. Homologous recombination in prokaryotes. *Microbiol*

Rev 52: 1-28.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology*. 1: 784-791.

Xu, B., Patzy, C., and Lurquin, P. F. 1988. A plasmid based method to quantitate homologous recombination frequencies in gram-negative bacteria. *BioTech* 6: 752-760.

Yarranton, G. T. and Sedwick, S. G. 1982. Cloned truncated *recA* genes in *E. coli* II. Effects of truncated gene products on in vivo *recA*<sup>+</sup> protein activity. *Mol. Gen. Genet.* 185: 99-104.

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this work

STRAIN OR PLASMID	RELEVANT CHARACTERISTICS	REFERENCE
<i>Xanthomonas campestris</i> :		
NRRL B1459	Strain selected for xanthan production	Jeanes <i>et al.</i> , 1976
IBT148	Spontaneous Rif <sup>r</sup> mutant derived from NRRL B1459.	Martínez-S. <i>et al.</i> , 1993.
IBT150	Spontaneous Ery <sup>r</sup> mutant derived from IBT148.	This work.
IBT R2	<i>recA</i> mutant derived from IBT148.	This work.
IBT R3	<i>recA</i> mutant derived from IBT148.	This work.
IBT R20	<i>recA</i> mutant derived from IBT150 by transfer of IBT R2 mutation.	This work.
IBT R30	<i>recA</i> mutant derived from IBT150 by transfer of IBT R3 mutation.	This work.
IBT148che	Chemotactic derivative from IBT148	This work
IBT R2che	Chemotactic derivative from IBT R2	This work
IBT R3che	Chemotactic derivative from IBT R3	This work
<i>Escherichia coli</i> :		
S17-1	Able to mobilize plasmids by mean of an RP4 inserted in the chromosome.	Simon <i>et al.</i> , 1983.

**Plasmids:**

<b>pSUP202</b>	<b>. ColE1 origin Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>, mob<sup>+</sup></b>	<b>Simon <i>et al.</i>, 1983</b>
<b>pMS16</b>	<b>Plasmid pSUP202 with <i>Rhizobium etli</i> <i>recA</i> . Tc<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup></b>	<b>Martínez-S. <i>et al.</i>, 1991</b>
<b>pMS26</b>	<b>Plasmid pMS16 with the <i>R. etli</i> <i>recA</i> gene interrupted with <i>Spc<sup>r</sup></i> gene, and <i>sacRB</i> Km<sup>r</sup> inserted in plasmid Tc<sup>r</sup></b>	<b>Martínez-S. <i>et al.</i>, 1991</b>
<b>pBX404-7</b>	<b>Constructed to measure genetic recombination, Ap<sup>r</sup></b>	<b>Xu <i>et al.</i>, 1988.</b>
<b>pJB3JI</b>	<b>CMA, Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></b>	<b>Brewin <i>et al.</i>, 1980.</b>
<b>pCR3</b>	<b>Carries <i>E. coli</i> <i>recA</i> gene</b>	<b>Horii <i>et al.</i>, 1980</b>

---

Abbreviations used: Resistance to ampicillin (Ap<sup>r</sup>), chloramphenicol (Cm<sup>r</sup>) erythromycin (Ery<sup>r</sup>), kanamycin (Km<sup>r</sup>), rifampicin (Rif<sup>r</sup>), spectinomycin (Spc<sup>r</sup>) and tetracycline (Tc<sup>r</sup>). Ability to be mobilized by conjugation (mob<sup>+</sup>). Chromosome mobilization ability (CMA).

**TABLE 2. Frequency of genetic homologous recombination**

<b>STRAIN</b>	<b>FREQUENCY OF <math>K_{mr}</math> AMONG <math>T_0</math> BACTERIA</b>
<b>IBT148</b>	<b><math>2 \times 10^{-3}</math></b>
<b>IBT R2</b>	<b><math>9 \times 10^{-7}</math></b>
<b>IBT R3</b>	<b><math>3 \times 10^{-6}</math></b>

TABLE 3. Reversion frequency of chemotactic derivatives

STRAIN	FREQUENCY OF REVERSION TO MUCOIDY
IBT148 <i>che</i>	$3.1 \times 10^{-4}$
IBT R2 <i>che</i>	$1.5 \times 10^{-4}$
IBT R3 <i>che</i>	$3.3 \times 10^{-4}$



TABLE 4. Plant virulence of different *X. campestris* derivatives

STRAIN	leaf lesions
Control	-
IBT148	++++
IBT148 <i>che</i>	+
IBT R2	++
IBT R2 <i>che</i>	+
IBT R3	++
IBT R3 <i>che</i>	+
IBT150	+++
IBT R20	+
IBT R30	+

### **Figure Legends**

**Figure 1.** Bacterial viability in the presence of MMS. Survival curves correspond to the following strains: IBT148 ( ), IBT R2 ( ), IBT R2/pMS16::pJB3JI ( ) and IBT R3 ( ).

**Figure 2.** Bacterial sensitivity to UV light irradiation. Part of the petri dish was irradiated for the time indicated, and the other part was protected with foil paper, the line shows the border between the two parts.

**Figure 3.** Southern blot hybridization done under stringent conditions using as probes plasmid pMS26 (A), plasmid pCR3 (B) and plasmid pSUP202 (C). Lanes correspond to total DNA restricted with *Pst* I of the following strains: 1, IBT148; 2, IBT R2; 3, IBT R3 for panels (A) and (B). 1, IBT148; 2, IBT R2; 3, IBT R20; 4, IBT R3; 5, IBT R30 for panel (C).

**Figure 4.** Photograph of cabbage leaves with characteristic lesions caused by *X. campestris* infection. The control plant was inoculated with sterile saline (A) and the virulence of the following strains was determined by inoculation of independent plants: IBT148 (B), IBT148*che* (C), IBT R2*che* (D), IBT R2 (E), IBT150 (F), IBT R20 (G), IBT R30 (H), IBT I), IBT R3*che* (J).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

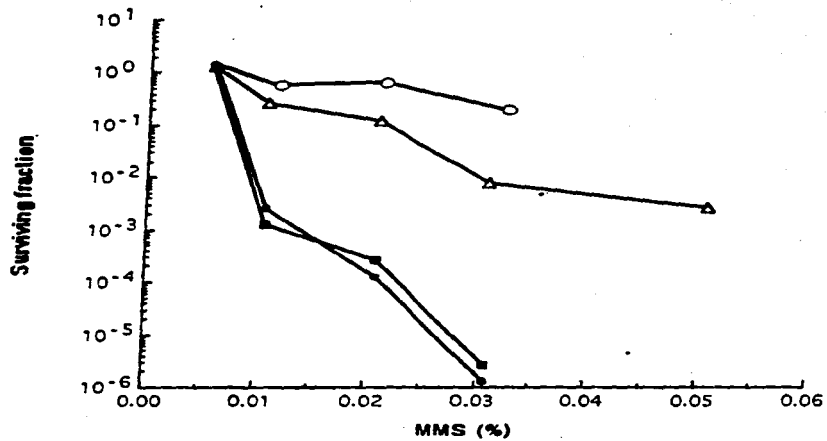


FIGURA No. 1

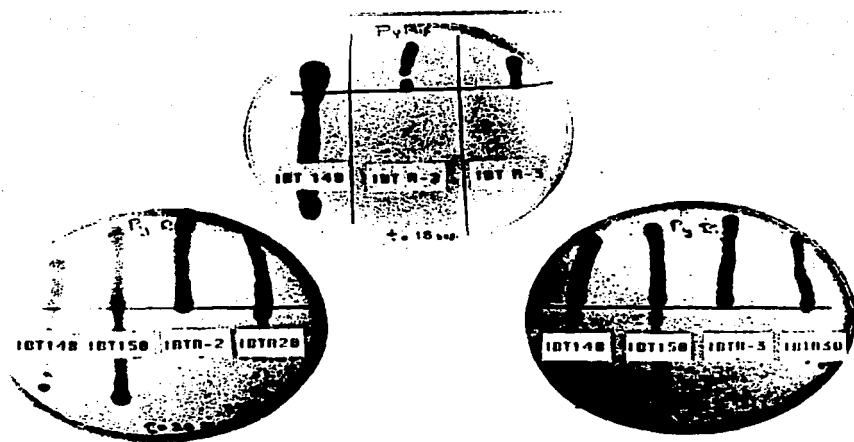


FIGURA No. 2

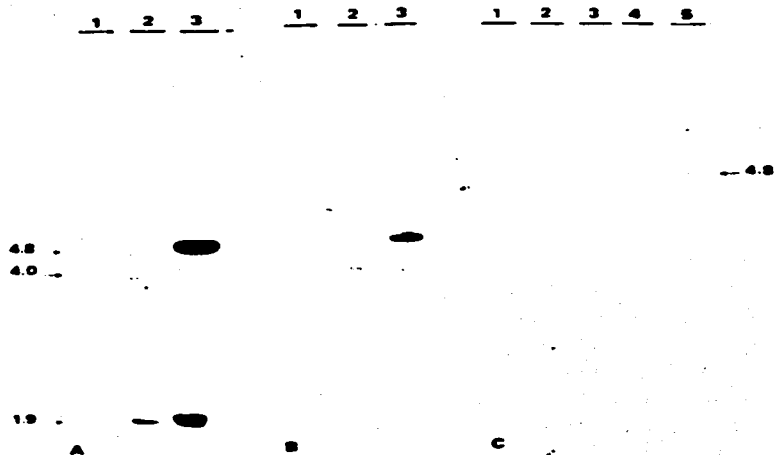


FIGURA No. 3

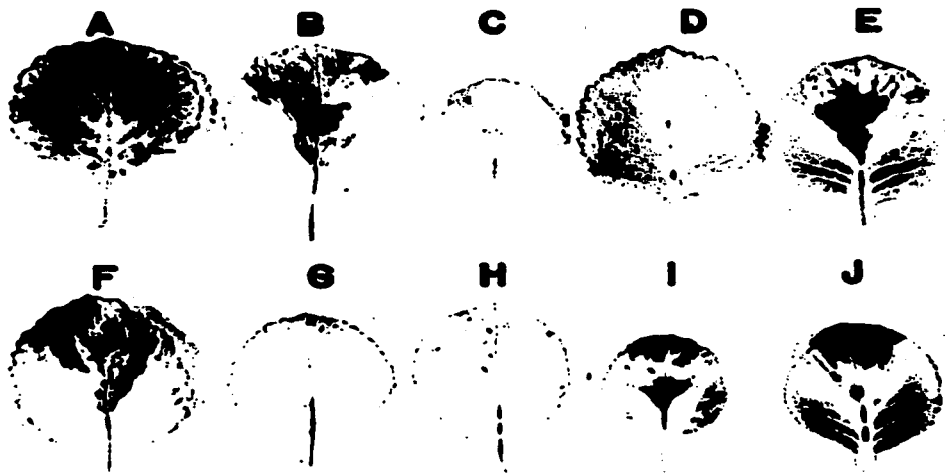


FIGURA No. 4

## V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

El trabajo experimental desarrollado se explica en el artículo anexo, y de éste se deriva lo siguiente:

1.- En la mutagénesis sitio específica de la cepa IBT 148 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* con el gen interrumpido *recA* de *Rhizobium etli* donado en el plásmido pMS26, se obtuvieron dos cepas presumiblemente mutantes *recA*<sup>\*</sup> por un evento de doble recombinación.

Las cepas obtenidas se denominaron IBT R2 e IBT R3 (Ver tabla 1 del artículo).

2.- En la caracterización de ambas cepas se obtuvieron los siguientes datos:

a) Ambas son sensibles a metil metano sulfonato, ya que su viabilidad se reduce en tres órdenes de magnitud con respecto a IBT 148, al crecer en presencia del mutágeno a una concentración del 0.02% (Ver Fig. 1 del artículo).

b) Al ser expuestas a diferentes períodos de tiempo de radiaciones de luz ultravioleta se observa que IBT R2 e IBT R3 son más sensibles que la cepa silvestre, ya que estas después de 10 segundos o más de exposición, son incapaces de crecer en el medio de cultivo (Ver Fig. 2 del artículo).

c) Al medir la frecuencia de recombinación homóloga en ambas cepas y la cepa silvestre, usando para esto el plásmido pBX404-7, se comprueba que las cepas *recA* tienen reducido en tres órdenes de magnitud dicha frecuencia (Ver Tabla 2 del artículo).

3.- Estas tres características evaluadas en IBT R2 e IBT R3, corresponden a cepas con el gen *recA* no funcional, por lo que para confirmar este carácter no funcional con la inserción del gen que codifica la resistencia a espectinomicina/estreptomicina, se evaluó la asociación genética entre ambos fenotipos. Tanto IBT R2 como en IBT R3 se transformaron con el plásmido pJB3JI, con el objeto de movilizar el fenotipo de *Spc* resistente a una tercera cepa IBT 150, las transconjugantes de ambas se denominaron IBT R20 e IBT R30. Estas cepas transconjugantes fueron incapaces de crecer en presencia de MMS (0.03%), como después de ser expuestas a mas de 10 segundos de irradiaciones de luz ultravioleta. De lo anterior podemos concluir que la mutación en *recA* es originada por un evento de doble recombinación con el gen interrumpido de *recA* contenido en el plásmido pMS26.

4.- En el análisis molecular por hibridación tipo Southern, se observa un fragmento homólogo de aproximadamente 4kb tanto con el gen *recA* de *R. etli* como con el de *E.coli* con las cepas IBT 148, IBT R2 e IBT R3 (Fig. 3A y 3B del artículo). Al hibridizar con pMS26

encontramos el cassette de resistencia a espectinomina insertado en un fragmento de 1.9 kb en ambas cepas, tamaño que corresponde solo al del cassette, por lo que el fragmento del gen *recA* en el que se encuentra insertado al ser menor y ser detectado con los genes *recA* de *R. etli* y *E. coli* no se aprecia.

En un análisis posterior en el que se usó la endonucleasa *EcoR1* y como sondas a los plásmidos pMS26 y pCR3 en condiciones de baja severidad, se observa una banda de 11.5 kb en las cepas IBT R2 e IBT R3, que corresponde a la secuencia homóloga del gen de *recA* y al cassette de espectinomina.

De acuerdo al análisis anterior se concluye que el fenotipo *RecA*<sup>-</sup> en las cepas IBT R2, IBT R20 e IBT R30 se debe a que el gen *recA* en dichas cepas se encuentra interrumpido por el cassette de espectinomina/estreptomina como consecuencia de un evento de doble recombinación homóloga con el plásmido pMS26.

Al observar las figuras 3A y 3B del artículo (caril No. 3), la cepa IBT R3 contiene un fragmento de 4.8 kb del pSUP202, por lo que ésta no es una doble recombinante, sin embargo IBT R30 obtenida por transferencia de la resistencia a espectinomina de IBT R3 a IBT 150 y que tiene un fenotipo *recA*<sup>-</sup>, ya no lo presenta. Esto sugiere que el gen *recA* fue sustituido por el interrumpido y las secuencias que se encontraban junto a éste y pertenecientes al plásmido ya no fueron transferidas (Fig. 3C caril 4 y 5 del artículo). El fenotipo *recA*<sup>-</sup> en IBT R3 probablemente se deba a una pequeña delección que inactiva la proteína *RecA*, misma que no pudimos apreciar en el análisis tipo Southern.

**LA CONCLUSIÓN FINAL ES QUE LA MUTACIÓN en *recA* EN *Xanthomonas Campestris* IBT 148 ES DEBIDO A LA SUSTITUCIÓN DEL GEN FUNCIONAL POR EL GEN INTERRUMPIDO Y NO POR OTRO REARREGLO GÉNICO.**

5.- Al evaluar el efecto de la mutación en el switch quimiotáctico o sea el cambio de bacterias mucoides y no quimiotácticas a no mucoides y quimiotácticas, encontramos que la frecuencia de reversión o sea el cambio de bacterias no mucoides quimiotácticas al fenotipo inicial de las derivadas de las mutantes *recA* y de la cepa IBT 148 se da en el mismo orden de magnitud por lo que se concluye que se trata de un rearreglo *recA*-independiente.

6.- Con el objeto de evaluar el efecto de la mutación sobre la virulencia, se inocularon hojas de col con las mutantes *recA*, encontrando que dicha mutación disminuye considerablemente la virulencia en dicha bacteria. (Trabajo realizado en el Laboratorio por el M. en C. Alberto Camas)

Del trabajo anterior concluimos que los objetivos de éste fueron cubiertos, y se cuenta ahora con una cepa con mejores características para ser utilizada como vector de expresión y



secreción de proteínas heterólogas, como sería la lipasa alcalina codificada por *Pseudomonas aeruginosa*.

## VI.- PERSPECTIVAS

Del presente trabajo puedo mencionar cuatro líneas a investigar que podrían ser importantes:

- En el aislamiento, estudio, caracterización y mejoramiento de microorganismos con vista a la producción de algún metabolito o compuesto de interés industrial, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* representa una alternativa buena para la expresión y secreción de proteínas heterólogas, ya que como se ha descrito tiene la habilidad de aceptar y mantener plásmidos heterólogos. En nuestro caso, la mutante recombinante negativa aquí construida, limitaría la pérdida o los arreglos del DNA pasajero por eventos de recombinación homóloga, ayudando a mantener de forma estable el o los plásmidos recombinantes empleados en este microorganismo.

Una acción futura a realizar sería: evaluar a estas cepas *recA*<sup>-</sup> de *Xanthomonas campestris* como sobreproductora de proteínas heterólogas y compararla tanto con la cepa silvestre como con *E. coli*, microorganismo muy utilizado para este fin.

- Al ser RecA una proteína multifuncional que participa en diferentes procesos celulares y que está distribuida ampliamente en procariontes, sería importante evaluar otros eventos o procesos de interés que presenta esta bacteria, para clasificarlos como *recA*-dependientes o independientes. Por otro lado, podría ser útil para realizar un análisis tanto genético como funcional de otros genes.

- Con respecto a los resultados en la obtención y selección de las mutantes, podemos decir que la estrategia experimental nos ofrece una alternativa adecuada de mutagénesis locus específica por un proceso de recombinación homóloga, utilizando para esto un gen de algún organismo relacionado y con un nivel adecuado de

homología y previamente mutado.

- Las cepas recombinantes negativas presentan disminuida de manera considerable la viabilidad, por lo que sería factible su liberación al medio ambiente como organismo "GEMS", además de que nuestra mutante es menos patógena para plantas que la cepa silvestre.

## VI.- BIBLIOGRAFIA

- AKABOSHI, E., and HOWARD-FLANDERS, P. (1990).** RecA-ssDNA interaction: induced strand cleavage by hydroxyl radical at a defined distance from the 5' end. *Mol. Gen. Genet.* **220:** 456-460
- ALONSO, J.C., LÜDER, G. and TRAUTNER, T.A.(1992).** Intramolecular homologous recombination in *Bacillus subtilis* 168. *Mol. Gen. Genet.* **236:** 60-64
- BAGDASARIAN, M.M., AMMAN, E., LURZ, R. and RUCKERT, B. (1983).** Activity of the hybrid *trp-lac(tac)* promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida* construction of broad-host-range, controlled expression vector. *Gene* **26:** 273-282
- BALL, T.K., WASMUTH, C.R. BRAUNAGEL, S.C. and BENEDIK, M.J. (1990).** Expression of *Serratia marcescens* extracellular protein requires *recA*. *J. Bacteriol.* **172(1):** 342-349
- BI, X., LYUY and LIU, L. (1995).** Specific stimulation of *recA*-independent plasmid recombination by a DNA sequence at a distance. *J. Mol. Biol.* **247:** 890-902
- CADMUS, M.C., ROGOVIN, S.P., BURTON, K.A. PITTSLEY, J.E. , KNOTSON, C.A. and JEANES ALLENE (1976).** Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRLB 1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can. J. Microbiol.* **22:** 942-948
- CAMERINI-OTERO, R.D. and HSIEH, P. (1995).** Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Ann. Rev. Genet.* **29:** 509-552
- COPLIN, D.L. and COOK, D. (1990).** Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **3(5):** 271-279
- CRAIG, N.L. (1988).** The mechanism of conservative site-specific recombination. *Ann. Rev. Genet.* **22:** 77-105
- CRECY-LAGARD de V., GLASER, P., LEJEUNE, P., SISMEIRO, O., BARBER, C.E. and DANIELS, M.J. (1990).** A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* **172(10):** 5877-5883
- DANIELS, M.J., BARBER, C.E., TURNER, PC, SAWCZYC, M.K., BYRDE, R.J.W. and FIELDING, A.H. (1984).** Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFF1. *EMBO J.* **3:** 3323-3328
- DARNELL, J., LODISH, H. and BALTIMORE, D. (1990).** Molecular Cell Biology. *Scientific American Books* 2ª edición.
- DE MOT, R., LAEREMANS, T. SCHOOF, G. and VANDERLEYDEN, J. (1993).** Characterization of the *recA* gene from *Pseudomonas fluorescens* OE 28.3 and construction of a *recA* mutant. *J. Gen. Microbiol.* **139:** 49-57
- DUMS, F., DOW, J.M. and DANIELS, M.J. (1991).** Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **229:** 357-364

- EKATERINIADOU, L.V., PAPOUTSOPOULOU, S.V. and KYRIAKIDIS, D.A. (1994).** High production of xanthan gum by a strain of *Xanthomonas campestris* conjugated with *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.* **16**(5): 517-522
- FERNÁNDEZ DE HENESTROSA, A.R., CALERO, S. and BARBÉ, J. (1991).** Expression of the *recA* gen of *Escherichia coli* in several species of gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 503- 506
- FU, J., CHANG, R., and TSENG, Y. (1992).** Construction of stable lactosa-utilizing *Xanthomonas campestris* by chromosomal integration of cloned *lac* genes using filamentousophage of DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 225-229
- GOLDBERG, I. and MEKALANOS, J.J. (1986).** Effect of a *recA* mutation on Cholera toxin gen amplification and deletion events. *J. Bacteriol.* **165**(3): 723-731
- GUERRY, P., POPE, P.M., BURR, D.H., LEIFER, J., JOSEPH, S.W. and BOURGEOIS, A.L. (1994).** Development and characterization of *recA* mutants of *Campylobacter jejuni* for inclusion in attenuated vaccines. *Infect. Immun.* **62**(2): 426-432
- HARDING, N.E., RAFFO, S., RAIMONDI, A., CLEARY, J.M. and IELPI, L. (1993).** Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum *J. Gen. Microbiol.* **139**: 447-457
- HORII, T., OGAWA, T. and OGAWA, H. (1980).** Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci* **77**(1): 313-317
- HÖTTE, B., RATH-ARNOLD, I., PÜHLER, A. and SIMON, R. (1990).** Cloning and analysis of a 35.3-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* **172**(5): 2804-2807
- HU NIEN-TAI, HUNG, M., CHIOU, S., TANG, F., CHIANG, D., HUANG, H. and WU, C. (1992).** Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* **174**(8): 2679-2687
- JAYASENA, V.K. and JOHNSTON, B.H. (1993).** Complement-stabilized D-loop RecA-catalyzed stable pairing of linear DNA molecules at internal sites. *J. Mol. Biol.* **230**: 1015-1024
- KAMOUN, S. and KADO, I. (1990).** Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production, and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(12): 3855-3860
- KAMOUN, S., TOLA, E. KAMDAR, H. and KADO, I. (1992).** Rapid generation of directed and unmarked deletions in *Xanthomonas*. *Mol. Microbiol.* **6**(6): 809-816
- KARLIN, S., WEINSTOCK, G.M. and BRENDEL, V. (1995)** Bacterial classifications derived from RecA protein sequence comparisons. *J. Bacteriol.* **177**(23): 6881-6893
- KOOMEY, J.M. and FALKOW, S. (1987).** Cloning of the *recA* gen of *Neisseria gonorrhoeae* and construction of Gonococcal *recA* mutants. *J. Bacteriol.* **169**(2): 790-795
- KREUZER, H. and MASSEY, A. (1996).** Recombinant DNA and Biotechnology. *ASM Press.* WASHINGTON, D.C. 43-51

- KRIEG, NOEL R., HOLT, and JOHN G. (1984).** BERGEY'S Manual of systematic Bacteriology Volumen 1. *Williams & Wilkins*
- KOPLIN, R., ARNOLD, W., HOTTE, B., SIMON, R., WANG, G. and PUHLER, A. (1992).** Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris* : the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucosa and GDP-mannosa biosynthesis. *J. Bacteriol.* **174**: 191-199
- LEZA, A., GARCÍA, J.O., GALINDO, E. and SOBERÓN-CH., G. (1995).** *Xanthomonas campestris* as a host for the production of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *J. Indust. Microbiol.* **15**: 1-7
- LIU, Y., TANG, J., CLARKE, B.R., DOW, J.M. and DANIELS, M.J. (1990).** A multipurpose broad host range cloning vector and its use to characterise an extracellular protease gen of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* . *Mol. Gen. Genet.* **220**: 433-440
- LLOYD, A.T. and SHARP, P.M. (1993).** Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J. Mol. Evol.* **37**: 399-407
- LORY, STEPHEN (1992).** Determinants of extracellular protein secretion in gram-negative bacteria . *J. Bacteriol.* **174**(11): 3423-3428
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., AND SAMBROOK, J. (1988).** Molecular cloning. A laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- MARTÍN, B., GARCÍA, P., CASTANIÉ, M. and CLAVERY, J. (1995).** The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* **15**(2): 367-379
- MARTINEZ, J.M., ROMERO, D., GIRARD, M. and DAVILA, G. (1991).** Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bacteriol.* **173**(10): 3035-3040
- MARTINEZ, J.M., PALACIOS, A., SANCHEZ, R., CARO, A. and SOBERÓN-CH., G. (1993).** Genetic stability and xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B1459 . *Mol. Microbiol.* **8**(6): 1053-1061
- MATIC, I., RAYSSIGUIER, C. and RADMAN, M. (1995).** Interspecies gene exchange in bacteria: The role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell* **80**: 507-515
- MICHELS, J., VANDE BROEK, A. and VANDERLEYDEN, J. (1991).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Rhizobium phaseoli* *recA* gene. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 486-490
- MILLER, R. and KOKJOHN, T. (1988).** Expression of the *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO is inducible by DNA-Damaging agents. *J. Bacteriol.* **170**-5: 2385-2387
- MILLER, R.V. and KOKJOHN, T.A. (1990).** General microbiology of *recA*: Environmental and evolutionary significance . *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 365-394
- NGUYEN, T.T., MUENCH, K.A. and BRYANT, F.R. (1993).** Inactivation of the RecA protein by mutation of histidine 97 or lysine 248 at the subunit interface. *J. Biol. Chem.* **268**-5: 3107-3113
- OLSEN, G.J., WOESE, C.R. and OVERBEEK, R. (1994).** The winds of evolutionary change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**(1): 1-6

- OHMAN, D.E., WEST, M.A. FLYNN, J.L. and GOLDBERG, J.B. (1985).** Method for gene replacement in *Pseudomonas aeruginosa* used in construction of *recA* mutants: *recA*-Independent instability of alginate production . *J. Bacteriol.* 162: 1068-1074
- PEIJNENBURG, A., BREED, P.V. BRON, S. and VENEMA, G. (1989).** Plasmid deletion formation in *recE4* and *addB72* mutants of *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 21: 205-215
- PUGSLEY, A.P., D'ENFERT, REYSS, I. and KORNACKER, M.G. (1990).** Genetics of extracellular protein secretion by gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 24: 67-90
- RABIBHADANA, S., CHAMNONGPOL, S., TREMPY, J.E., AMBULOS, JR. P. and MONGKOLSUK, S. (1993).** Isolation and expression in *Escherichia coli* of a *Xanthomonas oryzae recA*-like gene. *Gene* 132: 113-118
- RAMIREZ, M.E., FUCIKOVSKY, L., GARCÍA, J. F., QUINTERO, R. and GALINDO, E. (1988).** Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 29: 5-10
- RIERA, J., FERNÁNDEZ, DE H. A.R., GARRIGA, X., TAPIAS, A., and BARBE, J. (1994).** Interspecies regulation of the *recA* gene of gram negative bacteria lacking an *E. coli*-like SOS operator. *Mol. Gen. Genet.* 245: 523-527
- RUSSELL, P. J. (1992).** Genetics. Third edition . *Harper Collins publishers* N.Y. 194-225
- SANO, Y. (1993).** Role of *recA*-related gene adjacent to the *recA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175(17): 2451-2454
- SKARSTAD, K. and BOYE, E. (1993).** Degradation of individual chromosomes in *recA* mutants of *Escherichia coli* . *J. Bacteriol* 175-17: 5505-5509
- SMITH, GERALD R. (1988)** Homologous recombination in prokaryotes . *Microbial Rev.* 52: 1-28
- STENT, GUNTER S., and CALENDAR, R., (1971).** Molecular genetics. An introductory narrative. *W.H.Freeman and Company*
- STASIAK, A. (1992).** Three-stranded DNA structure, is this the secret of DNA homologous recognition? . *Mol. Microbiol.* 6(22): 3267-3276
- STORY, R.M., BISHOP, D.K., KLECKNER, N., and STEITZ, T.A. (1993).** Structural relationship of bacterial RecA proteins to recombination proteins from bacteriophage T4 and yeast. *Science* 259: 1892-1896
- TAO, L., HOLLINGSHEAD, S.K., SUVOROV, A.N., FERRETTI, J.J. and MCSHAN, W.M. (1995).** Construction of a *Streptococcus pyogenes recA* mutant via insertional inactivation, and cloning and sequencing of the complete *recA* gene. *Gene* 162: 59-62
- THORNE, L., TANSEY, L., and POLLOCK, T.J. (1987).** Clustering of mutations blocking synthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 169(8): 3593-3600
- THORNE, L., GOSINK, K.K. and POLLOCK, T.J. (1989).** Mutants of *Xanthomonas campestris* defective in secretion of extracellular enzymes. *J. Ind. Microbiol.* 4: 135-144
- VENKATESH, T.V. and DAS, H.K. (1992).** The *Azotobacter vinelandi recA* gene: sequence

analysis and regulation of expression. *Gene* 113: 47-53

-WATSON, JAMES D. (1970). Molecular Biology of the gene. *W.A. Benjamin Inc.* 2a. edición

-WILLIAMS, PH (1980). Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis.* 64: 736-74

-XU BIWEN, PASZTY, C. and LURQUIN, P.F. (1988). A plasmid-based method to quantitate homologous recombination frequencies in Gram-negative bacteria. *BioTechniques* 6-8: 752-760

-ZYSKIND, J.W., SVITIL, A.L., STINE, W.B. BIERY, M.C. and SMITH, D.W. (1992). RecA protein of *Escherichia coli* and chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.* 6(17): 2525-2537