

## HABLEMOS DE SEXO: REGULACIÓN DE LA TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DEL PLÁSMIDO SIMBIÓTICO DE *Rhizobium etli*

Romero, D.<sup>1</sup>, Sepúlveda, E.<sup>1</sup>, Pérez-Mendoza, D.<sup>2</sup>, Muñoz, S.<sup>2</sup>, Ramírez-Romero, M. A.<sup>1</sup>, Soto, M. J.<sup>2</sup>, Cervantes, L.<sup>1</sup>, Herrera-Cervera, J. A.<sup>3</sup>, López-Lara, I.<sup>1</sup>, Geiger, O.<sup>1</sup>, Sanjuán, J.<sup>2</sup> y Brom, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Cuernavaca, México. <sup>2</sup>Estación Experimental del Zaidín-CSIC. Granada, España. <sup>3</sup>Universidad de Granada, España. Tel: (777) 329 16 91, fax: (777) 317 55 81, email: dromero@ccg.unam.mx

El plásmido simbiótico (pSym, 371 Kb) de *Rhizobium etli* suele movilizarse conjugativamente a través de cointegración con otro plásmido automovilizable, p42a. La transferencia en estas circunstancias, ocurre a través de un sistema *tra/trb*. La movilización del pSym normalmente no ocurre en ausencia de p42a, sugiriendo que el pSym es un plásmido no conjugativo. A pesar de esto, la secuenciación del genoma completo de *R. etli* mostró la existencia en el pSym de un sistema completo de movilización conjugativa, del tipo *tra/vir*. Este sistema contiene las funciones necesarias para transferencia de DNA (genes *tra*) y formación de un sistema de transferencia tipo IV (operón *virB1-11* precedido por un gene adicional (*yp037*)).

Recientemente<sup>1</sup>, obtuvimos mutantes por inserción del transposón Tn5 las cuales permiten la movilización del pSym con alta frecuencia, aún en ausencia de p42a. Estas inserciones inactivan un gene, *rctA*, adyacente al operón *virB* del pSym. Empleando fusiones transcripcionales con *gusA*, encontramos que la expresión de *rctA* es alta en un fondo genético silvestre, reduciéndose significativamente en mutantes en *rctA*. Esto indica que la expresión de *rctA* está sujeta a autorregulación positiva. Las mutaciones en *rctA* también provocan un marcado incremento en la expresión de los operones *tra* y *virB* en el pSym. Al complementar a las mutantes en *rctA* con el gene silvestre, se observó una fuerte reducción tanto en la expresión del operón *virB* como en la frecuencia de movilización del pSym. Por tanto, *rctA* se comporta como un represor de la transferencia conjugativa del pSym. Como era de esperarse para un posible regulador transcripcional, RctA posee un dominio de unión a DNA del tipo hélice alada.

Encontramos también que la sobreexpresión de otro gene, *rctB*, provoca una reducción en la expresión de *rctA* y un aumento tanto en la expresión del operón *virB* como en movilización del pSym. Esto sugiere que RctB antagoniza la función represora de RctA, por un mecanismo aún desconocido.

Con el propósito de avanzar en la comprensión de este sistema, sobreexpresamos el producto de *rctA* fusionado a una etiqueta de histidinas y lo purificamos por unión a columnas de sepharosa-Ni y elución con imidazol. La proteína RctA purificada se empleó en ensayos de cambio en movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) para disectar la región del promotor del operón *virB* a la cual se une específicamente. Las regiones responsables parecen localizarse entre las cajas -10 y -35 del promotor de *rctA*, así como en una región posterior al inicio de transcripción. Actualmente, estamos refinando esta localización por experimentos de mutagénesis específica y *footprinting*.

Agradecimientos: a J. Rivera por apoyo técnico y al PAPIT-UNAM (Proy. IN226802) por apoyo financiero. I.-Pérez-Mendoza D., et al.,(2005). J. Bacteriol.187:7341-7350