

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

PROGRAMA DE EVOLUCION MOLECULAR

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA  
REGULACION DE LA REPLICACION DEL PLASMIDO  
SIMBIOTICO DE *Rhizobium etli*, CEPA CFN42

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
P R E S E N T A:  
MIGUEL ANGEL RAMIREZ ROMERO

DIRECTOR DE TESIS :  
DR MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS

CUERNAVACA, MOR.

2000

25/1/00



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el programa de Evolución Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos.

Para el desarrollo de este trabajo se contó con becas de manuntención otorgadas por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

De igual manera, se contó con beca del Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP) destinada a la compra de materiales y reactivos usados en la parte experimental de este trabajo.

## INDICE

Resumen.	1
Abstract.	2
Introducción.	
Definición e importancia biológica de los plásmidos.	3
Replicación.	
Generalidades.	4
Elementos esenciales para la replicación de los plásmidos.	6
Origen de replicación.	6
Proteínas de inicio de la replicación.	7
Mecanismos de inicio de la replicación.	8
Regulación del inicio de la replicación.	9
Otros mecanismos de regulación de la replicación.	10
Partición de plásmidos.	
Sistemas adictos o de muerte post-segregacional.	11
Sistemas de partición activa.	11
Otros sistemas relacionados con la estabilidad de plásmidos.	13
Incompatibilidad.	14
Antecedentes.	15
Hipótesis.	17
Objetivos.	18
Resultados.	
Parte I. Referencia del artículo: Structural elements required for replication and incompatibility of the <i>Rhizobium etli</i> symbiotic plasmid.	20
Parte II. Resultados Adicionales.	
Análisis de la secuencia de las regiones <i>cis</i> de incompatibilidad.	29
Análisis de la regulación de la replicación.	30
Identificación de la región promotora/operadora.	31
Identificación del inicio de la transcripción.	31
RepA es un regulador transcripcional del operón <i>repABC</i> .	32
Identificación de la región promotora reconocida por RepA.	33
Características estructurales de la región promotora/operadora.	35
Comparación del promotor <i>rep</i> con otros promotores de diferentes Rhizobiaceas.	36
El promotor del operón <i>repABC</i> no es funcional en <i>Escherichia coli</i> .	37
Diversidad estructural de las regiones promotoras de la familia <i>repABC</i> .	38
El promotor <i>repABC</i> no es el único factor que impide la replicación del pSim en <i>Escherichia coli</i> .	39

Análisis de resultados.	
La función de replicación del operón <i>repABC</i> .	40
La función de partición.	41
El promotor.	42
La regulación del operón <i>repABC</i> .	44
La incompatibilidad entre replicadores RepABC.	45
Las bases moleculares de la replicación y de la partición del pSim.	46
La incapacidad de replicación del pSim en <i>Escherichia coli</i> .	47
La organización genético-funcional del replicador del pSim.	48
Perspectivas.	49
Bibliografía.	50

## RESUMEN

El plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* (p42d), cepa CE3, pertenece a la familia de replicadores RepABC. Los miembros de esta familia están ampliamente dispersos entre las Rhizobiaceas, y contienen tres genes (*repA*, *repB*, *repC*), además de una secuencia intergénica entre *repB* y *repC* que está muy conservada. Existen muy pocos estudios sobre las funciones de los genes *rep*, sobre su organización genética y sobre la identificación de los determinantes de incompatibilidad. Por otra parte, no se conoce nada sobre sus características transcripcionales.

Con la finalidad de establecer las bases moleculares de la incompatibilidad, de la replicación, de la partición y de la regulación de la replicación del plásmido p42d, en este trabajo se identificaron los elementos necesarios para la replicación, para la partición, y su relación con las propiedades de incompatibilidad. Adicionalmente, se estudiaron sus propiedades transcripcionales y su relación con la regulación de la replicación.

Los resultados obtenidos mostraron que:

a) RepC es esencial para la replicación. b) RepA y RepB participan en la estabilidad del plásmido. c) RepA y RepB participan en la regulación del número de copias. d) RepA es un factor de incompatibilidad de acción en *trans*. e) El plásmido contiene 2 sitios de incompatibilidad de acción en *cis*, uno localizado entre *repB* y *repC* (*inca*) y el segundo curso abajo de *repC* (*incβ*, esencial para la replicación). f) Los genes *repABC* están organizados en un operón. g) La región promotora/operadora está contenida en un segmento de 127 pb curso arriba de *repA*. h) RepA es un regulador negativo de la transcripción del operón. i) El operador es una secuencia inversa repetida localizada entre el inicio de la transcripción y el codón de inicio de *repA*. j) El inicio de la transcripción se encuentra a 57 pb del codón de inicio de *repA*. k) Curso arriba de este sitio se encuentra una secuencia similar a la secuencia consenso para promotores de la familia sigma 70. l) El promotor del operón no es funcional en *Escherichia coli*. m) Es indispensable para la transcripción una pequeña región de 22 pb localizada curso arriba de la probable caja -35. Un alineamiento de dicha secuencia muestra un porcentaje de identidad del 63 % entre los replicadores RepABC de *Rhizobium etli* y de *Agrobacterium*.

## ABSTRACT

The *Rhizobium etli* symbiotic plasmid (p42d), from strain CE3, is a member of the RepABC family. This plasmids family is widely distributed among the Rhizobiaceae, and contain three conserved genes (*repA*, *repB* and *repC*), and also a conserved intergenic sequence between the *repB* and *repC* genes. The *rep* genes functions, their genetic organization, and incompatibility determinants have been poorly studied and nothing is known about their transcriptional characteristics.

To elucidate the molecular basis of incompatibility, replication, partition and the regulation of the replication of the p42d plasmid, the replication and partition elements and their relation to the incompatibility properties were identified. Additionally, the transcriptional characteristics were studied.

The results showed that:

a) RepC is essential for replication. b) RepA and RepB participate in the stability of the plasmid. c) RepA and RepB participate in the regulation of plasmid copy number. d) RepA is a *trans* incompatibility factor. e) The plasmid contains two incompatibility regions, one located between *repB* and *repC* (*inc $\alpha$* ), and the other, downstream of *repC* (*inc $\beta$* ) essential for replication. f) The *repABC* genes are organized in an operon. g) The promoter/operator region is contained in 127 bp upstream from *repA*. h) RepA is a negative transcriptional regulator of the operon expression. i) The operator region is an inverted repeat sequence located between the transcription start site and the initiation codon of *repA*. j) The transcription start site of the *repABC* operon was found 57 bp upstream of the initiation codon of *repA*. k) Upstream from this site, a similar sequence to the -35 and -10 boxes of the *Escherichia coli* sigma 70 promoter consensus was recognized. l) The promoter of *repABC* operon is not functional in *Escherichia coli* and m) A conserved fragment of 22 pb located upstream the -35 box of the promoters of the *Rhizobium etli* and *Agrobacterium* replicators is essential for their transcription.

## INTRODUCCION

### Definición e importancia biológica de los plásmidos.

La información genética contenida en las bacterias puede estar codificada en dos tipos de moléculas de DNA, llamadas cromosoma y plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de replicación autónoma y autoregulada, cuyo tamaño puede variar desde 1.5 kb hasta 2 400 kb (García-de los Santos *et al.* 1996; Burian *et al.* 1999). Además de la variedad en tamaños, pueden ser circulares o lineales, tener un número de copias que varía desde 1 hasta 500 e incluso coexistir con 11 plásmidos diferentes en una misma bacteria (Kado 1998). En conjunto, estas características determinan que, en algunas bacterias, los plásmidos pueden representar más del 25 % del material genético (Holmes *et al.* 1995).

En adición a las propiedades mencionadas, los plásmidos contribuyen de manera importante al proceso de diversificación bacteriana mediante eventos de recombinación y transferencia horizontal. En particular, éste último mecanismo se refiere a la movilización de material genético entre organismos de la misma especie o entre diferentes especies. El principal mecanismo de transferencia horizontal es la conjugación, y se ha observado que muchos plásmidos no sólo codifican los elementos necesarios para autotransferirse, sino que también pueden co-transferir a otros plásmidos o al cromosoma, propiedad que los señala como importantes factores de la evolución bacteriana (Amábile-Cuevas *et al.* 1992).

Todos los replicones pueden mantenerse en la célula gracias a que poseen regiones encargadas de codificar las funciones necesarias para replicar y segregarse. En el caso de los plásmidos, dichas funciones suelen estar codificadas en "Módulos" estructuralmente independientes pero que se encuentran funcionalmente relacionados. Ambos módulos, en muchos casos, están contenidos en segmentos de 2 a 5 kb de largo que son llamados replicones básicos (Summers 1996). La mayoría de los plásmidos presentan únicamente un replicón básico; sin embargo, se han descrito plásmidos que tienen dos o más replicones básicos (Bartosik *et al.* 1997).

En condiciones naturales, las funciones de replicación y segregación están estrictamente controladas mediante diversos mecanismos, y ambas funciones están relacionadas con las propiedades de incompatibilidad que exhiben los plásmidos. Una breve descripción de los elementos que participan en la replicación y en la partición de estas moléculas, así como las estrategias para su control y la forma como determinan las propiedades de incompatibilidad, se presenta a continuación.



## REPLICACION

### Generalidades.

La replicación es el proceso que permite sintetizar, a partir de una molécula de DNA, dos moléculas con la misma cantidad y calidad de información que la parental. Cuando se observa una molécula de DNA que se está replicando, pueden distinguirse dos regiones; aquella formada por una doble cadena, que corresponde al DNA que no ha sido replicado; y aquella en la que se encuentra una " horquilla de replicación ", y que corresponde al DNA que se está replicando. La distinción de estas regiones es importante, pues permite establecer un criterio para clasificar a los plásmidos en función de la dirección en la que son replicados. Así, un plásmido se replica unidireccionalmente cuando una horquilla se mueve a lo largo del DNA, mientras que un plásmido se replica bidireccionalmente cuando dos horquillas, que parten del mismo punto, se mueven en sentidos opuestos a través del DNA. En las horquillas se encuentra ensamblada la maquinaria enzimática necesaria para la replicación.

El mecanismo seguido por las proteínas de replicación básicamente es el mismo para cromosomas y plásmidos, y puede dividirse en tres etapas; inicio, elongación y término de la replicación. En el inicio, un conjunto de proteínas de inicio de la replicación interaccionan con el DNA en una región específica llamada origen de replicación (*ori*, ver más adelante). Tras la unión de las proteínas iniciadoras al DNA, éstas catalizan la apertura de la doble cadena y promueven la incorporación de las proteínas del primosoma y de DnaB en la horquilla recién formada. El primosoma es una estructura protéica que ayuda a desnaturalizar al DNA y facilita la función de DnaB (una helicasa) y DnaG (una primasa). Por su parte, DnaB desplaza a las proteínas de inicio y a su vez recluta a la proteína DnaG para que comience con la síntesis del primero de RNA necesario para la fase de elongación de la nueva cadena de DNA. A continuación, el complejo multiprotéico de la DNA polimerasa (DNApol) se incorpora a la horquilla de replicación para dar lugar a la formación del replisoma. El deslizamiento del replisoma a lo largo del DNA corresponde a la etapa de elongación, en la cual también participan proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (proteínas SSB), que ayudan a evitar la renaturalización y el daño a la molécula de DNA. Finalmente, el término de la replicación involucra el desmantelamiento del replisoma y la separación de las moléculas obtenidas (Baker y Wickner 1992). Un breve listado de las proteínas involucradas en la replicación, así como su función, se presenta en la Tabla 1.

Gen	Proteína	Función
<i>dnaA</i>	DnaA	Proteína de inicio de la replicación del cromosoma.
<i>dnaB</i>	DnaB	Helicasa y activador de la primasa.
<i>dnaC</i>	DnaC	Ayuda a introducir a DnaB en el complejo de inicio.
<i>dnaG</i>	Primasa	Síntetiza al primero de RNA.
<i>himA, hip</i>	IHF	Heterodímero, dobla al DNA en el <i>oriC</i> a través de una unión específica.
<i>fis</i>	FIS	Dobla al DNA en el <i>oriC</i> a través de una unión específica.
<i>hupA, hupB</i>	HU	Heterodímero, dobla al DNA en el <i>oriC</i> mediante una unión inespecífica.
<i>dnaE</i>	$\alpha$	Proteína central de la holoenzima DNAPolIII.
<i>dnaQ</i>	$\epsilon$	Exonucleasa con actividad 3' a 5'. Forma parte de la DNAPolIII.
<i>holE</i>	$\theta$	Función desconocida. Forma parte de la DNAPolIII.
<i>dnaX</i>	$\tau$	Centro de dimerización de la DNAPolIII.
<i>dnaX</i>	$\gamma$	Forman parte del complejo de inicio de polimerización.
<i>holA</i>	$\delta$	
<i>holB</i>	$\delta'$	
<i>holC</i>	$x$	
<i>holD</i>	$\psi$	
<i>dnaN</i>	$\beta$	Factor de procesividad.
<i>polA</i>	Poll	Renovación del primero y rellenado de espacios vacíos.
<i>lig</i>	Ligasa	Une fragmentos de DNA.
<i>gyrA, gyrB</i>	Girasa	Heterotetrámero, decatenación de dímeros de DNA.
<i>parC, parE</i>	Topo IV	Heterodímero, decatenación de dímeros de DNA.
<i>tus</i>	TBP	Proteína de término de la replicación.
<i>priA</i>	PriA	Forma parte del primosoma. Helicasa con actividad 3' a 5'.
<i>priB, priC</i>	PriB, PriC	Forman parte del primosoma.

**Tabla 1. Genes y Proteínas relacionados con la replicación del cromosoma de *Escherichia coli*** (Tomada de Baker y Wickner 1992 con modificaciones).

A pesar de que el mecanismo enzimático de replicación es universal, los plásmidos contienen información que genera diferencias, principalmente durante la etapa de inicio de la replicación. De acuerdo a la naturaleza de las interacciones entre el *ori* y las proteínas de inicio, pueden distinguirse tres mecanismos de replicación de plásmidos, que son nombrados como: i) tipo theta, ii) por desplazamiento de cadena, y iii) círculo rodante.

La replicación tipo theta ocurre en plásmidos circulares, en los que se forma una burbuja cuando la molécula se está duplicando, por lo que cuando se observan al microscopio, asemejan a una letra griega theta ( $\Theta$ ). Dicha burbuja puede estar formada por una o dos horquillas de replicación y por lo tanto, la replicación puede ser unidireccional o bidireccional.

En cuanto al mecanismo de desplazamiento de cadena (también llamado "loop D"), la maquinaria de replicación desdobra la doble hélice y usa, inicialmente, una de las

cadenas parentales como templado. En esta condición, el movimiento del replisoma a través de la doble hélice provoca que se desplace la cadena que aún no se replica, misma que permanece como cadena sencilla hasta que queda descubierta una segunda señal que promueve su replicación.

Finalmente, el mecanismo de replicación por círculo rodante comienza cuando la proteína de inicio de la replicación hace un corte en una de las cadenas, para así generar un extremo 3' que es usado como primero para comenzar con la síntesis de la cadena que no sufrió el corte. Una vez concluida la replicación de la cadena intacta, la cadena que sufrió el corte es replica y reparada.

Como puede notarse, la replicación de los plásmidos tiene múltiples peculiaridades sin embargo, es claro que depende estrictamente de la maquinaria de replicación del huésped, lo que implica que los plásmidos deben de establecer una adecuada comunicación con los elementos de replicación de la bacteria para asegurar su existencia sin afectar la viabilidad celular.

### **Elementos esenciales para la replicación de los plásmidos.**

Además de las proteínas proporcionadas por la célula (Tabla 1), los plásmidos codifican la información requerida para la replicación y su control en una región del replicón llamada " Módulo de Replicación ". Este *locus* es de vital importancia pues determina el número de copias y el mecanismo de replicación, propiedades que son características de cada plásmido.

La anatomía del módulo de replicación es esencialmente la misma en cualquier replicón; en él se encuentra un origen de replicación, una o más proteínas relacionadas con el inicio de la replicación (en la mayoría de los casos), y elementos de regulación del inicio de la replicación.

### **Origen de replicación (*ori*).**

Estrictamente hablando, corresponde al punto en que comienza la síntesis del DNA, no obstante, también podemos definirlo como el *locus* en donde las proteínas de inicio reclutan a la maquinaria de replicación.

Se sabe que para el caso de plásmidos bacterianos, pueden coexistir varios orígenes de replicación en una misma molécula (Banerjee *et al.* 1992; Kim *et al.* 1994). Estos orígenes pueden estar contenidos en un solo replicón básico o pueden estar en replicones básicos diferentes.

En la gran mayoría de los casos, un *ori* es una región en la que se encuentran secuencias de unión para proteínas de replicación, que pueden ser de dos tipos: los reconocidos por las proteínas de inicio de la replicación, y los que son reconocidos por proteínas accesorias (Fuller *et al.* 1984, Helinski *et al.* 1996). Los sitios de unión para proteínas de inicio son indispensables, y en la mayoría de los casos corresponden a secuencias directas repetidas llamadas iterones. Los iterones tienen un tamaño que varía de 12 a 22 pb y suelen estar separados por 11 pb. Estas secuencias están relacionadas con dos procesos: el inicio de la replicación y la regulación de la replicación, y por lo tanto, pueden encontrarse en el origen de replicación o en una región reguladora (ver más adelante) (Chattoraj *et al.* 1997). Además de los iterones, también se han encontrado secuencias palindrómicas que funcionan como sitios de unión para proteínas de inicio (i. e. plásmidos R1, pAL5000) (Giraldo y Díaz 1992; Stolt y Stoker 1996).

En adición a los sitios de unión para las proteínas de inicio, muchos orígenes de replicación suelen tener una región rica en AT, sitios de metilación, y una o más secuencias de unión para las proteínas DnaA, IHF, HU y FIS. Estas proteínas están codificadas en el cromosoma bacteriano y funcionan como elementos accesorios para la replicación de los plásmidos (Tabla 1) (Hansen *et al.* 1986; Ogura *et al.* 1990). Concretamente hablando, DnaA, la proteína de inicio de la replicación del cromosoma bacteriano, participa en la replicación de algunos plásmidos ayudando a desnaturalizar la doble cadena de DNA. Para ello, un monómero de la proteína se une a una secuencia de 9 pb conocida como caja DnaA y en esta condición, la proteína DnaA interacciona con las proteínas de inicio de la replicación del plásmido para catalizar la apertura de la cadena. Con respecto a las proteínas IHF, HU y FIS, colectivamente hablando se les conoce como proteínas similares a histonas, debido a la propiedad que tienen de unirse cooperativamente al DNA para inducir su doblado. Las tres proteínas funcionan como dímeros, y tras su unión a diferentes tipos de secuencias, inducen un dobléz en el DNA que ayuda a desnaturalizar la doble cadena (Travers 1997).

### **Proteínas de inicio de la replicación.**

La enorme mayoría de los plásmidos codifican una proteína que cataliza el inicio de la replicación, aunque cabe aclarar que los plásmidos tipo ColE1 no requieren proteína de inicio (Helinski *et al.* 1996).

Para el caso de plásmidos con replicación theta, las proteínas mejor estudiadas forman parte de una familia llamada Rep, entre las que figuran las proteínas de los plásmidos F, pSC101 y R6K (del Solar *et al.* 1998).

Todas las proteínas de la familia Rep tienen una enorme tendencia a formar dímeros en solución, interacción que se establece a través de un motivo " cierre de leucina ". Adicionalmente, tales proteínas se unen a iterones a través de un motivo HTH (Giraldo *et al.* 1998). Bajo la forma homodimérica, las proteínas de la familia Rep funcionan como represores de su transcripción, uniéndose a los iterones localizados sobre la región promotora del gen que las codifica. Contrastando con la función de los dímeros de Rep, la forma monomérica es responsable de catalizar el inicio de la replicación mediante su unión a los iterones que se encuentran en el origen de replicación (Matsunaga *et al.* 1997; Komori *et al.* 1999). Cabe aclarar que proteínas que recocen iterones también pueden controlar el inicio de la replicación a través del mecanismo de desplazamiento de cadena. El caso mejor estudiado corresponde a la proteína RepC del plásmido RSF1010 cuyas propiedades son similares a las mencionadas anteriormente (Sakai *et al.* 1996).

Por su parte, las proteínas de plásmidos que se replican por el mecanismo de círculo rodante, se caracterizan por formar dímeros o multímeros que tienen la doble función de romper un enlace fosfodiéster de una de las cadenas del DNA, y reparar el daño al terminar el ciclo de replicación del plásmido (Espinosa *et al.* 1995; Zhaoe *et al.* 1998). A diferencia de las proteínas Rep antes mencionadas, estas proteínas no presentan un motivo de unión a DNA tipo HTH, aunque mantienen la capacidad de formar dímeros a través del cierre de leucina (del Solar *et al.* 1998).

### **Mecanismos de inicio de la replicación.**

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

En cuanto a plásmidos con replicación por círculo rodante, los dímeros de la proteína de inicio se unen a secuencias repetidas en el origen e introducen un corte en una de las cadenas del DNA. Tras la ruptura del enlace fosfodiéster, en la mayoría de los

casos la proteína de inicio permanece unida al extremo 5' del DNA, generando un extremo 3' libre que se utiliza para la síntesis de la cadena líder. Al concluir esta etapa se libera un intermediario de cadena sencilla en donde la RNA polimerasa sintetiza un primero que sirve de sustrato para la síntesis de la cadena complementaria (Espinosa *et al.* 1995).

Aunque teóricamente en cada etapa de la replicación es posible establecer un mecanismo de control, hasta el momento sólo se han encontrado sistemas de regulación de la replicación de plásmidos asociados a la etapa de inicio, los cuales son directamente responsables de establecer el número de copias. Los modelos propuestos para tal función se presentan a continuación.

### Regulación del inicio de la replicación.

Independientemente del sistema de replicación que se siga, la regulación del inicio de la replicación de los plásmidos puede explicarse por alguno de dos modelos:

- Modelo 1. Requiere de una molécula que funciona exclusivamente como un inhibidor, el cual es codificado de manera constitutiva por el plásmido. La vida media del inhibidor es pequeña y su concentración es proporcional al número de copias del plásmido. En este sistema, cuando la célula aumenta de tamaño la concentración del inhibidor disminuye por dilución, lo que promueve la replicación del plásmido y con ello el aumento del número de copias. A su vez, al aumentar el número de copias aumenta la concentración del inhibidor hasta que se alcanza un punto en que la replicación se inhibe nuevamente. Este modelo puede llevarse a cabo mediante una proteína inhibidora que interactúa en el *ori* (regulación directa; i. e. plásmidos pMv158, pIP501) (del Solar *et al.* 1998), o a través de un inhibidor (que nuevamente puede ser una proteína o que incluso puede ser una molécula de RNA), que puede actuar sobre el promotor del gen para la proteína de inicio de la replicación o sobre el RNAm de ésta (regulación indirecta; i. e. plásmidos R1, pT181) (Nordström *et al.* 1984; Novick 1989).

- Modelo 2. El control del inicio de la replicación se ejerce limitando la concentración de la proteína de inicio o impidiendo su unión al origen de replicación. Para el primer caso, la proteína de inicio regula negativamente su expresión uniéndose a su propio promotor (i. e. plásmido F) (Ishiai *et al.* 1994; Uga *et al.* 1999). El segundo caso requiere de un *locus* de regulación formado por un grupo de iterones localizados en una región separada del origen de replicación. En este sistema, las proteínas Rep se unen inicialmente al origen; sin embargo, tras aumentar la concentración de monómeros, muchos de ellos se unen al *locus* de regulación. Bajo tales condiciones, las proteínas unidas a las distintas regiones

interactúan entre sí provocando el doblado del DNA y con ello la formación de una estructura que oculta al origen de replicación e impide el armado del replisoma (i.e. plásmido P1) (Abeles *et al.* 1995).

### Otros mecanismos de regulación de la replicación.

Algunos plásmidos son objeto de regulación del inicio de la replicación a través del control del estado de metilación del *ori* (i. e. P1, pSC101) (Bramhill y Kornberg 1988; Brendler *et al.* 1991). La metilación contribuye a la regulación en dos niveles distintos. En el primer nivel, el origen de replicación hemimetilado se oculta de nuevas rondas de replicación a través de su interacción con la membrana celular y/o con proteínas como SeqA, que reconoce los sitios de metilación no modificados (Brendler *et al.* 1995). En el segundo nivel, la metilación incrementa la eficiencia de inicio de la replicación, quizás favoreciendo la apropiada interacción entre proteínas y DNA (Abeles *et al.* 1993; Chatteraj y Schneider 1997).

El control por metilación no es indispensable ni se utiliza ampliamente para regular la replicación de los plásmidos, sin embargo, sí es de extrema importancia en la regulación de la replicación del cromosoma bacteriano (Reisenauer *et al.* 1999).

Como se mencionó en la sección de generalidades, tras iniciada la replicación, continúan las etapas de elongación y término de la replicación. En este trabajo, no se hace hincapié en estas etapas de la replicación pues no son el objeto principal de estudio, sin embargo, la información referente a tales tópicos puede consultarse en las referencias Baker y Wickner 1992; y Bussiere y Bastia 1999.

Es importante señalar que la replicación de los plásmidos corresponde al primer proceso necesario para asegurar la propagación de los mismos en la progenie celular. Una vez concluida, se pone en marcha un proceso de partición que es responsable de asegurar la distribución de las moléculas replicadas a las células hijas. Replicación y partición siguen mecanismos independientes, sin embargo, es claro que se encuentran perfectamente acoplados. Una breve descripción de los mecanismos de partición se presenta a continuación.

## PARTICION DE PLASMIDOS

Cuando el número de copias de un plásmido es elevado (de 50 a 100), la división celular permite la difusión de estos plásmidos a las células hijas; sin embargo, cuando el número de copias es pequeño (1 a 10) es necesaria la existencia de un módulo encargado de codificar un sistema de partición.

Los sistemas de partición de plásmidos pueden agruparse en dos categorías; sistemas adictos o de muerte post-segregacional y sistemas de partición activa.

### **Sistemas adictos o de muerte post-segregacional.**

Se basa en la existencia de sustancias tóxicas y de antídotos que son codificadas por el plásmido. La organización genética de los sistemas adictos es siempre la misma, pues constituyen un operón en donde el antídoto es codificado por el primer gen. Estos sistemas se autoregulan a nivel de la transcripción, mediante la unión del complejo antídoto-veneno al promotor del operón (Ruíz-Echevarria *et al.* 1991). En todos los casos conocidos, la molécula venenosa es químicamente estable, mientras que el antídoto es mucho menos estable pero se sintetiza en grandes cantidades (Jensen y Gerdes 1995).

En los sistemas adictos, cuando la bacteria pierde al plásmido, la concentración de la molécula que actúa como antídoto decae rápidamente, mientras que la molécula venenosa persiste en su citoplasma, lo que provoca daños en la bacteria que conducen a su muerte (Salmon *et al.* 1994).

De acuerdo a la naturaleza química del antídoto, se han identificado dos tipos de sistemas adictos:

1. Antídoto protéico: La molécula venenosa y el antídoto son dos pequeñas proteínas que antagonizan entre sí, formando un complejo muy lábil, debido a la menor vida media del antídoto (i. e. plásmido F) (Bernard y Couturier 1992; Johnson *et al.* 1996).
2. Antídoto ribonucléico: En este sistema, la traducción del RNAm del veneno la impide un RNA antisentido que se une al extremo 3' del mensajero (i. e. plásmido R1) (Jensen y Gerdes 1995).

### **Sistemas de Partición Activa.**

La partición activa se refiere al movimiento dirigido de los plásmidos recién replicados hacia las células hijas. Estos sistemas, al igual que la replicación, funcionan mediante la cooperación de elementos codificados en los plásmidos y en el cromosoma bacteriano.



Todos los grandes plásmidos contienen sistemas de partición activa que se encuentran codificados en una región llamada " Módulo de Partición ". Este módulo es de suma importancia para los plásmidos que lo contienen; pues se ha demostrado que su carencia provoca una pérdida del plásmido en un porcentaje que varía del 10 al 20 % por generación (Austin y Eichorn 1992).

En casi todos los plásmidos estudiados, se ha encontrado que el módulo de partición activa sigue un plan básico de organización genética, y que es idéntico al encontrado en el cromosoma de distintas bacterias. Dicha organización incluye un operón formado por dos genes (A y B), y una región no codificante que funciona como centrómero (Hiraga 1992; Williams y Thomas 1992). La adecuada función de los tres elementos es absolutamente necesaria para la partición y para la regulación de la función (Yates *et al.* 1999).

La región centromérica puede localizarse curso arriba o curso abajo del operón y, en la mayoría los casos, contiene sitios de unión para el producto del gen B y para la proteína IHF (Dam y Gerdes 1984; Gallie y Kado 1987; Davis y Austin 1988; Mori *et al.* 1989).

En cuanto al primer gen del operón (A), este codifica una proteína que hidroliza ATP siempre que está unida a DNA (Montallebi-Veshareh *et al.* 1990; Watanabe *et al.* 1992; Davis *et al.* 1996). Dicha proteína tiene una fuerte tendencia a formar dímeros en solución y en tal configuración, reprime la expresión del operón mediante su unión a secuencias inversas repetidas que traslapan al promotor, actividad estimulada por la interacción de la proteína A con la proteína B (Mori *et al.* 1986; Friedman y Austin 1988).

En lo que respecta al gen B, éste codifica una proteína que forma dímeros en solución, condición en la que puede unirse a la región centromérica mediante el reconocimiento de secuencias repetidas, lo que produce que el DNA se doble alrededor de la proteína B. La unión en el centrómero de un dímero de B, y de un heterodímero de IHF, produce un complejo de partición que se piensa es reconocido por un sistema celular capaz de dirigir a los plásmidos hacia las células hijas (Bouet *et al.* 2000). Adicionalmente, la unión de B al centrómero estimula el reclutamiento de más proteínas B alrededor del complejo de partición.

Se ha propuesto que la función de partición opera mediante el siguiente mecanismo: La unión de la proteína A con el ATP promueve su dimerización y la adquisición de una conformación que le permite interactuar con el complejo de partición, a través de su unión con la proteína B. Adicionalmente, A interactúa con un componente celular de la maquinaria de partición que permite posicionar específicamente a los complejos de partición, y quizás, proporciona la energía necesaria para el movimiento de los plásmidos a las células hijas (Niki e Hiraga 1997; Erdmann *et al.* 1999; Jensen y Gerdes 1999). Tras la

hidrólisis del ATP necesaria para la partición, el dímero de la proteína A adquiere una nueva conformación que le permite unirse a la región operadora, unión que favorece la proteína B (Hiraga 1992, Davey y Funnell 1997; Bouet y Funnell 1999).

La apropiada partición de los plásmidos se altera al elevar los niveles de las proteínas A y B. En este sentido, se ha demostrado que un exceso de la proteína A provoca la pérdida del plásmido por un mecanismo molecular desconocido (Ogura *et al.* 1990). Por su parte, un exceso de la proteína B provoca la inestabilidad del plásmido dependiente del centrómero (Kusukawa *et al.* 1987; Funnell 1988). La explicación de este fenotipo se relaciona con la propiedad que tiene la proteína B de formar agregados sobre el DNA. Se piensa que el exceso de la proteína B se recluta alrededor del complejo de partición, de tal suerte que se promueve la formación de una estructura que rebasa los límites normales del complejo, y que impide la expresión de los genes de replicación aledaños al módulo de partición (Lynch y Wang 1995). Este fenómeno se denomina silenciamiento, y se ha demostrado que es responsable de impedir la expresión de los genes que rodean al módulo de partición del plásmido P1 (Rodionov *et al.* 1999; Rine 1999).

#### Otros sistemas relacionados con la estabilidad de plásmidos.

Existen sistemas de resolución de dímeros y de modificación-restricción que pueden ayudar a los mecanismos básicos de estabilidad de los plásmidos. El primero funcionan a través de recombinación sitio específica mediada por una región del DNA del plásmido y por una recombinasa que puede ser codificada en cromosoma o en el plásmido (Gerlitz *et al.* 1990; Eberl *et al.* 1994; Diqué-Kochem y Eichenlaub 1993; Nordström 1989). La importancia de los sistemas de resolución de dímeros ha sido puesta de manifiesto con plásmidos de alto número de copias, puesto que mutaciones que impiden la separación de las moléculas recién sintetizadas, conducen a elevados porcentajes de pérdida por generación (Summers *et al.* 1993). La resolución de dímeros favorece la estabilidad tanto de plásmidos de bajo número de copias (i. e. F, P1) como de alto número de copias (pBR, RP4) (Nordström 1989). Con respecto a los sistemas de modificación-restricción, estos siguen una estrategia similar a la de los sistemas veneno-antídoto, sin embargo, son pocos los plásmidos en los que se ha descrito (Kulakauskas *et al.* 1995; Naito *et al.* 1995).

Finalmente, no es extraño encontrar que plásmidos con bajo número de copias contienen más de un sistema que asegure su estabilidad. Tal es el caso de los plásmidos F y P1 que contienen sistemas adictos, de partición activa y de resolución de dímeros que en conjunto producen la pérdida del plásmido menos de 1 vez por cada  $10^6$  divisiones celulares (Nordström y Austin 1989; Thiested *et al.* 1994; Ruíz-Chavarria *et al.* 1995).

## INCOMPATIBILIDAD

Los mecanismos responsables del control del inicio de la replicación y de la partición están involucrados en una propiedad muy importante que se observa entre plásmidos, y que se denomina incompatibilidad. La incompatibilidad se refiere a la incapacidad que presentan dos o más replicones de ser heredados establemente en la misma línea celular, en ausencia de presión selectiva. Esta propiedad es un reflejo de la existencia de elementos comunes, ya sea del sistema de inicio de la replicación o del sistema de partición y; por lo tanto, se puede considerar que los plásmidos incompatibles tienen una relación ancestral (Novick 1987; Austin y Nordstrom 1990).

Básicamente existen dos tipos de secuencias que pueden funcionar como determinantes de incompatibilidad, la primera corresponde a genes que pueden codificar proteínas responsables de la replicación, de la partición, o de la regulación de ambos procesos. A este tipo de determinantes se les llama elementos *trans*. El segundo tipo de determinante corresponde al origen de replicación, a la región centromérica, o a las secuencias reguladoras. Este tipo de determinantes se denomina elementos *cis*. Debido a que la incompatibilidad sólo puede observarse entre plásmidos con sistemas de replicación o de partición muy similares, dicha propiedad puede usarse como un criterio para la clasificación de plásmidos, además de que tiene importantes implicaciones en la dirección del flujo genético en la naturaleza (Couturier *et al.* 1988).

## ANTECEDENTES

Recientemente, en nuestro laboratorio se aisló y caracterizó el replicón básico (pH3) del plásmido simbiótico (pSim) de *Rhizobium etli*, cepa CFN42. Este replicón mide 5.6 kb, se encuentra localizado en la banda 79 del mapa de restricción en *Bam*HI del pSim, y porta todas las funciones necesarias para replicar con la misma estabilidad y con el mismo número de copias que el pSim, además de que es incompatible con el pSim. El análisis de la secuencia de pH3 demuestra que pertenece a la familia de replicadores básicos tipo RepABC, los cuales se caracterizan por tener tres genes, llamados *repA*, *repB* y *repC*, y en donde *repA* precede a *repB* y este a su vez a *repC*. Entre *repB* y *repC* se encuentra una región no codificante de 150 pb misma que está conservada en todos los miembros de la familia.

El análisis tipo BLAST de los genes de pH3 demuestra que *repA* y *repB* codifican proteínas que son homólogas a diferentes proteínas responsables de la partición de varios plásmidos y cromosomas enterobacterianos (proteínas de la familia Sop/Par), mientras que la proteína codificada por el gen *repC* no es homóloga a ninguna proteína de función conocida (Ramírez-Romero *et al.* 1997).

Por otra parte, se ha demostrado que los replicadores de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos entre las Rhizobiaceas. En particular, datos de nuestro laboratorio señalan que la secuencia de pH3 se encuentra presente en los plásmidos simbióticos de diferentes cepas de *Rhizobium etli* e incluso, existe evidencia que demuestra la coexistencia de dos o más plásmidos tipo RepABC en la misma bacteria (Burgos *et al.* 1996; Turner *et al.* 1996; Rigottier-Gois *et al.* 1998). En este punto cabe aclarar que la familia RepABC tiene ocho miembros, siete de los cuales están contenidos en la familia Rhizobiaceae y uno en el género *Paracoccus* (Nishiguchi *et al.* 1987; Tabata *et al.* 1989; Turner y Young 1995; Freiberg *et al.* 1997; Bartosik *et al.* 1998; Susuki *et al.* 1998; Li y Farrand 2000).

Con lo que respecta a las funciones desempeñadas por cada elemento de los replicadores básicos tipo RepABC, únicamente se cuenta con evidencia genética que señala que RepA y RepB están relacionadas con la estabilidad, y que RepC es esencial para la replicación. De acuerdo al análisis hecho con el replicador de *Paracoccus*, los sitios *cis* relacionados con la replicación y con la partición se encuentran dentro del gen de *repC* (Bartosik *et al.* 1998). Con respecto a la regulación de este tipo de replicadores, datos obtenidos por Gallie y colaboradores señalan la existencia de un *locus* localizado curso abajo de *repC* que afecta el número de copias del plásmido; sin embargo, dicho *locus* no se

encuentra en todos los replicadores de esta familia (Gallie et al. 1985).

En los estudios de incompatibilidad entre plásmidos de Rhizobiaceas previamente realizados, se ha encontrado que existe incompatibilidad entre los plásmidos de *Rhizobium*, los de *Agrobacterium* y entre los plásmidos de ambos géneros (O'Connell et al. 1984; Hooykaas et al. 1985; Szgedi y Otten 1998). Los estudios realizados han generado importantes avances en la clasificación de plásmidos de Rhizobiaceas en base a grupos de incompatibilidad, sin embargo, esta clasificación aún es insuficiente pues carece de bases moleculares. Particularmente hablando, las propiedades de incompatibilidad entre miembros de la familia de replicadores RepABC han sido poco estudiada. Así, los plásmidos pTiC58, pTiB6S3 (ambos de *Agrobacterium tumefaciens*) y pTAV1 (de *Paracoccus versutus*) pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, mientras que el plásmido pRiA4b (de *Agrobacterium rhizogenes*) forma parte de otro grupo de incompatibilidad (Hooykaas et al. 1980; Nester y Kosuge 1981; White y Nester 1995). Las bases moleculares de esta característica se encuentran en una fase insipiente de estudio, de tal suerte que sólo se ha definido un determinante de incompatibilidad para la región intergénica que separa a los genes *repB* y *repC* del plásmido pTiB6S3 (Tabata et al. 1989).

A pesar de que existen varios trabajos en los que se han aislado replicones básicos tipo RepABC, muy poco se sabe de la organización funcional y de la regulación de estos replicones. Este trabajo se desarrollo con la finalidad de buscar evidencia que indique cuales son los elementos responsables de la replicación, de la partición, de la regulación de la replicación y la caracterización primaria de las propiedades de incompatibilidad asociadas con los elementos descritos. El modelo de estudio fué el pSim de la cepa CFN42 de *Rhizobium etli*, un miembro de la familia de replicadores RepABC.

## HIPOTESIS

Las hipótesis de trabajo fueron las siguientes:

1. Si RepC es la proteína de inicio de la replicación, una mutación en el gen que la codifica provocará que el plásmido no pueda replicar.
2. Si RepA y RepB están relacionadas con la función de partición, una mutación en los genes *repAB* provocará la inestabilidad del plásmido.
3. El origen de replicación y el centrómero del plásmido deben de corresponder a segmentos de DNA con propiedades de incompatibilidad.
4. Si un sitio *cis* de incompatibilidad es indispensable para la replicación, entonces su delección debe de evitar la replicación del plásmido y, por lo tanto, debe de corresponder al origen de replicación.
5. Si un sitio *cis* de incompatibilidad es necesario para la partición, entonces su delección debe de conferir inestabilidad al plásmido y, por lo tanto, puede funcionar como el centrómero del plásmido.
6. Si las proteínas RepABC están relacionadas con las funciones de replicación y/o partición, entonces deben de funcionar como determinantes de incompatibilidad de acción en *trans*.

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

Estudiar los mecanismos moleculares de la regulación de la replicación del plásmido simbiótico de la cepa CFN42 de *Rhizobium etli*.

### Objetivos particulares.

1. Determinar la organización genética del replicón básico del pSim de CFN42.
2. Analizar las funciones de *repA*, *repB* y *repC*.
3. Localizar el origen de replicación y el centrómero del plásmido.
4. Localizar los determinantes responsables de la incompatibilidad.
5. Describir el sistema de regulación del inicio de la replicación.

**RESULTADOS**

**PARTE I**

**REFERENCIA DEL ARTICULO**



## Structural Elements Required for Replication and Incompatibility of the *Rhizobium etli* Symbiotic Plasmid

MIGUEL A. RAMÍREZ-ROMERO, NORA SOBERÓN, ANGELES PÉREZ-OSGUERA,  
JUAN TÉLLEZ-SOSA, AND MIGUEL A. CEVALLOS\*

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

Received 23 November 1999/Accepted 25 February 2000

The symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CE3 belongs to the RepABC family of plasmid replicons. This family is characterized by the presence of three conserved genes, *repA*, *repB*, and *repC*, encoded by the same DNA strand. A long intergenic sequence (*igs*) between *repB* and *repC* is also conserved in all members of the plasmid family. In this paper we demonstrate that (i) the *repABC* genes are organized in an operon; (ii) the RepC product is essential for replication; (iii) RepA and RepB products participate in plasmid segregation and in the regulation of plasmid copy number; (iv) there are two *cis*-acting incompatibility regions, one located in the *igs* (*inca*) and the other downstream of *repC* (*incβ*) (the former is essential for replication); and (v) RepA is a *trans*-acting incompatibility factor. We suggest that *inca* is a *cis*-acting site required for plasmid partitioning and that the origin of replication lies within *incβ*.

*Rhizobium etli*, like other members of the genus, contains large, low-copy-number plasmids. One of these, the symbiotic plasmid (pSym), carries many of the genes required for the formation of the nitrogen-fixing nodules which characterize the interaction of this bacterium with bean plants. pSym coexists in the same cell with 1 to 10 undercharacterized plasmids also known as "cryptic plasmids." Nevertheless, genes implicated in the synthesis of cellular components or in the utilization of nutrients have been located on some of these plasmids (14, 27).

Several basic replicons of *Rhizobium* and *Agrobacterium* plasmids have been cloned and sequenced: the *Agrobacterium tumefaciens* pTiB6S3, pTiC58, and pTi-SAKURA tumor-inducing plasmids (24, 41, 42); the *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4b root-inducing plasmid (31); the *Rhizobium leguminosarum* pRL8JI cryptic plasmid (43); the *R. etli* p42d symbiotic plasmid (36); the *Rhizobium* sp. pNGR234a symbiotic plasmid (11); and the *Sinorhizobium meliloti* pRmeGR4a plasmid (28). The first seven plasmids belong to the RepABC family and share the same genetic organization and a high degree of sequence identity in the three genes that identify these plasmids. Plasmid pRmeGR4a belongs to the RepC family, which is related to the former because they share a high degree of sequence identity with the *repC* gene, but *repA* and *repB* are not present. It has been shown that plasmids of the RepC family are common in field populations of *Rhizobium* (7, 37, 44).

Recently, a member of the RepABC plasmid family (pTAV320) was isolated from *Paracoccus versutus*, a bacterium unrelated to the *Rhizobiaceae* family, thus raising the possibility of finding this type of plasmid in other  $\alpha$  proteobacteria (4).

Three genes, *repA*, *-B*, and *-C*, are required for the stable replication and adequate partitioning of this plasmid family. The three genes are located in the same DNA strand and in the same order in all members of the family. The RepA and RepB

products are similar to proteins involved in the partitioning of plasmids F and P1 (46). Moreover, mutations in *repA* or *repB* of pTiB6S3 affect plasmid stability. It has been suggested that the products of these genes act as replication enhancers (42), but the data presented do not contradict a role in segregation (8). Also, it has been shown that RepC is the principal initiation protein, since frameshift mutations within the *repC* gene completely abolish replication functions (42). Despite the high degree of sequence identity that they share, plasmids pTiB6S3 and pRiA4b are compatible, and the Rep proteins of the first plasmid are not interchangeable with the corresponding products of the second in complementation tests. This indicates that the Rep proteins are highly specialized and specific (42). A large intergenic sequence (*igs*) is found between *repB* and *repC* in all replicators of the family.

Members of the RepABC plasmid family are unit copy plasmids or very low copy number plasmids. However, sequence analysis has shown that these plasmids do not contain DnaA boxes, at least with the signatures proposed by Schaper and Messer (39) and by Fuller et al. (12), and do not contain repeated sequences (iterons), which are common themes in low-copy-number plasmids.

Incompatibility has been detected between *Rhizobium* plasmids and between *Rhizobium* and *Agrobacterium* plasmids (5, 20, 21, 34, 35). The symbiotic plasmids, unrelated to their host range determinants, can belong to different incompatibility groups (16, 19). Nevertheless, the molecular basis for *Rhizobium* plasmid incompatibility is poorly understood.

The basic replicon of the symbiotic plasmid (p42d) of *R. etli* CE3 belongs, as mentioned above, to the RepABC plasmid family. This basic replicon is contained within a 5.6-kb *Hind*III fragment and confers replication stability on a plasmid normally incapable of replicating in *R. etli* (pSUP202). A recombinant plasmid containing the 5.6-kb *Hind*III fragment introduced into a *recA* derivative of CE3 exhibited incompatibility with p42d and replicated with the same copy number as the symbiotic plasmid. These data indicate that all the sequences of the symbiotic plasmid required for replication, copy number control, stability, and incompatibility reside in this fragment (36). With the aim of elucidating the molecular basis of the incompatibility and replication functions of plasmids of the

\* Corresponding author. Mailing address: Programa de Evolución Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. Phone: 73 11 46 63. Fax: 73 17 55 81. E-mail: mac@cifn.unam.mx.

RepABC family, we report here the identification of the *trans*-acting elements and the *cis*-acting sites required for incompatibility and their relation to replication and segregation.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani medium. *Rhizobium* strains were grown at 30°C in PY medium (32). Antibiotics were added at the following concentrations (in micrograms per milliliter): nalidixic acid, 20; tetracycline, 10; kanamycin, 30; chloramphenicol, 25; and ampicillin, streptomycin, or spectinomycin, 100 or as otherwise indicated.

**Bacterial matings.** pSUP202 and pRK7813 derivatives were introduced into *Rhizobium* using pRK2013 as the helper plasmid. Strains were grown in the proper liquid medium to stationary phase, mixed in a proportion (donor-helper) of 2:1 on PY plates, and incubated at 30°C overnight. The cells were resuspended in fresh PY medium, and serial dilutions were plated on the appropriate selective medium.

**Plasmid profiles.** Profiles of high-molecular-weight plasmids were obtained by the in-gel lysis procedure described by Wheatcroft et al. (45).

**DNA isolation, manipulation, and hybridization.** Genomic DNA was isolated by employing the components and instructions of the DNA-RNA isolation kit (Amersham). Plasmid DNA was isolated as described by Sambrook et al. (38). DNAs were restricted and ligated under the conditions specified by the enzyme manufacturer (Amersham). *Taq* polymerase or elongase (Gibco BRL) was used for PCR. The PCR products were cloned using a pMOSblue T vector kit or a pMOSblue blunt-ended vector kit (Amersham). DNA restriction fragments were separated for hybridizations by electrophoresis in 1% agarose gels, transferred onto Hybond N+ membranes (Amersham), and cross-linked in a UV cross-linker unit (Stratagene).

Hybridizations were performed overnight using [ $\alpha^{32}$ P]dCTP-labeled probes (Megaprime kit; Amersham) under high-stringency conditions (65°C in rapid-hyb buffer [Amersham]). Hybridization signals were detected on X-OMAT-K films (Kodak) in the presence of intensifying screens or in a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

**Plasmid stability.** Plasmid stability was calculated according to the procedure described by Durland and Helinski (10). Briefly, stationary-phase cultures were diluted in fresh medium without selection to give an initial optical density of 0.001 at 620 nm and cultivated for 9, 18, and 31 generations. Samples taken at these times were serially diluted and plated onto solid medium in the absence of selective drugs. One hundred colonies were chosen and picked onto plates with and without the selective antibiotic.

**Plasmid construction.** To identify the elements required for incompatibility and a stable replication of pH3, two collections of subclones, PCR products, and deletion derivatives of pHY were created. One collection, dedicated to identifying elements involved in replication, was constructed in the mobilizable vector pSUP202. This plasmid is unable to replicate in *Rhizobium*. All members of this collection were named with the prefix pRE- followed by the name of the insert. The second collection, made with the aim of identifying incompatibility determinants, was constructed in pRK7813, a vector capable of replicating in *R. etli* (22). The members of this collection were named with the prefix pKRE- and the name of the insert. A description of the construction of each plasmid is given in Table 1, and a scheme of their construction is shown in Fig. 1.

**Plasmid incompatibility.** To determine the incompatibility of the pKRE derivatives, the plasmids were introduced into CFNX101. The plasmid profiles of at least four transconjugants from each cross were analyzed.

**Plasmid replication in *R. etli*.** To determine the replication capabilities of the pRE derivatives in *R. etli*, the plasmids were introduced into CFNX107. The plasmid profiles of at least four transconjugants of each cross were analyzed. A recombinant plasmid was considered to have the capability to replicate in *R. etli* if (i) the plasmid profile of the transconjugants showed a new band and hybridization with pSUP202 and (ii) the new plasmid could be recovered from the transconjugants by transformation or conjugation with *E. coli*.

**Determination of plasmid copy number.** Plasmid copy numbers of CFNX107 transconjugants containing the plasmids pH3, pRE- $\Delta$ A1, pRE-prepA- $\Delta$ B-C, and pRE-prepA-BC were evaluated as follows. Total DNA was isolated, digested with *Hind*III endonuclease, resolved in a 1% agarose gel, and transferred to Hybond N+ membranes (Amersham). The blot was then simultaneously hybridized with a 1.4-kb *Hind*III-*Eco*RI fragment of the chromosomally encoded gene *recA* and with a 1.38-kb PCR product of *repC*. The *recA* probe hybridized with a 1.9-kb fragment, and *repC* hybridized with a fragment ranging between 3.8 and 5.6 kb. Hybridization signals were quantified using a PhosphorImager SI (Molecular Dynamics). The plasmid copy number was calculated as the ratio of the integrated hybridization signal of *repC* (plasmid) and the integrated hybridization signal of *recA* (chromosome).

#### RESULTS

**Replication and stability functions of the pH3 replicator region.** The ability of plasmid pH3 to autonomously and stably

replicate in *R. etli* and *A. tumefaciens* depends on its 5.6-kb *Hind*III insert. This insert contains three open reading frames homologous to the *repA*, *-B*, and *-C* genes found in other plasmids of the RepABC plasmid family (Fig. 1a). To identify the sequences essential for replication and stability, a set of subclones or deletion derivatives of the 5.6-kb *Hind*III insert were ligated into the nonreplicative vector pSUP202 and introduced into an *R. etli recA* strain lacking the symbiotic plasmid (CFNX107). As shown in Fig. 1b, plasmid pRE-MR (containing an insert with the complete *repABC* genes, including 270 bp upstream of *repA* and 500 bp downstream of *repC*) was the only plasmid able to replicate with the same stability as the parental plasmid, pH3. Plasmid pRE-MR contains the shortest insert having the same replicative properties as pH3, indicating that all elements required for stable replication reside within this insert. Plasmid pRE- $\Delta$ A1, a deletion derivative of pH3 which lacks most of the *repA* and *repB* genes, was able to replicate in CFNX107 but was rapidly lost in cultures without selective pressure (Fig. 2). This result indicates that at least one of these gene products is required for plasmid stability. To determine if both proteins participate in plasmid stabilization, two deletion-insertion derivatives of pRE-MR were constructed. The first one (pRE-prepA-BC) is an in-frame deletion-insertion of the *repA* gene in which a segment of 477 nucleotides has been replaced with a *Bam*HI site. The deleted segment includes the nucleotides encoding the ATP binding motif characteristic of this protein family (30). The second construct (pRE-prepA- $\Delta$ B-C) is an in-frame deletion-insertion of the *repB* gene in which a segment of 192 nucleotides has been replaced with a *Bam*HI site. Although these constructs are able to replicate in CFNX107, they were highly unstable, to an even greater extent than the *repAB* deletion derivative (Fig. 2). These results suggest that both the RepA and RepB products are required to promote stable replication.

To evaluate the role of RepC in replication, an  $\Omega$ Km interposon was introduced into the *Bgl*II restriction site located within the *repC* gene of pH3. The mutant plasmid (pRE-repC $\Omega$ Km) was unable to replicate in CFNX107, indicating that RepC is essential for replication.

The *repA*, *repB*, and *repC* genes are organized in a single operon. The *repA*, *-B*, and *-C* genes are encoded by the same DNA strand and contain two putative Shine-Dalgarno sequences, one located in the 5' end of *repA* and the other in the 5' end of *repC*, within the large intergenic sequence between *repB* and *repC*. This genetic arrangement suggests that the *repA*, *repB*, and *repC* genes are organized in a single operon. However, regions containing the *E. coli*  $\sigma^{70}$  promoter consensus [TTGACA(N<sub>17</sub>)TATAC/AA/T] were not found in the pH3 insert (17).

To determine if these genes are organized in a single operon, a genetic approach was followed. As mentioned above, *repA* and *repB* are not essential for replication while *repC* is indispensable for replication. As shown in Fig. 1b, a pSUP202 derivative (pRE-S1) containing the 3' end of *repB* and the complete *repC* gene and its downstream region is unable to replicate in *R. etli*, indicating that *repC* lacks a promoter of its own. A pH3 derivative (pRE- $\Delta$ S1.2) lacking the 5' end of *repA* and its upstream region is unable to replicate in *R. etli* as a result of a polar effect of this deletion on *repC*.

Plasmid pRE-MR replicates in *R. etli* as well as pH3, but the replacement of an internal fragment of *repA* or *repB* by an  $\Omega$ Km cassette (pRE-repA $\Omega$ Km and pRE-repB $\Omega$ Km, respectively) eliminates the replication of these constructions, indicating a polar effect on *repC* (Fig. 1b). Together, these data indicate that the *repABC* genes are arranged in a single operon.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant properties <sup>a</sup>	Reference
<i>E. coli</i>		
HB101	Host strain for plasmids	6
DH5 $\alpha$	Host strain for plasmids	18
<i>R. etli</i>		
CE3	Sm <sup>r</sup> ; nodulates <i>P. vulgaris</i>	32
CFNX101	<i>recA</i> :: $\Omega$ Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> ; derivative of CE3	25
CFNX107	<i>recA</i> :: $\Omega$ Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> p42a <sup>-</sup> p42d <sup>-</sup> ; derivative of CE3	25
Plasmids		
pRK7813	Tc <sup>r</sup> ; RK2-based plasmid vector	22
pRK2013	Helper plasmid; Km <sup>r</sup>	9
pSUP202	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; ColE1 origin; unable to replicate in <i>Rhizobium</i> spp.	40
pBSL128	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; contains an $\Omega$ Km cassette	2
pH3	pSUP202 derivative carrying a 5.6-kb <i>Hind</i> III fragment containing the basic replicon of p42d	36
pHY	pBluescript II SK(+) derivative carrying a 5.6-kb <i>Hind</i> III fragment containing the basic replicon of p42d	36
pRE-S1	pSUP202 derivative carrying a 2.4-kb <i>Sall</i> - <i>Hind</i> III fragment	This work
pRE- $\Delta$ X1	pSUP202 derivative in which the <i>Xho</i> I internal fragment of the 5.6-kb <i>Hind</i> III insert was deleted (from nucleotide 3235 to 4170) <sup>b</sup>	This work
pRE- $\Delta$ A1	pSUP202 derivative in which two contiguous <i>Aat</i> II internal fragments of the 5.6-kb <i>Hind</i> III insert were deleted; the deletions eliminate a portion of the <i>repA</i> and <i>-B</i> genes (between nucleotides 1187 and 3124)	This work
pRE- $\Delta$ S1.2	pSUP202 derivative in which two contiguous <i>Sall</i> internal fragments of the 5.6-kb <i>Hind</i> III insert were deleted; the deletion eliminates the 3' end of the <i>repA</i> gene and its downstream region (between nucleotides 358 and 1314)	This work
pRE-MR	pSUP202 derivative containing the complete <i>repABC</i> genes; the segment was generated by PCR and carries nucleotides 793 to 5084	This work
pRE-prep $\Delta$ A-BC	pSUP202 derivative containing the same insert as plasmid pRE-MR but with an in-frame deletion-insertion in the <i>repA</i> gene; the DNA sequence between nucleotides 1200 and 1667 inside the <i>repA</i> gene was replaced by a <i>Bam</i> HI restriction site; the insert was generated by ligating two PCR products in the correct direction; the first includes nucleotides 793 to 1200, and the second includes nucleotides 1667 to 5084	This work
pRE-prepA- $\Delta$ B-C	pSUP202 derivative containing the same insert as plasmid pRE-MR but with an in-frame deletion-insertion in the <i>repB</i> gene; the DNA sequence between nucleotides 2392 and 2586 inside the <i>repB</i> gene was replaced by a <i>Bam</i> HI restriction site; the insert was generated by ligating two PCR products in the correct direction; the first includes nucleotides 793 to 2392, and the second includes nucleotides 2586 to 5084	This work
pRE- $\Delta$ in $\alpha$	pSUP202 derivative containing the same insert as plasmid pRE-MR but with the intergenic sequence between <i>repB</i> and <i>repC</i> replaced by a <i>Bam</i> HI restriction site; the insert was generated by ligating two PCR products in the correct direction; the first encompasses nucleotides 793 to 3299, and the second includes nucleotides 3455 to 5084	This work
pRE- $\Delta$ inc $\beta$	pSUP202 derivative containing the same insert as plasmid pRE-MR but in which the sequence downstream of <i>repC</i> was eliminated; the segment was generated by PCR and carries nucleotides 793 to 4660	This work
pRE-repC $\Omega$ Km	pSUP202 derivative with the same insert as pH3 but in which the <i>repC</i> gene was interrupted by an $\Omega$ Km cassette (pBSL128 was the $\Omega$ Km cassette donor); the cassette was introduced by utilizing a <i>Bgl</i> II restriction site within the <i>repC</i> gene	This work
pRE-repB $\Omega$ Km	pSUP202 derivative with the same insert as plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C but with an $\Omega$ Km cassette inserted in the <i>Bam</i> HI site located within the remaining sequence of <i>repB</i> (pBSL128 was the $\Omega$ Km cassette donor)	This work
pRE-repA $\Omega$ Km	pSUP202 derivative with the same insert as plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C but with an $\Omega$ Km cassette inserted in the <i>Bam</i> HI site located within the remaining sequence of <i>repA</i> (pBSL128 was the $\Omega$ Km cassette donor)	This work
pKRE-1	pRK7813 derivative with the same insert as pH3	This work
pKRE-prepAB	pRK7813 derivative containing the complete <i>repAB</i> genes; the segment was generated by PCR and carries nucleotides 793 to 3299	This work
pKRE-inc $\beta$	pRK7813 derivative with an <i>Eco</i> RI fragment of 502 bp ( <i>inc</i> $\beta$ )	This work
pKRE-in $\alpha$	pRK7813 derivative containing the intergenic sequence between <i>repB</i> and <i>-C</i> genes ( <i>in</i> $\alpha$ )	This work
pKRE-S3	pRK7813 derivative with a 959-bp <i>Sall</i> fragment, including the upstream region and 5' end of <i>repA</i>	This work
pKRE-repAB	pRK7813 derivative containing the complete <i>repAB</i> genes but excluding the upstream region of <i>repA</i> ; the segment was generated by PCR and carries nucleotides 1063 to 3299	This work
pKRE-repC	pRK7813 derivative containing the sequence corresponding to the open reading frame of <i>repC</i>	This work
pKRE-prep $\Delta$ A-B	pRK7813 derivative containing a PCR product obtained from plasmid pRE-prep $\Delta$ A-BC; the insert contains <i>repB</i> and the same deletion in the <i>repA</i> gene as plasmid pRE-prep $\Delta$ A-BC but lacks <i>in</i> $\alpha$ , <i>repC</i> , and <i>inc</i> $\beta$	This work
pKRE-prepA- $\Delta$ B	pRK7813 derivative containing a PCR product obtained from plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C; the insert contains <i>repA</i> and the same deletion on the <i>repB</i> gene as plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C but lacks <i>in</i> $\alpha$ , <i>repC</i> , and <i>inc</i> $\beta$	This work
pKRE-prepA	pRK7813 derivative containing the complete <i>repA</i> gene, including the upstream region; the segment was generated by PCR and carries nucleotides 793 to 2277	This work

<sup>a</sup> Plasmid derivative descriptions use nucleotide numbers of the sequence of pH3 as coordinates.<sup>b</sup> GenBank accession number U80928.

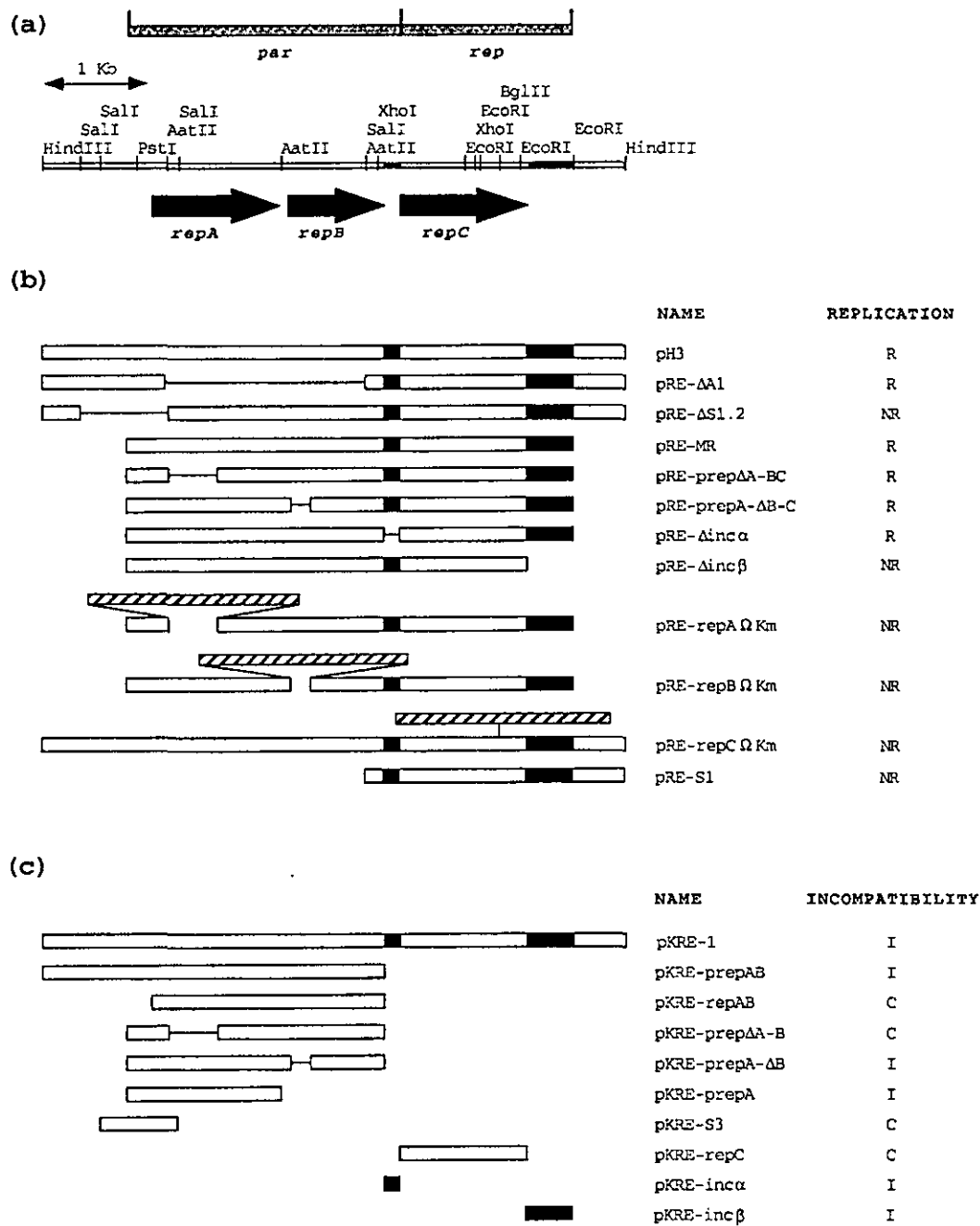


FIG. 1. Replication capabilities and incompatibility properties of pH3. (a) Restriction map of the pH3 insert. The shaded bar indicates regions involved in partition and replication. The orientations of the three open reading frames are indicated by arrows. The solid boxes indicate the locations of the *cis*-acting regions, which exhibit incompatibility with the symbiotic plasmid. (b) The open boxes represent the DNA inserts contained in each plasmid derivative. The thin lines connecting the open boxes indicate the DNA regions lost in the deletion derivatives. The hatched boxes represent  $\Omega$ Km cassettes. In the column labeled "replication," R indicates that the plasmid derivative has the ability to replicate in the *R. etli* strain CFNX107, and NR indicates that the plasmid is unable to replicate in this strain. (c) The open boxes represent the DNA inserts contained in each plasmid derivative. The thin lines between the open boxes indicate the DNA regions lost in the deletion derivatives. In the column labeled "incompatibility," I indicates that the plasmid derivative is incompatible with pSym of *R. etli* strain CFNX101, and C indicates that the construct is compatible with pSym of *R. etli* strain CFNX101. The solid boxes indicate the positions of the DNA regions containing *cis*-acting incompatibility determinants.

**RepA and RepB are involved in the control of plasmid copy number.** Plasmid copy number is one factor that influences plasmid stability. Plasmid pH3 in *R. etli* has the same copy number (between one and two copies per chromosome) as its parental plasmid, pSym. However, plasmid derivatives lacking most of the *repA* and *repB* genes (pRE- $\Delta$ A1), or with an in-frame deletion of *repA* (pRE-prep $\Delta$ A-BC) or *repB* (pRE-prepA-

$\Delta$ B-C), are unstable. To determine if this instability is the result, at least in part, of a diminished plasmid copy number, the plasmid/chromosome ratios of strains CFNX107(pRE- $\Delta$ A1), CFNX107(pRE-prep $\Delta$ A-BC), and CFNX107(pRE-prepA- $\Delta$ B-C) were determined (Fig. 3). Plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C contained  $3.1 \pm 0.98$  plasmid copies per chromosome, slightly more than pH3 ( $1.9 \pm 0.09$  copies per chromosome), and

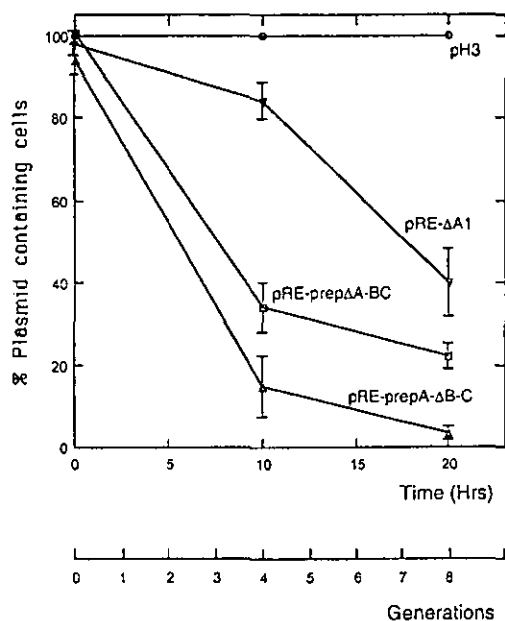


FIG. 2. Plasmid stability. Plasmid loss from populations of cells carrying different constructions with chloramphenicol resistance genes. O, CFNX107 cells carrying plasmid pH3;  $\square$ , CFNX107 cells carrying plasmid pRE-prep $\Delta$ A-BC;  $\nabla$ , CFNX107 cells carrying plasmid pRE- $\Delta$ A1;  $\Delta$ , CFNX107 cells carrying plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C. The graph shows the plasmid retention means ( $\bar{x}$ ) of three independent experiments  $\pm$  the standard deviations.

plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C contained  $1 \pm 0.02$  copies per chromosome. Surprisingly, plasmid pRE- $\Delta$ A1 had a copy number ( $6.4 \pm 0.04$  plasmid copies per chromosome) three times higher than that of pH3. These results indicate that RepA and RepB are involved in the control of the plasmid copy number.

**cis-acting sites required for incompatibility.** Incompatibility is defined as the inability of two different plasmids to reside in the same cell as independent replicons in the absence of selective pressure as a consequence of sharing similar replication and/or partition systems. To identify the incompatibility determinants present in pH3, several restriction fragments, PCR products, or deletion derivatives of the pH3 insert were subcloned in pRK7813 and introduced into CFNX101 (a *recA* derivative of the wild-type strain). Plasmid pRK7813 was chosen because it is a multicopy plasmid (two to seven copies per cell) capable of replicating in *R. etli* and because it is compatible with the six plasmids present in the *R. etli* wild-type strain. The incompatibility properties of these derivatives were evaluated by plasmid profile analysis. A DNA fragment was considered to exhibit incompatibility if its introduction into CFNX101 (i) caused the displacement of the symbiotic plasmid or (ii) induced the cointegration of the symbiotic plasmid with another cognate plasmid. The latter situation was interpreted as a result of the symbiotic plasmid's inability to survive as an independent replicon under selective pressure. A summary of the results is shown in Fig. 1c.

Plasmid pKRE-1 carrying the 5.6-kb *Hind*III fragment exhibits incompatibility with the symbiotic plasmid to the same extent as pH3, although its replication does not necessarily depend on itself. All constructs containing the intergenic sequence located between *repB* and *-C* or constructs harboring the 500-bp *Eco*RI fragment located immediately downstream of *repC* exhibited incompatibility with the symbiotic plasmid (Fig. 1c and data not shown). Moreover, a pRK7813 derivative harboring a PCR product containing no more than the intergenic sequence and a pRK7813 derivative containing only the

0.5-kb *Eco*RI fragment downstream of *repC* were incompatible with the symbiotic plasmid. These results clearly indicate that the replicator of the symbiotic plasmid contains two incompatibility regions, one located within the intergenic region between the *repB* and *-C* genes (*inc $\alpha$* ) and the other (*inc $\beta$* ) located within the *Eco*RI fragment downstream of *repC*. Neither of these regions encodes any protein, suggesting that they are *cis*-acting sites for incompatibility and probably targets for proteins involved in replication and/or partitioning. It is important to point out that a pRK7813 derivative containing the promoter of the *repABC* operon (pKRE-S3) is unable to exhibit incompatibility with the symbiotic plasmid. Similarly, constructions carrying only the open reading frames of the *repA*, *-B*, and *-C* genes do not exhibit incompatibility with the symbiotic plasmid, indicating that these regions do not carry other *cis*-acting incompatibility regions.

**RepA is a trans-acting element required for incompatibility.** To test whether the RepA and/or *-B* products exhibit incompatibility with the symbiotic plasmid, these proteins were supplied in *trans* from a multicopy vector (pRK7813). Different constructions containing the *repAB* genes but lacking the *inc $\alpha$*  and *inc $\beta$*  DNA regions were introduced into CFNX101. Transconjugant plasmid profiles were examined to determine incompatibility with the symbiotic plasmid. Figure 1c shows a scheme of the construction and a summary of the incompatibility results. Plasmid pKRE-prepAB, carrying the 270-bp *repA* upstream region and the complete *repA* and *-B* genes, displaced the symbiotic plasmid.

Plasmids containing only the *repA* upstream sequences or carrying only the *repA* and *-B* genes without the *repA* upstream region were unable to induce incompatibility with the symbiotic plasmid. Thus, the expression of the *repA* and/or *repB* gene is required to induce incompatibility. To determine if both or only one of the gene products was required for incompatibility, plasmids harboring (i) the *repA* gene with its upstream region (pKRE-prepA), (ii) the upstream *repA* region and the *repA* and *-B* genes but with *repA* containing an internal deletion (pKRE-prep $\Delta$ A-B), and (iii) the upstream *repA* region and the *repA* and *-B* genes but with *repB* containing an internal deletion (pKRE-prepA- $\Delta$ B) were introduced into CFNX101. Plasmid profile analysis of the transconjugant showed that constructions containing the complete *repA* gene were incompatible with the symbiotic plasmid, indicating that RepA but not RepB is needed to induce incompatibility.

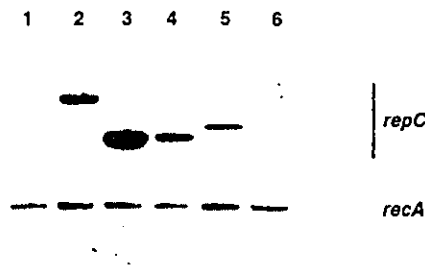


FIG. 3. Plasmid copy number. Autoradiogram of a Southern blot of total DNA digested with *Eco*RI and *Hind*III and probed simultaneously with a chromosomal detector (*recA*) and with a *repC* detector. The plasmid copy number of each strain was calculated as the ratio of the integrated hybridization signal of *repC* (plasmid) and the integrated hybridization signal of *recA* (chromosome). Lane 1, CFNX107; lane 2, CFNX107(pH3); lane 3, CFNX107(pRE- $\Delta$ A1); lane 4, CFNX107(pRE-prep $\Delta$ A-BC); lane 5, CFNX107(pRE-prepA- $\Delta$ B-C); and lane 6, CFNX107.

The *cis*-acting incompatibility region and its relation with replication and/or partitioning. The *inca* and *incβ* sites are potential targets for replication, partitioning, or regulatory proteins. Reasoning that the origin of replication is essential for plasmid existence but that the partition site and regulation sites are dispensable in the short term, we constructed plasmid derivatives containing the *repA*, *-B*, and *-C* genes but lacking the *incβ* region or the *inca* intergenic sequence (pRE-Δ*incβ* and pRE-Δ*inca*, respectively) and crossed them with CFNX107. Transconjugants were exclusively obtained with derivatives lacking *inca* and only when a low concentration (15 μg ml<sup>-1</sup>) of the selective antibiotic was used. Plasmid profile analysis of these transconjugants showed the presence of the construct as an independent entity, indicating that the new plasmid was capable of autonomous replication but was highly unstable. These data indicate that *incβ* is essential for replication and that the intergenic sequence between the *repB* and *repC* genes (*inca*) contains a sequence involved in the stable replication of the symbiotic plasmid (a possible interaction site for the RepA and/or RepB protein) (Fig. 1b).

### DISCUSSION

The minimal DNA fragment that the symbiotic plasmid of *R. etli* CE3 requires for stable replication and incompatibility is 4.3 kb. This size lies within the range of the 5 kb reported for plasmid pRL8JI (43) and the 4.2 kb reported for pTiB6S3 (42), which are members of the RepABC plasmid family.

In this work, the roles of the proteins encoded by the basic replicon of the symbiotic plasmid were determined. RepC is essential for replication, because an insertion of a ΩKm cassette in the *repC* gene abolished the replication ability of pH3. In plasmids pTiB6S3 and pTAV230, members of the RepABC plasmid family, it was also demonstrated that RepC is the limiting factor for replication and, accordingly, RepC was considered the initiator protein (4, 42). Derivatives of pH3 lacking most of the *repA* and *repB* genes or carrying an in-frame deletion of *repA* or *repB* showed reduced stability, indicating that each of these genes has a role in the stability of the pSym basic replicon. A plasmid harboring the *repB* deletion is significantly less stable than the plasmid derivative with *repA* deleted, and this construction is less stable than a plasmid lacking most of the *repA* and *repB* genes. These findings can be interpreted in two ways: first, that these plasmid derivatives have defects in the segregation machinery, and second, that these plasmids have a reduction in the frequency of the initiation of replication. To choose between the two interpretations, the plasmid copy numbers of these deletion derivatives were determined and compared with the plasmid copy number of the parental plasmid (pH3). Plasmid derivatives with an in-frame deletion of *repA* had slightly higher copy numbers than the parental plasmid. On the other hand, a pH3 derivative with a deletion of *repB* has a plasmid copy number similar to that of pH3, indicating that the frequency of initiation is not reduced; thus, we concluded that RepA and RepB are part of the plasmid segregation machinery. Furthermore, RepA and RepB products are homologous to the proteins of the *sop/par* family of partition systems, and the relative positions of the genes coding for these products are similar to those of the *sop/par* family (46).

The best-studied members of the *sop/par* family are the partition systems of the F and P1 plasmids (*sop* and *par*, respectively). Each system consists of two polypeptides (A and B), encoded by a single operon, and a *cis*-acting site. The gene encoding A precedes that encoding B, and the *cis*-acting site (centromerelike site) is located immediately downstream of

the B gene. Both proteins participate in the autoregulation of the operon and, together with the centromerelike site, in plasmid partitioning (46).

Genetic evidence indicates that the *repA*, *-B*, and *-C* genes are organized in a single operon: a pH3 deletion derivative lacking the 5' end of *repA* and its upstream sequence was unable to replicate in *R. etli*, indicating that the promoter of the replicator genes is located upstream of *repA*. Moreover, insertion derivatives with ΩKm cassettes, but not in-frame deletions of *repA* or *repB*, were unable to replicate, indicating a polar effect of these insertions on *repC*. This is an unusual situation, in which genes implicated in partition and in replication are organized in the same operon.

Transconjugants containing plasmid pRE-ΔA1 contain more plasmid copies than transconjugants containing pH3 or plasmid derivatives with in-frame deletions of the *repA* or *repB* gene, suggesting that the *repA* and *repB* products act together to regulate the plasmid copy number. Currently, we are testing the simplest hypothesis, namely, that RepA and RepB repress operon transcription and consequently the quantity of RepC, the initiator protein, so that plasmids lacking the RepA and RepB products will be increased in copy number. An explanation for the increased stability observed for plasmid pRE-ΔA1 compared with that of the deletion derivatives of *repA* and *repB* is that the elevated copy number of pRE-ΔA1 partially compensates for defects in partition.

Plasmid pH3 exhibits incompatibility with the symbiotic plasmid when introduced into an *R. etli recA* strain. Two small DNA regions within the pH3 insert exhibited incompatibility when they were introduced into a replicable vector. One is located in the intergenic sequence between *repB* and *repC* (*inca*), and the other is located within a 500-bp *EcoRI* fragment downstream of *repC* (*incβ*). Neither of these is a coding region, suggesting that they are *cis*-acting sites for partitioning and/or replication. A comparative sequence analysis of *inca* and *incβ* did not show any obvious similarity between them, and repetitive sequences were not found within or between them. A possible explanation is that the factor(s) interacting with *inca* is different from those interacting with *incβ*.

A functional origin of replication is an essential feature of a plasmid but, in the short term, the *cis*-acting partitioning site is dispensable. Our results showed that only plasmids lacking *inca* were capable of replication, although they were very unstable. As *incβ* appears to be indispensable for plasmid replication and deletion of *inca* produced a replicable but unstable plasmid, we tentatively conclude that the origin of replication resides within *incβ* and *inca* is a *cis*-acting partitioning site. From this assumption it follows that the *cis*-acting partitioning site is located immediately downstream of *repB*, which is precisely the situation found in members of the *sop/par* partition system family. The *cis*-acting sites for partitioning of the P1 and F plasmids are also incompatibility determinants (3, 15, 33).

In contrast, for pTAV320, the most divergent member of the RepABC plasmid family, it was shown that it is possible to obtain transconjugants of a tetracycline-resistant construct containing the *repC* coding sequence under the control of the *lac* promoter in a strain lacking the parental plasmid (4). It was concluded that the origin of replication resides within the coding sequence of the *repC* gene. However, the *repC* coding region of pH3 does not exhibit incompatibility with the symbiotic plasmid, which would be expected if an origin of replication, controlled by an initiation protein, resided within the *repC* gene. This may indicate that the *repC* coding region contains an accessory origin of replication or that these two plasmids, despite their sequence homology, contain origins of rep-

lication located in different positions. To obtain a definitive answer, we are currently mapping the origin of replication of pH3 by two-dimensional agarose gel electrophoresis (26).

In plasmids F and P1, an overexpression of polypeptides A or B induces incompatibility as a result of abnormal DNA-protein complexes formed between the A and B polypeptides and their respective centromerelike DNA sequences or by the overrepression that the A and B products exert on the transcription of their respective operons (1, 8, 13, 23, 29). In the *R. elii* symbiotic plasmid, the RepA product was identified as a *trans*-acting incompatibility determinant, because the reintroduction of extra copies of the *repA* gene, under the control of its own promoter, caused displacement of the symbiotic plasmid. In contrast, extra copies of the *repB* gene did not exhibit incompatibility with the symbiotic plasmid. This behavior can be explained in a way similar to that for the F and P1 plasmids: (i) an excess of RepA forms an abnormal DNA-protein complex between the partition site and RepA and RepB or (ii) RepA is the principal repressor of the system, and thus, an excess of RepA blocks the transcription of the initiator protein and in this way induces incompatibility with the symbiotic plasmid. This experiment does not exclude the possibility that, by utilizing higher doses of RepB, an effect on incompatibility could be observed.

In summary, we have found that (i) RepC is essential for replication, (ii) the lack of *repA* and/or *repB* products destabilizes plasmid partitioning, (iii) the lack of the RepA and B products increases the plasmid copy number, (iv) the *repA*, *-B*, and *-C* genes are organized as an operon, (v) RepA is an incompatibility determinant, and (vi) plasmid pH3 contains two *cis*-acting incompatibility regions, one indispensable for replication (*incβ*) and the other dispensable in the short term but required for stability (*incα*). We propose, as a working hypothesis, that (i) the RepA and *-B* products and their *cis*-acting site, *incα*, are part of the segregation machinery of the symbiotic plasmid, (ii) RepC is the initiator protein and interacts with the origin of replication, probably located within *incβ*, and (iii) RepA and *-B* also act as repressors of the *repABC* operon and regulate the amount of RepC produced and, as a result, the rate of initiation of plasmid replication.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank David Romero and Michael Dunn for their critical comments and Patricia Bustos and Rosa Angélica Rivas for their skillful technical support. We also thank Paul Gaytán and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides.

This work was supported by CONACyT grant 27850N and by DGAP-PAPIIT grant IN214398.

#### REFERENCES

1. Abeles, A. L., S. A. Fredman, and S. J. Austin. 1985. Partition of unit-copy miniplasmid to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region. *J. Mol. Biol.* 185:261-272.
2. Alexeyev, M. F., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion insertion mutagenesis. *Gene* 160:63-67.
3. Austin, S., and A. Abeles. 1983. Partition of unit-copy miniplasmid to daughter cells. II. The partition region of miniplasmid P1 encodes an essential protein and a centromere-like site at which it acts. *J. Mol. Biol.* 169:373-387.
4. Bartosik, D., J. Baj, and M. Włodarczyk. 1998. Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology* 144:3149-3157.
5. Beynon, J. L., J. E. Beringer, and A. W. B. Johnston. 1980. Plasmid and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J. Gen. Microbiol.* 120:421-429.
6. Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
7. Burgos, P. A., E. Velázquez, and N. Toro. 1996. Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in Rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:843-849.
8. Davis, M. A., L. Radnedge, K. A. Martin, F. Hayes, B. Youngren, and S. J. Austin. 1996. The P1 ParA protein and its ATPase play a direct role in the segregation of plasmid copies to daughter cells. *Mol. Microbiol.* 21:1029-1036.
9. Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski. 1980. Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7347-7351.
10. Durland, R. H., and D. R. Helinski. 1987. The sequence encoding the 43-kilodalton *trfA* is required for efficient replication or maintenance of minimal RK2 replicons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plasmid* 18:164-169.
11. Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394-401.
12. Fuller, R. S., B. E. Funnell, and A. Kornberg. 1984. The DnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal origin (*oriC*) and other sites. *Cell* 38:889-900.
13. Funnell, B. E. 1988. Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmid containing the centromere *parS*. *J. Bacteriol.* 170:954-960.
14. García-de los Santos, A., S. Brom, and D. Romero. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:119-125.
15. Gardner, R. C., L. Malcolm, P. L. Bergquist, and H. E. Lane. 1982. *incD*, a genetic locus in F responsible for incompatibility with several plasmids of the *incF* group. *Mol. Gen. Genet.* 188:345-352.
16. Geniaux, E., and N. Amarger. 1993. Diversity and stability of plasmid transfer in isolates from a single field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102:251-260.
17. Greener, A., S. M. Lehman, and D. R. Helinski. 1992. Promoters of the broad host range plasmid RK2: analysis of transcription (initiation) in five species of Gram-negative bacteria. *Genetics* 130:27-36.
18. Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-560.
19. Hooykaas, P. J. J., A. A. N. van Brussel, H. den Dulk-Ras, G. M. S. von Slogteren, and R. A. Schilperoort. 1981. Sym-plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature (London)* 291:351-353.
20. Hooykaas, P. J. J., H. den Dulk-Ras, A. J. G. Regensburg-Tuinck, A. A. N. van Brussel, and R. A. Schilperoort. 1985. Expression of a *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid in *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens*: incompatibility with a *R. trifolii* Sym plasmid. *Plasmid* 14:47-52.
21. Hynes, M. F., R. Simon, and A. Pühler. 1985. The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAt C58. *Plasmid* 13:99-105.
22. Jonathan, D. G., and N. Gutterson. 1987. An efficient mobilizable cosmid vector. pRK7813, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens* strain HV37a. *Gene* 61:299-306.
23. Kusukawa, N., H. Mori, A. Kondo, and S. Hiraga. 1987. Partitioning of F plasmid: overproduction of an essential protein for partition inhibits plasmid maintenance. *Mol. Gen. Genet.* 208:365-372.
24. Li, P., and S. K. Farrand. 2000. The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing system. *J. Bacteriol.* 182:179-188.
25. Martínez-Salazar, J., D. Romero, M. L. Girard, and G. Dávila. 1991. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bacteriol.* 173:3035-3040.
26. Martín-Parras, L., P. Hernández, M. L. Martínez-Robles, and J. B. Schwartzman. 1991. Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 220:843-853.
27. Mercado-Blanco, J., and N. Toro. 1996. Plasmids in Rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:535-545.
28. Mercado-Blanco, J., and J. Olivares. 1994. The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid* 32:75-79.
29. Mori, H., A. Kondo, A. Ohshima, T. Ogura, and S. Hiraga. 1986. Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J. Mol. Biol.* 192:1-15.
30. Motallebi-Veshareh, M., D. A. Rouch, and C. M. Thomas. 1990. A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 4:1455-1463.
31. Nishiguchi, R., M. Takanami, and A. Oka. 1987. Characterization and sequence determination of the hairy root inducing plasmid pRIA4b. *Mol. Gen. Genet.* 206:1-8.
32. Noel, K. D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
33. Novick, R. P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51:381-395.
34. O'Connell, M. P., D. Dowling, J. Neilan, R. Simon, L. K. Dunican, and A. Pühler. 1984. Plasmid interactions in *Rhizobium*: incompatibility between symbiotic plasmids, p. 713. In C. Veeger and W. E. Newton (ed.), *Advances*

- in nitrogen fixation research—1985. Nijhoff Junk, The Hague, The Netherlands.
35. O'Connell, M. P., M. F. Hynes, and A. Puehler. 1987. Incompatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and Ri plasmid of *Agrobacterium*. *Plasmid* 18:156-163.
  36. Ramírez-Romero, M. A., P. Bustos, M. L. Girard, O. Rodríguez, M. A. Cevallos, and G. Dávila. 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* 143:2825-2831.
  37. Rigottier-Gois, L., S. L. Turner, J. P. W. Young, and N. Amarger. 1998. Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmid and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. *Microbiology* 144:771-780.
  38. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  39. Schaper, C., and W. Messer. 1995. Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J. Biol. Chem.* 270:17622-17626.
  40. Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
  41. Suzuki, K., N. Ohta, Y. Hattori, M. Uraji, A. Kato, and K. Yoshida. 1998. Novel structural difference between nopaline- and octopine-type *irbJ* genes: construction of genetic and physical map and sequencing of *irb/traI* and *rep* gene clusters of a new Ti plasmid pTi-SAKURA. *Biochim. Biophys. Acta* 1396:1-7.
  42. Tabata, S., P. J. J. Hooykaas, and A. Oka. 1989. Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J. Bacteriol.* 171:1665-1672.
  43. Turner, S. L., and J. P. W. Young. 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8J1. *FEMS Microbiol. Lett.* 133:53-58.
  44. Turner, S. L., L. Rigottier-Gois, R. S. Power, N. Amarger, and J. P. W. Young. 1996. Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 142:1705-1713.
  45. Wheatcroft, R., G. D. McRae, and R. W. Miller. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:9-17.
  46. Williams, D. R., and M. T. Thomas. 1992. Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 138:1-16.



RESULTADOS

PARTE II

RESULTADOS ADICIONALES

### Análisis de la secuencia de las regiones *cis* de incompatibilidad.

Los resultados presentados en el artículo señalan la existencia de dos determinantes de incompatibilidad de acción en *cis* llamados *inc $\alpha$*  e *inc $\beta$* . De acuerdo a la información bibliográfica disponible, para que una región no codificante ejerza incompatibilidad, debe de contener sitios de unión para alguna de las proteínas de replicación o de partición. Con la finalidad de identificar posibles sitios de unión para dichas proteínas, se analizó la secuencia de las regiones *inc* y se encontró que en *inc $\alpha$* , además del motivo AAAAGAAA previamente reportado, existen dos pares de secuencias directas repetidas, un par de 7 nucleótidos y el otro de 5, todos contenidos en una región de 56 pb (Figura 1A). Con respecto a *inc $\beta$* , se identificó a 40 pb del término de *repC* una secuencia palindrómica perfecta de 16 pb, la cual se localiza en una región cuyo contenido de GC (45.5 %) es significativamente inferior al promedio de todo *inc $\beta$*  (58.33 %) (Figura 1B).

A

```
CCCGC AAAAGAAA GAGCTCCCTCAACGTCGCCGTCGTGGAAGCCCTTCTGTCTCTGTAGCAAGAA
CAGAATCGCATTTCCTCGAATCCTCGTCAAGAGTCTTTGGCGCCGTTTGGTGAGCGAATTCCTT
TGCCTGCTGAAAGGTGAGAGACA
```

B

```
GAATTCTCGCTTGGCCCGATGATAATGGCGTTGTTGAAGGCCAACGGCAAGGCGGTTTGAGGGCT
GGGTAAGTGC GGCTGATCGTTATTCCTGCCGTTGAGGATTCG GTT GTGGTCAGCTGACCAC CAAG
CTAACCTCTTGGAAAACACCAACTTTCAAAGGCGGCTTGTCGCAGGCATTGTGCCGGTTACCGTCT
GGTCCCGAGCCAAATGACGCCTCTTAGGGGAACAGTAGACCGTGATCTCAATACGAACGCGCCCA
AGGTCGCGCACGAACAAGACCAGGAGCGAAGTCTTCGCACGAAATGGCAGCCGCCTTTCATCAATT
CATTTGGCACC GCGCGGCAAATCGCAAGGCGGCCGGCTGTGCCGGCTAATCGCGAGTGGGCGATGG
CGCCGCATGGATAGGACGCAATAGGAACA ACTACCTGCTGCCATCCGCAGCGCCGGAATCTACGGG
GCTGATTGCGCGCGGCACTTCCACAACACTGGGAGAATTC
```

Figura 1. Análisis de la secuencia de las regiones *inc $\alpha$*  e *inc $\beta$* . A: *inc $\alpha$* . El rectángulo señala una secuencia presente en todos los replicadores *repABC*. Las flechas señalan secuencias directas repetidas; B: *inc $\beta$* . El rectángulo señala la posición de una secuencia palindrómica. La flecha señala el término del gen *repC*. La barra negra señala una región rica en AT.

## Análisis de la regulación de la replicación.

El plásmido simbiótico de *R. etli*, cepa CFN42, se clasifica como de bajo número de copias (1 a 2 por cromosoma). En teoría, los plásmidos con este número de copias pueden controlar su replicación a través de la síntesis de inhibidores de la replicación, ocultando al *ori*, o regulando negativamente la transcripción de la proteína de inicio.

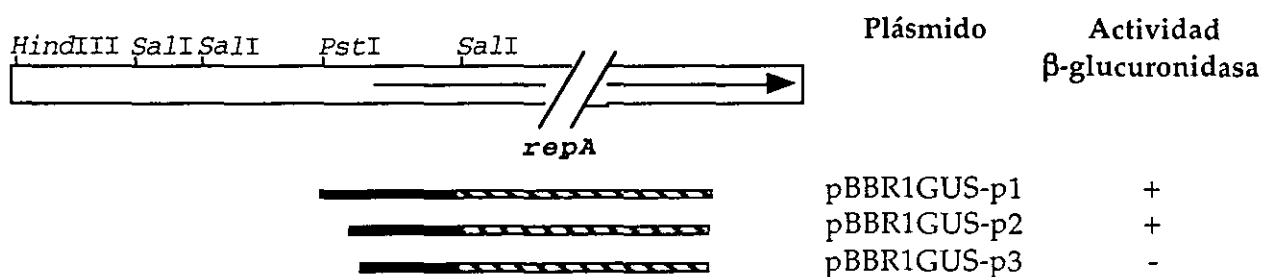
Debido a que el mecanismo de control de la replicación más ampliamente usado es la regulación transcripcional de la proteína de inicio, se decidió probar si la replicación de pH3 es controlada por dicho mecanismo. La estrategia y los resultados obtenidos para probar esta hipótesis se presentan a continuación. Las cepas y los plásmidos usados se presentan en la Tabla 2.

Cepa	Características Relevantes	Referencia
<i>Rhizobium etli</i>		
CFNX107	CE3 <i>recA</i> :: Sp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , p42a-, p42d-	Martínez-Salazar <i>et al.</i> 1991
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Cepa hospedera para plásmidos recombinantes, Nal <sup>r</sup>	Hanahan 1983
BW21038	<i>pir</i> <sup>+</sup> , <i>uidA</i> -, Cm <sup>r</sup>	Metcalf <i>et al.</i> 1996
<b>Plásmidos</b>		
pBluescript II SK+	Vector de clonación, <i>ori</i> ColE1, Cb <sup>r</sup>	Stratagene
pRK7813	Vector de clonación, <i>ori</i> RK-2, Tc <sup>r</sup>	Jonathan y Guterson 1987
pBBMCS53	pBBR1MCS-5 acarreando al gen <i>uidA</i> sin promotor, <i>ori</i> de <i>Bordetella</i> (promiscuo)	Girard, L. No publicado
pMAK705		
pBBR1GUS-p1	pBBR1MCS-5 acarreando un segmento con 172 pb curso arriba de <i>repA</i>	Este trabajo
pBBR1GUS-p2	pBBR1MCS-5 acarreando un segmento con 127 pb curso arriba de <i>repA</i>	Este trabajo
pBBR1GUS-p3	pBBR1MCS-5 acarreando un segmento con 63 pb curso arriba de <i>repA</i>	Este trabajo
pBBR1GUS-p1ΔIR	pBBR1GUS-p1 acarreando la delección de una secuencia inversa repetida (posición +4 a +27)	Este trabajo
pKRE-1	pRK7813, <i>repA</i> +, <i>repB</i> +, <i>repC</i> +	Este trabajo
pKRE-ΔA1	pRK7813, <i>repA</i> -, <i>repB</i> -, <i>repC</i> +	Este trabajo
pKRE-prepAB	pRK7813, <i>repA</i> +, <i>repB</i> +, <i>repC</i> -	Este trabajo
pKRE-prepΔA-B	pRK7813, <i>repA</i> -, <i>repB</i> +, <i>repC</i> -	Este trabajo
pKRE-prepA-ΔB	pRK7813, <i>repA</i> +, <i>repB</i> -, <i>repC</i> -	Este trabajo
pKRE-prepA	pRK7813, <i>repA</i> +, <i>repB</i> -, <i>repC</i> -	Este trabajo

Tabla 2. Cepas y plásmidos usados en el estudio de la regulación de la replicación de pH3.

### Identificación de la región promotora/operadora.

Con la finalidad de identificar la región mínima necesaria para el control de la expresión de los genes *rep*, se fabricaron tres fusiones transcripcionales entre diferentes segmentos curso arriba de *repA*, con el gen reportero *uidA* (GUS) del plásmido pBBMCS53 (Tabla 2). La fusión más grande consistió de una subclona de pH3 limitada por los sitios de restricción *Pst*I y *Sal*I. Dicho segmento está formado por 172 pb curso arriba de *repA* y 253 pb de *repA*. Las otras dos fusiones se obtuvieron clonando dos productos de PCR. Uno de ellos posee 127 pb curso arriba de *repA*, y el otro 63 nucleótidos curso arriba de *repA* (Figura 2). Los plásmidos obtenidos se movilizaron a CFNX107 y se evaluó la actividad específica  $\beta$ -glucuronidasa. Se encontró que con 127 pb curso arriba de *repA* la transcripción del gen reportero se comporta del mismo modo que el fragmento de 172 pb (Figura 2).



**Figura 2. Identificación de la región mínima necesaria para la transcripción.** La expresión de diferentes fusiones transcripcionales fué analizada en el fondo genético de la cepa CFNX102. Las barras negras representan distintos segmentos del operon *repABC*. Las barras rayadas representan al gen *uidA* (GUS) del plásmido pBBMCS53.

### Identificación del inicio de la transcripción.

Con la finalidad de mapear el inicio de la transcripción del operón *repABC*, se estableció un ensayo de extensión del primero usando RNA total de la cepa CFNX107/pBBR1GUS-p1 y un oligonucleótido que mapea 39 pb dentro del gen *repA*. Se encontró que el inicio de la transcripción se localiza 57 pb curso arriba del codón de inicio de *repA* (Figuras 3 y 7).

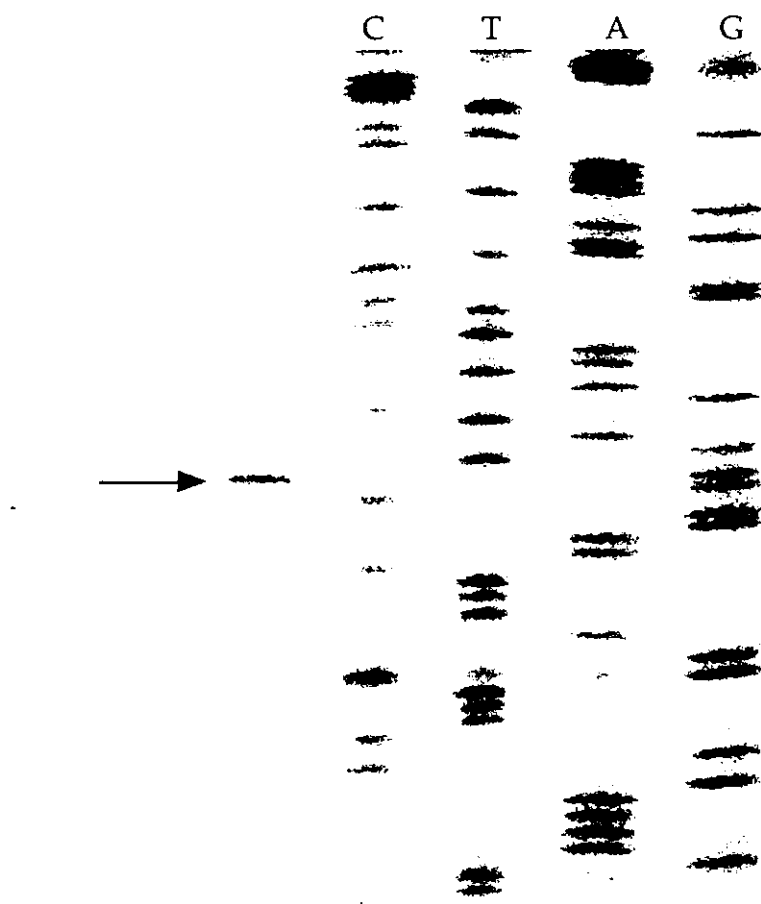


Figura 3. Identificación del inicio de la transcripción. La flecha indica la posición +1.

### RepA es un regulador transcripcional del operón *repABC*.

Como se menciona en el artículo, los productos de los genes *repA* y *repB* están relacionados con el control del número de copias, probablemente a través del control negativo de la transcripción del operón y por tanto, indirectamente limitando la expresión de la proteína de inicio RepC. Para probar esta hipótesis, la fusión transcripcional contenida en el plásmido pBBR1GUS-p1 se movilizó a diferentes cepas derivadas de la cepa de *R. etli* CFNX107 que contenían distintos plásmidos de la serie pKRE-, los cuales codifican uno o más de los genes *rep* transcribiendo bajo el control del promotor nativo (Tabla 2).

Los resultados obtenidos indicaron que la actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa se abatió siempre que RepA se proveyó en *trans* (Figura 4, carriles 3, 4, 6 y 8). Sobresale el hecho de que sólo se requiere de RepA para inhibir completamente la transcripción del gen reportero (carril 8). Adicionalmente, RepB y RepC fueron incapaces de reprimir la expresión de *uidA* (carriles 5 y 7). De estos experimentos podemos concluir que RepA es un regulador negativo de la transcripción del operón *repABC*.

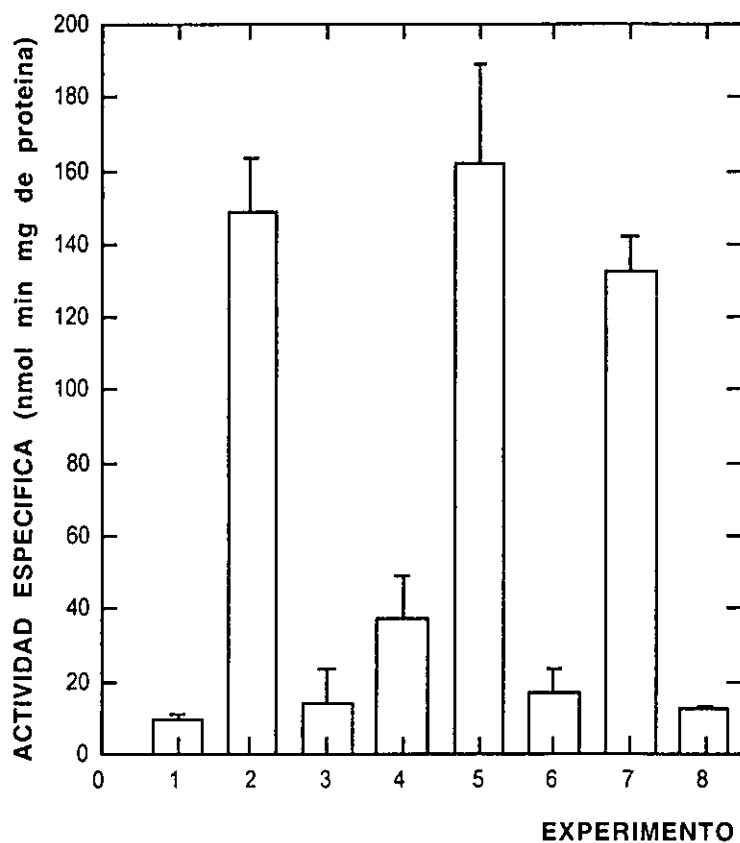


Figura 4. Identificación del regulador transcripcional del operón *repABC*. Carril 1, control negativo; carril 2, sin proteínas Rep; carril 3, RepABC; carril 4, RepAB; carril 5, RepBC; carril 6, RepAC; carril 7, RepC; carril 8, RepA.

#### Identificación de la región promotora reconocida por RepA.

Con el objeto de identificar el sitio de unión de la proteína RepA en la región promotora, se desarrolló un ensayo de protección al dimetilsulfato *in vivo*. Para ello, se usó DNA genómico de dos cepas de CFNX107 que contienen distintos pares de plásmidos, una con pBBR1GUS-p1 y pRK7813; y la otra con pBBR1GUS-p1 y pKRE-prepA (Tabla 2). En este experimento se usó el oligonucleótido empleado para mapear el inicio de la transcripción.

La Figura 5A muestra los resultados de este análisis. En el carril 1 se observa el patrón de protección a la metilación en presencia de RepA y en el carril 2 el patrón de metilación en ausencia de RepA. De acuerdo al análisis densitométrico practicado (Figura 5B, panels a, b y c), tres guaninas colocadas en diferentes regiones mostraron protección a la metilación; la primera se encuentra en la posición +4 (región I), la segunda mapea en la posición +22 (región II) y la tercera en la posición +27. Estos resultados sugieren que la región operadora de RepA se extiende de las posiciones +4 a +27 (Figura 7).

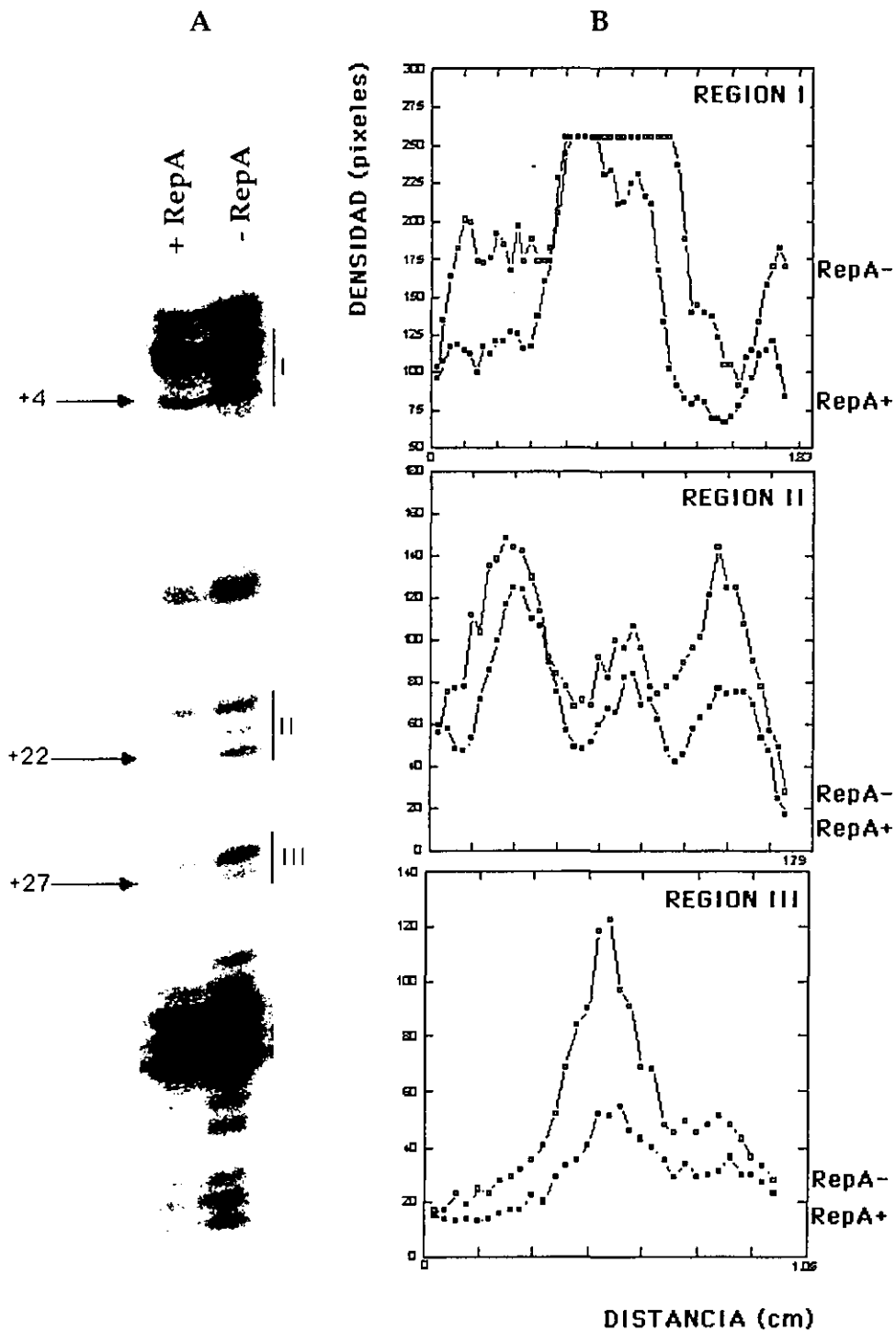


Figura 5. Identificación del sitio de unión de RepA en la región promotora. A: Imagen del ensayo de protección al dimetilsulfato. Las flechas indican las posiciones protegidas; B: Análisis densitométrico de las regiones protegidas. Las gráficas muestra los resultados obtenidos en cada región (identificadas con números romanos).

Para comprobar estos resultados, el segmento limitado por el nucleótido +4 y +27 se eliminó y la actividad  $\beta$ -glucuronidasa se midió en presencia y ausencia de RepA. Se encontró que la región removida se relaciona con el control negativo de la expresión del gen reportero (datos preliminares, Figura 6).

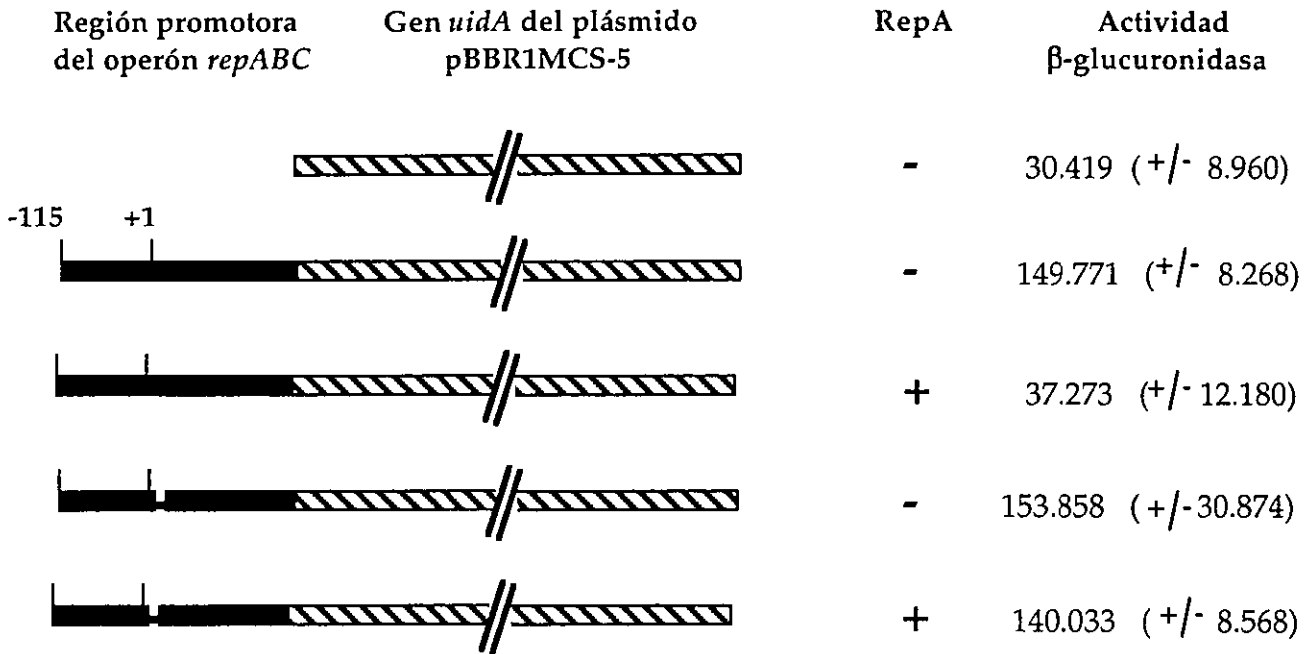


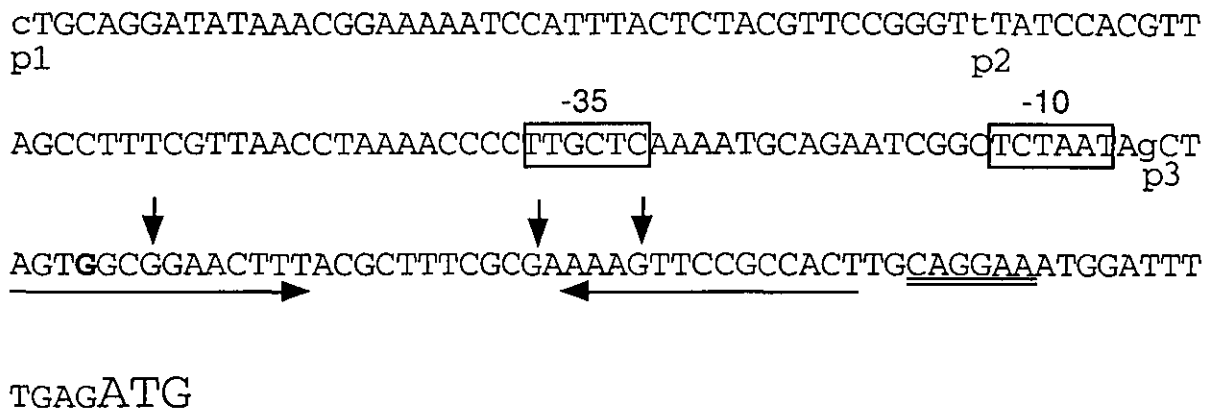
Figura 6. Análisis genético de la región promotora/operadora del operón *repABC*. La expresión de diferentes fusiones transcripcionales fué analizada en presencia y ausencia de la proteína RepA. Las barras negras representan la región promotora/operadora del operón *repABC*. Las barras rayadas representan al gen *uidA*. La línea delgada representa una delección que abarca de la posición +4 a +27. Los datos son el promedio de tres mediciones independientes con sus respectivas desviaciones estandar.

#### Características estructurales de la región promotora/operadora.

De acuerdo a los resultados hasta aquí obtenidos, existe fuerte evidencia que el promotor y el operador del operón *repABC* se encuentran localizados dentro de un segmento de 127 pb curso arriba del gen *repA*. Para identificar estos elementos, se analizó manualmente la secuencia de esta región, y se encontró una organización muy similar a la estructura consenso de los promotores reconocidos por factores de la familia sigma 70 de *E. coli* [TTGACA(N<sub>17</sub>+/-1)TATAC/AA/T]. Adicionalmente, de la posición -3 a la posición +37 se localizó una secuencia repetida en orientación inversa. La longitud de la secuencia es de 14 nucleótidos y los elementos están separados por 12 pb. Cabe mencionar que en esta secuencia se localizaron dos de las tres protecciones descritas en la sección anterior, lo cual sugiere que corresponde al motivo reconocido por RepA. Los elementos



identificados en este análisis, aunados a la identificación previa de una probable secuencia de unión al ribosoma, localizada a 12 pb del codón de inicio de *repA* (Figura 7), conforman una organización transcripcional muy parecida a la encontrada en diferentes genes bacterianos.



**Figura 7. Secuencia de la región promotora/operadora del operón *repABC*.** Las secuencias similares al consenso -35 y -10 de promotores sigma 70 se encuentran dentro de rectángulos. Se indican la posición del operador (flechas horizontales), del inicio de la transcripción (letra negrita), del probable sitio de unión al ribosoma (subrallado doble), del codón de inicio de *repA* (letras grandes), de las bases mapeadas por ensayos de protección (flechas verticales) y de la posición del extremo 5' de las fusiones transcripcionales analizadas (letras minúsculas acompañadas por la identificación p1, p2 o p3).

### Comparación del promotor *rep* con otros promotores de diferentes Rhizobiaceas.

Existen muy pocos trabajos realizados con genes de Rhizobiaceas en los que se hayan estudiado promotores diferentes a los de la familia sigma 54. En este sentido, y debido a la escasa información disponible, la predicción de las cajas -10 y -35 antes descrita requería de mayor sustento, así que para reforzar la hipótesis de que dichas secuencias están relacionadas con la actividad transcripcional del operón *repABC*, se hizo un alineamiento entre la región promotora de *repABC* y diferentes secuencias promotoras descritas en las Rhizobiaceas. La colección de secuencias usada para este análisis se conformó, exclusivamente, por regiones promotoras en las que se conocen experimentalmente los sitios de inicio de la transcripción.

Como se puede observar en la Figura 8A, el alineamiento reveló un substancial porcentaje de identidad entre las distintas secuencias equivalentes a las cajas -10 y -35 descritas en este trabajo. Adicionalmente, sobresale el hecho de que la distancia de separación entre las diferentes regiones -10 y -35 varió únicamente de 16 a 18 nucleótidos, y que la distancia entre los distintos inicios de la transcripción y las regiones -10 variaron

de 4 a 7 nucleótidos. De este alineamiento se obtuvo la secuencia consenso que se muestra en la Figura 8B, la cuál es muy similar a la secuencia consenso de los promotores sigma 70 de *E. coli*. Con base en este análisis, existe una buena probabilidad de que el promotor del operón *repABC* pertenezca a la familia de promotores reconocidos por la familia de factores sigma 70.

A	- 35	- 10	Referencia
Rm. <i>lrpE</i>	TTCCCGCT <b>TTGCGCGCCA</b> -GCGCAAGCCGCGCT <b>TAACACT</b> TCCGCCA		Bae <i>et al.</i> 1989
Re. <i>repABC</i>	AAACCCCT <b>TTGCT</b> CAAAATGC-AGAAT-CGGCT <b>TCTAATAGCTAGTG</b>		Este trabajo
Rm. <i>hemA-P2</i>	CAATGCT <b>TTGACT</b> TCGATCG-ATGTT-CGGG <b>GAGAATGAAGTTT</b> TG		Leong <i>et al.</i> 1985
Re. <i>recA</i>	TCCGCTAT <b>TTGCGAGAGT</b> -GGAACAAATAGGG <b>TACAAACT</b> CGACA		Tapias <i>et al.</i> 1997
Bj. <i>glnB-P1</i>	GAACCGT <b>TTGCCT</b> -ATTTTCGTAG-TCTTCGGT <b>TATTTTGGGCGG</b>		Martin <i>et al.</i> 1989
Bj. <i>groESL2</i>	CTTTGCT <b>TTGTTT</b> -GCCG-ACCAAGCCGGCT <b>TATTTT</b> CGGAGC		Babst <i>et al.</i> 1996
Rm. <i>pck</i>	GGCTATCT <b>TTGCT</b> TGGGTCA-GCCTTGCCGGT <b>TATGTTCCGACGA</b>		Osteras <i>et al.</i> 1995
Re. <i>lipA</i>	TGACGGG <b>TTTCCT</b> TG-G-CGCCT-GCCTGCTGAT <b>TTCCTTCGGCG</b>		Taté <i>et al.</i> 1997
Bj. <i>rrn</i>	ATTGGCG <b>TTGACAGC</b> -CCGGAAGGTGGGGCC <b>TATAACCCCAAC</b>		Beck <i>et al.</i> 1997
Bj. <i>etfSL</i>	TCCGCG <b>TTGACC</b> GGGCCGG-GTCAGGCC <b>TTTAGGTTCCGCGCC</b>		Weidenhaupt <i>et al.</i> 1996
Bj. <i>fbfFH</i>	AGCGGCT <b>TTGCGT</b> TCGCCCG-GCAAGGGT <b>GCCAATAGAACGAT</b>		Thony-Meyer <i>et al.</i> 1989
Bj. <i>glnA</i>	TCCGGGCT <b>GGACGCTATCTG</b> -AGCCGGGT <b>GATCCCGCATTT</b>		Carlson <i>et al.</i> 1985
Bj. <i>groESL5</i>	CCTTTGCT <b>TTGACAGGATCGC</b> -GGCCAAGCC <b>TATTTCCGGCG</b>		Babst <i>et al.</i> 1996
At. <i>groESL</i>	CGCGTCT <b>TTGACT</b> CCGGGAG-AGCGCCTCCT <b>TATCTCGGCTCT</b>		Segal y Ron 1993
Rm. <i>ntxA</i>	TCCACGCT <b>TTGACCAAAT</b> TCC-AGTAATAAGCA <b>TATTTTGGGCCA</b>		Albright <i>et al.</i> 1989
Rm. <i>hemA-P1</i>	TCCGGGG <b>TTGACCACTGATC</b> -GCTTTGAAGGA <b>AAGAAAGGCGACA</b>		Leong <i>et al.</i> 1985
At. <i>sigA</i>	CAAGGGG <b>CGGACGCGGATGCGCGGAAACAGGTGTTAGCGTCA</b> G		Segal y Ron 1993
Bj. <i>groESL4-P1</i>	GAAGCCCT <b>TTGCCCCCGCAAAT</b> TCC-TGTCT <b>TATTT</b> CAGCCT		Babst <i>et al.</i> 1996
Rm. <i>nodD1</i>	CCGCACCT <b>TTGATCCATTA</b> ACTTCAGGGT <b>TCTCTAATAGGACTC</b>		Fisher <i>et al.</i> 1987

## B

Consenso Rhizobiaceas	<b>TTG(A/C)C(T/C)</b>	17+/-1	<b>TAT(A/T)(A/T)(T/C)</b>	6+/-1
Consenso <i>E. coli</i>	<b>TTG A C A</b>	17+/-1	<b>TAT A (A/C)(T/A)</b>	7+/-1

Figura 8. Alineamiento de las regiones promotoras de diferentes Rhizobiaceas. Las secuencias correspondientes a las cajas -35 y -10 se encuentran en negrita. El sitio de inicio de la transcripción se encuentra subrayado. At. *Agrobacterium tumefaciens*; Bj. *Bradirhizobium japonicum*; Re. *Rhizobium etli*; Rm. *Rhizobium meliloti*.

El promotor del operón *repABC* no es funcional en *E. coli*.

La elevada similitud que existe entre la secuencia consenso de promotores tipo sigma 70 de *E. coli* y la secuencia del promotor *repABC*, sugiere que dicho promotor podría ser funcional en *E. coli*. Para probar esta hipótesis, la fusión transcripcional contenida en el plásmido pBBR1GUS-p1 se movilizó a una cepa de *E. coli uidA-* (cepa BW21038), y la actividad específica de  $\beta$ -glucuronidasa se evaluó. Los resultados obtenidos demostraron que el promotor del operón *repABC* no fue capaz de promover la transcripción del gen reportero (datos no mostrados).

## Diversidad estructural de las regiones promotoras de la familia *repABC*.

Como se mencionó anteriormente, el replicador básico del plásmido p42d pertenece a la familia de replicadores RepABC, los cuales son muy similares en organización, tamaño y secuencia. Con la finalidad de identificar motivos similares a las cajas -35, -10 y a la secuencia operadora descritas en este trabajo, se alinearon las primeras 127 bases curso arriba del codón de inicio de *repA* de cada replicador. La inspección del alineamiento no mostró claras regiones conservadas, sin embargo, permitió identificar un grupo de secuencias formado por las regiones promotoras de los plásmidos p42d (*R. etli*), pRiA4b (*A. rhizogenes*), pTi-SAKURA, pTiC58 y pTiB6S3 (los tres de *A. tumefaciens*) en el que existen varias regiones conservadas. Sobresale fuertemente una región de 22 pb localizada curso arriba de la caja -35 en la que hay una identidad del 63 % y que es indispensable para la transcripción (datos no mostrados). Adicionalmente, la región correspondiente a la caja -35 resultó idéntica en un 66 %, mientras que en las secuencias correspondientes a la caja -10 y a la inversa repetida no se encontraron elevados porcentajes de identidad (Figura 9). Con respecto al resto de las secuencias, éstas resultan ser muy diferentes a las del grupo mencionado, por lo que no se lograron identificar regiones similares a las correspondientes cajas -10, -35 y a la inversa repetida descritas en este trabajo (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados sugieren que los promotores RepABC son bastante diversos.

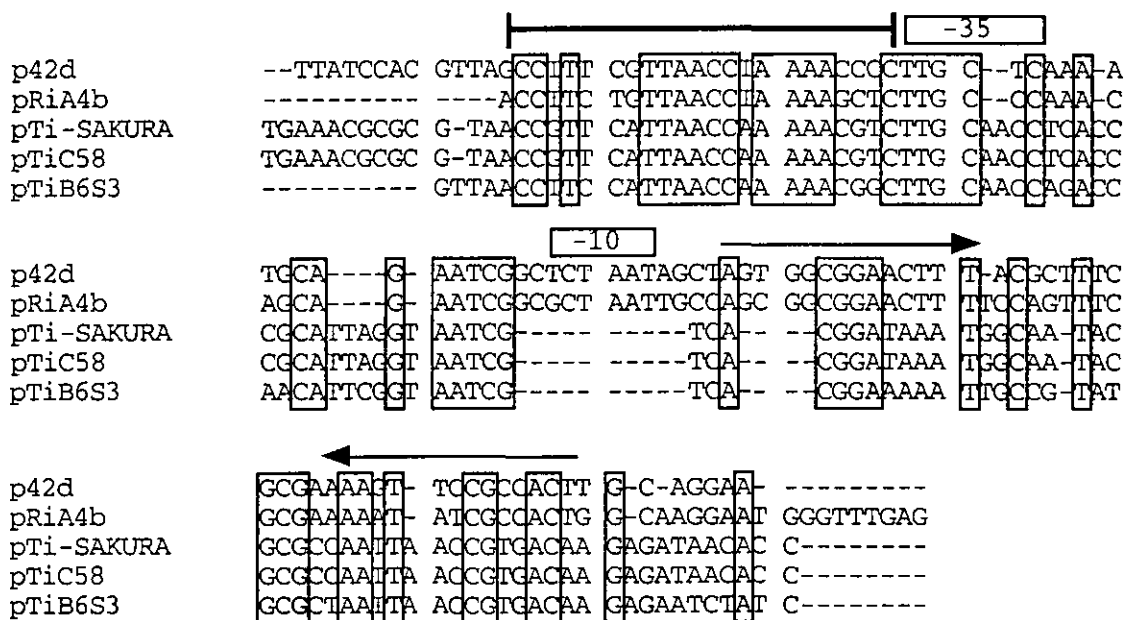


Figura 9. Alineamiento de las regiones promotoras de plásmidos de *Agrobacterium* y de *R. etli* miembros de la familia RepABC. La línea gruesa señala el motivo curso arriba de la caja -35. Las flechas indican la posición de la secuencia inversa repetida.

El promotor *repABC* no es el único factor que impide la replicación del pSim en *E. coli*.

El establecimiento de un plásmido en una bacteria básicamente depende de la adecuada interacción entre las proteínas requeridas para el armado del replisoma en el inicio de la replicación (del Solar et al. 1996). No obstante, intuitivamente es posible pensar que existen otros factores que pueden limitar la replicación de un plásmido en un huésped distinto al nativo. Entre estos factores se encuentra la adecuada expresión de los genes plasmídicos necesarios para replicar.

Los resultados de este trabajo demuestran que el promotor *repABC* no funciona en *E. coli*, lo cual sugiere que el inicio de la transcripción podría ser un factor limitante para el establecimiento del plásmido en dicha bacteria. Si tal hipótesis es correcta, la sustitución del promotor/operador *repABC* por la región promotora/operadora del gen *lacZ* permitiría romper la barrera que impide la replicación del replicador básico del pSim en *E. coli*.

Para probar esta hipótesis, se obtuvo un producto de PCR que amplificó exclusivamente la secuencia comprendida del codón de inicio de *repA* hasta el término de *incβ*, usando un oligonucleótido que colocó un sitio de unión al ribosoma 6 pb antes del codón de inicio de *repA*. El producto obtenido fue subclonado en el plásmido pSK+ en la orientación que permitió colocar al promotor del gen *lacZ* de dicho plásmido curso arriba del codón de inicio de *repA*. A partir de esta construcción se obtuvo un segundo producto de PCR usando oligonucleótidos que amplificaron desde el promotor de *lacZ* hasta el término de *incβ*. Este último producto de PCR fue clonado en un vector (pMAK705) que codifica una proteína de inicio de la replicación termosensible. Finalmente, se evaluó la capacidad de replicación del plásmido obtenido (pMAK705-*repABC*) a la temperatura no permisible, encontrándose que dicho plásmido no fue capaz de replicar en *E. coli*.

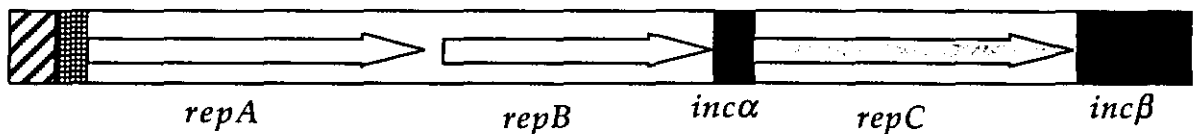


Figura 10. Mapa genético de la fusión transcripcional de la región promotora del gen *lacZ*, y el operón *repABC*. La caja rayada representa al promotor de *lacZ*. La caja punteada representa un pequeño fragmento del gen *lacZ*. Las cajas negras corresponden a los sitios *cis* de incompatibilidad.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

La propiedad que define a cualquier replicon es su capacidad de replicar establemente. Esta propiedad tiene importantes implicaciones, pues depende de la correcta y coordinada ejecución de diferentes procesos moleculares que involucran desde la expresión de una miríada de genes responsables de la replicación y segregación, hasta el reconocimiento y la interacción entre proteínas, o entre proteínas y DNA. El estudio de estos procesos moleculares se facilita usando como modelo a los plásmidos, debido a que son fáciles de aislar y manipular, suelen tener una organización relativamente simple, y su presencia no es indispensable para la sobrevivencia de la bacteria. Además, en los plásmidos adquieren una gran importancia los mecanismos de replicación y segregación debido a que determinan importantes cualidades como el rango de huésped, el número de copias y la incompatibilidad, todas ellas características que constituyen barreras moleculares que limitan la dispersión, establecimiento y por tanto, la historia evolutiva de tales moléculas.

El replicador básico del pSim de *R. etli* es un miembro representativo de la familia de replicadores tipo RepABC. Estos replicadores, aunque están ampliamente distribuidos entre las Rhizobiaceas, no han sido suficientemente estudiados. En este sentido, los resultados presentados constituyen la primera descripción minuciosa de las propiedades de replicación, estabilidad, incompatibilidad y de la regulación de la replicación de plásmidos de la familia RepABC.

### La función de replicación del operón *repABC*.

La evidencia mostrada en el artículo señala que la proteína de inicio corresponde a RepC, lo cual concuerda con la situación observada en otros plásmidos de la misma familia (Bartosik *et al.* 1998; Tabata *et al.* 1989). Además de RepC, los datos obtenidos señalan que *incβ* es un determinante de incompatibilidad y que es indispensable para la replicación. En teoría, para que una secuencia no codificante ejerza incompatibilidad debe de contener un sitio de unión para alguna de las proteínas de partición o de replicación. En este sentido, la inspección de la secuencia de *incβ* no revela la presencia de iterones; sin embargo, es posible identificar una secuencia palindrómica perfecta que se encuentra dentro de una región de 77 pb en la que el contenido de AT es del 54.5 %. Este hallazgo resulta muy sugestivo, pues secuencias palindrómicas se han identificado como sitios de unión para proteínas de inicio de la replicación en los plásmidos pAL5000, R1 y  $\lambda$ uv (Stolt y Stoker 1996; del Solar *et al.* 1998). Considerando estos antecedentes, además de la

localización, las características del palíndrome, el contenido de AT de la región aledaña y la necesaria presencia de *incβ* para replicar, proponemos la hipótesis de que dicho palíndrome corresponde al sitio de reconocimiento de la proteína RepC y por tanto, que el origen de replicación se encuentra en la vecindad de esta secuencia. Para demostrar que RepC se une al palíndrome, experimentos de geles de retardo y "footprinting" pueden utilizarse. En cuanto a la localización del origen de replicación se podría establecer a través de geles de dos dimensiones.

Un dato curioso es que la secuencia palindrómica presente en *incβ* también se encuentra, en la misma posición, en el replicador del plásmido pRiA4b, pero no se encuentra en el resto de los miembros de la familia de replicadores RepABC. Con base en la alta conservación estructural de estos replicadores, la hipótesis más sencilla sería pensar que todos los miembros de la familia RepABC contienen un mismo sitio de unión para la proteína de inicio y por tanto, el mismo origen de replicación. La evidencia reportada hasta el momento sugiere que este no es el caso. Una posibilidad para explicar tales diferencias puede ser deducida del polimorfismo mostrado por las proteínas RepC. Estas proteínas son las más variables de las tres proteínas Rep que caracterizan a la familia y por ello, se han propuesto como indicadores de la diversidad de replicadores RepABC (Burgos *et al.* 1996; Turner *et al.* 1996; Rigottier-Gois *et al.* 1998). Las diferencias entre las proteínas RepC sugieren que existe presión de selección sobre la etapa de inicio de la replicación, promoviendo el reconocimiento de secuencias muy distintas por parte de la proteína de inicio, lo cual explica la ausencia de palíndromes idénticos al encontrado en el replicador del pSim de CFN42.

### La función de partición.

Los resultados del artículo sugieren que RepA y RepB son responsables de conferir estabilidad al replicador básico. La comparación de la secuencia de estas proteínas con las bases de datos demuestra que son similares a las proteínas de partición de la familia Sop/Par de *E. coli*. De hecho, mutaciones que afectan a los genes de partición de los plásmidos F y P1 causan inestabilidad (Austin y Eichorn 1992) lo cual corresponde a la situación observada cuando se mutan los genes *repA* y *repB*. En adición a RepA y RepB, *incα* es una región que confiere incompatibilidad y que es dispensable al corto plazo para la replicación. El análisis de la secuencia de *incα* demuestra que se encuentra altamente conservada en todos los replicadores RepABC y permite identificar una región de 60 nucleótidos en la que se encuentran dos secuencias directas repetidas de siete nucleótidos y dos secuencias repetidas de cinco bases. La presencia de secuencias repetidas es

característica de las regiones centroméricas de los plásmidos P1 y F. Para el caso del centrómero de P1, existe una región de 82 pb en la que se encuentran seis secuencias repetidas que son reconocidas por la proteína ParB. Dos repetidas son de seis nucleótidos y están en orientación directa. Las otras cuatro contienen siete nucleótidos y de éstas, tres se encuentran en orientación directa y una es inversa con respecto a las anteriores (Davis *et al.* 1990). En cuanto al centrómero de F, este *locus* contiene doce directas repetidas de 43 pb, y dentro de cada repetida se encuentra una inversa repetida de 7 pb que es el sitio de unión para la proteína SopB (Mori *et al.* 1989).

Con base en las coincidencias estructurales y fenotípicas de *repABinca* con los sistemas de partición activa de los plásmidos F y P1, se propone que el sistema *repABinca* es responsable de la partición activa del pSim, y que RepB es la proteína que principalmente se une a *inca*. Para demostrar esto se podría clonar *inca* en un plásmido inestable y complementar *in trans* con las proteínas RepA y RepB. Adicionalmente, se podría demostrar que tales proteínas pueden unirse a *inca* mediante geles de retardo y se podrían identificar los sitios de unión de las proteínas mediante footprinting.

#### El promotor.

El análisis de la región promotora del operón *repABC* permitió identificar una secuencia que es muy similar a la secuencia consenso reconocida por los promotores de la familia sigma 70. En dicha secuencia la caja -10 es 83 % idéntica a la correspondiente del consenso de *E. coli*, mientras que la caja -35 es 50 % idéntica a su contraparte en dicho consenso. Adicionalmente, la distancia que separa ambas cajas y la distancia entre la caja -10 y el inicio de la transcripción corresponden perfectamente con los requerimientos para el reconocimiento de promotores por factores sigma 70 (Harley y Reynolds 1987; Shlomit y Hanah 1993). Más aún, el alineamiento de 18 promotores de diferentes Rhizobiaceas con el probable promotor del operón *repABC* demuestra una elevada similitud estructural entre éstos y la secuencia consenso de promotores tipo sigma 70. Con base en los datos expuestos, se propone que el promotor del operón *repABC* es reconocido por factores sigma 70, situación similar a la encontrada en otros sistemas de partición y de replicación de diferentes plásmidos (i. e. P1, P7, R1) (Hayes *et al.* 1994; Jensen *et al.* 1994).

La similitud encontrada entre el consenso de los promotores sigma 70 y el del operón *repABC* sugiere que este último podría funcionar en *E. coli*, sin embargo, los resultados obtenidos indican lo contrario. Tal resultado puede explicarse de varias maneras:

1. Que la función del promotor depende de un activador que no está presente en *E. coli*.

2. Que existe un represor transcripcional en *E. coli* u otra proteína afín a la secuencia promotora del operón *repABC* que bloquea la transcripción del gen reportero.
3. Que no hay transcripción debido a que existe alguna anomalía en cualquiera de las etapas que componen al proceso (reconocimiento del promotor, formación del complejo cerrado, isomerización a complejo abierto, elongación y término de la transcripción).
4. Que el sitio de unión al ribosoma del replicador de *R. etli* no es funcional en *E. coli*.

Para el caso de las dos primeras hipótesis, la información con la que se cuenta no permite descartar ninguna de las posibilidades, sin embargo, se puede hacer un experimento de retardo usando extracto total de proteínas para verificar si existe unión en el promotor *repABC*. Incluso con este experimento se puede verificar, en caso de observar retardo, si la proteína responsable es sigma 70.

Con respecto a la tercera opción, un alineamiento de las proteínas sigma 70 de *E. coli* y de *R. etli* reveló una elevada homología en las regiones responsables del reconocimiento de las cajas -10 y -35 (regiones 2.4 y 4.2 respectivamente) lo cual corrobora los datos obtenidos previamente por Luka y colaboradores (Luka *et al.* 1996). Si consideramos que la región promotora del operón *repABC* es similar a la secuencia consenso reconocida por el factor sigma 70 de *E. coli*, y si también consideramos la elevada homología observada entre las regiones 2.4 y 4.2 de las proteínas sigma 70 de ambas bacterias, cabe la posibilidad de que la RNAPol de *E. coli* pueda unirse al promotor *rep*. Una prueba sencilla para demostrar interacción entre la RNAPol de *E. coli* y el promotor de *repABC* nuevamente es un gel de retardo usando la proteína purificada.

Si se acepta que el promotor del operón *repABC* es bastante parecido al consenso de sigma 70, y que las regiones de sigma 70 responsables del reconocimiento del promotor están muy conservadas, resulta probable pensar que ambos elementos interactúan apropiadamente; sin embargo, dicha interacción puede generar una estructura que altera las etapas de isomerización y/o elongación, lo cual impide la síntesis del correspondiente RNA. Con base en lo antes expuesto, se propone que la última hipótesis puede explicar la imposibilidad que tiene el promotor del operón *repABC* de controlar la expresión genética en *E. coli*. Para comprobar esta hipótesis primero se debe demostrar la interacción entre RNAPol de *E. coli* y el promotor *repABC*. Si existe unión, después se pueden hacer experimentos de transcripción *in vitro* con RNAPol de *E. coli*. Si existe transcripción debe haber algún factor en *E. coli* que impide la función del promotor. Si no existe transcripción, se puede caracterizar el complejo transcripcional formado para determinar con precisión el factor que impide la transcripción.

Con lo que respecta a la cuarta opción, la secuencia propuesta para ser el sitio de



unión al ribosoma del operón *repABC* (CAGGAA) se encuentra muy alejada del consenso de *E. coli* (AGGAGG), además de que tampoco se encuentra a la distancia apropiada para que teóricamente funcione en *E. coli* (en esta bacteria, el sitio de unión a ribosoma suele encontrarse entre 5 y 10 pb curso arriba del codon de inicio del gen correspondiente). Con base en estas diferencias, es muy probable que el RNAm del operón *repABC* no pueda ser traducido en *E. coli* y por ello no se observe actividad del gen reportero.

### La regulación del operón *repABC*.

Los resultados obtenidos indican que RepA funciona como un regulador negativo de la expresión del operón, y que su sitio de unión corresponde a una secuencia inversa repetida de 14 pb. Esta situación es muy similar a la que se presenta en los sistemas Sop/Par en donde las respectivas proteínas SopA y ParA reprimen la expresión del operón. Ambas proteínas reconocen secuencias repetidas que funcionan como operadores. Para el caso de SopA, las secuencias de reconocimiento son 2 pares de inversas repetidas de 7 nucleótidos, mientras que ParA reconoce una inversa repetida imperfecta de 20 pb. Ambos operadores se encuentran entre el promotor y el codón de inicio del primer gen del operón (Mori *et al.* 1989; Funell *et al.* 1988; Funell *et al.* 1991).

Por otra parte, la actividad represora de RepA es concordante con el resultado de que una delección de *repA* conduce a un aumento en el número de copias (ver artículo). En conjunto los datos obtenidos permiten concluir que RepA, además de su participación en la partición, funciona como un regulador negativo de la transcripción del operón *repABC*.

Dado el alto porcentaje de identidad observado entre las distintas proteínas RepA, se esperaría que todas tuvieran las mismas funciones y que reconocieran secuencias similares en las región operadoras de sus respectivos replicadores; sin embargo, el alineamiento de las primeras 127 pb curso arriba de *repA* de cada replicador, indica una amplia diversidad en toda la región. Podemos pensar que dicha divergencia obedece a una fuerte presión de selección mediante la cual se ha favorecido la creación de diferentes promotores/operadores, o se ha promovido su localización en distintas posiciones con respecto al inicio del primer gen del operón. Coincidentemente, esta situación es similar a la encontrada entre los sistemas de partición de los plásmidos P1 y P7. Ambos sistemas tienen la misma organización genética y pueden ser fácilmente alineados; sin embargo, virtualmente no existe similitud en las regiones curso arriba de los genes *parA* (Hayes *et al.* 1994).

## La incompatibilidad entre replicadores RepABC.

Los resultados presentados en el artículo sugieren que *inca* e *incβ* son elementos *cis* de incompatibilidad asociados con la partición y con la replicación; respectivamente. En cuanto a las proteínas Rep, únicamente se identificó a RepA como un determinante de incompatibilidad, lo cual concuerda con la actividad represora que ejerce dicha proteína. Este fenotipo es similar al que ejercen las proteínas SopA y ParA; las cuales funcionan como reguladores transcripcionales capaces de ejercer incompatibilidad (Ogura *et al.* 1990).

Curiosamente, bajo las condiciones experimentales usadas, la región promotora no resultó ser un determinante de incompatibilidad. Este resultado pudiera explicarse asumiendo que la concentración de operadores introducidos a la bacteria no fue la suficiente para unir a todas las proteínas RepA y por lo tanto, que no se alteraron drásticamente las funciones de RepA en la partición. De lo anterior se deduce que si introduyéramos un mayor número de operadores, se esperaría observar un fenotipo de incompatibilidad; sin embargo, cabe aclarar que esta situación no se presenta en condiciones naturales.

Aunque en este trabajo no se demostró si RepC ejerce incompatibilidad, con base en su función, se esperaría que dicha proteína fuera un determinante de incompatibilidad. Las propiedades de incompatibilidad de las proteínas RepC nunca han sido demostradas, sin embargo, en trabajos previos se ha sugerido que las diferentes familias de RepC corresponden a grupos de incompatibilidad, y que la divergencia de RepC puede ser responsable de la compatibilidad exhibida por muchos miembros de la familia de replicadores RepABC (Li y Farrand 2000). La comparación de la secuencia de las proteínas RepC de los plásmidos pTiC58 y pTiB6S3 las agrupa en una misma familia; lo cual es consistente con la observación de que ambos plásmidos son incompatibles (Hooykaas *et al.* 1980; Nester y Kosuge 1981). Por su parte, la proteína RepC del plásmido pRiA4b se encuentra en una familia distinta a la de las anteriores proteínas, lo cual también es concordante con el hecho de que pRiA4b es compatible con los otros dos plásmidos (White y Nester 1980).

En suma, el escenario actual presenta tres determinantes de incompatibilidad de los cuales, dos están relacionados con la partición y con la regulación (*inca*, RepA) y uno con la replicación (*incβ*). En los sistemas normales, la replicación es la primera función que se pone en juego para el establecimiento de un plásmido y por lo tanto, sus elementos ejercen incompatibilidad en primera instancia, para después dar paso al efecto de los determinantes asociados a la partición. Debido a que el replicador mínimo del pSim no

presenta la organización observada en todos los replicadores hasta ahora descritos (un módulo de replicación y uno de partición transcripcionalmente independientes), en este caso se esperaría que RepA, una proteína de partición, confiriera la primera línea de incompatibilidad, seguida por los determinantes de replicación. Esta hipótesis puede explicar los resultados reportados por Rigottier-Gois y colaboradores quienes encontraron que dos plásmidos clasificados como miembros de una misma familia RepC son compatibles (Rigottier-Gois *et al.* 1998).

### Las bases moleculares de la replicación y de la partición del pSim.

A continuación se propone el modelo que se muestra en la figura 11 para describir el funcionamiento básico del replicador del pSim. Debido a que RepC es estrictamente necesaria para la replicación, proponemos que esta proteína cataliza el inicio de la replicación a través de su interacción con la secuencia *incβ*, dado que esta región también es indispensable para la replicación, presenta características típicas de un origen de replicación (secuencias palindrómicas que pueden ser el sitio de reconocimiento para la proteína de inicio, y que están localizadas en una región rica en AT; Stolt y Stoker 1996) y genera incompatibilidad. Por otra parte, RepA y RepB son responsables de la partición y quizás interactúan con la secuencia *incα*, a la que proponemos funciona como un centrómero. Si tal hipótesis es correcta, la interacción RepAB-*incα* podría funcionar como un segundo sistema de regulación de la replicación, limitando la expresión de *repC* a través de silenciamiento. Adicionalmente, RepA regula negativamente la expresión del operón y con ello, limita la expresión de *repC*.

Con este modelo no se descarta la posibilidad que las proteínas RepAB también puedan funcionar como elementos accesorios para la replicación; ni que RepC podría participar en la partición, o que podría funcionar como regulador negativo de su propia expresión siempre que interactuara con *incα*. Finalmente, tampoco se descarta que el origen de replicación y el centrómero pudieran localizarse en una sola de las regiones *cis* de incompatibilidad. Siguiendo esta hipótesis, dado que *incβ* es indispensable, probablemente esta región contiene ambas funciones. Resultados obtenidos por Bartosik y colaboradores indican que RepB se une a un pequeño segmento de DNA localizado curso abajo del gen *repC* del plásmido pTAV1 (datos no publicados). Si recordamos que RepB es homóloga a SopB/ParB, y que estas últimas proteínas reconocen al centrómero de sus respectivos plásmidos, esta última hipótesis podría ser verdadera. Ante tal situación, *incα* podría ser una región de control del inicio de la replicación o del control del número de copias.

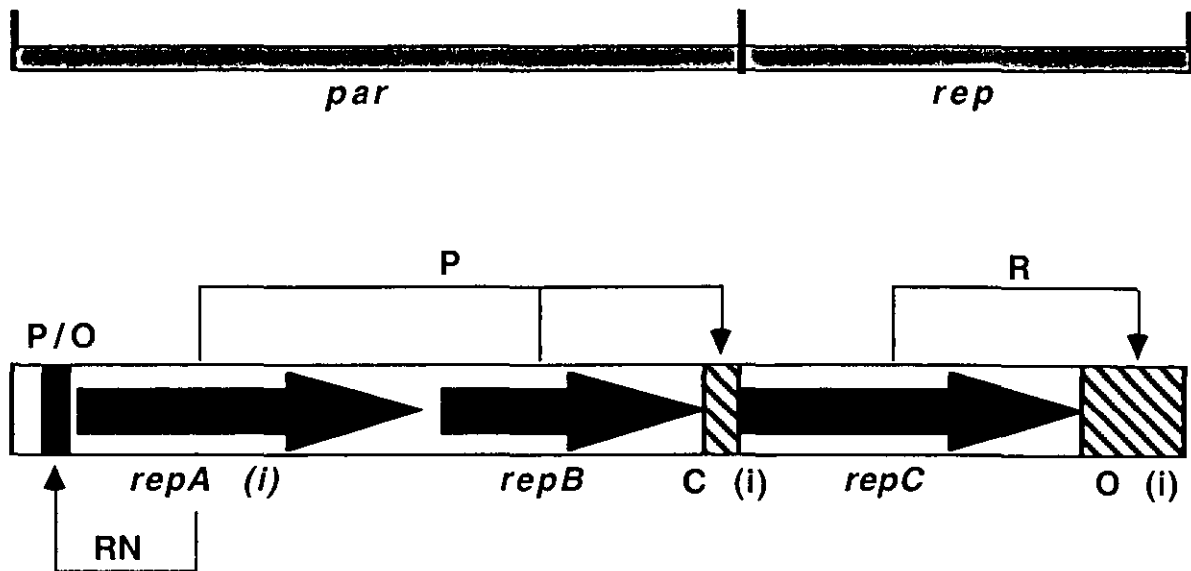


Figura 11. Modelo para explicar las bases moleculares de la replicación y de la partición del pSim de *R. etli*. Las flechas representan a los genes *repABC*. La barra oscura representa a la región promotora/operadora. Las barras rayadas representan al centrómero (C) y al origen de replicación (O). RN: Regulación negativa; P/O: Promotor/operador; P: Partición; R: Replicación; i: determinante de incompatibilidad.

#### La incapacidad de replicación del pSim en *E. coli*.

El experimento diseñado para probar si el inicio de la transcripción es el factor limitante para la replicación del pSim en *E. coli*, sugiere que existen otros factores que impiden la replicación del pSim en dicho fondo genético.

La apropiada replicación de un plásmido en una bacteria depende de múltiples factores; sin embargo, se ha observado que el ensamblaje del replisoma es la principal limitante para la replicación de un plásmido en un fondo genético distinto al nativo (del Solar *et al.* 1996). Considerando tal observación, es posible que las proteínas de replicación del pSim no puedan interactuar con la maquinaria de replicación de *E. coli*. Adicionalmente, existen otros parámetros que pueden limitar la replicación del pSim en *E. coli*. Por ejemplo, la topología del plásmido puede ser diferente entre *R. etli* y *E. coli*, de tal manera que aun cuando la maquinaria de replicación funcione apropiadamente en *E. coli*, si el superenrollamiento del plásmido es tan diferente que oculta o altera estructuras indispensables para la replicación, es de esperarse que el plásmido no replique. Una situación de este tipo ha sido observada con plásmidos de *Bacillus subtilis*, en donde diferencias en el superenrollamiento impiden su replicación en *E. coli* (del Solar *et al.* 1996). Otro factor que puede impedir la replicación del pSim en *E. coli* puede ser un

desbalance en las funciones de transcripción y/o traducción de los genes *repABC*. Así, un exceso de transcripción y traducción pueden generar la acumulación de productos hasta un punto en el que interfieren con el balance metabólico de la bacteria.

### **La organización genético-funcional del replicador del pSim.**

Como se mencionó en el artículo, el operón *repABC* del pSim codifica las funciones de partición y de replicación. Esta situación es única y constituye el primer ejemplo en el que ambos tipos de genes son co-transcritos, y de acuerdo a los resultados adicionales, representa el primer replicón en que ambas funciones son coreguladas.

La elevada conservación de la organización de los replicadores RepABC y su amplia dispersión en las Rhizobiaceas sugieren que al agrupar las funciones de replicación y partición se adquieren grandes ventajas. Quizás una prueba de tales ventajas la constituye el hecho de que el pSim es extremadamente estable. La estabilidad es una propiedad que depende de la correcta ejecución de las funciones de partición y de replicación. Si consideramos que, de acuerdo al análisis de la secuencia del pSim, aparentemente no existe ningún otro sistema de partición en dicha molécula (Dávila y colaboradores, comunicación personal), resulta indiscutible aceptar que el replicador del pSim es extremadamente eficiente. Es probable que dicha eficiencia obedezca a que al agrupar ambas funciones se adquieren importantes simplificaciones sobre los sistemas de regulación, lo cual disminuye la frecuencia de errores; además de que se cuenta con una organización genética que permite coordinar fácilmente ambas funciones y que puede generar una elevada especificidad. Esta situación puede ser de suma importancia pues los replicadores RepABC son muy comunes entre las Rhizobiaceas y de hecho, se ha demostrado la presencia de tres replicadores de la misma familia en *R. etli* (Cevallos y colaboradores, comunicación personal), lo cual pone de manifiesto la necesidad de contar con sistemas de replicación y partición altamente específicos.

Finalmente, a pesar de que los hechos demuestran que los replicadores RepABC son muy eficientes y específicos, es posible vislumbrar algunas desventajas de su organización. Por ejemplo, una mutación que afecte al sistema de partición puede afectar directamente la función de replicación, además de que al disminuir el número de vías de regulación se puede perder plasticidad de respuesta en situaciones adversas.

## PERSPECTIVAS

Los resultados aquí presentados son una pequeña contribución al estudio de los replicadores RepABC. Para consolidar los resultados obtenidos sugerimos lo siguiente:  
Replicación.

1. Demostrar que en *incβ* se encuentra el origen de replicación.
2. Demostrar que la secuencia palindrómica corresponde al sitio reconocido por RepC.
3. Investigar que tipo de sistema de replicación sigue el replicador RepABC de *R. etli*.
4. Demostrar si RepC es un factor de incompatibilidad.
5. Demostrar si RepC funciona como regulador negativo de su expresión.
6. Estudiar las propiedades bioquímicas de RepC.
7. Identificar la etapa limitante para la replicación de plásmidos RepABC en *E. coli*.

Partición.

1. Demostrar si *inca* es un centrómero.
2. Investigar que proteína(s) interactúa(n) con *inca*. Identificar las regiones que interactúan con la(s) proteína(s).
3. Probar si la interacción entre *inca* y las proteínas Rep proveen de un segundo sistema de regulación de la replicación.
4. Identificar las funciones de RepB y probables funciones adicionales de RepA (como elemento del replisoma o del complejo de partición).
5. Estudiar las propiedades bioquímicas de las proteínas RepAB.

Transcripción.

1. Definir con precisión las bases con las que interactúa RepA.
2. Definir la secuencia de unión al ribosoma.
3. Definir con precisión la secuencia de un promotor funcional en *R. etli*.
4. Investigar la función de la secuencia localizada curso arriba de la probable caja -35.
5. Probar la " fuerza del promotor " en *R. etli*.
6. Establecer la etapa de la transcripción que limita la expresión del promotor de *R. etli* en *E. coli*.

## BIBLIOGRAFIA

- Abeles, A. L., Brendler, T. y Austin, S. J. (1993). Evidence of two levels of control of P1 *oriR* and host *oriC* replication origins by DNA adenine methylation. *J. Bacteriol.* 175: 77801-7807.
- Abeles, A. L., Reaves, L. D. Youngren-Grimes, B. y Austin, S. J. (1995). Control of P1 plasmid replication by iterons. *Mol. Microbiol.* 18: 903-912.
- Albright, L. M., Ronson, C. W., Nixon, B. T. y Ausubel, F. M. (1989). Identification of a gene linked to *Rhizobium meliloti ntrA* whose product is homologous to a family ATP-binding proteins. *J. Bacteriol.* 171: 1932-1941.
- Amábile-Cuevas, C. F. y Chicurel, M. F. (1992). Bacterial plasmids and gene flux. *Cell.* 70: 189-199.
- Austin, S. y Nordstrom, K. (1990). Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell.* 60: 351-354.
- Austin, S. J. y Eichorn, B. G. (1992). Random diffusion can account for *topA*-dependent suppression of partition defects in low-copy-number plasmids. *J. Bacteriol.* 174: 5190-5195.
- Babst, M., Hennecken, H. y Fischer, H. -M. (1996). Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* 19: 827-839.
- Bae, Y. M., Holmgren, E. y Crawford, I. P. (1989). *Rhizobium meliloti* anthranilate synthase gene: Cloning, sequence, and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171: 3471-3478.
- Baker, T. A. y Wickner, S. H. (1992). Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 26: 447-477.
- Banerjee, S. K., Luck, B. T., Kim, H. Y. y Iyer, V. N. (1992). Three clustered origins of replication in a promiscuous-plasmid replicon and their differential use in a PolA<sup>+</sup> strain and a  $\Delta$ PolA strain of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174: 8139-8143.
- Bartosik, D., Wlodarczyk, M. y Thomas, C. M. (1997). Complete nucleotide sequence of replicator region of *Paracoccus (Thiobacillus) versutus* pTAV1 and its correlation to several plasmids of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Plasmid.* 38: 53-59.
- Bartosik, D., Baj, J. y Wlodarczyk, M. (1998). Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology.* 144: 3149-3157.

- Beck, C., Marty, R., Kläusli, S., Hennecke, H. y Göttfert, M. (1997). Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 179: 364-369.
- Bernard, P. y Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J. Mol. Biol. 226: 735-745.
- Bouet, J.-Y. y Funnell, B. E. (1999). P1 ParA interacts with the P1 partition complex at *parS* and an ATP-ADP switch controls ParA activities. The EMBO Journal. 18: 1415-1424.
- Bouet, J.-Y., Surtees, J. A. y Funnell, B. E. (2000). Stoichiometry of P1 plasmid partition complexes. J. Biol. Chem. 275: 8213-8219.
- Bramhill, D. y Kornberg, A. (1988). A model for initiation at origins of DNA replication. Cell. 54: 915-918.
- Brendler, T. G., Abeles, A. L. y Austin, S. J. (1991). Critical sequences in the core of the P1 plasmid replication origin. J. Bacteriol. 173: 3935-3942.
- Brendler, T. G., Abeles, A. L. y Austin, S. J. (1995). A protein that binds to the P1 origin core and the *oriC* 13mer region in a methylation-specific fashion is the product of the host *seqA* gene. The EMBO Journal. 14: 4083-4089.
- Brendler, T. G., Abeles, A. L., Reeves, L. D. y Austin, S. J. (1997). The iteron bases and spacers of the P1 replication origin contain information that specifies the formation of a complex structure involved in initiation. Mol. Microbiol. 23: 559-567.
- Burgos, P. A., Velázquez, E. y Toro, N. (1996). Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in Rhizobia. MPMI. 9: 843-849.
- Burian, J., Stuchlik, S. y Kay, W. W. (1999). Replication control of a small cryptic plasmid of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 294: 49-65.
- Bussiere, D. E. y Bastia, D. (1999). Termination of DNA replication of bacterial and plasmid chromosomes. Mol. Microbiol. 31: 1611-1618.
- Carlson, T. A., Guerinot, M. L. y Chelm, B. K. (1985). Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 162: 698-703.
- Chattoraj, D. K. y Schneider, T. D. (1997). Replication control of plasmid P1 and its host chromosome: the common ground. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 57: 145-186.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. y Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiol. Rev. 52: 375-395.



- Dam, M. y Gerdes, K. (1994). Partitioning of plasmid R1. Ten direct repeats flanking the *parA* promoter constitute a centromere-like partition site *parC*, that expresses incompatibility. *J. Mol. Biol.* 236: 1289-1298.
- Davey, M. J. y Funnell, B. E. (1997). Modulation of the P1 plasmid partition protein ParA by ATP, ADP, and P1 ParB. *J. Biol. Chem.* 272: 15286-15292.
- Davis, M. A. y Austin, S. J. (1988). Recognition of the P1 plasmid centromere analog involves binding of the ParB protein and is modified by a specific host factor. *The EMBO Journal.* 7: 1881-1888.
- Davis, M. A., Martin, K. A. y Austin, S. J. (1990). Specificity switching of the P1 plasmid centromere-like site. *The EMBO Journal.* 9: 991-998.
- Davis, M. A., Radnedge, L., Martin, K. A., Hayes, F., Youngren, B. y Austin, S. J. (1996). The P1 ParA protein and its ATPase activity play a direct role in the segregation of plasmid copies to daughter cells. *Mol. Microbiol.* 21: 1029-1036.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M. y Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microb. and Mol. Biol. Rev.* 62: 434-464.
- Disqué-Kochem, C. y Eichenlaub, R. (1993). Purification and DNA binding of the D protein, a putative resolvase of the F-factor of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 237: 206-214.
- Eberl, L., Kristensen, C. S., Givskov, M., Grohmann, E., Gerlitz, M. y Schwab, H. (1994). Analysis of the multimer resolution system encoded by the *parCBA* operon of broad-host-range plasmid RP4. *Mol. Microbiol.* 12: 131-141.
- Erdmann, N., Petroff, T. y Funnell, B. E. (1999). Intracellular localization of P1 ParB protein depends on ParA and *parS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14905-14910.
- Espinosa, M., del Solar, G., Rojo, F. y Alonso, J. C. (1995). Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 111-120.
- Fischer, H. M., Babst, M., Kaspar, T., Acuña, G., Arigoni, F. y Hennecke, H. (1993). One member of a *groESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *The EMBO Journal.* 12: 2901-2912.
- Fisher, R. F., Brierley, H. L. Mulligan, J. T. Long, S. R. (1987). Transcription of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *J. Biol. Chem.* 262: 6849-6855.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. y Perret, X. (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 387: 394-401.

- Friedman, S. A. y Austin, S. J. (1988). The P1 plasmid-partition system synthesizes two essential proteins from an autoregulated operon. *Plasmid*. 19: 103-112.
- Fuller, R. S., Funnell, B. E. y Kornberg, A. (1984). The DnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal origin (*oriC*) and other sites. *Cell*. 38: 889-900.
- Funnell, B. E. (1988a). Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmid containing the centromere *parS*. *J. Bacteriol.* 170: 954-960.
- Gallie, D. R., Hagiya, M. y Kado, C. I. (1985). Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58 replication region with a novel high-copy-number derivative. *J. Bacteriol.* 161: 1034-1041.
- Gallie, D. R. y Kado, C. I. (1987). *Agrobacterium tumefaciens* pTAR *parA* promoter region involved in autoregulation, incompatibility and plasmid partitioning. *J. Mol. Biol.* 193: 465-478.
- García-de los Santos, A., Brom, S. y Romero, D. (1996). *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 12: 119-125.
- Gerlitz, M., Habrak, O. y Schwab, H. (1990). Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination. *J. Bacteriol.* 172: 6194-6203.
- Giraldo, R. y Díaz-Orejas, R. (1992). Differential binding of wild-type and mutant RepA protein to *oriR* sequence suggest a model for the initiation of plasmid R1 replication. *J. Mol. Biol.* 228: 787-802.
- Giraldo, R., Andreu, J. M. y Díaz-Orejas, R. (1998). Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *The EMBO Journal*. 17: 4511-4526.
- Hansen, E. B. y Yarmolinsky, M. B. (1986). Host participation in plasmid maintenance: dependence upon *dnaA* of replicons derived from P1 and F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 4423-4427.
- Harley, C. B. y Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nuc. Acids. Res.* 15: 2343-2361.
- Hayes, F., Radnedge, L., Davis, M. A. y Austin, S. J. (1994). The homologous operons for P1 and P7 plasmid partition are autoregulated from dissimilar operator sites. *Mol. Microbiol.* 11: 249-260.
- Helinski, D. R., Toukdarian, A. E. y Novick, R. P. (1996). Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids. En *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, et al., ed.), 2a edic., pp. 2295-2324, ASM Press, Washington DC.

- Hiraga, S. (1992). Chromosome and plasmid partition in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Biochem. 61: 283-306.
- Holmes, M. L., Pfeifer, F. y Dyall-Smith, M. L. (1995). Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. Gene. 153: 117-121.
- Hooykaas, P. J. J., den Dulk-Ras, H., Ooms, G. y Schilperoort, R. A. (1980). Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 143: 1295-1306.
- Hooykaas, P. J. J., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuink, A. J. G., van Brussel, A. A. N. y Schilperoort, R. A. (1985). Expression of a *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid in *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens*: incompatibility with a *R. trifolii* Sym plasmid. Plasmid. 14, 47-52.
- Ishiai, M., Wada, C., Kawasaki, Y. y Yura, T. (1994). Replication initiator protein RepE of mini-F plasmid: functional differentiation between monomers (initiator) and dimers (autogenous repressor). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 3839-3843.
- Jensen, R. B., Dam, M. y Gerdes, K. (1994). Partitioning of plasmid R1. The *parA* operon is autoregulated by ParA and its transcription is highly stimulated by a downstream activating element. J. Mol. Biol. 236: 1299-1309.
- Jensen, R. B., Grohmann, E., Schwab, H., Díaz-Orejas, R. y Gerdes, K. (1995). Comparison of *cdd* of F, *parD* of RP4, and *parD* of R1 using a novel conditional replication system of plasmid R1. Mol. Microbiol. 17: 211-220.
- Jensen, R. B. y Gerdes, K. (1999). Mechanism of DNA segregation in prokariotes: ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicon during the cell cycle. The EMBO Journal. 18: 4076-4084.
- Johnson, E. P., Ström, A. R. y Helinski, D. R. (1996). Plasmid RK2 toxin protein ParE: Purification and interaction with the ParD antitoxin protein. J. Bacteriol. 178: 1420-1429.
- Kado, C. I. (1998). Origin and evolution of plasmids. Antonie van Leeuwenhoek. 73: 117-126.
- Kawasaki, Y., Wada, C. y Yura, T. (1990). Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. Mol. Gen. Genet. 220: 277-282.
- Kim, N. Y., Banerjee, S. K. y Iyer, V. N. (1994). The IncN plasmid replicon: two pathways of DNA polimerase I independent replication. J. Bacteriol. 176: 7735-7739.
- Kim, S. K. y Wang, J. C. (1998). Localization of F plasmid SopB protein to positions near the poles of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 1523-1527.

- Komori, H., Matsunaga, F., Higuchi, Y., Ishiai, M., Wada, C. y Miki, K. (1999). Crystal structure of a prokaryotic replication initiator protein bound to DNA at 2.6 Å resolution. *The EMBO Journal*. 18: 4597-4607.
- Konieczny, I. y Helinski, D. R. (1997). The replication initiation protein of the broad-host-range plasmid RK2 is activated by the ClpX chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 14378-14382.
- Kulakauskas, S., Lubys, A. y Ehrlich, D. (1995). DNA Restriction-modification systems mediate plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* 177: 3451-3454.
- Kusukawa, N., Mori, H., Kondo, A. y Hiraga, S. (1987). Partitioning of F plasmid: Overproduction of an essential protein for partition inhibits plasmid maintenance. *Mol. Gen. Genet.* 208: 365-372.
- Leong, S. A., Williams, P. H. y Ditta, G. S. (1985). Analysis of the 5' regulatory region of the gene for  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase of *Rhizobium meliloti*. *Nuc. Acids. Res.* 13: 5965-5976.
- Li, P.-L. y Farrand, S. K. (2000). The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *J. Bacteriol.* 182: 179-188.
- Lisser, S. y Margalit, H. (1993). Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nuc. Acids. Res.* 21: 1507-1516.
- Luka, S., Patriarca, E. J., Riccio, A., Iaccarino, M. y Defez, R. (1996). Cloning of the *rpoD* analog from *Rhizobium etli*: *sigA* of *R. etli* is growth phase regulated. *J. Bacteriol.* 178: 7138-7143.
- Lynch, A. S. y Wang, J. C. (1995). SopB protein-mediated silencing of genes linked to the *sopC* locus of *Escherichia coli* F plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 1896-1900.
- Marczynski, G. T. y Shapiro, L. (1993). Bacterial chromosome origins of replication. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3: 775-782.
- Martin, G. B., Thomashow, M. F. y Chelm, B. K. (1989). *Bradyrhizobium japonicum glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters. *J. Bacteriol.* 171: 5638-5645.
- Matsunaga, F., Ishiai, M., Kobayashi, G., Uga, H., Yura, T. y Wada, C. (1997). The central region of RepE initiator protein of mini-F plasmid plays a crucial role in dimerization required for negative replication control. *J. Mol. Biol.* 274: 27-38.
- Metcalf, W. W., Jiang, W., Daniels, L. L., Kim, S.-K., Haldimann, A. y Wanner, B. L. (1996). Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZ $\alpha$*  for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid*. 35: 1-13.

- Montallebi-Veshareh, M., Rouch, D. A. y Thomas, C. M. (1990). A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 4: 1455-1463.
- Mori, H., Kondo, A. Ohshima, A. Ogura, T. y Hiraga, S. (1986). Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J. Mol. Biol.* 192: 1-15.
- Mori, H., Mori, Y., Ichinose, Ch., Niki, H., Ogura, T., Katos, A. y Hiraga, S. (1989). Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning. *J. Biol. Chem.* 264: 15535-15541.
- Naito, T., Kusano, K. y Kobayashi, I. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science.* 267: 897-899.
- Nester, E. W. y Kosuge, T. (1981). Plasmids specifying plant hyperplasias. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 531-565.
- Niki, H. e Hiraga, S. (1997). Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell Division cycle in *E. coli*. *Cell.* 90: 951-957.
- Nishiguchi, R., Takanami, M. y Oka, A. (1987). Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy-root-inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.* 206: 1-8.
- Nordström, K., Molin, S. y Light, J. (1984). Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of plasmid R1 system. *Plasmid.* 12: 71-90.
- Nordström, K. y Austin, S. J. (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu. Rev. Genet.* 23: 37-69.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51: 381-395.
- Novick, R. P. (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 537-565.
- O'Connell, M. P., Dowling, D., Neilan, J., Simon, R., Dunican, L. K. y Puehler, A. (1984). Plasmid interactions in *Rhizobium*: Incompatibility between symbiotic plasmids. In "Advances in Nitrogen Fixation Research" (C. Veeger and W. E. Newton, Eds.) p713. Nijhoff Junk, The Hague.
- O'Connell, M. P., Hynes, M. F. y Puehler, A. (1987). Incompatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and Ri plasmid of *Agrobacterium*. *Plasmid.* 18: 156-163.
- Ogura, T., Niki, H., Kano, Y., Imamoto, F. y Hiraga, S. (1990). Maintenance of plasmids in HU and IHF mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 220: 197-203.

- Ogura, T., Niki, H., Mori, H., Morita, H., Hasegawa, M., Ichinose, C. y Hiraga, S. (1990). Identification and characterization of *gyrB* mutants of *Escherichia coli* that are defective in partitioning of mini-F plasmids. *J. Bacteriol.* 172: 1562-1568.
- Osteras, M., Driscoll, B. T. y Finan, T. M. (1995). Molecular and expression analysis of the *Rhizobium meliloti* phosphoenolpyruvate carboxikinase (*pckA*) gene. *J. Bacteriol.* 177: 1452-1460.
- Ramírez-Romero, M. A., Bustos, P., Girard, L., Rodríguez, O., Cevallos, M. A. y Dávila, G. (1997). Sequence, Localization and Characteristics of the Replicator Region of the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology*, 143: 2825-2831.
- Rigottier-Gois, L., Turner, S. L., Young, P. W. y Amarger, N. (1998). Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. *Microbiology*. 144: 771-780.
- Rine, J. (1999). On the mechanism of silencing in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8309-8311.
- Rodionov, O., Lobočka, M. y Yarmolinsky, M. (1999). Silencing of genes flanking the P1 plasmid centromere. *Science.* 283: 546-549.
- Ruíz-Echevarria, M. J., Berzal-Herraz, A., Gerdes, K. y Díaz-Orejas, R. (1991). The *kis* and *kid* genes of the *parD* maintenance system of plasmid R1 form an operon that is autoregulated at the level of transcription by the co-ordinated action of the Kis and Kid proteins. *Mol. Microbiol.* 5:2685-2693.
- Ruíz-Echevarria, M. J., de la Torre, M. A. y Díaz-Orejas, R. (1995). A mutation that decreases the efficiency of plasmid R1 replication leads to the activation of *parD*, a killer stability system of the plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 130: 129-136.
- Salmon, M. A., van Malderen, L., Bernard, P. y Couturier, M. (1994). The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey. *Mol. Gen. Genet.* 244: 530-538.
- Segal, G. y Ron, E. Z. (1993). Heat shock transcription of the *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens* may involve a hairpin-loop structure. *J. Bacteriol.* 175: 3083-3088.
- Shlomit, L y Margalit, H. (1993). Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nuc. Acids. Res.* 21: 1507-1516.
- Sozhamannan, S. y Chatteraj, D. K. (1993). Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiation binding to the origin. *J. Bacteriol.* 175: 3546-3555.

- Stolt, P. y Stoker, N. G. (1996). Protein-DNA interactions in the *ori* region of the *Mycobacterium fortuitum* plasmid pAL5000. *J. Bacteriol.* 178: 6693-6700.
- Summers, D. K., Beton, C. W. H. y Withers, L. (1993). Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* 8: 1031-1038.
- Summers, D. K. (1996). The biology of plasmids. pp. 1-91. Blackwell Science, Inc., USA.
- Suzuki, K., Ohta, N., Hattori, Y., Uraji, M., Kato, A. y Yoshida, K. (1998). Novel structural difference between nopaline- and octopine-type *trbJ* genes: construction of genetic and physical map and sequencing of *trb/tral* and *rep* gene clusters of a new Ti plasmid pTi-SAKURA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1396:1-7.
- Szegedi, E. y Otten, L. (1998). Incompatibility properties of tartrate utilization plasmids derived from *Agrobacterium vitis* strains. *Plasmid.* 39: 35-40.
- Tabata, S., Hooykaas, P. J. J. y Oka, A. (1989). Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J. Bacteriol.* 171: 1665-1672.
- Tapias, A., Fernández de Henestrosa, A. R. y Barbé, J. (1997). Characterization of the promoter of the *Rhizobium etli recA* gene. *J. Bacteriol.* 179: 1573-1579.
- Taté, R., Riccio, A., Iaccarino, M. y Patriarca, E. J. (1997). Cloning and transcriptional analysis of the *lipA* (lipoic acid synthetase) gene from *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 165-172.
- Thisted, T., Sorensen, N. S. Wagner, E. G. H. y Gerdes, K. (1994). Mechanism of post-segregational killing: Sok antisense RNA interacts with Hok mRNA via its 5'-end single-stranded leader and competes with the 3'-end of Hok mRNA for binding to the *mok* translational initiation region. *The EMBO Journal.* 13: 1960-1968.
- Thöny-Meyer, L., Stax, D. y Hennecke, H. (1989). An unusual gene cluster for the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirement for effective root nodule symbiosis. *Cell.* 57: 683-697.
- Travers, A. (1997). DNA-protein interactions: IHF-the master bender. *Current Biology.* 7: R252-R254.
- Turner, S. y Young, P. W. (1995). The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8JI. *FEMS Microbiol. Lett.* 133: 53-58.
- Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Power, R. S., Amarger, N. y Young, P. W. (1996). Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology.* 142: 1705-1713.

- Uga, H., Matsunaga, F. y Wada, C. (1999). Regulation of DNA replication by iterons: an interaction between the *ori2* and *incC* regions mediated by RepE-bound iterons inhibits DNA replication of mini-F plasmid in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*. 18: 3856-3867.
- Watanabe, E., Wachi, M., Yamasaki, M. y Nagai, K. (1992). ATPase activity of SopA, a protein essential for active partitioning of F plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 234: 346-352.
- Weidenhaupt, M., Rossi, P., Beck, C., Fisher, H.-M. y Hennecke. (1996). *Bradyrhizobium japonicum* possesses two discrete sets of electron transfer flavoprotein genes: *fixA*, *fixB* and *etfS*, *etfL*. *Arch. Microbiol.* 165: 169-178.
- White, F. F. Nester, E. W. (1980). Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *J. Bacteriol.* 144: 710-720.
- Williams, D. R. y Thomas, Ch. M. (1992). Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1-16.
- Wösten, M. M. S. M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 127-150.
- Yates, P. Lane, D. y Biek, D. P. (1999). The plasmid centromere, *sopC*, is required for full repression of the *sopAB* operon. *J. Mol. Biol.* 290: 627-638.
- Zhao, A. C., Ansari, R. A., Schmidt, M. C. y Khan, S. A. (1998). An oligonucleotide inhibits oligomerization of a rolling circle initiator protein at the pT181 origin of replication. *J. Biol. Chem.* 273: 16082-16089.

ASDA... NO GAIN  
 ...