

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO  
PROGRAMA DE EVOLUCION MOLECULAR

“CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES *cis* DE  
INCOMPATIBILIDAD DEL REPLICADOR DEL PLÁSMIDO  
SIMBIÓTICO p42d DE *Rhizobium etli*.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

P R E S E N T A:

**NORA ELSA SOBERÓN MALTOS**

CIFN



UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS

CUERNAVACA, MOR.

JUNIO DEL 2004.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

---

Este trabajo fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos en el Programa de Evolución Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno perteneciente a la Universidad nacional Autónoma de México.

Durante el desarrollo de proyecto conté con una beca para estudios de Posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como con una beca complementaria concedida por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

Algunos materiales y reactivos utilizados en parte de este proyecto fueron adquiridos gracias al apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado(PAEP).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Nora Elsa Soberón

Maltos

FECHA: 19 - Mayo - 2004

FIRMA: Nora E. Soberón

---

DEDICATORIA

A mis padres

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Angel Cevallos por sus consejos, su tiempo y disposición para la discusión sobre el proyecto y la vida durante todos estos años.

A los Dras. Laura Camarena y Alicia Gonzales, así como a los Dres. Guillermo Dávila, Mario Soberón, Manuel Espinosa y Jorge Membrillo por la revisión de la tesis.

A los Dres. Guillermo Dávila, Mario Soberón y David Romero por su participación como miembros del comité tutorial. A la Dr. Brenda Valderrama por la revisión del artículo.

A mi familia: mis Pas Norberto y Margarita, mis hermanos Sandry, Mireya, Nor, mi cuate (Hector), mis sobrinos Carlos, Luis, Sonia, Tito y Nuncho y mis cuñados Sandra, Cinthia y José Juan por su apoyo desde lejos.

A los Dres Juan Téllez, Miguel A. Ramírez por resolver todas mis dudas en el laboratorio.

A Javier izquierdo y Tania Venkova por su amistad y su ayuda desinteresada siempre que los necesitaba.

A mis viejas amigas (por tiempo, no por edad!) Liliana, Claudia y Vania por las risas, lagrimas y tantas cosas compartidas. A Elia, Viviana, Sonia por escuchar y compartir los mediodías. A mis todavía mas viejos amigos Gero, Eva, Martha, Ligia, Luis (el primo), Gilda, Gaby, Ale, Ady, Elia y Felipe, por enseñarme que la distancia no termina con la verdadera amistad.

A Victor por todos los "Pingüinos".

A mis amigos y compañeros del CIFN: Elizabeth, Sandra, Ramón, Angeles, Mario, Victor Glz., Neto, Grisel, Mela, Héctor, Pili, Ara, José, Pau, Ismael, Vero, Gama y los demas...

A Edith, Angeles, Ximena, Gabriel, Jalisco, Andrisk, Cuervo, Sol y Ricardo, por hacer los reuens más divertidos.

A Dolores Cuellar por la elaboración de cartas y demás tramites durante el doctorado.

A todos los que se me olvidan...

---

---

<b>ABSTRACT</b>	1
<b>RESUMEN</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Definición e importancia biológica de los plásmidos	3
<b>Replicación</b>	4
Replicación tipo Theta	6
Replicación por desplazamiento de cadena	7
Replicación por Circulo rodante	8
<b>Regulación de la replicación</b>	9
Iterones	10
Control por RNA antitranscrito	11
Represor transcripcional y un RNA antisentido	15
Proteína inhibidora	17
<b>Partición de plásmidos</b>	19
Sistemas Killer	19
Resolución de dímeros	20
Sistemas de Partición Activa	21
Localización de los plásmidos F y P1 en la célula	25
Otros sistemas de partición	28
<b>Incompatibilidad</b>	
Definición	29
Incompatibilidad causada por replicación	31
Incompatibilidad causada por partición	34
<b>ANTECEDENTES</b>	
Plásmidos tipo <i>repABC</i>	35
Incompatibilidad en <i>Rhizobium</i>	38
<i>Rhizobium etli</i> y sus plásmidos	39
El plásmido p42d	40
<b>OBJETIVOS</b>	42
<b>RESULTADOS</b>	
Manuscrito del artículo "Incompatibility and the partition site of the <i>repABC</i> basic replicon of the symbiotic plasmid from <i>R. etli</i> "	43
Resultados Adicionales	57
<b>DISCUSIÓN</b>	64
<b>PERSPECTIVAS</b>	66
<b>REFERENCIAS</b>	67
<b>APÉNDICE</b>	77

---

**ABSTRACT**

The basic replicon of the symbiotic plasmid (p42d) of *Rhizobium etli* CE3 is constituted by the *repABC* operon. Whereas RepC is essential for plasmid replication, RepA and RepB are involved in plasmid partitioning. Three incompatibility regions have been previously identified in this plasmid: the first one encodes RepA, a partitioning protein that also down-regulates the *repABC* transcription. The second region is situated within the *repB-repC* sequence (*inc $\alpha$* ) which encodes an antisense RNA, and the last one, *inc $\beta$* , is located in a 502 bp-*EcoRI* fragment spanning the last 72 bp of the coding region of *repC* and the following downstream sequence. In this work we show that: 1) the *inc $\beta$*  region is required for plasmid partitioning. 2) A 16 bp palindrome sequence, located 40 bp downstream of the stop codon of *repC* gene of plasmid p42d is necessary and sufficient to induce incompatibility towards the parental plasmid and accounts for all the incompatibility properties of this region (*inc $\beta$* ). 3) The palindrome is the DNA target site for RepB binding. With these findings we propose that *inc $\beta$*  contains the partitioning site (*par* site) of the basic replicon of plasmid p42d and that the 16 bp palindrome is the core sequence to nucleate the RepB binding. We also show that the antisense RNA is the only incompatibility determinant in *inc $\alpha$*  and comparing sequences of other *R. etli* strains we propose that the differences in the loop of the antisense RNA are the cause of different incompatibility groups.



## RESUMEN

El replicador básico del plásmido simbiótico p42d de *Rhizobium etli* está constituido por un replicador tipo *repABC*. La proteínas RepA y RepB están involucradas en la estabilidad, mientras que RepC es la proteína esencial para la replicación del plásmido. Se han identificado tres determinantes de incompatibilidad en esta región: el primero es la proteína de partición RepA, que también regula negativamente la transcripción del operón. El segundo determinante de incompatibilidad es la región llamada *inca*, la cual está situada entre los genes *repB* y *repC*, esta región codifica para un RNA antisentido. El último, *incb* es un fragmento *EcoRI* de 502 pb que comprende las últimas 72 pb de la región codificante de *repC* y la secuencia corriente abajo del gene. En este trabajo mostramos que: 1) Se requiere la región *incb* para una adecuada partición del plásmido, 2) Una secuencia palíndromo de 16 pb, localizada a 40 pb río abajo del codón de paro de *repC* es necesaria y suficiente para ejercer incompatibilidad. 3) El palíndromo es el sitio blanco del DNA para la unión de RepB. A partir de estos resultados proponemos que *incb* contiene el sitio de partición (sitio *par*) del plásmido p42d y que la secuencia palíndromo es la parte central del sitio de unión de RepB. También mostramos que el RNA antisentido es el único determinante de incompatibilidad presente en *inca* y comparando las secuencias de regiones homologas a *inca* de otros plásmidos de *R. etli*, proponemos que, las diferencias en el asa del RNA antisentido produce los diferentes grupos de incompatibilidad.

## INTRODUCCION

Los plásmidos son moléculas de DNA lineales o circulares, cuya replicación y segregación se realiza independientemente de las del cromosoma, se encuentran tanto en bacterias, como en algunas levaduras y hongos (Actis *et al.* 1999). Su tamaño varía desde 1.3 kilobases (kb) hasta 2400 kb y codifican para funciones accesorias no esenciales para la sobrevivencia de la bacteria. Los plásmidos pueden llegar a representar hasta el 50% del material genético de una bacteria (García-de los Santos *et al.* 1996). La diferencia entre plásmido y cromosoma radica básicamente en que el cromosoma es indispensable para la sobrevivencia de la bacteria en cualquier condición de crecimiento, en cambio, el plásmido no. El plásmido podría ser indispensable para crecer en ciertos ambientes, pero no para otros, puesto que codifican para funciones accesorias como resistencia a antibióticos, degradación de compuestos químicos, resistencia a metales, factores de virulencia, producción de tumores en plantas, la nodulación y fijación de nitrógeno, etc. (Brock y Madigan 1993). Si una molécula de DNA tiene aunque sea, solo un gene esencial para el crecimiento de la bacteria en cualquier condición, se le considera entonces, un cromosoma adicional.

La parte más pequeña del plásmido que es capaz de replicar con el mismo número de copias que el plásmido completo se le denomina *replicón básico* y consta de un origen de replicación (*ori*), aunque en algunos casos se encuentran más de uno; al menos una proteína involucrada en el inicio de la replicación (en la mayoría de los casos) y posee la información genética involucrada en el control de la replicación. Generalmente los plásmidos presentan únicamente un replicón básico; sin embargo, se han descrito plásmidos que tienen dos o más replicones básicos (Mazaitis *et al.* 1981; Bartosik *et al.* 1997).

Los plásmidos están presentes en un número de copias definido dentro del huésped, el número varía dependiendo del plásmido, pero puede ser de una, hasta cientos de copias por célula (Kado 1998). El número de copias de un plásmido está determinado por algunos

genes presentes en él, pero este número puede variar de acuerdo al huésped de que se trate y de las condiciones de crecimiento de éste.

Muchos de los plásmidos cuentan con la información requerida para su transferencia conjugativa, o cuentan con los elementos necesarios para ser movilizados por otros plásmidos a otras bacterias, de la misma o de diferente especie o inclusive a plantas (Amabile-Cuevas y Chicurel 1992). Esta característica contribuye de manera importante en el proceso de diversificación bacteriana, pues la adquisición de plásmidos representa una manera rápida y eficiente de obtener nuevas características adaptativamente ventajosas para sobrevivir ante un medio cambiante y muchas veces poco favorable. Sin embargo, no todos los plásmidos pueden transferirse y estabilizarse en todas las bacterias. La manera con la que un plásmido puede distribuirse y estabilizarse en una determinada comunidad bacteriana depende de ciertas características intrínsecas de los plásmidos como son: su mecanismo de replicación, su transferibilidad, su mecanismo de partición y su incompatibilidad (Sykora 1992).

## **- REPLICACION**

La replicación es el proceso que permite sintetizar, a partir de una molécula de DNA, dos moléculas con la misma información genética. Este proceso se divide en tres etapas: inicio, elongación y término.

La secuencia de eventos que dispara el inicio de la replicación de los plásmidos tienen muchas características comunes entre ellos y los cromosomas. La replicación empieza (excepto para ColE1) con la unión de al menos una proteína (proteína de inicio); a una región específica de DNA llamada origen de replicación (*ori*). Tras la unión de la proteína iniciadora, ésta cataliza la apertura del DNA y promueve la incorporación de las proteínas del primosoma y de la helicasa DnaB en la horquilla recién formada (Bramhill y Kornberg 1988). El primosoma es un complejo proteico que ayuda a desnaturalizar el DNA y facilita la unión de DnaB (una helicasa) y de DnaG (una primasa). DnaB desplaza a la

proteína de inicio y a su vez recluta a DnaG para iniciar la síntesis del primero de RNA necesario para la fase de elongación de la nueva cadena de DNA. Una vez cumplida esta etapa, el complejo multiproteico de la DNA polimerasa III (DNApol) se incorpora a la horquilla de replicación, lo que da lugar a la formación del replisoma. El deslizamiento del DNA a lo largo del replisoma corresponde a la etapa de elongación, en la cual también participan proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (proteínas SSB) que evitan la renaturalización, y sobre todo, 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 en *Escherichia coli* y su función se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes y proteínas relacionadas con la replicación del cromosoma de *Escherichia coli*

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>	DnaG	Sintetiza el primero de RNA
<i>himA, hip</i>	IHF	Heterodímero, dobla al DNA a través de una unión específica
<i>hupA, hupB</i>	HU	Heterodímero, dobla al DNA mediante una unión inespecífica
FIS	<i>fis</i>	Proteína de unión al DNA
<i>dnaE</i>	$\alpha$	Proteína central de la holoenzima DNApolIII
<i>dnaQ</i>	$\epsilon$	Exonucleasa con actividad 3'-5'. Forma parte de la DNApolIII
<i>holE</i>	$\theta$	Forma parte de la DNApolIII
<i>dnaX</i>	$\tau$	Forma parte de la DNApolIII
<i>dnaX</i>	$\gamma$	Complejo $\gamma$ de la DNApolIII
<i>holA</i>	$\delta$	
<i>holB</i>	$\delta'$	
<i>holC</i>	$\chi$	
<i>holD</i>	$\psi$	
<i>dnaN</i>	$\beta$	Factor de procesividad
<i>polA</i>	PolI	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 termino de la replicación
<i>priA</i>	PriA	Forma parte del primosoma. Helicasa con actividad 3'-5'
<i>priB, priC'</i>	PriB, PriC	Forma parte del primosoma
<i>dnaT</i>	DnaT	Forma parte del primosoma
<i>ssb</i>	SSB	Proteína de unión a DNA de cadena sencilla

Tomada y modificada de Baker y Wickner 1992.

**Tipos de replicación.** Existen tres mecanismos de replicación para plásmidos circulares nombrados: Replicación tipo Theta ( $R\theta$ ), Replicación por Círculo Rodante (CR) y Replicación por desplazamiento de cadena (Figura 1).

### Replicación tipo theta

En el mecanismo de replicación tipo theta, la síntesis de DNA es continua para una de las cadenas (líder) y discontinua en la otra cadena (retrasada). La replicación tipo theta puede empezar en uno o en varios orígenes de replicación y puede ser uni o bidireccional. Bajo el microscopio electrónico los intermediarios de replicación se ven como la letra “ $\theta$ ” theta, por eso recibe este nombre. Con algunas excepciones, este tipo de replicación requiere para que comience la replicación, de una proteína iniciadora codificada por el plásmido, algunos replicones pueden también necesitar a la DNA polimerasa del huésped (DNAPol I) como ColE1 durante los primeros pasos de la síntesis de la cadena líder.

Algunas características que se pueden encontrar en muchos de los orígenes de los plásmidos con este tipo de replicación son: (i) secuencias directas repetidas llamadas iterones y que son el sitio de unión para las proteínas Rep codificadas por el plásmido. (ii) Regiones con secuencias repetidas ricas en AT, donde ocurre la desnaturalización del DNA y el ensamblaje de las proteínas involucradas en la replicación. (iii) Uno o más sitios de reconocimiento para la proteína DnaA (proteína de inicio de la replicación del cromosoma del huésped) denominados “cajas DnaA”. El origen de replicación puede contener también sitios de reconocimiento para el pegado de proteínas que doblan al DNA como IHF, HU o FIS (del Solar 1998), o secuencias de metilación Dam, las cuales están presentes tanto en el origen de replicación del cromosoma de *Escherichia coli*, como en el origen de replicación de algunos plásmidos que replican bajo este mecanismo, como P1 (Brenner *et al.* 1991), y pSC101 (Bramhill y Kornberg 1988).

La presencia de secuencias directas repetidas en las cuales las proteínas Rep se une, no son exclusivas de los plásmidos  $R\theta$ , estas secuencias también se encuentran en

plásmidos que replican mediante desplazamiento de cadena (Scholz *et al* 1989) o círculo rodante (Lacks *et al.* 1986).

Existen plásmidos con replicación tipo-theta ampliamente estudiados, como el-R6K, pSC101, P1, entre otros, estos replicones requieren una proteína iniciadora codificada por el plásmido, (Shafferman y Helinski 1983; Ingmer *et al.* 1995; Mukhopadhyay y Chatteraj 2000). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta no es una característica general, el mejor modelo de un replicón de este tipo cuya replicación es independiente de una proteína iniciadora es el plásmido ColE1 (Marians 1992; Polisky 1988).

### **Replicación por desplazamiento de cadena**

El ejemplo más conocido de plásmidos que replican por un mecanismo de desplazamiento de cadena son los plásmidos promiscuos de la familia IncQ, cuyo prototipo es el plásmido RSF1010. Los miembros de esta familia requieren tres proteínas codificadas por el plásmido para iniciar la replicación del DNA: una proteína con actividad helicasa 5' - 3' (RepA), otra con actividad de primasa (RepB), y una proteína iniciadora llamada RepC (Sakai y Komano 1996).

La replicación en el plásmido RSF1010 ocurre a partir de dos orígenes de replicación adyacentes de cadena sencilla (*ssiA* y *ssiB*) posicionados en las diferentes cadenas de DNA. La replicación empieza, cuando estos orígenes se exponen como regiones de cadena sencilla. Esta desnaturalización depende de RepC y RepA y la facilita una región rica en AT adyacente al origen. La síntesis del primero necesario para iniciar la replicación la lleva a cabo RepB. La síntesis de cada una de las cadenas ocurre continuamente y provoca el desplazamiento de la cadena complementaria. Debido a las actividades de las tres proteínas codificadas por el plásmido (RepA, RepB y RepC), la replicación es independiente de la transcripción de la RNAPol del huésped y de las proteínas del huésped que actúan en las primeras etapas de replicación (DnaA, DnaB, DnaC y DnaG). Esta independencia, podría ser la razón por la cual los plásmidos de este tipo son de amplio rango de hospedero (del Solar *et al.* 1998).

**Replicación por Circulo Rodante**

La replicación por CR es unidireccional y se considera un proceso asimétrico, porque la síntesis de la cadena líder, y la síntesis de la cadena retrasada no se lleva a cabo al mismo tiempo. La replicación se inicia cuando la proteína Rep codificada por el plásmido hace un corte sitio-específico en una de las cadenas de DNA, en un sitio llamado origen de doble cadena (*dso*). El corte libera un extremo 3'-OH libre el cual se usa como primero para la síntesis de la cadena líder (Novik 1989). La elongación a partir del extremo 3'-OH, requiere la participación de proteínas del huésped (DNAPolIII, SSB y la helicasa PcrA) y ésta, continúa hasta que, el replisoma alcanza el *dso*. Los productos de la replicación de la cadena líder, son una molécula de doble cadena de DNA y un intermediario de cadena sencilla, el cual corresponde a la cadena parental desplazada. Esta última se convierte en una molécula de doble cadena por las proteínas del huésped que inician la replicación a partir de un origen de cadena sencilla, físicamente distinto al *dso* (*sso*). El último paso sería el superenrollamiento de las moléculas por la DNA girasa del huésped.

Las proteínas iniciadoras de los plásmidos que replican por CR tienen una actividad de DNA transferasa, de tal manera que son capaces de cortar y unir moléculas de DNA de la misma manera que lo hacen las topoisomerasas tipo I (del Solar *et al.* 1998).

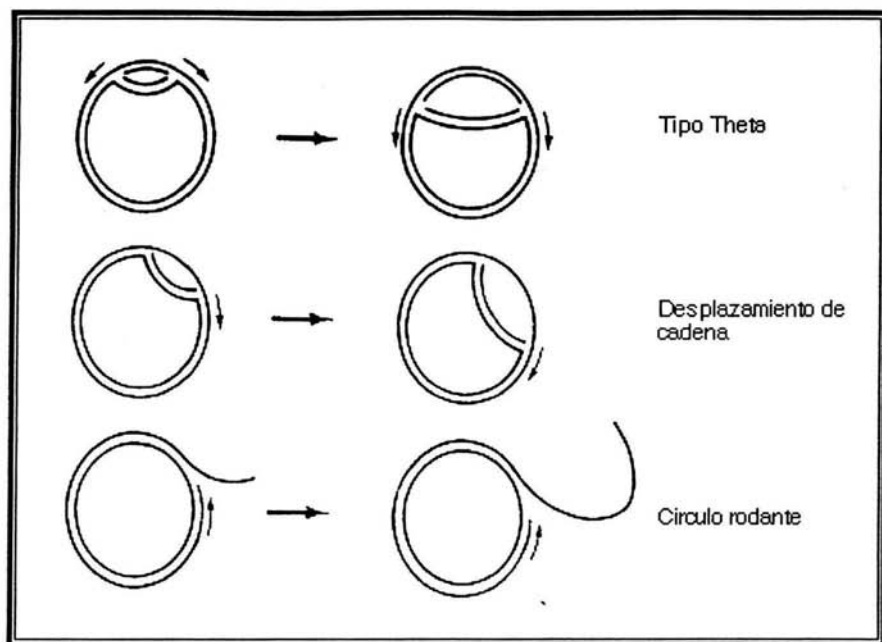


Fig1. Tipos de replicación. Tomada y modificada de Komberg y Baker 1992

## REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN

Una replicación autónoma es una característica fundamental para el plásmido, sin embargo, el plásmido debe sincronizar su replicación con el crecimiento y la división de la célula huésped. Para llevar a cabo una coexistencia estable con la célula huésped, cada plásmido debe de replicar al menos una vez por generación. Un plásmido que replica menos de una vez por generación sufrirá una reducción en el número de copias y por lo tanto disminuirá el número de células con plásmidos. Por otro lado, si el plásmido replica más de una vez por generación, su número de copias incrementará al unísono de la carga metabólica de la célula huésped, lo que provocará un daño en la viabilidad de la célula hospedera.



La replicación de los plásmidos está controlada básicamente por: (i) Iterones, (ii) RNA antitranscrito, (iii) RNA antitranscrito y un represor transcripcional ó, (iv) Una Proteína inhibidora.

**Iterones:** Como se mencionó anteriormente, los iterones son los sitios de reconocimiento de la proteína iniciadora de la replicación, y se encuentran, generalmente, adyacentes al origen. La inhibición se lleva a cabo mediante un mecanismo llamado “handcuffing”, que ocurre cuando hay una interacción entre las proteínas iniciadoras que están unidas a estas secuencias. Esta interacción puede ocurrir de manera intra o intermolecular; es decir, una interacción entre proteínas que están unidas en la misma molécula de DNA, o dos moléculas de DNA unidas a través de la interacción proteína-proteína, y estas proteínas están unidas también a los iterones correspondientes, impidiendo así, la formación del complejo necesario para dar inicio a la replicación (Chattoraj 2000).

Los iterones también pueden encontrarse en regiones fuera del origen de replicación, (P1, F, RK2, R6K), aunque éstos no participan en el inicio de la replicación, tienen un papel importante en el control de la replicación (Abeles *et al.* 1995). En plásmidos que no tienen iterones adicionales, los iterones presentes en el origen son los únicos involucrados en el control de la replicación. Los iterones pueden estar adyacentes o separados por secuencia, los que están presentes en el origen suelen estar presentes en “tandem” y situados a una distancia que es, en general, un múltiplo de 11 (del Solar *et al.* 1998). Esto implica que el complejo proteína Rep-iteron está alineado en la misma cara del DNA. Se requieren múltiples iterones para la actividad del origen, pero no todos los iterones son esenciales. Cuando la concentración de iterones se incrementa, ya sea en *cis* o en *trans*, el número de copias del plásmido disminuye, (Helinski 1996) es decir, la replicación no es óptima. Los iterones tienen un efecto mucho mayor cuando están en *cis* que en *trans*. Por ejemplo, cuando se adiciona un solo iterón a un miniP1, el número de copias disminuye 2 veces, pero la presencia del mismo iteron en un vector multicopia reduce el número de copias un 20% solamente. En el caso de P1, el número de copias disminuye al incrementar la concentración de iterones presentes al formarse un dímero,

pero la deleción de los iterones presentes en uno de los orígenes de un dímero incrementa el número de copias (Park *et al.* 2001). Esto indica que los iterones en el origen son los principales responsables del control negativo del número de copias (Park *et al.* 2001).

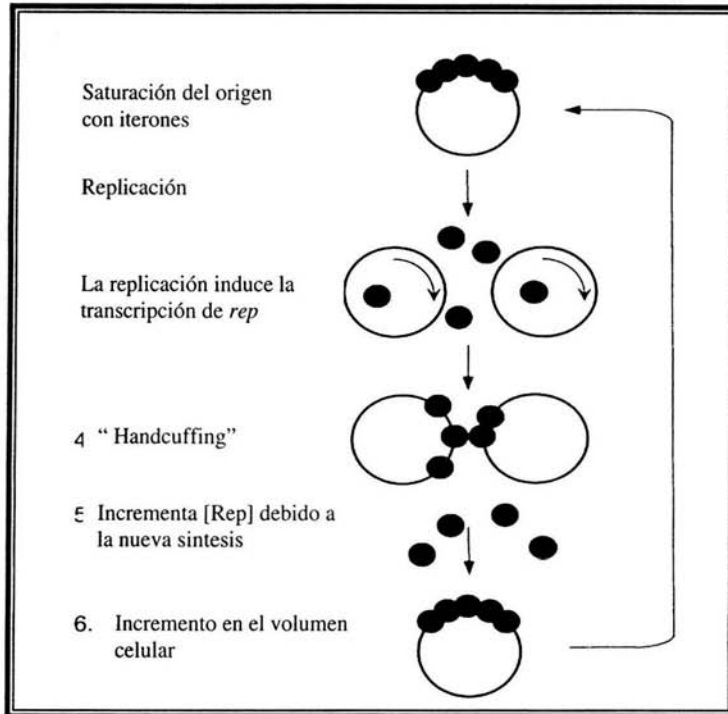


Fig. 2. Control de la replicación por iterones. Tomada y modificada de Chattoraj 2000.

**Control a través de un RNA antitranscrito** Los RNA antitranscrito, o RNA antisentido son transcritos pequeños (de 30 a 150 nucleótidos), que se unen a una región complementaria en otro RNA blanco, e interfieren con el papel biológico del RNA al que se une. Todos los RNA antisentido tienen en su estructura secundaria uno o más "tallos-asa", y el RNA blanco tiene, aunque no siempre, una estructura "tallos-asa" complementaria a la estructura del RNA antisentido. El asa es un determinante importante para la especificidad de la unión antisentido-blanco. Y el tallo, generalmente determina la estabilidad del RNA antisentido (Wagner y Simons 1994). En un caso clásico, ambos RNAs (antisentido y blanco) se transcriben en direcciones opuestas a partir del mismo templado de DNA, y de

esta manera, los dos RNAs son complementarios totalmente. Sin embargo, en algunos casos el RNA antisentido actúa en *trans*, la complementación con el RNA blanco es solo parcial y tiene más de un sitio blanco al cuál unirse (Brantl, 2002). En los plásmidos que regulan su número de copias por RNA antisentido, la regulación se lleva a cabo por inhibición. El RNA antisentido se sintetiza constitutivamente y en la gran mayoría de los casos es inestable; de esta manera, cualquier cambio en el número de copias del plásmido se reflejará en un cambio en la concentración del RNA antisentido. Este cambio en la concentración será "percibido" y conducirá a una frecuencia de replicación alterada. Así, un incremento en el número de copias, provoca también, un incremento en la concentración del RNA antisentido, lo cual conduce a una inhibición por parte de RNA antisentido hacia una función esencial para la replicación. En cambio, si hay una reducción del número de copias del plásmido, también habrá una reducción en la concentración del RNA antisentido, lo que provocará un incremento en la frecuencia de replicación. Los primeros casos de control por RNA antisentido se descubrieron para el plásmido ColE1 y R1 por Tomizawa y Nordström respectivamente en el año de 1981.

Como se mencionó anteriormente, los plásmidos tipo ColE1 no requieren de una proteína iniciadora para empezar la replicación, sino de un RNA primero llamado RNA II, que es el blanco para el control del número de copias. La regulación ocurre de la siguiente manera: inicialmente, una RNA polimerasa del huésped sintetiza un pre-prímero de 550 nucleótidos (nt), durante su síntesis, el pre-prímero adquiere una conformación específica, la cual se requiere para su actividad. El pre-prímero con esta conformación forma un híbrido con el DNA en la región del origen. La RNAsa H del huésped corta el RNA del híbrido RNA-DNA, convirtiéndolo en un primerero maduro para la replicación. Este corte deja un extremo 3'OH libre para que la DNA polimerasa I inicie la replicación. El control de la replicación lo media un RNA antisentido de 108nt (RNAI) que se transcribe constitutivamente por la cadena complementaria en la región del pre-prímero. La unión de RNAI a RNAII impide que el RNAII adquiera la conformación necesaria para formar el híbrido RNA-DNA necesario para dar inicio a la replicación del plásmido. Existe un

segundo elemento que participa en la regulación, la proteína Rom la cual aumenta la estabilidad del complejo RNAI y el pre-prímero. Sin embargo, Rom no es un componente esencial en la regulación, las deleciones del gene *rom* provocan solo un pequeño incremento en el número de copias (Atlung *et al.* 1999).

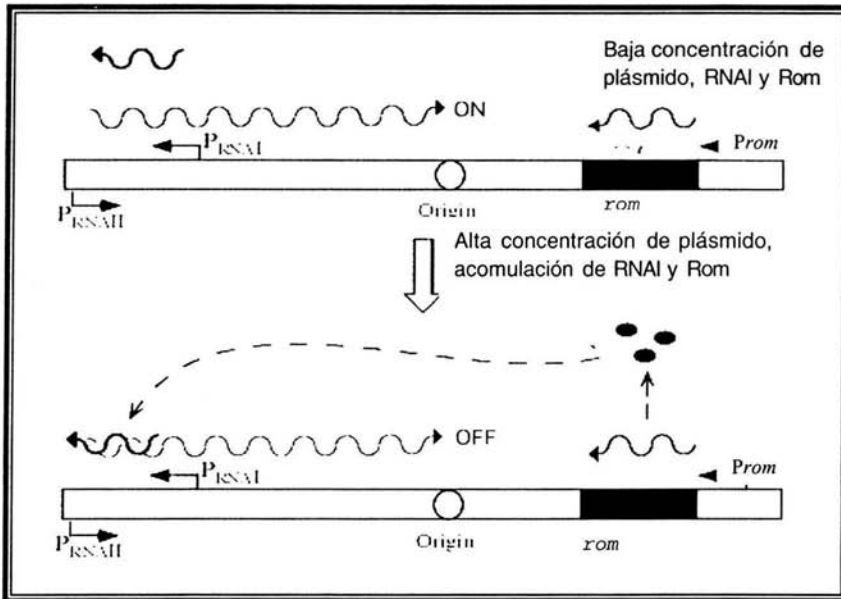


Fig. 3. Control de la replicación de ColE1. Tomada y modificada de

Los plásmidos de la familia pT181 también se regulan por un RNA antisentido, en este caso, el RNA blanco es el RNA mensajero de la proteína iniciadora de la replicación. Durante la transcripción, el RNA mensajero puede tomar dos estructuras conformacionales, que dependen de la presencia, o ausencia del RNA antisentido. En la presencia del RNA antisentido, éste se une al mensajero provocando la formación de un terminador transcripcional  $\rho$ -independiente y como consecuencia, la terminación prematura del transcrito *rep*-RNAm. En la ausencia de la unión del RNA antisentido al RNA mensajero, el mensajero adquiere una conformación donde hay un silenciamiento del terminador transcripcional. Por lo tanto la transcripción continua hasta formar un RNA mensajero completo y en consecuencia, la síntesis de la proteína Rep. La unión del RNA antisentido

debe ocurrir durante un corto periodo de tiempo (10 a 20 segundos) para que sea efectiva (Brantl 2002).

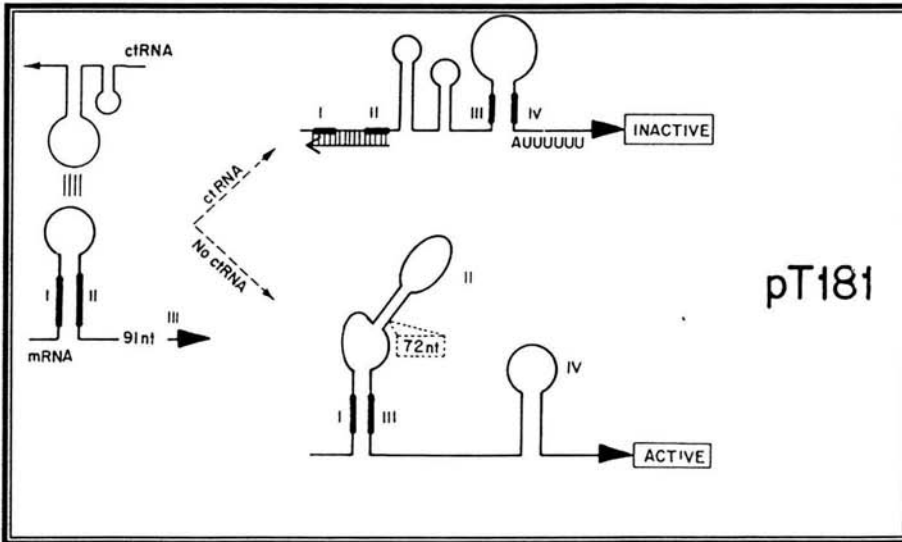


Fig. 4. Control de la replicación del plásmido pT181. Tomada de del Solar *et al.* 1998.

En el caso del plásmido R1, su replicón básico contiene tres marcos abiertos de lectura, *copB*, *tapA* y *repA* transcritos a partir de un mismo promotor (P1). El gene *copB* codifica para el represor transcripcional CopB; *tapA* para un péptido líder de 24 aa llamado TAP y el gene *repA* codifica para la proteína iniciadora de la replicación. El origen de replicación se encuentra río abajo del gene *repA*. Dentro de la región de DNA que codifica para el RNA mensajero de *repA* (*repA*-RNAm) se transcribe un RNA antisentido de 90nt llamado CopA. El principal elemento en el control de la replicación es CopA, este RNA antisentido se une a CopT (CopT se definió como la región del mRNA complementaria a CopA (“T” es de “target”), el cual es parte de la región *repA*-RNAm. La unión de CopA a CopT bloquea el inicio de la traducción del péptido líder Tap y provoca también un corte dependiente de la RNasaIII. La traducción de Tap se requiere para que se pueda traducir *repA*, pues una estructura estable en el RNA bloquea el sitio de unión del ribosoma. De esta manera, inhibiendo la traducción del péptido líder Tap, CopA inhibe la traducción de *repA*.

El segundo elemento en el control del número de copias de R1 es la proteína tetramérica CopB. CopB actúa como un represor transcripcional de un segundo promotor (P2) que se encuentra río abajo de *copB* y que transcribe también a *tap* y *repA*. De esta manera, cuando CopB se une a P2, bloquea la transcripción a partir de este promotor y *repA* se expresa casi exclusivamente a partir del promotor P1. Deleciones en el gen *copB* provocan un incremento de ocho veces en el número de copias del plásmido (Riise et al 1982).

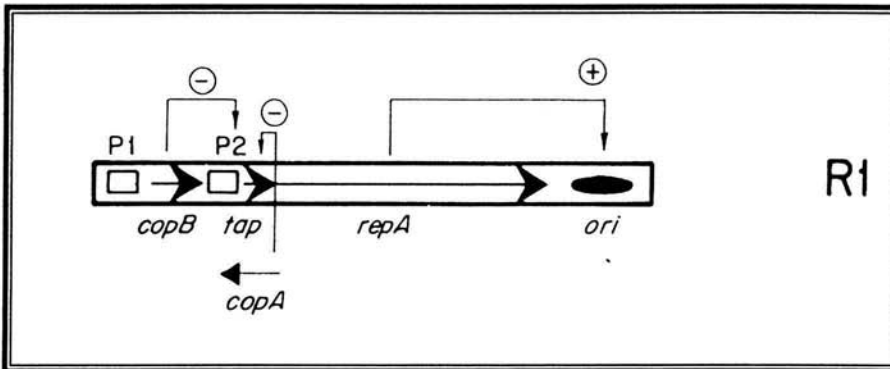


Fig.5. Control de la replicación de R1. Tomada de del Solar *et al.*. 1998.

**Represor transcripcional y un RNA antisentido** Los ejemplos más estudiados de plásmidos regulados por un represor transcripcional y un RNA antisentido son los plásmidos pMV158 y pIP501.

El plásmido pMV158 es un plásmido de amplio rango de hospedero, su regulación se basa en la disponibilidad de la proteína iniciadora RepB, y esta disponibilidad está regulada por el producto de dos genes, *rnalI* y *copG* (del Solar *et al* 2002). El primero (*rnalI*) codifica para un RNA antisentido de 50 nt que se une al inicio del RNA mensajero de *repB*. El siguiente codifica para un represor transcripcional llamado CopG de tan sólo 45aa. CopG se une al promotor Pcr que dirige la síntesis de un RNA mensajero bicistrónico para *copG* y *repB* inhibiendo así, su propia transcripción y la de *repB*. La unión de CopG al promotor abarca alrededor de 50 pb, e incluye una secuencia inversa repetida de 13 pb que

abarca la mayor parte de la caja -35 del promotor. Las mutaciones o las deleciones del gene *copG* producen un incremento en el número de copias del plásmido (del Solar *et al.* 1998).

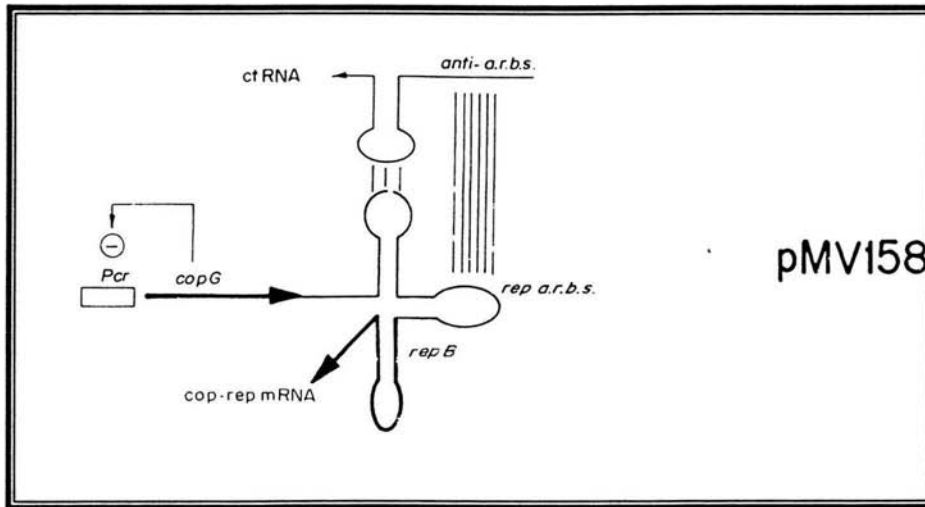


Fig. 6. Control de la replicación de pMV158. Tomada de del Solar *et al.* 1998.

En el caso del plásmido pIP501, el control del número de copias se lleva a cabo por un represor transcripcional llamado CopR y un RNA antisentido llamado RNAIII. El promotor pI dirige la expresión del gene *copR*, cuyo producto, inhibe (aunque no totalmente) la transcripción a partir del promotor pII, localizado río abajo de pI. Este promotor (pII) es el único que dirige la expresión del gene *repR*, que codifica para la proteína iniciadora de la replicación. Un tercer promotor pIII dirige la síntesis de RNAIII, el cual se une al RNA mensajero de *repR* y provoca la terminación prematura del mensajero. Un descenso en el número de copias del plásmido, resultará en una disminución de la concentración de CopR, lo que provocará la desrepresión del promotor pII, y por lo tanto, un incremento en la concentración de RepR. (del Solar y Espinosa 2000). De manera inusual, el RNAIII tiene una vida media de alrededor de 30 minutos, lo cual hace difícil corregir rápidamente una fluctuación en el número de copias. Sin embargo, se propone que

una disminución en el número de copias, podría resultar en una disminución en la concentración de CopR, lo cual provocaría una desrepresión del promotor pII y un incremento en la expresión de *repR*. Adicionalmente, la transcripción a partir de pIII se inhibiría por el incremento de la transcripción a partir de pII, de tal manera que una reducción en la cantidad de RNAlII en la célula sería ligeramente acelerada (Brantl y Wagner 1997).

**Proteína inhibidora** La regulación por medio de una proteína inhibidora es poco común, un ejemplo es la regulación del replicón de  $\lambda$ -dv. Este replicón requiere la síntesis de dos proteínas (O y P) para iniciar la replicación, estas dos proteínas se transcriben en un mismo RNA mensajero, este RNAm contiene, además, la región codificante para otra proteína llamada Cro. Cro se une a la región operadora  $O_R$  del promotor  $P_R$  y actúa como un inhibidor de la transcripción del operón (Murotsu y Matsubara 1980).

También se reportó un plásmido críptico de *E. coli*, llamado pKL1 de solo 1.6 kb que parece regularse principalmente por la proteína iniciadora de la replicación (RepA). El replicón básico del plásmido contiene la región codificante para RepA, dos sitios de unión para RepA (BD1 y BD2), y una secuencia de reconocimiento para la proteína IHF. Como un primer paso para iniciar la replicación, RepA se une como dímero a BD1 y BD2, (esta unión se favorece por la unión de IHF) lo que facilita el ensamblaje del primosoma. Cuando la concentración de RepA se incrementa, los dímeros forman hexámeros, los cuales se unen a BD2 y regulan la transcripción de RepA. De esta manera, la concentración de hexámeros y dímeros determina el número de copias del plásmido (Burian *et al.* 1999, 2003). Se ha descartado la regulación por iterones, por una proteína o por un RNA antisentido, pues no se encontraron ni iterones ni otros marcos abiertos de lectura en la región; además tampoco se encontró la presencia de RNA en ensayos de Northern blot que pudieran participar en la regulación por RNA antisentido.



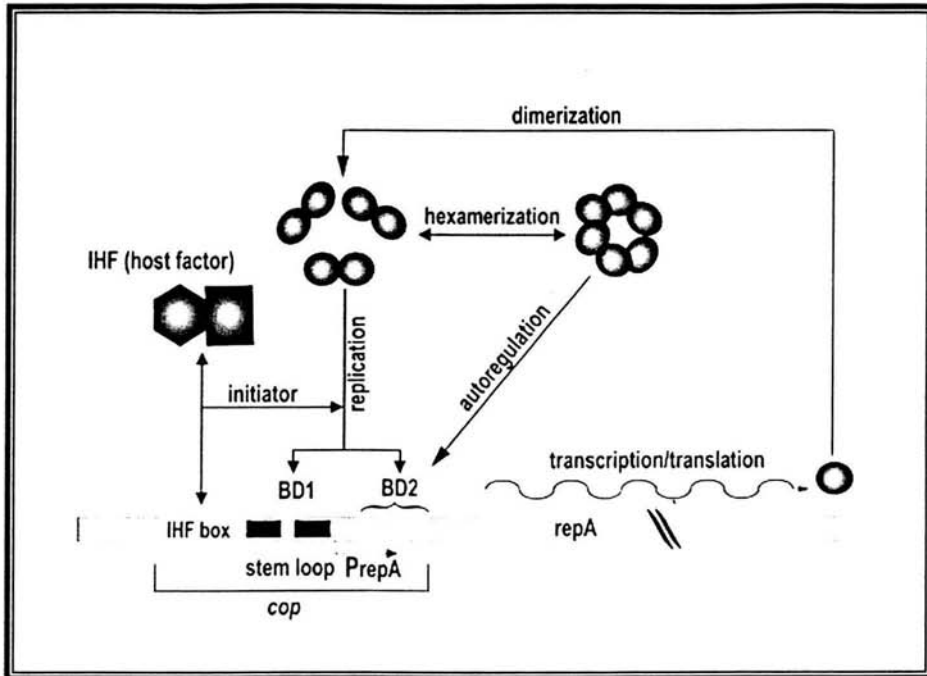


Fig. 7. Control de la replicación de pKL1. Tomada de Burian *et al.* 2003.

Algunos plásmidos son objeto de la regulación del inicio de la replicación, a través del control del estado de metilación del *ori*. Este tipo de control sucede en los plásmidos P1 y pSC101 (Bramhill y Konberg 1988; Brendler *et al.* 1991). La metilación contribuye a la regulación en dos niveles distintos: En el primero, el *ori* recién replicado se encuentra hemimetilado y la membrana celular lo secuestra, previniendo el inicio de una nueva ronda de replicación (Chattoraj y Schneider 1997). En el segundo nivel, la metilación de las dos cadenas de DNA incrementa la eficiencia de inicio de replicación, quizá favoreciendo la apropiada interacción entre las proteínas que participan en replicación del DNA (Abeles *et al.* 1993; Chattoraj y Schneider 1997).

## **-PARTICIÓN DE PLASMIDOS**

Los sistemas de partición, permiten a los plásmidos asegurar su permanencia durante la división de la célula huésped. Cuando el número de copias es elevado (más de 50), la división celular permite la difusión al azar de estos plásmidos a las células hijas; sin embargo, cuando el número de copias es pequeño, se necesita un sistema de partición. Los sistemas encargados de asegurar la segregación de los plásmidos pueden agruparse en tres categorías: a) Sistemas killer o de muerte post-segregacional, encargados de eliminar de la población a las células libres de plásmidos, b) Sistemas de resolución de dímeros, que evitan la formación de dímeros o multímeros, mediante recombinación sitio-específica, y c) Sistemas de partición activa, que distribuye específicamente una copia del plásmido a cada una de las células hijas.

**Sistemas Killer** El sistema killer, o también llamado Sistema de Adicción, consta de un mecanismo de toxina-antitoxina (TA). Se basa en la acción antagónica de una molécula letal (toxina) y otra capaz de neutralizar la acción de la molécula venenosa (antitoxina). Invariablemente, la molécula venenosa, o toxina es químicamente estable, mientras que la antitoxina es mucho menos estable. De esta manera, cuando se produce una célula sin plásmido por algún error en la replicación o en la partición, la nueva célula hereda el complejo TA. La antitoxina se degrada rápidamente por las enzimas del huésped, mientras que la toxina no. Puesto que la toxina no es inhibida nuevamente, interactúa con un blanco esencial en el huésped produciendo la muerte celular. El blanco con el cual la toxina interactúa varía dependiendo del sistema de cada plásmido. En el caso de los plásmidos F y RK2 la toxina tiene como blanco a la DNA girasa del huésped inhibiendo la replicación (Hayes 2003), en cambio, la toxina del plásmido R1 es una endoribonucleasa que corta los RNAs mensajeros e inhibe la síntesis de proteínas (Zhang *et al.* 2004).

La organización genética de los sistemas TA es casi siempre la misma: la constituye un operón en donde la antitoxina está codificada por el primer gene del operón. Estos sistemas se autorregulan a nivel de la transcripción mediante la unión del complejo TA al

promotor del operón. Aunque la mayoría de los módulos tienen esta organización, hay ejemplos en donde el orden de los genes es el contrario, donde la toxina es la única que ejerce el efecto regulatorio, o donde está implicado el producto de un tercer gene en la regulación del operón (Gerdes-Kulka y Glaser 1999; Gerdes 2000; Rawlings 1999).

De acuerdo a la naturaleza química de la antitoxina, se han identificado dos tipos de sistemas de adicción:

El tipo I: Cuando la antitoxina es un RNA antisentido, en este sistema la traducción del RNA mensajero de la toxina la impide un RNA antisentido que se une al extremo 3' del mensajero, como en el plásmido R1 (Jensen y Gerdes 1999). El tipo II: cuando la toxina y la antitoxina son dos proteínas que antagonizan entre sí formando un complejo muy lábil, debido a la menor vida media de la antitoxina, como en el plásmido F (Bernard y Couturier 1992; Jonson *et al.* 1996).

**Resolución de dímeros** La importancia de un sistema de resolución de dímeros se ha puesto de manifiesto con plásmidos de alto número de copias (como ColE1), ya que las mutaciones que impiden la separación de las moléculas recién sintetizadas, conducen a porcentajes elevados de pérdida del plásmido por generación (Summer *et al.* 1993). La resolución de los dímeros favorece la estabilidad de plásmidos de alto y de bajo número de copias. Este sistema, funciona a través de una recombinación sitio-específica mediada por una región de DNA del plásmido y por una recombinasa que puede ser codificada por el huésped o por el plásmido.

El plásmido ColE1 contiene un sitio de 240 pb llamado *cer*, en este sitio se lleva a cabo una recombinación intramolecular, mediada por la recombinasa heterodimérica XerC y XerD. Esta recombinasa, se une al sitio *cer* y produce el corte de una de las cadenas del DNA y la unión durante la recombinación. El resultado de esta recombinación, es la conversión de los dímeros de DNA a monómeros (Summer y Sherratt 1984). Una delección del sitio *cer* promueve la formación de oligómeros y la inestabilidad del plásmido. Esta

misma recombinasa (XerC y XerD), actúa en el sitio *dif* del cromosoma de *E. coli* para resolver dímeros del cromosoma (Blakely *et al.* 1991).

El sistema de recombinación sitio específica del plásmido P1 está localizado en una región llamada *loxP-Cre*. Cre es la recombinasa que actúa sobre las secuencias directas repetidas que se encuentran dentro del sitio *lox*, resolviendo así los dímeros (Summer 1996).

La capacidad de resolución de los dímeros esta ampliamente distribuida entre plásmidos con sistema de partición activa, sistemas similares a *lox* y *cre* se han identificado en el plásmido F (O'Connor *et al.* 1986) y en otros plásmidos de amplio rango de hospedero como el RK2 (Roberts *et al.* 1990).

**Sistemas de Partición Activa.** Una distribución estable, tanto del cromosoma bacteriano, como de los plásmidos de bajo número de copias al momento de la división celular depende de un sistema adecuado de partición. El sistema de partición activo se refiere al movimiento dirigido de los plásmidos recién replicados hacia las células hijas. Este sistema asume una asociación entre el plásmido y la membrana celular (Jacob y Cuzin 1963). Los sistemas más estudiados son los de los plásmidos F, P, y R1. El sistema de partición activa se encuentra codificado en una región llamada "Módulo de Partición" y es de suma importancia para los plásmidos que la contienen, pues se ha demostrado que su carencia, provoca la pérdida del plásmido.

En casi todos los plásmidos estudiados, el módulo de partición sigue un plan básico de organización genética, el cual es similar al encontrado en algunos cromosomas bacterianos. Este sistema consta de dos proteínas que actúan en *trans* y una región no codificante que actúa en *cis* 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).

Los genes que codifican para las proteínas de partición se expresan a partir de un mismo operón, que está sujeto a la autorregulación transcripcional por la acción conjunta de los dos productos (Friedman y Austin 1988). El primer gen del operón (A), codifica para una proteína que hidroliza ATP cuando se encuentra unida al DNA (Watanabe *et al.* 1992; David *et al.* 1996). Esta proteína tiene una fuerte tendencia a formar dímeros en solución, y en dicha configuración, reprime la expresión del operón mediante su unión a secuencias inversas repetidas que sobrelapan al promotor. Esta actividad se estimula por la interacción con la proteína B (Mori *et al.* 1986; Friedman y Austin 1988). El gene B, codifica para una proteína que se une a la región centromérica como dímero, mediante el reconocimiento de secuencias repetidas. Esto produce que el DNA se doble alrededor de la proteína B. La unión al centrómero de un dímero de B, produce un complejo de partición que se cree que lo reconoce una maquinaria capaz de dirigir a los plásmidos hacia las células hijas.

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. Posteriormente, A interactúa con un componente celular que permite posicionar específicamente a los complejos de partición, y quizá, proporciona la energía necesaria para el movimiento de los plásmidos a las células hijas (Niki y Hiraga 1997; Erdman *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 y actuar como regulador negativo; esta unión al operador se favorece por la proteína B (Hiraga 1992; Bounet y Funell 1999).

La expresión coordinada de las proteínas es esencial para una partición eficiente; una sobreproducción de cualquiera de las dos proteínas en el plásmido P1 causa inestabilidad (Abeles *et al.*, 1985; Funell 1988). Se ha demostrado que un exceso de la proteína A provoca la pérdida del plásmido por un mecanismo 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; Funell 1988). La explicación de este

fenotipo se relaciona con la propiedad de B de formar agregados sobre el DNA. Se piensa que el exceso de la proteína B se incorpora alrededor del complejo de partición, de tal manera que se promueve la formación de una estructura que rebasa los límites normales del complejo e impide la expresión de los genes de replicación adyacentes al módulo de partición (Lynch y Wang 1995).

#### Plásmido F

El *locus* responsable de la partición en el plásmido F está adyacente al replicón mínimo, y consta de dos genes, llamados SopA y SopB y un sitio *cis* llamado *sopC*. *sopC* se localiza aguas abajo de *sopB* y presenta 12 secuencias repetidas de 43 pb dispuestas en orientación directa y en tándem. Algunos estudios sobre SopA proponen que la inestabilidad observada cuando se sobreproduce la proteína pudiera ser debido a una inadecuada interacción con SopB en el complejo de partición, la cual cambia la estructura del complejo (Lemonnier *et al.* 2000). La presencia de solo una de las 12 secuencias repetidas es suficiente para la estabilidad del replicón (Biek y Shi 1994).

#### Plásmido P1

En este plásmido, el *locus* de partición se encuentra también adyacente al *locus* encargado de la replicación, el *locus* de partición está compuesto de los genes *parA* y *parB*, cuyas proteínas funcionan en *trans*, y de *parS*, un sitio de acción en *cis*. El centrómero tiene un sitio de unión para la proteína IHF, flanqueado por dos tipos distintos de secuencias llamadas, cajas A (7pb) y cajas B (6pb), las cuales son reconocidas por RepB. La unión al centrómero de un dímero de B y de un heterodímero de IHF, produce un complejo de partición que se cree reconoce una maquinaria capaz de dirigir a los plásmidos hacia las células hijas (Bouet y Funell 2000).

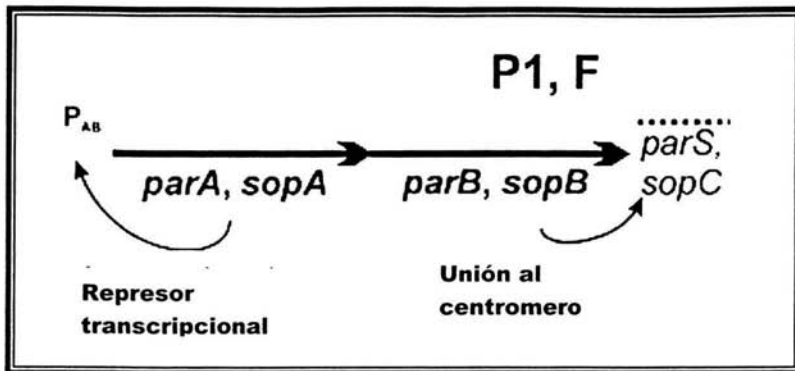


Fig. 8. Esquema del locus de partición de los plásmidos F y P. Tomada y modificada de Gerdes *et al.* 2004.

#### Plásmido R1

El sistema de partición del plásmido R1 consta de dos proteínas que actúan en *trans* (ParM y ParR) y una región *cis*, *parC*, que actúa como centromero. La región centromérica *parC*, la cual consta de dos grupos de 5 secuencias directas repetidas de 11 pb cada una, que rodean al promotor del operón, se localiza curso arriba de *parM* y *parR*. La proteína Par R se une a *parC* participando en la partición y la regulación del operón. ParM interactúan con el complejo ParR/*parC* de manera ATP- dependiente (Møller-Jensen *et al.* 2003). ParM forma filamentos que están involucrados en la partición del plásmido.

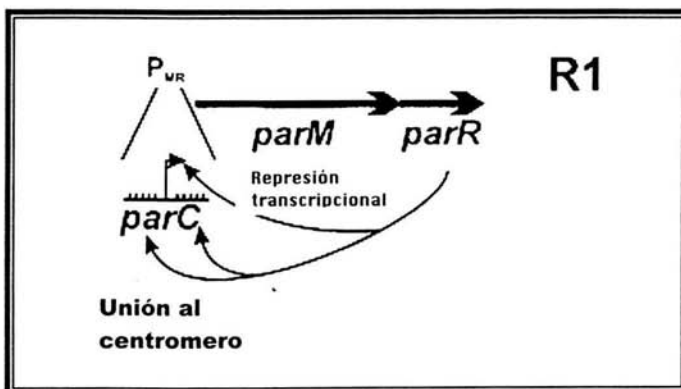


Fig. 9. Esquema del locus de partición de R1. Tomada y modificada de Gerdes *et al.* 2004.

### **Localización de los plásmidos F y P1 en la célula**

El uso de técnicas de hibridización *in situ* con detectores marcados con fluoróforos (FISH) o fusiones con proteínas fluorescentes, revelan que la célula bacteriana está organizada perfectamente, y que tanto el DNA, como las proteínas se localizan en sitios específicos de la célula. Algunos estudios con *E. coli* muestran que el origen del cromosoma se localiza cerca de los polos de la célula; mientras que, plásmidos de bajo número de copias se encuentran, o en el centro de la célula (cuando no ha replicado el plásmido) o en los polos, para el caso de R1, o en la posición 1/4 y 3/4 de la célula para el caso de F y P1. La replicación de los plásmidos inicia en el centro de la célula, y cada una de las moléculas de DNA se va moviendo hacia la dirección opuesta, hasta alcanzar la posición que le corresponde en la célula.

Las ATPasas SopA y ParA del plásmido F y P1, respectivamente, parecen distribuirse por todo el espacio citoplasmático; mientras que las proteínas que se unen al centrómero SopB y ParB pueden localizarse, en el centro de la célula, en posiciones 1/4 y 3/4, o en ambas. En el caso del plásmido F, la posición de SopB es dependiente de la presencia de SopA (Erdmann *et al.* 1999). Para el plásmido P1, la localización de ParB depende de la presencia de ParA y de *parS* (Erdmann *et al.* 1999).

Recientemente se reportó que la proteína ParA del plásmido pB171, la cual pertenece a la misma familia que las ATPasas SopA y ParA (“Walker type ATPasas”) oscila en forma de espiral dentro de la célula de manera ATP dependiente (Ebersbach y Gerdes 2004). En la ausencia del complejo ParB-centrómero ParA forma estructuras helicoidales fijas, de tal manera que, ParB unido al DNA activa, por un mecanismo desconocido la oscilación de ParA. Mutaciones en el sitio de unión a ATP de ParA afectan la formación de las helices, lo que indica que el sitio de unión a ATP es esencial para la formación.



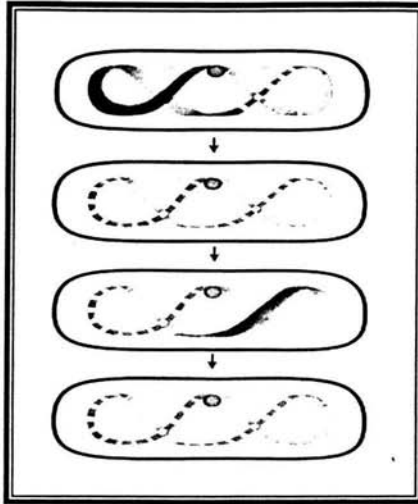


Fig. 10. Oscilación del filamento de ParA. Tomada y modificada de Ebersbach y Gerdes 2004.

En el plásmido R1, la situación es diferente: la proteína que se une al centrómero, ParR, se distribuye uniformemente en la célula (Gordon y Wright 2000), mientras que ParM forma filamentos que van desde el centro, hacia el borde de la célula. Experimentos de marcaje simultáneo de ParM y el plásmido muestran que, el plásmido está localizado siempre en la punta del filamento de ParM (Møller-Jensen et al 2003). Los filamentos decaen a partir del centro de la célula hacia los polos de la célula, donde está localizado el plásmido; mientras que en células con un solo plásmido localizado en el centro no tiene filamentos de ParM unidos a él (Gerdes et al 2004). Basados en estos resultados Møller-Jensen y colaboradores proponen un modelo de partición para el plásmido R1; que describen como un proceso autónomo, es decir, que se lleva a cabo independientemente de los factores del huésped. Después de la duplicación, el plásmido interactúa con ParR, la formación del complejo de partición ParR/*parC* sirve como un punto de nucleación para la polimerización de ParM que separa a los plásmidos y los mueve hacia los polos conforme se incrementa la polimerización de la proteína, debido a la unión constante de ParM-ATP al complejo ParR/*parC*. Cuando los monómeros de ParM se unen a la punta del filamento, ocurre la hidrólisis de ATP, disociando el complejo y permitiendo que otra molécula de ParM-ATP se una al complejo.

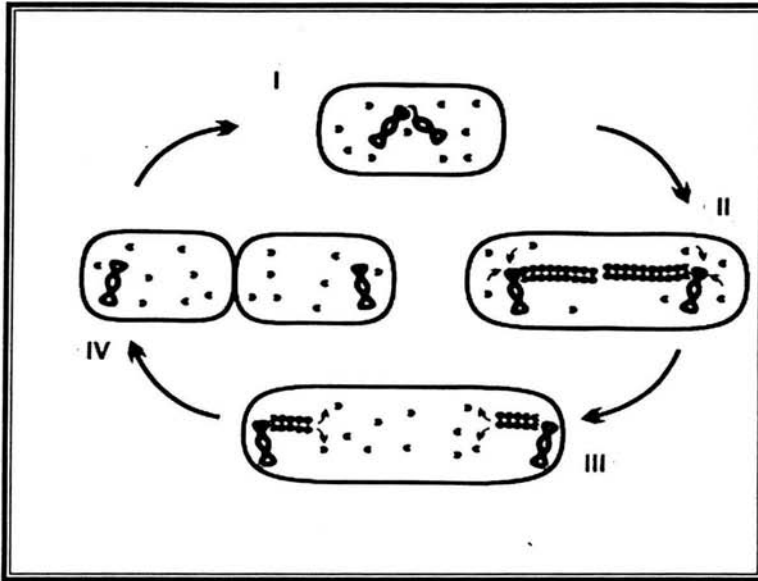


Fig. 11. Representación de la polimerización de ParM. Tomada de Møller-Jensen *et al.* 2003. I) Se forma el complejo de partición. II) La adición de ParM-ATP al filamento produce la fuerza para mover el plásmido hacia los polos de la célula. III) La hidrólisis de ATP provoca la desestabilización del filamento. IV) Se requiere el intercambio de nucleótidos para la siguiente ronda de partición.

Los plásmidos de mediano número de copias como el RK2 o de alto número como el pUC19 parecen tener también una localización específica dentro de la célula (Pogliano *et al.* 2001). La posición de RK2 varía dependiendo del número de señales en la célula. Una sola señal se localiza preferentemente en el centro de la célula, dos señales se localizan cerca de las posiciones  $1/4$  y  $3/4$  de la célula; en cambio, en células con cuatro señales se encuentran en posiciones  $1/8$ ,  $3/8$ ,  $5/8$  y  $7/8$ . Aunque para un plásmido que contiene el origen de pUC19 casi el 30% de las células parece tener una distribución azarosa, el resto de las células muestra un patrón dependiente del tamaño de la célula: La localización del plásmido cerca del centro de la célula se observó en células pequeñas, mientras que en células más grandes el plásmido tomó las posiciones  $1/4$  y  $3/4$ .

### Otros sistemas de Partición

Existen sistemas de partición que no pertenecen a la familia de los sistemas presentes en los plásmidos P1 y F. El mejor ejemplo, de este caso, es el sistema de partición del plásmido TP228 de *Salmonella newport*, denominado *parFG*, este sistema consta de dos genes adyacentes, *parG* y *parF*, y una región centromérica localizada curso arriba (Hayes 2000). El gene *parF* codifica para una proteína de 22 kDa y tiene un motivo débil de unión a ATP. El producto del gene *parG* es una proteína de 8.6 kDa que no presenta homología con ninguna otra proteína de partición caracterizada. ParF es una proteína multimérica que parece estar más relacionada filogenéticamente con la proteína de división celular MinD que con las proteínas de partición de los plásmidos. ParG es una proteína dimerica que se une a la secuencia curso arriba de *parFG*, y esta unión se estimula en la presencia de ParF (Barilla y Hayes 2003).

Recientemente, un nuevo sistema de partición fue caracterizado (Simpson *et al.* 2003). Este nuevo sistema de partición se encontró en un plásmido de *Staphylococcus* llamado pSK1 y consiste en un solo gene involucrado en la partición (*par*) y una región curso arriba que aparentemente funciona como centrómero. La proteína Par aparentemente no tiene un motivo de unión a ATP. La región centromérica contiene siete secuencias directas repetidas de 12 pb, y una secuencia inversa repetida de 7 pb.

No es extraño encontrar que plásmidos de bajo número de copias contienen más de un sistema que asegure su segregación a las células hijas. Tal es el caso de los plásmidos F y P1 que contienen sistemas de partición activa, sistemas killer y de resolución de dímeros, que en conjunto, reducen la pérdida del plásmido a menos de una vez por cada  $10^6$  divisiones celulares (Nordstrom y Austin 1989; Thiested *et al.* 1994; Ruiz-Echevarria *et al.* 1995).

## **-INCOMPATIBILIDAD**

### **Definición**

La incompatibilidad se define como la propiedad que evita que dos plásmidos, coexistan como moléculas independientes en una misma célula en ausencia de presión selectiva (Novik *et al.* 1976). Este fenómeno es una consecuencia de que los plásmidos comparten elementos involucrados en el sistema de replicación o en el de partición, y/o en los sistemas de regulación de uno o de ambos sistemas; es decir, plásmidos incompatibles están genéticamente relacionados (Novik y Hoppensteadt 1978). Generalmente, si dos plásmidos son del mismo grupo de incompatibilidad la introducción de uno de los dos plásmidos por conjugación, transformación o transducción a la célula huésped provoca una desestabilización del plásmido residente, si es que se ejerce una presión selectiva para el plásmido entrante.

Un ejemplo de los eventos que conducen a la incompatibilidad en plásmidos de mediano o alto número de copias se muestra en la Fig. 12. Los plásmidos A y B representados por los círculos blancos o negros respectivamente. Estos plásmidos, poseen regiones idénticas involucradas en su replicación y/o en su estabilidad. Los plásmidos podrán coexistir en la célula mientras el cultivo bacteriano esté creciendo en un medio selectivo para ambos plásmidos. Como consecuencia del hecho de que comparten el sistema de replicación y/o partición, el número de copias de la suma de las moléculas de los plásmidos A y B será igual al número de copias del cualquiera de los plásmidos por separado y estos serán azarosamente distribuidos a las células hijas. Los plásmidos se seleccionan generalmente al azar para ser usados como molécula templado para la replicación, en este caso, el mecanismo de replicación no puede distinguir entre los dos plásmidos. Además, esta selección azarosa generará más moléculas de uno u otro plásmido en cada célula huésped. Este desbalance podría amplificarse en subsecuentes rondas de replicación, puesto que los plásmidos con mayor número de copias en la célula tendrán mayor probabilidad de ser seleccionados como templados en la siguiente ronda de

replicación. Y eventualmente, esto conducirá a la aparición de líneas celulares con solo un tipo de los plásmidos (Novick, 1987).

En los plásmidos unicopia sucede algo similar, pero el efecto es mucho más rápido, no se necesita varias rondas de replicación para ver que uno de los plásmidos se pierde. En el caso de los plásmidos unicopia también existe una competencia de los sitios de DNA por las proteínas que actúan en ellos, ya sea que participen en la replicación, la partición del plásmido o en la regulación de cualquiera de estos.

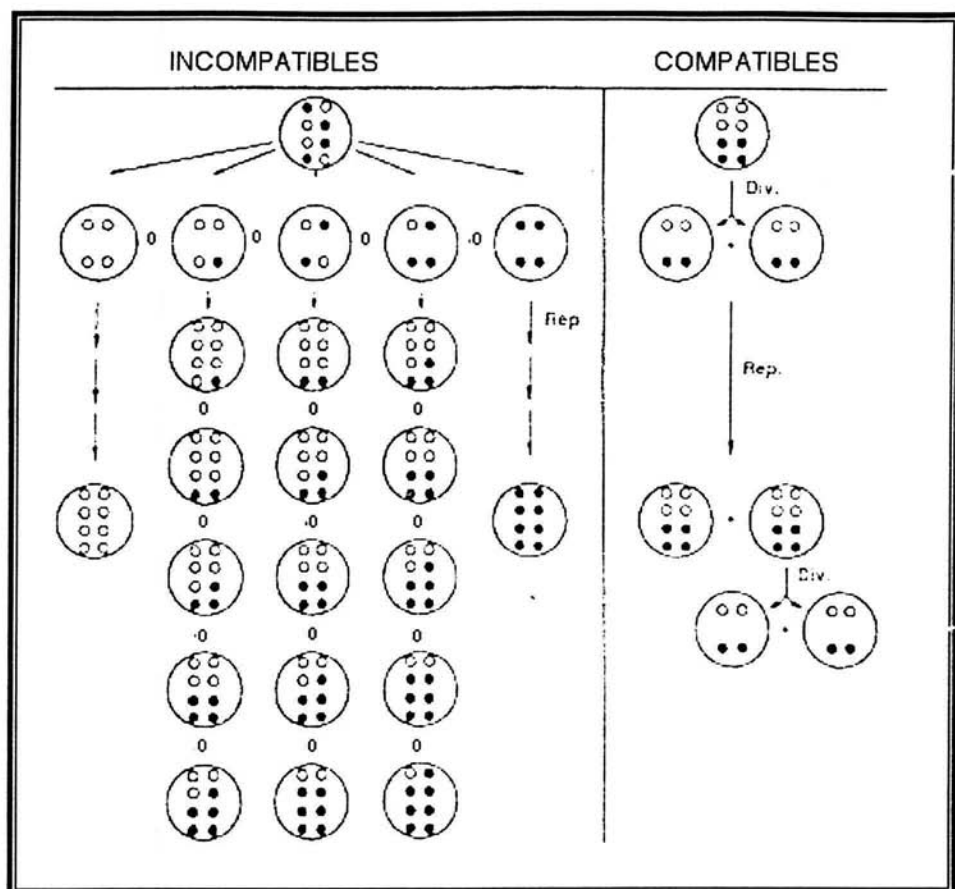


Fig. 12. Mecanismo de segregación de plásmidos. Tomada y modificada de Novick 1987

### Determinantes de incompatibilidad

#### Incompatibilidad causada por replicación

En los plásmidos regulados por RNA antitranscrito el primer determinante de incompatibilidad es precisamente este RNA que reconoce secuencias específicas en el plásmido.

En el caso ColE1, el antitranscrito RNAI es el determinante de incompatibilidad, la proteína Rom, aunque participa en la regulación, no es un determinante de incompatibilidad, ni siquiera cuando se sobreexpresa (Tomizawa y Itoh 1981). Para pT181 el determinante de incompatibilidad es el RNAII (Projan y Novick 1986). Y para R1 solo *copA* induce incompatibilidad, el gene *copB* no es capaz de ejercer incompatibilidad (Nordström *et al.* 1981). Debido a que las proteínas Rom y CopB no ejercen incompatibilidad, y cuando se mutan no hay un cambio drástico en el número de copias, se dice que, estas proteínas solo son auxiliares en la regulación de la replicación del plásmido.

En el plásmido pMV158 que se regula por un RNA antitranscrito (RNA II) y una proteína, el RNAII ejerce incompatibilidad cuando se complementa en *trans* a altas dosis. En cambio, el represor transcripcional (CopG) ejerce sólo una débil incompatibilidad hacia el replicón de pMV158 cuando se clona bajo su propio promotor en un plásmido compatible de alto número de copias. Si se clonan el RNAII, y CopG por separado en un plásmido del mismo número de copias que el pMV158 sólo RNAII ejerce una débil incompatibilidad, pero si los dos elementos están presentes, se observa una clara incompatibilidad hacia el plásmido silvestre. Este resultado indica que los dos elementos son importantes en la regulación de la replicación.

La mayoría de las mutaciones que alteran el número de copias y las propiedades de incompatibilidad se localizan en una asa del RNA antisentido, o del RNA blanco (Wagner y Simons 1994).

En el caso de los plásmidos regulados por iterones, el grupo de secuencias repetidas localizadas en el *ori*, y las regiones de autorregulación y control del número de copias son los principales determinantes de incompatibilidad. Existen básicamente dos modelos para explicar el fenómeno de incompatibilidad mediado por iterones: El primero propone que los iterones son capaces de titular la proteína iniciadora de la replicación, limitando así, las rondas de inicio de la replicación. Este modelo surgió porque, en algunos plásmidos, la delección de los iterones, o la sobreproducción de la proteína iniciadora provocaba un

aumento en el número de copias del plásmido y eliminaba el efecto de incompatibilidad; sin embargo, este efecto observado en el plásmido F (Tsutsui *et al.* 1983), no se observa en otros plásmidos estudiados. La sobreproducción de las proteínas iniciadoras en R6K o RK2 no afecta la incompatibilidad y provoca una disminución en el número de copias del plásmido. Esto llevo a proponer un segundo modelo conocido como “handcuffing” o “coupling” basado en la interacción entre la proteína iniciadora y el origen de replicación, el cual propone dos alternativas para la unión Rep-Iteron dependiendo de la concentración intracelular de este complejo: a bajas concentraciones, el complejo estimula el inicio de la replicación hasta que la regulación del número de copias se lleva a cabo. Sin embargo, cuando el número de copias se incrementa o un segundo plásmido que posee el mismo sistema de replicación se introduce a la célula, la concentración proteína Rep-iteron es lo suficientemente alta para producir la unión de casi todas las proteínas unidas a los iterones y esta unión evita que estén disponibles para la replicación. Con la excepción del plásmido PI, se ha demostrado que el fenotipo de incompatibilidad correlaciona directamente con el número de iterones presentes en un plásmido normalmente compatible (Kittell y Helinski 1993).

El origen de replicación clonado de los plásmidos que poseen iterones muestran incompatibilidad (Abeles *et al.* 1984, Shafferman *et al.* 1981, Tsutsui *et al.* 1983). La mayoría de los orígenes de los plásmidos regulados por un RNA antisentido no ejercen incompatibilidad, como los plásmidos ColE1 e IncFII (Hashimoto-Gotoh y Inselburg 1979; y Timmis *et al.* 1978). Sin embargo, el origen del plásmido pT181 si ejerce incompatibilidad (Novick et al 1984) y se propone que es debido a la competencia por la proteína de inicio de replicación (Highlander y Novick 1990).



### **Incompatibilidad causada por partición**

La incompatibilidad mediada por los sistemas de partición ocurre por la competencia de los sitios de unión de estas proteínas, al sitio de acción en *cis* o al hipotético receptor membranal. Si dos plásmidos aparentemente diferentes usan el mismo sistema de partición serán reconocidos como el mismo plásmido en la célula huésped. Esto producirá una distribución azarosa de las moléculas y la aparición de células sin uno de los plásmidos.

El principal determinante de incompatibilidad en los sistemas de partición es el centrómero o sitio "*par*". Como por ejemplo *sopC* para el plásmido F (Kline 1985); o *parS* para P1 (Austin y Abeles 1985). En algunos plásmidos, como F y P1 se ha observado que la sobreproducción de las proteínas de partición también provoca incompatibilidad (Actis *et al* 1999). En el caso de la proteína A, no se sabe con claridad el motivo por el cual se produce la incompatibilidad. Se cree que la proteína A se une al complejo de partición de una manera que modifica la estructura del complejo y de esta manera, impide una correcta partición del plásmido. La razón por lo que la proteína B causa incompatibilidad es porque el exceso de la proteína B se incorpora alrededor del complejo de partición, de tal manera que se promueve la formación de una estructura que rebasa los límites normales del complejo e impide por silenciamiento la expresión de los genes de replicación aledaños al módulo de partición (Lynch y Wang 1995).

Un estudio realizado mediante la técnica de FISH sobre la localización de plásmidos compatibles en *E. coli* muestra que cada uno de los plásmidos tiene una localización diferente en la célula, lo que indica que cada plásmido interactúa con una estructura celular diferente (Quoc Ho *et al.* 2002). Aunque la estructura con la cual el plásmido interactúa no se ha identificado, esto explicaría otra razón por la que se observa el fenómeno de incompatibilidad. Dos plásmidos que son incompatibles, competirían por ocupar un limitado número de sitios importantes en la célula para la replicación o partición del plásmido.

## ANTECEDENTES

### Los plásmidos tipo *repABC*

Los plásmidos de la familia *repABC* se caracterizan por tener los genes involucrados en la replicación y la partición, en un mismo operón. Este operón está compuesto de tres genes: *repA*, *repB* y *repC*, y tienen una región muy conservada entre los genes *repB* y *repC*. El producto de los genes *repA* y *repB*, tienen homología con las proteínas A y B del sistema de partición *par/sop* del plásmido P1 y F. Se ha demostrado que las proteínas RepA y RepB participan en la estabilidad y la regulación del número de copias del plásmido (Bartosik *et al.* 2001, Ramírez-Romero *et al.* 2000). El gene *repC* es esencial para la replicación y por tal motivo, RepC es considerada la proteína iniciadora de la replicación (Bartosik *et al.* 1998, Ramírez-Romero *et al.* 2002, Tabata *et al.* 1989).

La mayoría de los plásmidos de esta familia, se encuentran en los rhizobia (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*); sin embargo, también se han encontrado en *Paracoccus versutus*, *P. pantotrophus* (Bartosik *et al.* 1997, 2003) y *Ruegeria sp* (Zhong *et al.* 2003). Aunque no se ha reportado, la base de datos indica que también un plásmido de *Rhodobacter sphaeroides* pertenece a esta familia de replicadores (GenBank 002718; Bartosik *et al.* 2003). También se han reportado replicadores *repABC* en el cromosoma lineal de *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner *et al.* 2001), en un cromosoma lineal de *Brucella suis* (Paulsen *et al.* 2002) y en el de *B. melintensis* (Del Vecchio *et al.* 2002). Ver Tabla 2.

Tabla 2. Replicadores tipo *repABC* reportados.

Especie	Replicador	Característica relevante	Referencia
<i>A. tumefaciens</i>	pTiC58	Plásmido inductor de tumores. Tipo-Nopaline	Li and Farrand, 2000; y Goodner <i>et al.</i> , 2001
	pTiB6S3	Plásmido inductor de tumores. Tipo-Octopine	Tabata <i>et al.</i> , 1989
	pTi-SAKURA	Plásmido inductor de tumores. Tipo-Nopaline	Suzuki <i>et al.</i> , 1998
	pAtC58	Plásmido críptico	Goodner <i>et al.</i> , 2001
	L C58	Cromosoma lineal	Goodner <i>et al.</i> , 2001
<i>A. rhizogenes</i>	pRiA4b	Plásmido inductor de tumores. Tipo-Agropine	Nishiguchi <i>et al.</i> , 1987
	pRi1724	Plásmido inductor de tumores. Tipo-Mikimopine	Moriguchi <i>et al.</i> , 2001
<i>R. etli</i>	p42a	Plásmido críptico	Cevallos <i>et al.</i> , 2002
	p42b	Plásmido con genes <i>lps</i>	Cevallos <i>et al.</i> , 2002
	p42d	Plásmido simbiótico	Ramírez-Romero <i>et al.</i> , 1997
<i>R. leguminosarum</i>	pRL8JI	Plásmido críptico	Turner and Young, 1995
<i>R. sp</i>	pNGR234a	Plásmido simbiótico	Freiberg <i>et al.</i> , 1997
<i>M. loti</i>	pMLa	Plásmido críptico	Kaneko <i>et al.</i> , 2000
	pMLb	Plásmido críptico	Kaneko <i>et al.</i> , 2000
<i>S. meliloti</i>	pSyma	Plásmido <i>nod-nif</i>	Galibert <i>et al.</i> , 2001
	pSymb	Plásmido simbiótico b	Galibert <i>et al.</i> , 2001
<i>P. versutus</i>	pTAV320	Plásmido críptico	Bartosik <i>et al.</i> , 1998
<i>B. melitensis</i>		Cromosoma II	DelVecchio <i>et al.</i> , 2002
<i>B. suis</i>		Cromosoma II	Paulsen <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	pRS241d	Plásmido críptico	No publicado
<i>Ruegeria sp</i>	pSD25 (I) pSD25 (II)	Plásmido críptico	Zhong <i>et al.</i> , 2003

El análisis de secuencia de DNA del replicador del plásmido pTiC58 mostró que, alrededor del replicador se encuentra, en orientación divergente el operón *trb*; que está involucrado en la transferencia del plásmido (Li y Farrand 2000). En la región intergénica entre *traI* (primer gene del operón *trb*) y *repA* se encuentran dos cajas *tra*, las cuales son sitio de reconocimiento para TraR, un activador de la transferencia conjugativa del plásmido Ti, que responde a "quorum-sensing". En la expresión del operón *traI-trb* a partir de las cajas *tra*, asociadas al operón, participan TraR y una acil-homoserin lactona (AAI). Los estudios sobre la expresión de *repA* mostraron que la región que contiene las dos cajas *tra* se requiere para la máxima expresión de *repA* y su expresión aumenta significativamente por TraR y AAI. El número de copias del plásmido aumenta de 5 a 7 veces en cepas que expresan *traR*, pero sólo si está presente AAI también. Estos resultados indican que el número de copias del plásmido Ti está bajo la influencia del sistema de "quorum-sensing". La estructura del plásmido pTiC58 también se ha encontrado en otros plásmidos Ti: pTi-SAKURA y pTiR10. El plásmido pRL8JI de *R. leguminosarum* tiene una estructura similar, pero solo se encuentra una caja *tra*.

Un estudio detallado en el plásmido TiR10 de *Agrobacterium tumefaciens* demostró que la regulación del operón *repABC* también depende de TraR. El replicador tiene 4 promotores, tres de ellos regulados positivamente por TraR y el cuarto promotor se regula negativamente por RepA y RepB. La región promotora contiene, además, dos sitios de reconocimiento para la proteína TraR denominadas cajas *tra* II y III. Los inicios de transcripción de los promotores P1, P2 y P3 se encuentran en la posición -248, -228 y -162 respectivamente, de acuerdo al codón de inicio de *repA*. La caja *tra*II se localiza curso arriba de P1 y la caja *tra*III se encuentra curso abajo de P1, pero curso arriba de P2 (Pappas y Winans 2003a). El inicio de transcripción del cuarto promotor (P4) se localizó en la posición -46 con respecto al codon de inicio de *repA*. La actividad de P4 no requiere de TraR; RepA y RepB lo autorregulan negativamente (Pappas y Winans 2003b). RepA es esencial para la autorepresión cuando se expresa en *cis* y RepB actúa como co-represor cuando ambas están en *cis*. Cuando RepA y RepB están en *trans*, se requieren ambas para

la represión; sin embargo, RepB no se une al DNA, solo aumenta o favorece la unión de RepA al DNA.

El plásmido pTAV1 de *Paracoccus versutus* tiene dos replicadores; uno de ellos pertenece a la familia de replicadores tipo *repABC* (pTAV320). En este replicador se identificó ya, el sitio de partición (Bartosik *et al.* 2001), el cual se encuentra en una región curso abajo de *repC* llamada *inc2* (por ser un determinante de incompatibilidad). Esta región presenta dos secuencias repetidas de 14 pb llamadas R1 y R2 (5'-ACAGCTGTTAAGTC-3') a las cuales se une específicamente RepB. Estas secuencias no parecen estar en ningún replicador tipo *repABC* reportado para las Rhizobias, sin embargo, se han encontrado secuencias similares en otros plásmidos de *Paracoccus* aparentemente tipo *repABC* y en el genoma de *R. sphaeroides*. (Bartosik *et al.* 2003).

### **Incompatibilidad en *Rhizobium***

Dos líneas de evidencia demuestran que los plásmidos *repABC* abarcan más de un grupo de incompatibilidad (Cevallos *et al.* 2002): Primero, estudios de hibridización indican que algunas cepas de *Rhizobium* contienen más de un plásmido con replicador tipo *repABC* (Riggottier-Gois *et al.* 1998). Segundo, el análisis de la secuencia del genoma de algunos *Rhizobium* demuestra que poseen más de un replicón tipo *repABC*. En el extremo, los seis plásmidos de *R. etli* pertenecen a la familia *repABC* (González, comunicación personal). Algunas evidencias experimentales muestran incompatibilidad del p42a hacia el pTiC58, un plásmido de *Agrobacterium* que porta los determinantes de patogenicidad (García-de los Santos y Brom, 1997). Este no es un caso aislado, pues se ha demostrado experimentalmente que hay incompatibilidad entre plásmidos de *Rhizobium*, así como entre plásmidos de *Rhizobium* y de *Agrobacterium* (O'Connell *et al.* 1987; Hooykaas *et al.* 1985). Un ejemplo es la incompatibilidad reportada para el plásmido pRiA4b y el p42d (Cevallos *et al.* 2002). En el laboratorio, se han construido cepas de *Rhizobium* que contienen dos plásmidos simbióticos con el mismo o con diferente rango de hospederos, lo que indica, claramente, que los plásmidos simbióticos pueden pertenecer a diferentes grupos de incompatibilidad.

Los plásmidos de *Agrobacterium* también pertenecen a varios grupos de incompatibilidad: IncRh1, IncRh2, IncRh3, IncRh4 e IncAg1 (Hooykaas *et al.* 1980, Nester y Kosuget 19881, Gallie *et al.* 1984, Szegedi *et al.* 1996); sin embargo, dado que estos estudios se realizaron hace ya muchos años, no establecen el tipo de replicador del plásmido, solo se conoce el tipo de opina para la cual codifican. Algunos estudios de diversidad sobre los replicadores de los plásmidos entre las Rhizobias, sugieren diferentes grupos de incompatibilidad de acuerdo a la similitud entre la secuencia de *repC* (Palmer *et al.* 2000).

*Agrobacterium tumefaciens* tiene 4 replicadores, tres de ellos del tipo *repABC* (el cromosoma lineal, el plásmido pTiC58 y pAtC58). Estudios de FISH sobre la localización de los cuatro replicadores muestran que todos ellos se localizan en el polo de la célula, sin embargo, como sucede con los plásmidos compatibles de *E. coli*, los replicadores ocupan áreas discretas y parecen no colocalizar, o hacerlo a muy bajos niveles. (Kahng y Shapiro 2003). Los mismos estudios, se hicieron con *Sinorhizobium meliloti*, el cual tiene un cromosoma circular y dos megaplásmidos del tipo *repABC*, los tres replicadores se observan también en los polos de la célula, aunque ligeramente hacia el centro.

### ***Rhizobium etli* y sus plásmidos**

*Rhizobium etli* es una especie que nodula y fija nitrógeno en plantas de fríjol. La cepa tipo CFN42, cuenta con seis plásmidos grandes, (nombrados p42a al p42f de acuerdo a su tamaño) cuyos tamaños fluctúan entre los 150 kb y los 800 kb. Dos de estos plásmidos p42d y el p42b son esenciales para nodular y fijar nitrógeno. El p42d o pSim porta los genes esenciales para la nodulación (genes *nod* y *nol*) y muchos de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*). El plásmido p42b contiene algunos de los genes para la síntesis de lipopolisacáridos (LPS), moléculas esenciales en el desarrollo del nódulo (García de los Santos y Brom 1997). Algunos otros de sus plásmidos participan también de alguna manera en el proceso simbiótico, ya que cepas curadas del plásmido p42c o p42f y

grandes deleciones de p42e muestran una drástica reducci3n en su competitividad para nodular (Brom *et al.* 1992, 2000).

### El plásmido p42d

El replic3n bási3co del pSim de la cepa CFN42 se encuentra ubicado dentro de la banda *Bam*HI 79 del mapa estructural del plásmido. El replicador se localiza dentro de un fragmento *Hind*III de 5.6 kb (Ramírez-Romero, *et al.*, 1997). El análisis de ésta secuencia demostró la presencia de tres grandes marcos abiertos de lectura, similares en secuencia y organizaci3n a los replicadores tipo *repABC* previamente reportados. El inicio de la transcripci3n del oper3n se encuentra a 45 pb curso arriba del codon de inicio de *repA*. Las proteínas RepA y RepB del plásmido p42d tienen alrededor de 30% de similitud con las proteínas SopA/ParA y SopB/ParB, (sistema de partici3n del plásmido F y P1). Las deleciones en *repA* y *repB* disminuyen la estabilidad del plásmidos, lo que indica su participaci3n en la segregaci3n. Además, las deleciones de estos dos genes (*repA* y *repB*) producen un aumento en el número de copias del plásmido, lo que demuestra su participaci3n en la regulaci3n del número de copias (Ramírez-Romero *et al.* 2000). RepA es un factor de incompatibilidad en *trans* y está implicado en la regulaci3n transcripcional negativa del oper3n (Ramírez-Romero *et al.* 2001). RepC es esencial para la replicaci3n y por esta raz3n se considera la proteína iniciadora. También se encontraron dos regiones, *cis* capaces de ejercer incompatibilidad cuando eran introducidas en *trans*, la primera es la regi3n entre *repB* y *repC* llamada *inc $\alpha$*  y la segunda es un fragmento *Eco*R1 de 500 pb curso abajo de *repC* denominada *inc $\beta$*  (Ramírez-Romero *et al.* 2000),

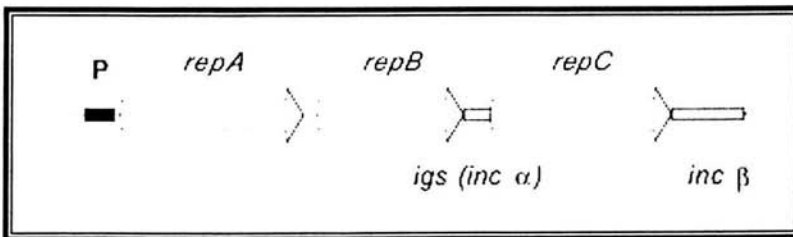


Fig. 13. Esquema del replicador del plásmido simbiótico p42d de *R. etli*.

La incompatibilidad es un factor que limita la adquisición de nuevos plásmidos, y por esta razón juega un papel central en la evolución bacteriana, Es por eso, que uno de los principales intereses en nuestro laboratorio es determinar los mecanismos de la incompatibilidad entre plásmidos y su relación con la replicación y la partición del plásmido p42d de *Rhizobium etli*.



## OBJETIVO

Identificar las regiones *cis* que confieren incompatibilidad en el plásmido simbiótico p42d y entender las bases moleculares de la misma,

### Objetivos Particulares

- 1,- Determinar las regiones *cis* del replicador que sean capaces de ejercer incompatibilidad,
- 2,- Identificar la(s) proteína(s) del plásmido que interaccionan con la región *cis* determinante de incompatibilidad.
- 3,- Establecer si los plásmidos de una colección de cepas pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad y con esto definir los motivos involucrados en el fenotipo de incompatibilidad.
- 4,- Relacionar el fenotipo de incompatibilidad con la replicación, partición o regulación del plásmido,

**RESULTADOS**



## Incompatibility and the partitioning site of the *repABC* basic replicon of the symbiotic plasmid from *Rhizobium etli*

Nora Soberón, Tatiana Venkova-Canova, Miguel A. Ramírez-Romero, Juan Téllez-Sosa, and Miguel A. Cevallos\*

*Programa de Evolución Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico*

Received 11 December 2003, revised 20 January 2004

### Abstract

The basic replicon of the symbiotic plasmid (p42d) of *Rhizobium etli* CE3 is constituted by the *repABC* operon. Whereas RepC is essential for plasmid replication, RepA and RepB are involved in plasmid partitioning. Three incompatibility regions have been previously identified in this plasmid: the first one encodes RepA, a partitioning protein that also down-regulates the *repABC* transcription. The second region is situated within the *repB*–*repC* intergenic sequence (*inc $\alpha$* ), and the last one, *inc $\beta$* , is located in a 502 bp *EcoRI* fragment spanning the last 72-bp of the coding region of *repC* and the following downstream sequence. In this paper we show that: (1) The *inc $\beta$*  region is required for plasmid partitioning. (2) A 16-bp palindrome sequence, located 40 bp downstream of the *repC* gene of plasmid p42d, is necessary and sufficient to induce incompatibility towards the parental plasmid, and accounts for all the incompatibility properties of this region (*inc $\beta$* ). (3) The palindrome is the DNA target site for RepB binding. With these findings we propose that *inc $\beta$*  contains the partitioning site (*par* site) of the basic replicon of plasmid p42d, and that the 16-bp palindrome is the core sequence to nucleate the RepB binding.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Symbiotic plasmid; *repABC*; Plasmid partitioning; Incompatibility; *Rhizobium etli*

### 1. Introduction

It is now clear that basic replicons belonging to the *repABC* family are present in a wide variety of  $\alpha$ -proteobacteria. They were initially found in plasmids of high molecular weight and low copy number in strains of the *Rhizobium* and *Agrobac-*

*terium* group, but later they were also described in less-related genera like in *Paracoccus*, *Rhodobacter*, and *Ruegeria* (Bartosik et al., 1998; Cevallos et al., 2002; Li and Farrand, 2000; Nishiguchi et al., 1987; Ramírez-Romero et al., 1997; Tabata et al., 1989; Turner and Young, 1995; Zhong et al., 2003). Information of the available genomic sequences gave us two interesting surprises. First, the *repABC* genes are found in the linear chromosomes of *Agrobacterium* and *Brucella*, in the absence of other recognizable

\* Corresponding author. Fax: +52-777-317-55-81.

E-mail address: [mac@cifn.unam.mx](mailto:mac@cifn.unam.mx) (M.A. Cevallos).

replication system (DelVecchio et al., 2002; Goodner et al., 2001; Paulsen et al., 2002). Second, more than one *repABC* replicons may coexist in a given strain indicating that this plasmid family encompasses several incompatibility groups (Cevallos et al., 2002; Galibert et al., 2001; Goodner et al., 2001; Kaneko et al., 2000).

The organization of the *repABC* basic replicons is simple: plasmid encoded functions involved in partitioning and replication are restricted to a single operon of three genes: *repA*, *repB*, and *repC* (Fig. 1). RepA and RepB have sequence similarities with proteins involved in the partition of plasmids and chromosomes (Bignell and Thomas, 2001).

Mutations in these genes greatly decrease plasmid stability corroborating their role in plasmid segregation (Ramírez-Romero et al., 2000). RepA of the *Rhizobium etli* plasmid p42d is a *trans*-incompatibility factor, and it has been implicated in the negative transcriptional regulation of the *repABC* operon (Ramírez-Romero et al., 2001). However, in the *Agrobacterium* octopine-type Ti plasmid RepB enhances the RepA-mediated repression of the operon (Pappas and Winans, 2003). It has been shown that RepC is essential for replication and for this reason was considered as the initiator protein (Bartosik et al., 1998; Ramírez-Romero et al., 2000; Tabata et al., 1989).

Two strong incompatibility regions have been identified in the *repABC* plasmids p42d of *R. etli* and in pTAV320 of *Paracoccus versutus*. One incompatibility region is placed in the 155-bp intergenic sequence between the *repB* and *repC* genes in both plasmids, whereas the other is located downstream the *repC* stop codon. The *repB*–*repC*

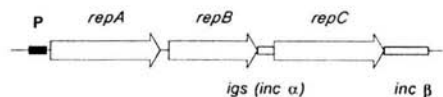


Fig. 1. Representation of the replication/partition region of a *repABC* plasmid. The arrows represent the position of the *repA*, *repB*, and *repC* genes. Hatched boxes show the position of *inc $\alpha$*  and *inc $\beta$*  incompatibility regions. Black box indicates the position of the *repABC* promoter.

intergenic regions show a high degree of sequence conservation in all *repABC* plasmids, suggesting that they play a similar role in the partitioning and/or replication of these plasmids (Bartosik et al., 2001; Cevallos et al., 2002; Li and Farrand, 2000). In contrast, the regions located downstream of *repC* genes are highly divergent.

Recently, the partitioning site of plasmid pTAV320 from *P. versutus* was located downstream of the *repC* gene, in the so-called *inc2* region (equivalent to the *inc $\beta$*  region of p42d). This region contains two 14-bp repeated sequences, which are the binding sites for the RepB partition protein. Plasmids containing *inc2* have greater stability when RepA and RepB are provided in *trans*, but they do not reach the 100% stability observed in the parental plasmid (Bartosik et al., 2001). A comparative DNA sequence analysis showed that the 14-bp repeated sequences found in pTAV320 are conserved in the composite-plasmids of *Paracoccus* but absent in the *repABC* rhizobial plasmids, which lead us to question the location of the partition site in the later (Bartosik et al., 2002).

Incompatibility or the incapacity to coexist of two plasmids as independent replicons in the same cell results from the interference of the replication and/or partitioning functions among them (Novick, 1987). This phenomenon is a limiting factor in the acquisition of new plasmids, and for this reason plays a central role in shaping bacterial evolution. An important research interest for our group is to determine the mechanisms of plasmid incompatibility and their relationship to plasmid replication and partitioning in the p42d model plasmid from *R. etli*.

In this paper we identify and characterize the partition site of plasmid p42d. This site, a 16-bp palindrome sequence, is located 40 bp downstream of the *repC* gene of plasmid p42d, and it is the RepB binding site. The palindrome is necessary and sufficient to induce incompatibility towards the parental plasmid, and accounts for all the incompatibility properties of this region (*inc $\beta$* ). Deletions in this sequence, abolish RepB binding, dramatically disturb plasmid partition, and such sequences lose the capacity to exert incompatibility.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed on Table 1. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria–Bertani medium. *Rhizobium* strains were grown at 30°C in PY medium (Noel et al., 1984). Antibiotics were added at the following concentrations (in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ): tetracycline 10; chloramphenicol 30; and carbenicillin 100; nalidixic acid 20.

### 2.2. Bacterial matings

pSUP202 and pRK7813 derivatives were introduced into *Rhizobium* using the *E. coli* S17-1 strain as mating donor. Strains were grown in the proper liquid medium to stationary growth phase, mixed in a donor:receptor ratio of 1:2, plated on PY plates and incubated at 30°C overnight. Cells were resuspended in fresh PY medium and serial dilutions were plated on the appropriate selective media.

### 2.3. DNA isolation and manipulation

Genomic DNA was isolated employing components and instructions of a DNA/RNA isolation kit (Amersham). Plasmid and cosmid DNAs were isolated from *E. coli* DH5 $\alpha$  with the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Restriction enzymes (BRL) and DNA ligase (Amersham–Pharmacia Biotech) were used according to the manufacturer's instructions. *E. coli* transformation and agarose DNA electrophoresis were performed by standard methods as described by Sambrook et al. (1989). *Taq* DNA polymerase, Platinum *Taq* polymerase, Ace polymerase (Invitrogen) or Elongase (Gibco–BRL) were used for PCR.

The sequences of the primers used in this work are listed in Table 2. All amplification products were cloned using a pMOSblueT kit, pMOSblue blunt-ended kit (Amersham) or TOPO TA cloning kit (Invitrogen), and their sequence determined.

### 2.4. DNA sequencing

Both DNA strands were sequenced with universal and custom-made oligonucleotide primers using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit and a 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems).

### 2.5. Plasmid profiles

Profiles of high molecular weight plasmids were obtained by the in-gel lysis procedure described by Wheatcroft et al., 1990.

### 2.6. Cloning and sequence of the *incB* homologous regions of other *R. etli* and *Agrobacterium* plasmids

The *incB* homologous regions of plasmids belonging to different *R. etli* strains (Table 1) were amplified by PCR using total DNA as templates. Primers incBPU and MGP delimiting a 492-bp fragment from plasmid p42d, between positions –65 and +424 relative to the *repC* stop codon, were utilized. The *incB* homologous region of the *Agrobacterium rhizogenes* plasmid pRi4Ab was obtained by PCR using primers RiAU and RiAL and DNA of plasmid pAO244 as template (Nishiguchi et al., 1987). The PCR products were cloned into plasmid pRK7813 in order to determine their incompatibility properties.

### 2.7. Construction of plasmid carrying *incB* derivatives

Four derivatives of the p42d basic replicon carrying progressive deletions of the *incB* region were generated by PCR. All the PCR products were designed to contain *Bam*HI and *Hind*III restriction sites at their extremes for easy cloning. Primer BREP 2 located 258-bp upstream of the *repA* start codon was used in all the PCRs. To generate the insert of plasmid pSUP-MRc primer MG was utilized. Primer MF was used to obtain the insert of plasmid pSUP-MRsB. The insert of plasmid pSUP-MRc2 was produced with primer Inc2H. The insert of plasmid pSUP-MRp was obtained with primer PAHI. The four PCR

Table 1  
Strains and plasmids used in this work

Strains plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	Host strain for plasmids	Hanahan, 1983
S17-1	Host strain for plasmids	Simon et al., 1983
BL21(DE3)pLys	Host strain for plasmids	Studier et al., 1990
<i>R. etli</i>		
CFNX101	<i>recA::<math>\Omega</math> Sp<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup></i> ; derivative of CE3	Martínez-Salazar et al., 1991
CFNX107	<i>recA::<math>\Omega</math> Sp<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup> p24a<sup>-</sup> p42d<sup>-</sup></i> derivative of CE3	Martínez-Salazar et al., 1991
CE3	Spontaneous Sm <sup>R</sup> derivative of the wild-type strain CFN42	Noel et al., 1984
BRA 5	Wild-type strain from Brazil	Piñero et al., 1988
KIM 5	Wild-type strain from Sonora, Mexico	Josephson and Pepper, 1984
NITRAGIN 8251	Wild-type strain from USA	Piñero et al., 1988
TAL182	Wild-type strain from Hawaii, USA	Piñero et al., 1988
VIKING-1	Wild-type strain from Belize	Piñero et al., 1988
Incl-2	Wild-type strain from Celaya, Gto. México	Pérez-Ramírez et al., 1998
<i>Plasmids</i>		
pRK7813	Tc <sup>R</sup> , RK2-based plasmid vector	Jonathan and Guttererson, 1987
pSUP202	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> ; ColE1 origin unable to replicate in <i>Rhizobium</i> sp	Simon et al., 1983
pAO244	Clone containing the basic replicon of plasmid pRiA4b from <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Nishiguchi et al., 1987
pMAL-c2X	Plasmid vector to generate protein fusions with the maltose binding protein	LaVallie et al., 2000
<i>Derivatives of pRK7813</i>		
pKRE-inc $\beta$	Plasmid containing an EcoRI fragment of 500 bp ( <i>inc<math>\beta</math></i> ) from plasmid p42d	Ramírez-Romero et al., 2000
pKRE-BBra	Plasmid containing a PCR fragment carrying the homologous <i>inc<math>\beta</math></i> region from a plasmid in BRA-5 strain	This work
pKRE-BNit	Plasmid containing a PCR fragment carrying the homologous <i>inc<math>\beta</math></i> region from a plasmid in NITRAGIN 8251 strain	This work
pKRE-BKim	Plasmid containing a PCR fragment carrying the homologous <i>inc<math>\beta</math></i> region from a plasmid in KIM-5 strain	This work
pKRE-BTal	Plasmid containing a PCR fragment carrying the homologous <i>inc<math>\beta</math></i> region from a plasmid in TAL182 strain	This work
pKRE-BVik1	Plasmid containing a PCR fragment carrying the homologous <i>inc<math>\beta</math></i> region from a plasmid in VIKING-1 strain	This work
pKRE-Bincl-2	Plasmid containing a PCR fragment carrying the homologous <i>inc<math>\beta</math></i> region from a plasmid in Incl-2 strain	This work
pKRE-BRi	Plasmid containing a PCR fragment carrying the homologous <i>inc<math>\beta</math></i> region from plasmid pRiA4b	This work
pKRE-incB2	Plasmid containing a PCR fragment carrying the first 250 bp of <i>inc<math>\beta</math></i> region from plasmid p42d	This work
pKRE-incB3	Plasmid containing a PCR fragment carrying the first 148 bp of <i>inc<math>\beta</math></i> region from plasmid p42d	This work
pKRE-incB4	Plasmid containing a PCR fragment carrying the first 108 bp of <i>inc<math>\beta</math></i> region from plasmid p42d	This work
pKRE-incB5	Plasmid containing a PCR fragment carrying the last 365 bp of <i>inc<math>\beta</math></i> region from plasmid p42d	This work
pKRE-incB6	Plasmid containing a PCR fragment carrying from the 16-bp palindromic sequence to the end of <i>inc<math>\beta</math></i> region from plasmid p42d	This work
pKRE-incB7	Plasmid containing the <i>inc<math>\beta</math></i> region with a deletion of the 16-bp palindromic sequence from p42d	This work
pMAL-RepB	pMAL-c2X derivative containing <i>repB</i> of p42d plasmid inserted in frame with the gene encoding the maltose binding protein	This work

Table 1 (continued)

Strains plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Derivatives of pSUP202</i>		
pSUP-MRc	Plasmid that embrace a region from 115-bp upstream of the start codon of <i>repA</i> to the 3' end of <i>incβ</i>	This work
pSUP-MRsB	Plasmid that embrace a region from 115-bp upstream of the start codon of <i>repA</i> to the stop codon of <i>repC</i>	This work
pSUP-MRc2	Plasmid that embrace a region from 115-bp upstream of the start codon of <i>repA</i> and the first 250-bp of <i>incβ</i>	This work
pSUP-MRp	Plasmid that embrace a region from 115-bp upstream of the start codon of <i>repA</i> to the 3' end of the 16-bp palindrome sequence	This work
pSUP-MRBL1	Plasmid containing the same insert of pSUP-MRsB plus the <i>incβ</i> region inserted within and in the same direction of the Ap <sup>R</sup> gene	This work
pSUP-MRBs1	Plasmid containing the same insert of pSUP-MRsB plus the 250 first bp of <i>incβ</i> region inserted within and in the same direction of the Ap <sup>R</sup> gene	This work
pSUP-MRBL2	The same that pSUP-MRBL1, but <i>incβ</i> region cloned in the opposite direction	This work

Table 2  
Primers used in this work

Primer	Position	Sequence
incBPU	65 bp upstream the stop codon of <i>repC</i>	5'-CTGCAGTCCAGCTTGGCCCGATGAT-3'
incBPL	178 bp downstream the stop codon of <i>repC</i>	5'-CTGCAGTTGAGATCACGGTCTACTGTTC-3'
MGP	421 bp downstream the stop codon of <i>repC</i>	5'-CTGCAGTCCAGTGTGTGGAAGTGCCG-3'
Inc2H	178 bp downstream the stop codon of <i>repC</i>	5'-CTGCAGTTGAGATCACGGTCTACTGTTC-3'
Brep2	115 bp upstream the start codon of <i>repA</i>	5'-GGATCCTGCCGAGGCTCTTCG-3'
MF	The stop codon of <i>repC</i>	5'-AAGCTTTTACCCAGCCCTCAAACCT-3'
MG	424 bp downstream the stop codon of <i>repC</i>	5'-AAGCTTCAGTGTGTGGAAGTGCCG-3'
PAHI	The palindrome sequence	5'-AAGCTTGGTGGTCAGTCGACCACA-3'
Mal-B1a	Initial codon of <i>repB</i>	5'-CTGAATTCATGCCGCTTCTCGGC-3'
Mal-B2	The stop codon of <i>repB</i>	5'-TCAAGCTTTTACACTCCCTGTTTCCG-3'
PAL	The palindrome sequence	5'-GTGGTCAGTCGACCAC
OPA		5'-TCCCGATCGATCGGGA
RiAU	One nucleotide after the stop codon of <i>repC</i>	5'-AATTAGCGAGTATGGAGC-3'
RiAL	Stop codon of <i>repC</i>	5'-CTTCTCCAGTTTTTCTCG-3'

Primers used in this work. The restriction sites of the primers are indicated in the following manner \_\_\_\_ *Pst*I sites; ----- *Bam*HI; \_\_\_\_\_ *Hind*III; ~~~~~ *Eco*RI.

products were digested with *Bam*HI and *Hind*III and inserted within the tetracycline resistance gene of plasmid pSUP202 (see Table 2 for primer positions).

## 2.8. Plasmid incompatibility test

To determine the incompatibility properties of the different fragments inserted in pRK7813, the recombinant plasmids were introduced by conjugation into a *R. etli* strain carrying the sym-

biotic plasmid (CFNX101). The plasmid profiles of at least six transconjugants from each cross were analyzed. A recombinant plasmid was considered to exert incompatibility towards the symbiotic plasmid if, when introduced into CFNX101, caused the displacement of the symbiotic plasmid. Cointegrations between the symbiotic plasmid and another cognate plasmid were repeatedly observed. This situation was taken as evidence of incompatibility, considering that the symbiotic plasmid could replicate using the

origin of replication of the plasmid into which is cointegrated.

### 2.9. Plasmid stability

Plasmid stability was estimated according to the procedure described by Durland and Helinski (1987). Briefly, stationary phase cultures were diluted in fresh medium without selection to an initial optical density of 0.3 at 540 nm and cultivated for 30 h (~12 generations). Samples taken at this time were serially diluted and plated onto solid media in the absence of selective drugs. One hundred colonies were chosen and picked onto plates with and without the selective antibiotic.

### 2.10. Expression and purification of an MBP–RepB fusion

To overexpress RepB in *E. coli*, the *repB* coding region of plasmid p42d was amplified by PCR using primers Mal-B1a and Mal-B2. Then the PCR product was introduced in the *Eco*RI and *Hind*III sites of pMAL-c2X vector, to create a gene encoding a fusion product between the maltose binding protein (MBP) and RepB. *E. coli* BL21 (DE3) pLys cells carrying this construct were grown at 37 °C with vigorous shaking to an optical density of 0.4 at 540 nm. The culture was induced with 0.1 mM IPTG and left growing for 2 h. Cells were then harvested, concentrated, and disrupted by sonication. The MBP–RepB fusion was purified from the soluble fraction following the instruction of the manufacturers (New England BioLabs), using an amylose resin affinity column. The presence of the MBP–RepB fusion was followed by dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis in all the purification steps.

### 2.11. DNA mobility shift assays

In these experiments two amplification products were used. The first one, of 258-bp, including the palindrome sequence was obtained with primers incBPU and incBPL, and plasmid pKRE-inc $\beta$  DNA as template. The fragment spans 65 bp upstream of the *repC* stop codon, and 180 bp downstream of it. The second product used as a negative

control consisted of 144-bp and was produced with primers incBPU and inc3 using DNA of plasmid pKRE-incB7 as template. It lacks the palindrome but conserves 65 bp upstream the stop codon of *repC* and 80 bp downstream of it. Both products were purified from gel using Wizard PCR Preps DNA Purification Resin (Promega).

Binding reactions contained 700 ng of each fragment and protein at the concentrations indicated, in a 20  $\mu$ l total volume. Reactions were carried out at 30 °C for 20 min in a buffer containing 50 mM Hepes-KOH, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ g/ml BSA, 1 mM DTT, and 10% glycerol. The samples were run on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel (15:1 acrylamide: BIS) in 0.5 $\times$  TBE buffer at 4 °C. The DNA was visualized by staining with ethidium bromide.

Double-stranded oligonucleotide shift assays were performed as previously described (Santana et al., 2000). One hundred nano gram of PAL or OPA were 5' end labeled with [<sup>32</sup>P]dATP and T4 polynucleotide kinase (USB). The same amount of the corresponding unlabeled oligonucleotide was annealed to its radioactive partner by boiling them together and slowly cooling to room temperature in a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA. The labeled fragments were purified using Microcon filter. Binding reactions contained 10<sup>5</sup> cpm labeled-DNA and different amounts of protein (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0  $\mu$ g) were carried out at 30 °C for 20 min in a buffer containing 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, and 1  $\mu$ g poly(IIdC). The binding reactions were run on 10% non-denaturing polyacrylamide gel.

### 2.12. Bioinformatics

The *repC* downstream sequences (*inc $\beta$*  regions) of the *R. etli* plasmids were aligned using the Clustal-W program (Thompson et al., 1994) at the WWW Service of the European Bioinformatics Institute (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>).

*GenBank Accession numbers.* The sequences of the homologous *inc $\beta$* -regions of the *R. etli* plasmids are: Inc1-2, AY496292; BRA 5, AY496293; KIM 5, AY496294; NITRAGIN 8251, AY496295; TAL182, AY496296; and VIKING 1, AY496297.



3. Results

3.1. Comparative sequence analysis of *incβ* regions in various *repABC* plasmids

Plasmid p42d contains two incompatibility sites: one located in the intergenic sequence (igs) between *repB* and *repC*, called *incx*, and other, *incβ*, in the 502 bp fragment containing the last 72 bp of the *repC* coding region and the following downstream sequence (Ramírez-Romero et al., 2001). A comparative sequence analysis between

the *repC* downstream regions of all sequenced *repABC* replicons did not find any significantly conserved motif among them (data not shown).

We hypothesized that a comparative study of less divergent *incβ* regions could facilitate the identification of functional regions within *incβ*. To restrict the range of diversity we choose 6 plasmid-containing *R. etli* strains from different parts of the world (Table 1). In this analysis we included plasmid pRiA4b from the closely related *A. rhizogenes* that belongs to the same incompatibility group as plasmid p42d (Cevallos et al., 2002).

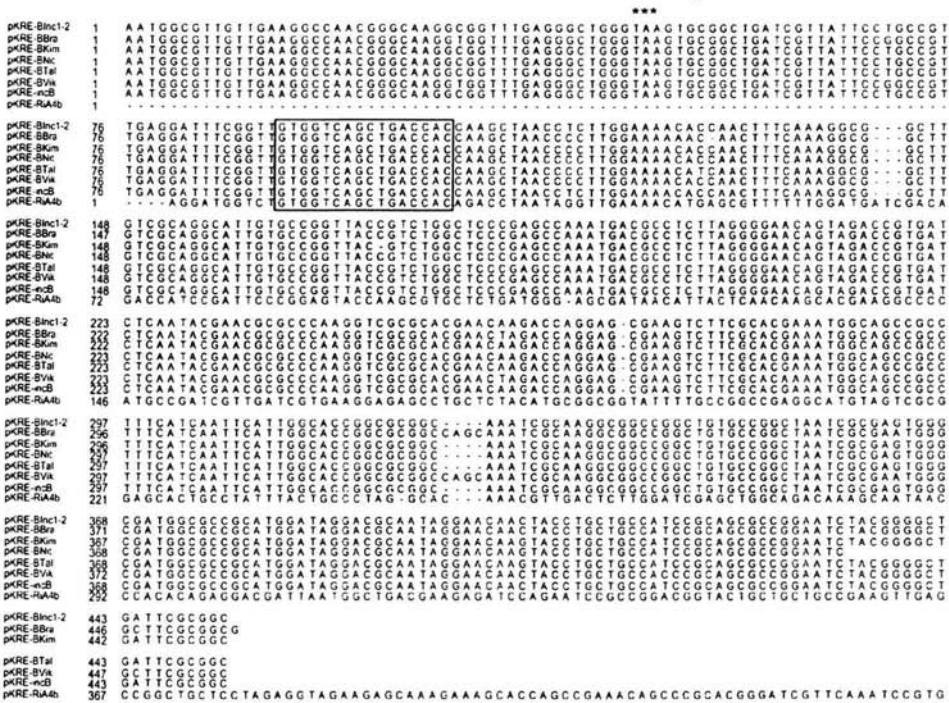


Fig. 2. Alignment of the nucleotide sequences from the homologous *incβ* regions of some *Rhizobium* plasmids and of plasmid pRiA4b from *A. rhizogenes*. Identical bases are shown in gray boxes. Asterisks indicate the stop codon of *repC*. The square indicates the position of the 16-bp palindromic sequences.

The homologous *incβ* regions of the *R. etli* plasmids were amplified by PCR using genomic DNA as a template. The PCR products were cloned and their DNA sequences were determined. Later, the inserts of these constructs were introduced into plasmid pRK7813, and the resultant plasmids were transferred into *R. etli recA* strain (CFNX101) to determine their incompatibility phenotypes. All the constructs were capable of displacing plasmid p42d, indicating that the incoming plasmids carry incompatibility determinants and that all share the same incompatibility group. The DNA alignment of these sequences demonstrates a high degree of identity among the *R. etli* plasmids, but the equivalent sequence of plasmid pRiA4b showed less conserved sequences. The most conspicuous motif conserved between all is a 16-bp palindrome sequence: [5'-GTGGTCAGCTGACCAC-3']. The presence of this element suggests a role in incompatibility determination (Fig. 2).

### 3.2. Assignment of the minimal DNA sequence from the *incβ* region of plasmid p42d required for incompatibility

The *incβ* region of plasmid p42d was originally described as a 502-bp *EcoRI* fragment of containing the last 72 bp of the coding region of *repC*, and 430 bp downstream of the stop codon of this gene (Ramírez-Romero et al., 2000). The 5' end of the conserved 16-bp palindrome sequence is situated 40 bp downstream of the *repC* stop codon. To determine if this sequence is the unique element involved in incompatibility, PCR products containing different regions of *incβ*, with or without the 16-bp palindrome, were obtained. These products were cloned into pRK7813 and introduced into *R. etli* strain CFNX101 by conjugation. The incompatibility properties of the constructs were determined by analyzing the plasmid profile of the transconjugants.

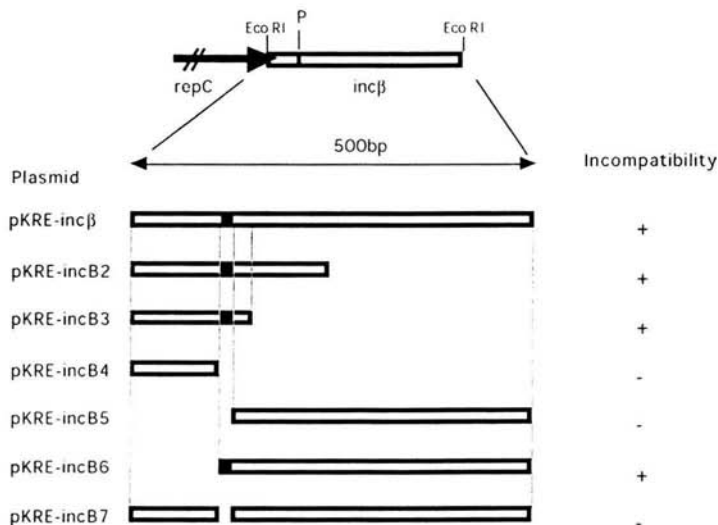


Fig. 3. Delimitation of the incompatibility determinants within the *incβ* region. A schematic representation of the RepC (black arrow) and the 500-bp *incβ* regions (open box) of plasmid p42d is given above. The open boxes represent PCR fragments of *incβ* cloned into pRK7813, introduced in CFNX101 and tested for incompatibility. Solid boxes indicate the palindrome sequence (P). Symbol "+" indicates that the plasmid derivative is incompatible with p42d of *R. etli* CFNX101. Symbol "-" indicates that the construct is compatible with p42d of *R. etli* CFNX101.

As shown in Fig. 3, only inserts containing the 16-bp palindrome displaced plasmid p42d, indicating that this sequence was necessary and sufficient to induce incompatibility.

### 3.3. The *incβ* region is involved in the segregational stability of plasmid p42d, an observation confirming the presence of partitioning site in this region

It is well established that plasmids lacking their partitioning site are not properly distributed to the daughter cells during cell division and they are rapidly lost from the cell population (for reviews: Bignell and Thomas, 2001; Møller-Jensen et al., 2000).

To determine the possible role of *incβ* and to check the function of the 16-bp palindrome in plasmid partitioning, various derivatives of the p42d basic replicon carrying progressive deletions of *incβ* region were constructed and their stability was evaluated.

All the constructs begin in the same point, 258 bp upstream of *repA*. The plasmid pSUP-MRc was generated to carry the whole 502-bp *incβ* region. In contrast, plasmid pSUP-MRsB was designed to carry only the first 72 bp from the 502-bp *incβ* region (up to the stop codon of RepC), without the palindrome sequence. The insert of plasmid pSUP-MRc2 contains 250 bp from the *incβ* region. Lastly, plasmid pSUP-MRp harbors a fragment whose 3' end matches the 3' end of the palindrome. All these plasmids were introduced individually into a *R. etli* strain lacking p42d (CFNX107) and their stabilities were evaluated.

Construct pSUP-MRsB was highly unstable, even in presence of selective antibiotic. Only 45% of the cells retained the plasmid after overnight culture (see Fig. 4). After 30 h of growth (~12 generations), only 22% of the cells retained the plasmid. Frequently, *R. etli* CFNX107 containing this construct regained 100% stability, but the analysis of the plasmid-profiles and the following

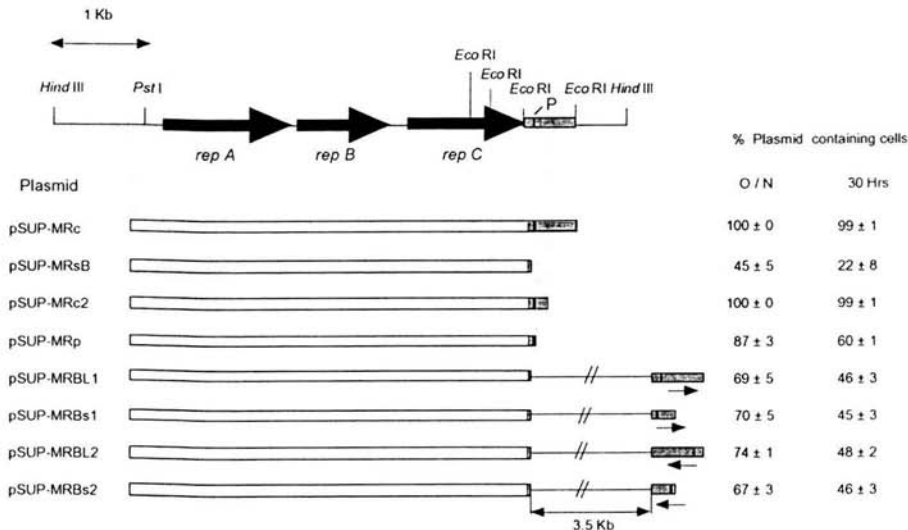


Fig. 4. Plasmid stability. Plasmid retention in the cell population of *R. etli* CFNX107, harboring *incβ* regions of various lengths. A scheme of the *repABC* minimal replicon of plasmid p42d is given above. The genes are shown as black arrows. The grey solid boxes represent the *incβ* region and the palindrome sequence (P), respectively. The open boxes below represent the DNA inserts carried by each plasmid derivative. The arrows show the orientation of the cloned fragment. Samples were taken immediately after dilution in fresh medium (O/N) and 30 h later (see Section 2). The data are based on three independent experiments.

hybridization with a specific probe showed that this construct forms a cointegrate elsewhere in the genome (data not shown).

In contrast, 99% of the cells from the strain harboring the construct with the complete *incβ* (pSUP-MRc) conserved the plasmid after ~12 generations, a fact confirming the positive role of *incβ* region in the plasmid segregational stability.

Plasmid pSUP-MRc2 showed the same stability as the construct containing the complete *incβ* region, indicating that all the requirements for efficient partitioning are contained within the first 250-bp of *incβ*. In contrast, 60% of the *R. etli* cells retained the derivative that match the 3' end of the 16-bp palindrome (pSUP-MRp), after ~12 generations. These results demonstrate that the 16-bp palindrome is an essential element for plasmid partitioning, but other DNA elements located downstream the 3' end of the palindrome are also required (Fig. 4).

As shown in Fig. 4, the complete *incβ* region (502-bp) and its shortened version (250-bp) were introduced, in the two possible orientations, within

the ampicillin resistance ( $Ap^R$ ) gene of plasmid pSUP-MRsB. These constructs, pSUP-MRBL1, pSUP-MRBs1, pSUP-MRBL2, and pSUP-MRBs2 were introduced into *R. etli* CFNX107, and their stabilities were followed. After 12 generations all of them showed a plasmid retention capacity near 50%, a percentage considerably higher than that obtained with pSUP-MRsB (22%). These results showed that presence of a translocated *incβ* region is not sufficient to stabilize the plasmid at wild-type levels, and suggested that some other DNA element(s) located between the 3' end of the palindrome and the 3' end of *incβ* contained in plasmid pSUP-MRc2 are also required.

#### 3.4. RepB binds specifically the 16-bp palindrome

Two plasmids are incompatible because they share one or more elements involved in plasmid replication or plasmid partitioning or in the regulation of these processes (Novick, 1987). In the experiments described above, we showed that the

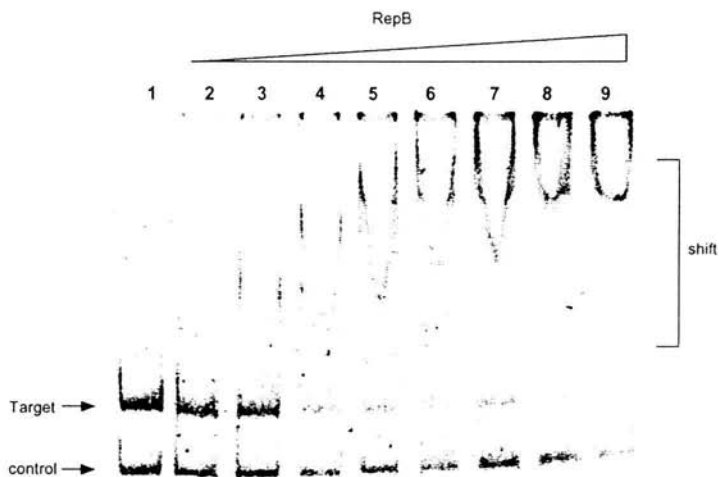


Fig. 5. Gel mobility shift assays showing the ability of RepB to bind *incβ*. DNA fragments used as targets in the binding reactions are a 258-bp PCR product containing the palindrome sequence (Target) and 144-bp PCR product that lacks the palindrome sequence, but retains the sequence surrounding it (negative control). Lane 1, the PCR products with no protein addition. Lanes 2–9, the PCR products incubated with 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, and 2.0  $\mu$ g of RepB protein, respectively.

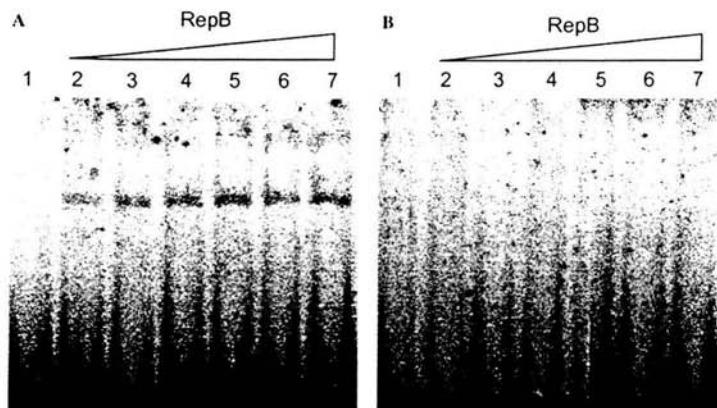


Fig. 6. Gel mobility shift assays of two 16-bp palindromes by RepB. The first palindrome has the wild-type sequence [5'-GTGGTCAGCTGACCAC-3'], and the second one, the negative control, retains the same base composition, but differs in sequence [5'-TCCCGATCGATCGGGA-3']. (A) The gel mobility shift assay using the wild-type palindrome. (B) Gel mobility shift assays using the second palindrome. In both panels lane 1 shows the fragments with no protein added. Lanes 2–9, the DNA fragments incubated with 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0  $\mu\text{g}$  of RepB protein, respectively.

*incB* region is involved in the segregational stability of the plasmid. It was also demonstrated that a 16-bp palindrome located within this region is the sequence responsible for the incompatibility properties of *incB*. We hypothesized that the palindrome sequence acts as an incompatibility determinant because it is the target site of the partitioning proteins (*par* site). Since RepB is a member of the ParA–ParB partitioning proteins family, we decided to evaluate the possible binding of this factor to *incB* by DNA electrophoretic shift assays. To achieve this RepB was overexpressed in *E. coli* and purified as a protein fusion with the maltose binding protein (MBP). For the binding experiments two PCR products containing the *incB* region were utilized. The first one consists of a 258-bp fragment that contains the 16-bp palindrome. The second DNA fragment embraces a similar region but with two differences: it was shorter in size (144-bp) and the 16-bp palindrome was eliminated (see Section 2).

As shown in Fig. 5 the fusion protein binds to the PCR product containing the 16-bp palindrome in a protein concentration-dependent manner, but not to the PCR product lacking the palindrome.

To corroborate the specificity of the binding, a double-stranded DNA molecule, containing only the 16-bp palindrome sequence, was synthesized in vitro and labeled by [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]. Another 16-bp palindrome retaining the same nucleotide composition of the natural palindrome, but differing by sequence, was utilized as negative control. As shown in Fig. 6, RepB–MBP is capable to bind specifically to the 16-bp palindrome present in the *incB* region of plasmid p42d, but not to the palindrome with different sequence. These results demonstrate that the palindrome specifically nucleate the binding of RepB to plasmid p42d.

#### 4. Discussion

A comparison between the sequenced *repABC* basic replicons shows evident similarities: all contain three genes with similar sequences, and their products play identical roles in plasmid replication and partitioning. A large and also well-conserved *repB*–*repC* intergenic sequence is present in all of them (Bartosik et al., 2001; Cevallos et al., 2002; Li and Farrand, 2000), although its function remains

unknown, but probably has some role controlling plasmid partitioning or replication. In two not closely related *repABC* plasmids p42d from *R. etli* and pTAV320 from *P. versutus*, it has been shown that the *repB*–*repC* intergenic sequence is a strong incompatibility factor. In these plasmids, a sequence located immediately downstream of the stop codon of *repC* is also capable of exerting incompatibility against their parental plasmids (Bartosik et al., 2001; Ramírez-Romero et al., 2000). This observation indicates that this region plays some functional role in the replication and segregation of the plasmids and is probably present in all members of the family. However, no similarities were found at the DNA sequence level. In plasmid pTAV320 Bartosik et al. (2001) found a homologous region with two identical 14-bp repeated sequences that are the DNA binding targets for RepB. These sequences were able to confer segregational stability to an unstable plasmid when RepA and RepB were added in *trans*, indicating that the partitioning site resides there. However, this stabilization did not reach the wild-type levels, suggesting that some element in the system is missing. The 14-bp repeated sequences were only found in other composite-plasmids of a closely related species (*Paracoccus pantotrophus*) (Bartosik et al., 2002).

In this work we found a high degree of DNA sequence similarity between the incompatibility regions located downstream the *repC* stop codon, *incβ*, with other plasmids of *R. etli* and to *A. rhizogenes* plasmid pRiA4b, all belonging to the same incompatibility group. A 16-bp palindrome sequence was the only DNA motif recognized within *incβ* and it is the most conserved in the homologous regions of plasmids of the same incompatibility group. Here we show that this palindrome sequence is necessary and sufficient to exert incompatibility towards the parental plasmid by being the RepB DNA target site.

The *incβ* region is required for plasmid stability, but surprisingly, its translocation to another region of the same plasmid reduced its ability to restore wild-type levels of plasmid stability. It is obvious that that some *cis* elements in the upstream and downstream of the *par* site are necessary for proper plasmid segregation.

Despite the lack of sequence conservation among members of the *repABC* family, all of them have a functional partitioning site located downstream from, but near, the stop codon of *repC*. From an evolutionary point of view, and taking into account that more than one *repABC* replicon can exist in the one strain, it could be accepted that the *par* site changes rapidly to skip interferences with the segregational ability of the other *repABC* plasmids, and by this mechanism to avoid loss of information by incompatibility.

In the recently published sequence of the *R. etli* p42d plasmid a copy of the 16-bp palindrome was found approximately 3.4 kb downstream the stop codon of *repC* (Gonzalez et al., 2003). Moreover, the palindrome is not present in the chromosome or in any other plasmid of this strain (G. Dávila, personal communication).

The presence of multiple and dispersed *par*-sites is not uncommon in bacteria containing homologous of the ParA–ParB partitioning proteins. The *Streptomyces coelicolor* genome contains 15 copies of inverted repeats related to the sequences proposed as the target site for SpoJ (ParB) in *Bacillus subtilis*. The prophage plasmid N15 contains four sequences related to the SopB binding site of F plasmid. (Bignell and Thomas, 2001; Ravin and Lane, 1999). The role of these multiple partitioning sites remains to be elucidated.

#### Acknowledgments

We thank Michael Dunn and Brenda Valderama for their critical comments and Angeles Pérez-Oseguera for her skilful technical support. We also thank Paul Gaytán and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides. We are grateful to Dr. Enrique Merino and Dr. Ernesto Pérez-Rueda for their advice in computer analyses and Dr. Atsuhiko Oka for plasmid pAO244. This work was supported by CONACYT Grant 36758-N.

#### References

- Bartosik, D., Baj, J., Włodarczyk, M., 1998. Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of

- the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. Microbiology 144, 3149–3157.
- Bartosik, D., Baj, J., Piechucka, E., Waker, E., Włodarczyk, M., 2002. Comparative characterization of *repABC*-type replicons of *Paracoccus pantotrophus* composite plasmids. Plasmid 48, 130–141.
- Bartosik, D., Szymanik, M., Wysocka, E., 2001. Identification of the partition site within the *repABC*-type replicon of the composite *Paracoccus versutus* plasmid pTAV1. J. Bacteriol. 183, 6234–6243.
- Bignell, C., Thomas, C.M., 2001. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. J. Biotech. 91, 1–34.
- Cevallos, M.A., Porta, H., Izquierdo, J., Tun-Garrido, C., Garcia-de-los-Santos, A., Davila, G., Brom, S., 2002. *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. Plasmid 48, 104–116.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltzman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagijs, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., Overbeek, R., 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 443–448.
- Durland, R.H., Helinski, D.R., 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.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Bountry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dréano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernández-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandenberg, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Kuo-Chen, Y., Batut, J., 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science 293, 668–672.
- Gonzalez, V., Bustos, P., Ramirez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernandez-Gonzalez, I., Hernandez-Celis, J.C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodriguez, O., Flores, M., Cevallos, M.A., Collado-Vides, J., Romero, D., Davila, G., 2003. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. Genome Biol. 4, R36.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Qurollo, B., Goldman, B.S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lapps, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., Slater, S., 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science 294, 2323–2328.
- Hanahan, D., 1983. Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557–560.
- Jonathan, D.G., Gutterson, N., 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.
- Josephson, K.L., Pepper, I.L., 1984. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran desert. Soil Biol. Biochem. 16, 651–655.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S., 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7, 331–338.
- LaValle, E.R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A., McCoy, J.M., 2000. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. Methods Enzymol. 326, 322–340.
- Li, P., 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 system. J. Bacteriol. 182, 179–188.
- Martinez-Salazar, J., Romero, D., Girard, M.L., Dávila, G., 1991. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. J. Bacteriol. 173, 3035–3040.
- Møller-Jensen, J., Jensen, R.B., Gerdes, K., 2000. Plasmid and chromosome segregation in prokaryotes. Trends Microbiol. 8, 313–320.
- Nishiguchi, R., Takanami, M., Oka, A., 1987. Characterization and sequence determination of the hairy root inducing plasmid pRiA4b. Mol. Gen. Genet. 206, 1–8.
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., Cevallos, M.A., 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158, 148–155.
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. Microbiol. Rev. 51, 381–395.
- Pappas, K.M., Winans, S.C., 2003. The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid *repABC* operon. Mol. Microbiol. 49, 441–455.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., DeBoy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M., Fraser, C.M., 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant

- pathogens and symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 13148–13153.
- Pérez-Ramírez, N.O., Rogel, M.A., Wang, E., Castellanos, J.Z., Martínez-Romero, E., 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. FEMS Microbiol. Ecol. 26, 289–296.
- Piñero, D., Martínez, E., Selander, R.K., 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2825–2832.
- Ramírez-Romero, M.A., Bustos, P., Girard, M.L., Rodríguez, O., Cevallos, M.A., Dávila, G., 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. Microbiology 143, 2825–2831.
- Ramírez-Romero, M.A., Soberón, N., Pérez-Oseguera, A., Téllez-Sosa, J., Cevallos, M.A., 2000. Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid. J. Bacteriol. 182, 3117–3124.
- Ramírez-Romero, M.A., Téllez-Sosa, J., Barrios, H., Pérez-Oseguera, A., Rosas, V., Cevallos, M.A., 2001. RepA negatively autoregulates the transcription of the repABC operon of the *Rhizobium etli* Symbiotic plasmid basic replicon. Mol. Microbiol. 42, 195–204.
- Ravin, N., Lane, D., 1999. Partition of the linear plasmid N15: interactions of N15 partition functions with the sop locus of the F plasmid. J. Bacteriol. 181, 6898–6906.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santana, M.A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zabaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S.J., Rosenstein, Y., 2000. CD3-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and Nkappa B transcription factor in human T lymphocytes. J. Biol. Chem. 275, 31460–31468.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engineering transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technology 1, 784–791.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 185, 60–89.
- Tabata, S., Hooykaas, P.J.J., Oka, A., 1989. Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTib6S3. J. Bacteriol. 171, 1665–1672.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
- Turner, S.L., Young, J.P., 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8J1. FEMS Microbiol. Lett. 133, 53–58.
- Wheatcroft, R., McRae, G.D., Miller, W.R., 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. Mol. Plant Microbe Interact. 3, 9–17.
- Zhong, Z., Caspi, R., Helinski, D., Knauf, V., Sykes, S., O'Byrne, C., Shea, T.P., Wilkinson, J.E., DeLoughery, C., Toukdarian, A., 2003. Nucleotide sequence based characterizations of two cryptic plasmids from the marine bacterium *Ruegeria* isolate PR1b. Plasmid 49, 233–252.

Communicated by M. Espinosa



---

## RESULTADOS ADICIONALES

Como mencionamos anteriormente, la secuencia intergénica localizada entre *repB* y *repC* del plásmido p42d (*incα*) es capaz de ejercer incompatibilidad hacia el plásmido p42d cuando la introducimos a una cepa de *R. etli recA* (Ramírez-Romero *et al.* 2000). Esta región muestra un alto grado de similitud en secuencia entre todos los plásmidos *repABC* reportados hasta ahora (Cevallos *et al.* 2002). También se ha demostrado para el plásmido pTAV320 (de *P. versutus*) y pRiA4b (de *A. rhizogenes*) que esta región de DNA es capaz de inducir incompatibilidad frente a su respectivo plásmido parental cuando se introduce en *trans*, lo que sugiere, que esta es una característica general entre los replicones *repABC* (Bartosik *et al.* 2001; Nishigushi *et al.* 1987).

Nos interesa determinar el o los motivos presentes en *incα* que participan en la incompatibilidad, ya que estos motivos pudieran estar involucrados en la replicación, partición o la regulación de cualquiera de estas funciones primordiales del plásmido. Para ello, realizamos dos estrategias, la primera consiste en determinar la región mínima capaz de ejercer incompatibilidad.

Para determinar cual es la región mínima necesaria para ejercer incompatibilidad de la región *incα*, amplificamos por PCR diversas regiones internas de la región de incompatibilidad, las clonamos en un vector replicable en *Rhizobium* (pRK7813) y las conjugamos a la cepa CFNX101 (*R. etli recA*). Para los experimentos de incompatibilidad seleccionamos siempre el plásmido entrante, y observamos la presencia o ausencia del plásmido residente como un replicón independiente. Solo dos de las construcciones, pInc1 y pInc5 fueron capaces de desplazar al plásmido p42d (Fig 7). La primera contiene toda la región *incα*, y la segunda construcción contiene un inserto que abarca desde los nucleótidos 1 al 111 después del codón de termino de *repB*. Estos resultados indican que la región de 110pb contiene todos los elementos de *incα* requeridos para incompatibilidad. Demostramos que las clonas tienen la construcción correcta hibridando con el inserto utilizado. Para los casos en los que no observamos incompatibilidad secuenciamos el

inserto para eliminar la posibilidad de que la pérdida del fenotipo se debiera a una mutación.

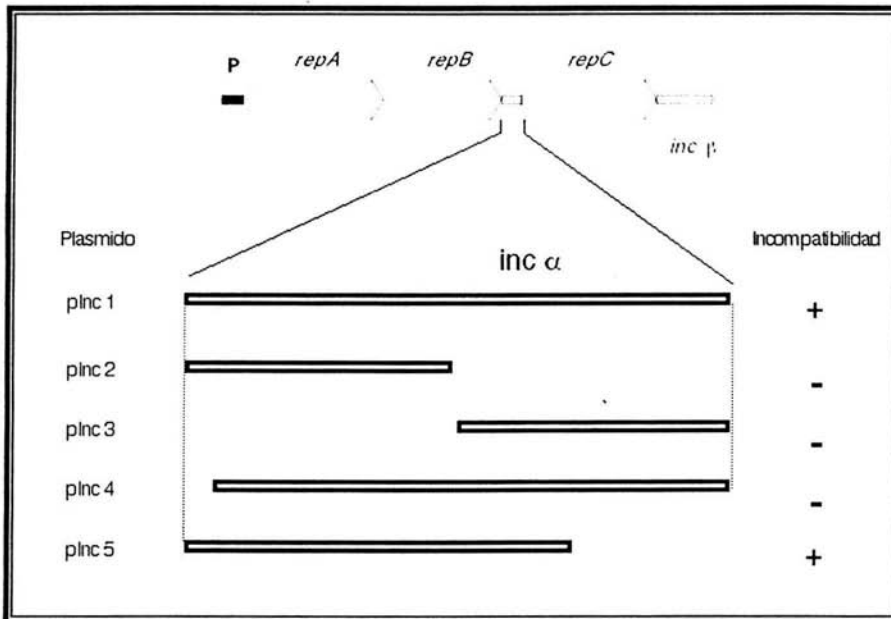


Fig. 7. Representación esquemática del replicador del plásmido p42d. Se muestran los diferentes fragmentos de *inca* analizados y su fenotipo hacia el plásmido silvestre.

La segunda estrategia consistió en utilizar una colección de cepas de *R. etli* aislada de diferentes partes del mundo, con el propósito de distinguir, en base a las secuencias, las regiones involucradas con la incompatibilidad. De esta manera, lo primero que hicimos fue, determinar si las cepas de nuestra colección poseen plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad al que pertenece el p42d, ya que si analizamos las secuencias de plásmidos compatibles, veremos cuales secuencias, al variar, pueden cambiar el grupo de incompatibilidad. Para evaluar la incompatibilidad de estos plásmidos, realizamos los siguientes experimentos: obtuvimos por PCR las regiones homólogas a *incα* de plásmidos de la colección de cepas, clonamos cada uno de estos productos en un vector replicable en

*Rhizobium*, conjugamos estas clonas a la cepa CFNX101 y determinamos sus propiedades de incompatibilidad frente al plásmido p42d (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Colección de cepas utilizadas en el análisis y su comportamiento frente al plásmido simbiótico p42d de *R. etli*.

C E P A	Nombre de la construcción	FENOTIPO
BRA 5 ( <i>R. etli</i> )	pIA-Bra	INCOMPATIBLE
KIM 5 ( <i>R. etli</i> )	pIA-Kim	INCOMPATIBLE
NGR234 ( <i>Rhizobium sp</i> )	pIA-NGR	COMPATIBLE
NITRAGIN 8251 ( <i>R. etli</i> )	pIA-Nit	INCOMPATIBLE
TAL 182 ( <i>R. etli</i> )	pIA-Tal	INCOMPATIBLE
VIKING-1 ( <i>R. etli</i> )	pIA-Vik	INCOMPATIBLE
<i>A. rhizogenes</i>	pIA-RiA4b	COMPATIBLE

Con el propósito de identificar los motivos implicados en la incompatibilidad, secuenciamos los productos de PCR obtenidos a partir de las regiones homólogas a *incα* de los plásmidos de la colección de cepas. El análisis comparativo de estas secuencias, teniendo en cuenta el grupo de incompatibilidad al que pertenecen, nos permitiría reconocer cuáles son las regiones que pueden cambiar sin alterar las propiedades de incompatibilidad, y cuales de ellas, al variar, cambian el grupo de incompatibilidad. Sin embargo, el análisis de las secuencias, nos mostró que *incα* está altamente conservada entre los diferentes plásmidos de la colección y es muy difícil determinar el o los motivos involucrados en la incompatibilidad.

Un análisis más detallado de la secuencia de pInc5 (región mínima de *incα* capaz de ejercer incompatibilidad) realizada por Tatiana Venkova-Canova demostró que existe un gene que codifica a un RNA antisentido pequeño (ctRNA) en esta región. El promotor del gene del ctRNA está situado 59 pb curso arriba del codón de inicio de *repC*, y presenta similitud al consenso de promotores dependientes de sigma70. Esta secuencia se encuentra en la cadena complementaria del DNA de la región codificante del operón *repABC*: (TTGACG) N17 (GATTCT) (las bases idénticas al consenso de *E. coli* están subrayadas). El inicio del transcrito se localizó en una base “G”, 94 pb curso arriba del inicio de *repC*. Además, se encontró una secuencia con potencial a formar una estructura secundaria semejante a los terminadores *rho*-independiente en la misma cadena de DNA. Este RNA antisentido es el único determinante de incompatibilidad presente en *incα* (Fig 8).

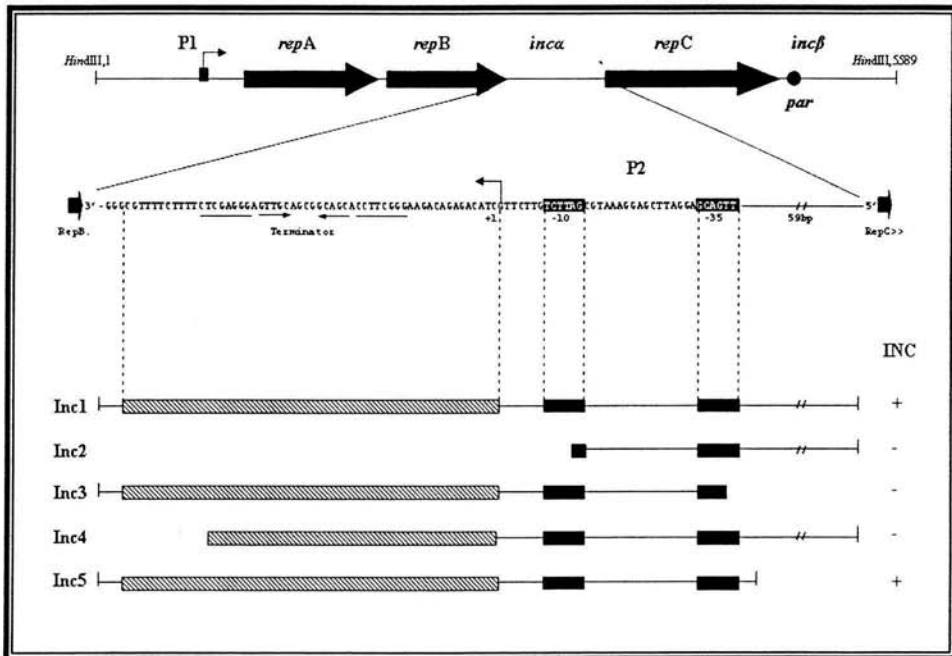


Fig. 8. Secuencia del RNA antisentido presente en el replicador del plásmido p42d y su localización en las clonas analizadas.

Realizamos un alineamiento de las cadenas opuestas presentes en las regiones homólogas a *incα* de la colección de cepas y encontramos que todas ellas tienen similar la región correspondiente al promotor, lo que nos indica que también pudieran codificar para un RNA antisentido (Fig. 9).

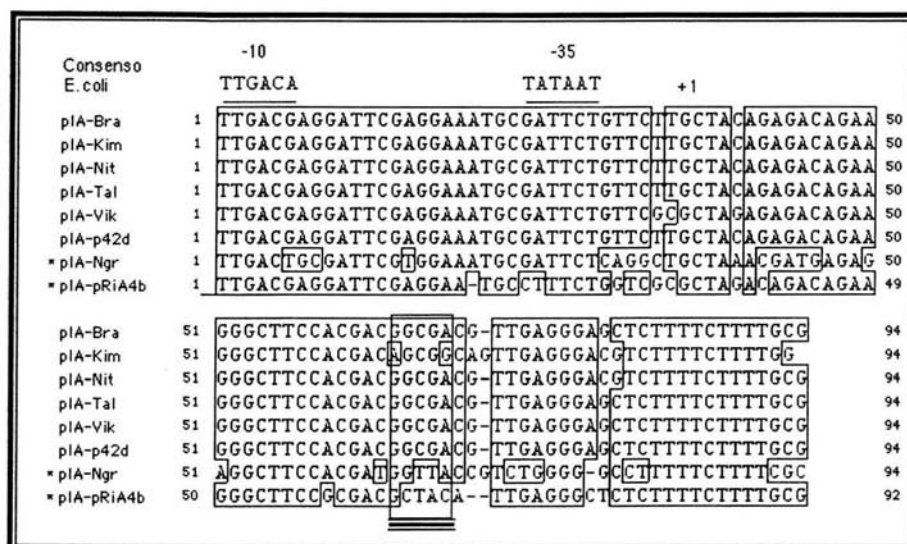


Fig. 9. Alineamiento de las secuencias de DNA, las cuales podrían codificar para un RNA antisentido en las regiones homólogas a *incα* de los plásmidos de la colección de cepas. Las bases que formarían el asa se muestran con la línea     . Las secuencias que corresponden a los plásmidos compatibles con respecto al p42d están marcadas con asterisco.

Realizamos la predicción de la estructura secundaria de las regiones homólogas a *incα*, de cada uno de los plásmidos de la colección, mediante el programa GeneQuest de DNASTAR. Si tomamos en cuenta el comportamiento frente al p42d podemos observar que los plásmidos incompatibles presentan una estructura secundaria del RNA antitranscrito muy semejante (Fig. 10).

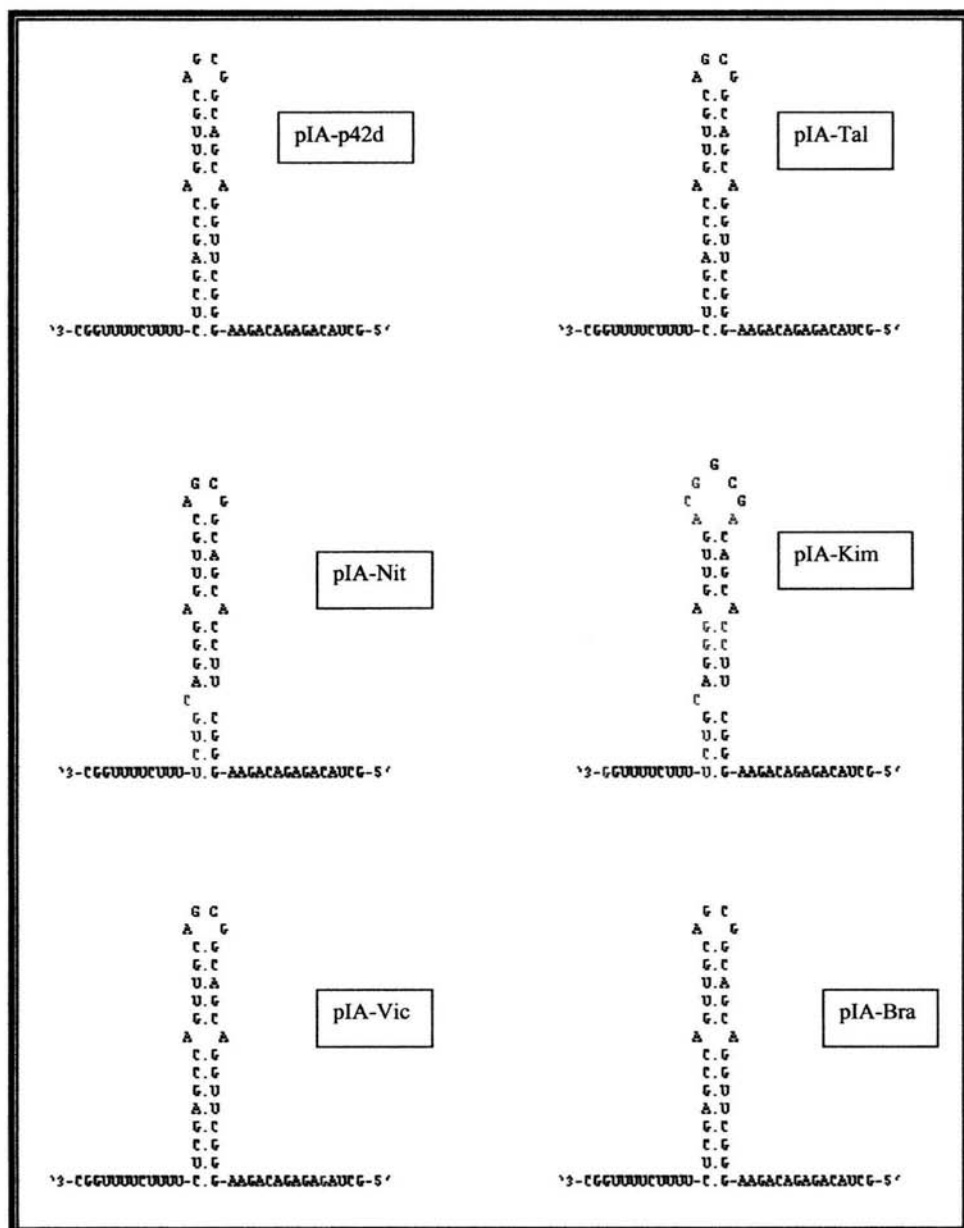


Fig. 10. Estructura secundaria predicha para los RNA antisentidos probablemente presentes en las regiones homologas a *incα* de plásmidos incompatibles. En rojo se muestran los cambios en la secuencia comparados con el p42d.

En cambio, las estructuras secundarias de los RNA antitranscritos entre los plásmidos compatibles son mucho más diferentes, y estas diferencias radican principalmente en el asa del antitranscrito (Fig. 11). Estos resultados concuerdan con las observaciones reportadas por Wagner y Simons en 1994, quienes propusieron, que los cambios de especificidad para un RNA antisentido ocurren en el asa.

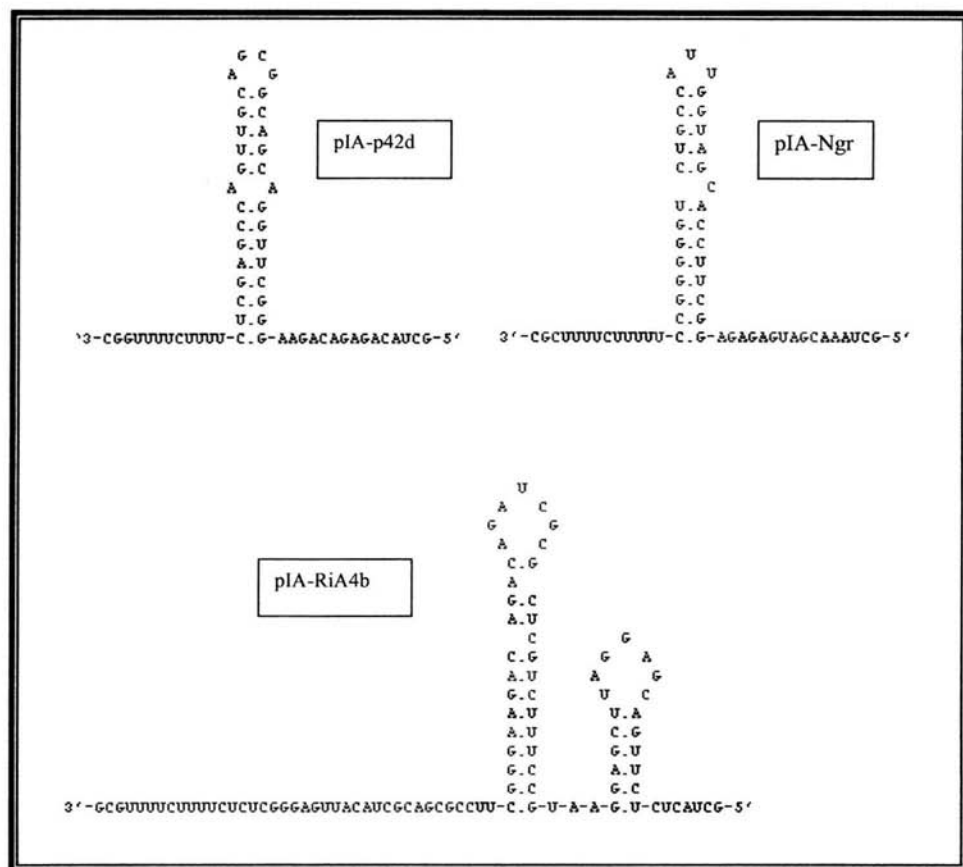


Fig. 11. Estructura secundaria predicha para los RNA antisentidos probablemente presentes en las regiones homólogas a *incA* de plásmidos compatibles. En rojo se muestran los cambios en la secuencia comparados con el p42d.

## DISCUSIÓN

El replicón básico del plásmidos simbiótico p42d de *Rhizobium etli* es hasta ahora, el mejor caracterizado dentro de los replicadores tipo *repABC*. En este replicón del p42d, se han identificado al menos tres determinantes de incompatibilidad: RepA, *incα* e *incβ*, RepA es un factor de incompatibilidad en *trans* y sabemos que esta involucrado en la regulación del operón (Ramírez-Romero *et al.* 2001).

En este trabajo mostramos que el RNA antisentido presente en *incα* es el único determinante de incompatibilidad en esta región, el cual está altamente conservado entre diferentes plásmidos tipo *repABC* de *R. etli*. Esta conservación en secuencia va más allá de estos plásmidos (Cevallos *et al.* 2002). Las secuencias-homologas a *incα* de todos los plásmidos tipo *repABC* hasta ahora reportados parecen codificar también para un RNA antisentido, ya que alineamientos de estas secuencias muestran que comparten los motivos característicos del RNA antisentido presente en el replicador del p42d (cajas -10 y -35, la G como inicio y una estructura secundaria como posible terminador).

La similaridad ente la estructura secundaria del RNA antitranscrito de estos plásmidos está estrechamente relacionada con el grupo de incompatibilidad al que pertenece el plásmido, De tal manera que, haciendo una predicción de la estructura secundaria de este RNA antisentido podríamos predecir si pertenece a un mismo grupo de incompatibilidad o no. Si presenta similitudes, estas deben de estar sobre todo en el asa del RNA para predecir que sean incompatibles. El asa generalmente contiene entre 5-8 nucleótidos. Mutaciones puntuales en el asa del RNA antisentido alteran la especificidad de la interacción con el blanco (Franch *et al.* 1999), lo que indica que la interacción asa-asa inicia la reacción de apareamiento entre el RNA antisentido y el RNA blanco, Las diferencias en las secuencias del asa se encuentran a menudo en asas de RNAs antisentido-blanco de plásmidos cercanamente relacionados y son las bases de la compatibilidad (Wagner y Simons 1994). Mutaciones puntuales en el asa alteran la especificidad de la



interacción, como ya lo mencionamos y dan origen a nuevos grupos de incompatibilidad (Brantl 2002).

No sabemos hasta ahora, el papel que juega el RNA antisentido en las funciones del plásmido, sin embargo, experimentos hechos en nuestro laboratorio indican que esta involucrado en su replicación.

Los resultados del artículo nos demuestran que *incβ* es un determinante de incompatibilidad involucrado con la partición del plásmido, y que RepB se une específicamente a esta región en la secuencia palindromo *in vitro*, Sin embargo RepB no parece ser un determinante de incompatibilidad, al menos no cuando está presente en cantidades normales para la célula, Esta observación es similar para sus homólogos SopB y ParB de los plásmidos F y P. SopB y ParB sólo son capaces de inducir incompatibilidad cuando se sobreexpresan (Actis *et al.* 1999, Lynch y Wang 1995), lo que nos sugiere que también este podría ser el caso para RepB.

Son interesantes los resultados contrastantes obtenidos con las diferentes regiones del plásmido pRiA4b de *Agrobacterium rhizogenes*. Cuando clonamos la región homóloga a *incα* de este plásmido y evaluamos su capacidad de desplazar al plásmido simbiótico, vemos que el plásmido que contiene esta región es compatible con el p42d. Sin embargo, cuando evaluamos a la región homóloga a *incβ*, esta sí causa incompatibilidad y por lo tanto es capaz de desplazar al plásmido simbiótico. Esto nos sugiere que el replicador del plásmido no evoluciona como una unidad.

## PERSPECTIVAS

Determinar el elemento *cis* necesario para una adecuada segregación del plásmido.

Examinar si RepB es un determinante de incompatibilidad y si es capaz de producir silenciamiento de los genes aledaños como lo hacen ParB y SopB de los plásmido PI y F respectivamente.

Analizar la posible interacción entre las proteínas del replicador y su localización en la célula, Actualmente esto está siendo realizado en nuestro laboratorio mediante el uso de sistemas de dos híbridos y la utilización de proteínas fluorescentes respectivamente.

También se está buscando la localización del origen de replicación mediante geles de dos dimensiones, Creemos que el origen se encuentra dentro de *repC*, así que también se analiza la capacidad replicativa de plásmidos con diferentes regiones de *repC* complementados en *trans* con la proteína iniciadora (RepC).

## REFERENCIAS

- Abeles, A. L., Brendler, T. y Austin, S. J. (1993) Evidence of two levels of control of P1 *oriR* and host *oriC* replications origins by DNA adenine methylation. *J. Bacteriol.* 175: 7801-7807.
- Abeles, A. L., Friedman, S. A. y Austin, S. J. (1985) Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region. *J. Mol. Biol.* 85: 261-272.
- Abeles, A., Reaves, L. D. Youngre-Grimes, B. y Austin S. J. (1995) Control of P1 plasmid replication by iterons. *Mol. Microbiol.* 18: 903-912.
- Abeles, A. L. Snyder, K. M. y Chatteraj, D. K. (1984) P1 plasmid replication: replication structure. *J. Mol. Biol.* 173: 307-324.
- Actis, L. A., Tolmasky, M. E. y Crosa J. H. (1999) Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front. Biosci.* 1: D43-62.
- Amabile-Cuevas, C.F. y Chicurel, M. E. (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189-1999.
- Austin, S. y Abeles, A. (1985) The partition functions of P1, P7 and F miniplasmids. *Basic Life Sci.* 30: 215-226.
- Atlung, T., Chistensen, B. B. y Hansen, F. G. (1999) Role of the Rom protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in *Escherichia coli* K-12. *Plasmid* 41: 110-119.
- Baker, T. A. y Wickner, S. H. (1992) Genetics and enzymology of DNA replication in *Echerichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* 26: 447-477.
- Bartosik, D., Baj, J., Piechuka, E., Waker, E. y Wlodarczyk, M. (2002) Comparative characterization of *repABC*-type replicons of *Paracoccus pantotrophus* composite plasmids. *Plasmid* 48: 130-141.
- Bartosik, D., Wlodarczyk, M. y Thomas, C. M. (1997) Complete nucleotide sequence of pTAV320, a *repABC*-type replicon of *Paracoccus (Thiobacillus) versutus* pTAV1 and its correlation to several plasmids of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species, *Plasmid* 38: 53-59.
- Blakely, G., Colloms, S., May, G., Burke, M. y Sherratt, D. (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is ars red for chromosomal segregation at cell division. *New Biologist.* 3: 789-798.

- Bedbrook, J.R. y Ausebel, F.M. (1976) Recombination between bacterial plasmids leading to the formation of plasmid multimers. *Cell*. 9: 707-716.
- 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.
- Bramhill, D. y Kornberg, A. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54:915-918.
- Brantl, S. (2002) Antisense-RNA regulation and RNA interference *Rev. Biochem. Et Biophys. Act.* 1575:15-25.
- Brantl, S. y Wagner, E. G. H. (1997) Dual function of the *copR* gene product of plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* 179: 7016-7024.
- Brendler, T., Abeles, A. y Austin S. J. (1991) Critical sequences in the core of the P1 plasmid replication origin. *J. Bacteriol.* 173:3935-3942.
- Brock T. D. y Madigan, M. T. (1993) *Microbiología*. Sexta Edición Ed. PHH. Pag 273-277.
- Brom, S., Garcia-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R. y Romero, D. (2000) In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth required interaction among different replicons. *Plasmid* 44: 34-43.
- Brom, S., Garcia-de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D. y Palacios, R. (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174: 5183-5189.
- Bouet, J.Y. y Funell, B. E. (1999) P1 ParA interacts with the P1 partition complex at *parS* and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *EMBO J.* 18: 1415-1424.
- Bouet, J.-Y., Surtees, J. A. y Funell, B. E. (2000) Stoichiometry of P1 plasmid partition complexes. *J. Biol. Chem.* 275: 8213-8219.
- Burian, J., Ausió, J., Phipps, B., Moore, S., Dougan, D. y Kay, W. (2003) Hexamerization of RepA from the *Escherichia coli* plasmid pKL1. *Biochem.* 42: 10282-10287.
- 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.
- Cevallos, M.A., Porta, H., Izquierdo, J., Tun-Garrido, C., Garcia-de los Santos, A., Dávila, G. y Brom. S. (2002) *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids or the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. *Plasmid* 48: 104-116.

- 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.
- Chattoraj, D. K. (2000) Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Rev. Mol. Microbiol.* 37:467-476.
- 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. y Espinosa, M. (2000) Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol.* 37:492-500.
- Del Solar, G., Giralgo, R., Ruiz-Echeverria, M. J., Espinosa, M. y Diaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microb. and Mol. Biol. Rev.* 62:434-464.
- Del Solar, G., Hernández-Arriaga, A. M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M. y Espinosa, M. (2002) A genetically economical family of plasmid-encoded transcriptional repressors involved in control of plasmid copy number. *J. Bacteriol.* 184: 4943-4951.
- Del Solar, G., Acebo, P. y Espinosa, M. (1997) Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNAII and the compact *rnaII* region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis. *Mol. Microbiol.* 23: 95-108.
- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P. H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J. J., Haselkorn, R., Kyrpides, N. y Overbeek, R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 443-448.
- Ebersbach, G. y Gerdes, K. (2004) Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol. Microbiol.* 52: 385-398.
- Engelberg-Kulka, H. y Glaser, G. (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 53: 43-70.
- Erdman, N., Petroff, T. y Funell, B. E. (1999) Intracellular localization of P1 ParB protein depends on ParA and *parS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14905-14910.
- Franch, T., Petersen, M., Wagner, E. G. H., Jacobsen, J. P. Y Gerdes, K. (1999) Antisense RNA regulation in Prokaryotes: rapid RNA/RNA interaction facilitated by a General U-turn loop structure. *J. Mol. Biol.* 294: 1115-1125.

- Friedman, S. A. y Austin, S. J. (1988) The P1 plasmid partition system synthesizes two essential proteins from one autoregulated operon. *J. Bacteriol.* 170: 103-112.
- Funell, B. E. (1988) Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmid containing the centromere *ars*. *J. Bacteriol.* 170: 954-960.
- Gallie, D. R., Zaitlin, D., Perry, K. L. y Kado, C. I. (1984) Characterization of the replication and stability regions of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTAR. *J. Bacteriol.* 157: 739-745.
- García-de los Santos, A., Brom, S. y Romero, D. (1996) Rhizobium plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. of Microbiol. And Bioitech.* 12: 119-125.
- García-de los Santos, A. y Brom, S. (1997) Characterization of two plasmids-borne *lps* beta loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 10: 891-902.
- Gerdes, K. (2000) Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol.* 182: 561-572.
- Gerdes, K., Møller-Jensen, J., Ebersbach, G., Kruse, T. y Nordström, K. (2004) Bacterial mitotic machineries. *Cell* 116: 359-366.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Qurollo, B., Goldman, B.S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollan, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. y Slater, S. (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2323-2328.
- Gordon, G. S. y Wright, A. (2000) DNA segregation in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 681-708.
- Hashimoto-Gotoh, T. y Inselburg, J. (1979) ColE1 plasmid incompatibility: localization and analysis of mutations affecting incompatibility. *J. Bacteriol.* 139: 608-619.
- Hayes, F. (2000) The partition system of multidrug resistance plasmid TP228 includes a novel protein that epitomizes an evolutionarily distinct subgroup of the ParA superfamily. *Mol. Microbiol.* 37: 528-541.
- Hayes, F. y Barilla, D. (2003) Architecture of the ParF-ParG protein complex involved in prokaryotic DNA segregation. *Mol. Microbiol.* 49: 487-499.

- Helinski, D. R., Toukdarian, A. E., y Novick, R. P. (1996) Replication control and other stable maintenance mechanism of plasmid. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington DC: American Society of Microbiology Vol2 pp 2295-2324.
- Highlander, S. K. y Novick, R. P. (1990) Mutational and Physiological analyses of plasmid pT181 functions expressing incompatibility. *Plasmid* 23: 1-15.
- Hiraga, S. (1992) Chromosome and plasmid partition in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 283-306.
- Hooykaas, P.J.J., den Dulk-Ras, H., Ooms, G. y Schilperoort, A. (1980) Interactions between octopine and nopaline plasmid 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.
- Ingmer, H., Fong E. L. y Cohen, S. N. (1995) Monomer-dimer equilibrium of the pSC101 RepA protein. *J. Mol. Biol.* 250: 309-314.
- Kolter, R. y Helinski, D. (1978) The activity of the replication terminus of plasmid R6K in hybrid replicons in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 124: 425-441.
- Jacob, F. y Cuzin, F. (1963) On the regulation on DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 329-348.
- 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. *EMBO J.* 18: 4076-4084.
- Jonson, 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.
- Kittell, B. L. y Helinski, D. R. (1993) Plasmid Incompatibility and Replication Control. *Bacterial conjugation Chap 8*: 223-241.
- Kline, B. C. (1985) A review of Mini-F plasmid maintenance. *Plasmid* 14: 1-16.

- 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.
- Lacks, S. A., López, P. Greenberg, B. y Espinosa, M. (1986) Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.* 192: 753-765.
- Lemonnier, M., Bouet, J-Y., Libante, V. y Lane, D. (2000) Disruption of the F plasmid partition complex *in vivo* by partition protein SopA. *Mol. Microbiol.* 38: 493-503.
- 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.
- 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. U.S.A.* 92: 1896-1900.
- Marians, K. J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 673-719.
- Mazaitis, A. J., Mass, R. y Maas, W. K. (1981) Structure of a naturally occurring plasmid with genes for enterotoxin production and drug resistance. *J. Bacteriol.* 145: 97-105.
- Meinhart, A., Alonso, J. C., Strater, N. y W, Saenger. (2003) Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1661-1666.
- Møller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R.B., Roepstorff, P. y Gerdes, K. (2003) Bacterial mitosis: ParM of plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol. Cell.* 12: 1477-1487.
- Mori, H., Kondo, A., Ohshima, A., Ogura, T. y Hiraga, S. (1986) Structure and function of F plasmid genes essential for partitioning. *J. Mol. Biol.* 192: 1-15.
- Mukhopadhyay, S. y Chattoraj D. K. (2000) Replication-induced transcription of an autorepressed gene: The replication initiator gene of plasmid P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 7142-7147.
- Murotsu, T. y Matsubara, K. (1980) Role of an autorepression system in the control of lambda dv plasmid copy number and incompatibility. *Mol. Gen. Genet.* 179: 509-519.
- Nester, E. W. y Kosuget, T. (1981) Plasmid specifying plant hyperplasias. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 531-565.



- Niki, E. y Hiraga, S. (1997) Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. Coli*. *Cell*. 90: 951-957.
- Nordström, K. y Austin, S. J. (1989) Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Ann. Rev. Genet.* 23: 37-69.
- Nordström, K., Molin, S. y Light, J. (1984) Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* 12: 71-90.
- Novick, R. P. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51: 381-395.
- Novick, R.P., Alder, G.K., Projan, S. J., Carleton, S., Highlander, S., Gruss, A., Khan, S. A. y Iordanescu, S. (1984) Control of pT181 replication I, The pT181 copy control function acts by inhibiting the synthesis of a replication protein. *EMBO J.* 3: 2399-2405.
- Novick, R.P. (1989) Staphylococcal plasmid and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 537-565.
- Novick, R.P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtis, R., Datta, N. y Falkow, S. (1976) Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40: 168-189.
- Novick, R. P. y Hoppensteadt, F. C. (1978) On plasmid incompatibility. *Plasmid* 1: 421-434.
- 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.
- O'Connor, M. B., Kilbane, J. J. y Malamy, M. H. (1986) Site-specific and illegitimate recombination in the *oriV1* region of the F factor, DNA sequences involved in recombination and resolution. *J. Molec. Biol.* 189: 85-102.
- Ogura, T., Niki, H., Mori, H., Morita, M., 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.
- Palmer, K. M., Turner, S. L. y Young, J. P. W. (2000) Sequence diversity of the plasmid replication gene *repC* in the Rhizobiaceae. *Plasmid* 44: 209-219.
- Pappas, K. M. y Winans, S. C. (2003) The *luxR*-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol. Microbiol.* 48:1059-1073.
- Pappas, K. M. y Winans, S. C. (2003) The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid *repABC* operon. *Mol. Microbiol.* 49: 441-455.

- Park, K., Han, E., Paulsson, J. y Chatteraj, D.K. (2001) Origin pairing ("handcuffing") as a mode of negative control of P1 plasmid copy number. *EMBO J.* 24: 7323-7332.
- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., Dodson, R. J., Umayan, L., Brinkac, L. M., Beanan, M. J., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Durkin A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Nelson, W. C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S. E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S. R., White, O., Salzberg, S. L., Hoover, D. L., Lindler, L. E., Halling, S. M., Boyle, S. M. y Fraser, C. M. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 13148-13153.
- Projan, S. J. y Novick, R. P. (1986) Incompatibility between plasmids with independent copy control, *Mol. Gen. Genet.* 204: 341-348.
- Pogliano, J., Ho, T. Q., Zhong, Z. Y Helinski, D. R. (2001) Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4486-4491.
- Polisky, B. (1988) ColE1 replication control circuitry: sense from antisense. *Cell* 55: 929-932.
- Quoc Ho, T., Zhong, Z., Aung, S. y Pogliano, J. (2002) Compatible bacterial plasmid are targeted to independent cellular locations in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 21: 1864-1872.
- Ramirez-Romero, M. A., Bustos, P., Girard, M. L., Rodriguez, 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.
- Ramirez-Romero, M. A., Soberón, N., Perez-Oseguera, A., Téllez-Sosa, J. y Cevallos, M. A. (2000) Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 182: 3117-3124.
- Ramirez-Romero, M.A., Téllez-Sosa, J., Barrios, H., Pérez-Oseguera, A., Rosas, V. y Cevallos, M.A. (2001) RepA negatively autoregulates the transcription of the *repABC* operon of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid. *Mol Microbiol.* 42: 195-204.
- Rawlings, D. E. (1999) Proteic toxin-antitoxin, bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the *par* system of pTF-FC2. *FEMS Microbiol. Lett.* 176: 269-277.
- Riggottier-Gois, L., Turner, S.L., Young, J.P.W. y Amarger, N. (1998) Distribution of *repC* plasmid-replication sequence among plasmid and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. *Microbiology* 144: 771-780.

- Riise, E., Stougaard, P., Bindslev, B., Nordström, K. y Molin, S. (1982) Molecular cloning and functional characterization of a copy number control gene (*copB*) of plasmid R1. *J. Bacteriol.* 151: 1136-1145.
- Roberts, R.C., Burioni, R. y Helinski, D.R. (1990) Genetic characterization of the stabilizing functions of a region of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* 172: 6204-6216.
- Ruiz-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.
- Sakai, H. y Komano, T. (1996) DNA replication of the IncQ broad-host-range plasmid in gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 39-71.
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M., y Scherzinger, E. (1989). Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75: 271-288.
- Shafferman, A. y D. R. Helinski (1983) Structural properties of the beta origin of replication of plasmid R6K. *J. Biol. Chem.* 258: 4083-4090.
- Shafferman, A., Stalker, D. M., Tolun, A., Kolter, R. y Helinski, D. R. (1981) Structure-function relationships in essential regions for plasmid replication p. 259-270. In S. Levy, R.C. Clowes, and E.L. Koning (ed), *Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids*. Plenum Publishing Cop., New York.
- Simpson, A. E., Skurray, R. A. y Firth, N. (2003) A single gene on the Staphylococcal multiresistance plasmid pSK1 encodes a novel partitionin system. *J. Bacteriol.* 185: 2143-2152.
- Stougaard, P., Molin, S. y Nordström, K. (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78: 6008-6012.
- Summer, D. K. (1996) *The biology of plasmids*. Pp 1-91. Blackwell Science. Inc. USA.
- Summer, D.K., Beton, C.W.H. y Withers, H.L. (1993) Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* 8: 1031-1038.
- Summer, D. K. y Sherratt, D. J. (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability. *Cell* 36: 1097-1103.
- Sykora (1992) Macroevolution of plasmids: a model for plasmid speciation *J. Theor. Biol.* 159: 53-65.

- 
- Szegedi, E., Czakó, M. y Otten, L. (1996) Further evidence that vitopine-type pTis of *Agrobacterium vitis* represent a novel group of Ti plasmid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 139-143.
- Tabata, S., Hooykaas, P. J. J., Oka, A. (1989) Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J. Bacteriol.* 171: 1665-1672.
- Thiested, T., Sorensen, N. S., Wagner, E. G. y Gerdes, K. (1994) Mechanism of postsegregational 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. *EMBO J.* 13: 1960-1968.
- Timmis, K., Andres, I. y Slocombe, P. (1978) Plasmid incompatibility: cloning of an IncFII determinant of R6-5 *Nature* 71: 4556-4560.
- Tomizawa, J. y Itoh, T. (1981) Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6096-6100.
- Tsutsui, H., Fujiyama, A., Murotsu, T. y Matsubara, K. (1983) Role of nine repeating sequences of the mini-F genomes for expression of F-specific incompatibility phenotype and copy number control. *J. Bacteriol.* 155: 337-334.
- Wagner, E. G. y Simons, R. W. (1994) Antisense RNA control in bacteria, phages and plasmids. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 713-742.
- 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.
- Williams, D. R. y Thomas, Ch. M. (1992) Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1-16.
- 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.
- Zhang, J., Zhang, Y., Zhu, L., Suzuki, M. y Inouye, M. (2004) Interference of RNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *JBC in Press.*
- Zhong, Z., Caspi, R., Helinski, D., Knauf, V., Sykes, S. O'Byrne, C., Shea, T. P., Wilkinson, J. E., DeLoughery, C. y Toukdarian, A. (2003) Nucleotide sequence based characterizations of two cryptic plasmids from the marine bacterium *Ruegeria* isolate PR1b. *Plasmid* 49 :233-252.

---

## APÉNDICE

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

MIGUEL A. RAMÍREZ-ROMERO, NORA SOBERÓN, ANGELES PÉREZ-OSEGUERA,  
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* pRLJ1 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 (iternons), 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 *HindIII* fragment and confers replication stability on a plasmid normally incapable of replicating in *R. etli* (pSUP202). A recombinant plasmid containing the 5.6-kb *HindIII* 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 [<sup>32</sup>P]dCTP-labeled probes (Megaprime kit; Amersham) under high-stringency conditions (65°C in rapid-hybrid 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-ΔA1, pRE-prepA-ΔB-C, and pRE-prepA-ΔC 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-ΔA1, 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-ΔB-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*III 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-ΔS1.2) 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::<math>\Omega</math> Sp<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup></i> ; derivative of CE3	25
CFNX107	<i>recA::<math>\Omega</math> Sp<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> p42a<sup>-</sup> p42d<sup>-</sup></i> ; derivative of CE3	25
Plasmids		
pRK7813	Te <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> Te <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- $\Delta$ inca	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<math>\beta</math></i> )	This work
pKRE-inca	pRK7813 derivative containing the intergenic sequence between <i>repB</i> and <i>-C</i> genes ( <i>inca</i> )	This work
pKRE-S3	pRK7813 derivative with a 959-bp <i>Sall</i> 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-prepA-B	pRK7813 derivative containing a PCR product obtained from plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C; the insert contains <i>repB</i> and the same deletion in the <i>repA</i> gene as plasmid pRE-prepA- $\Delta$ B-C but lacks <i>inca</i> , <i>repC</i> , and <i>inc<math>\beta</math></i>	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>inca</i> , <i>repC</i> , and <i>inc<math>\beta</math></i>	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.



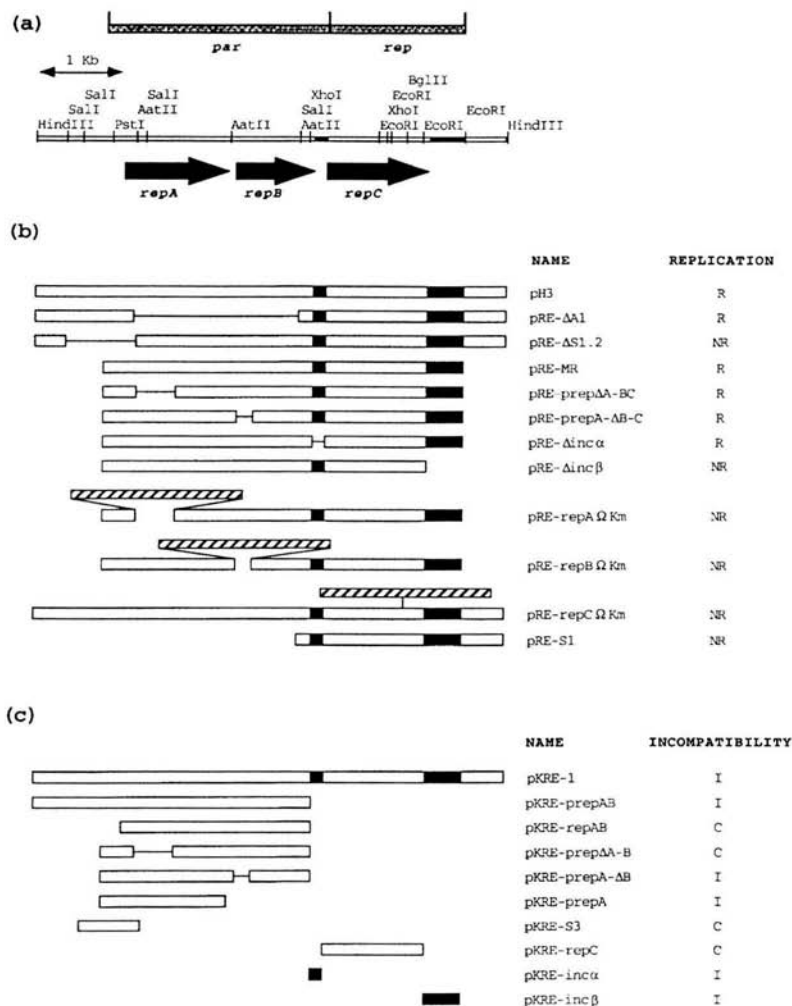


FIG. 1. Replication capabilities and incompatibility properties of pH3. (a) Restriction map of the pH3 insert. The shaded bar indicates regions involved in partition and replication. The orientations of the three open reading frames are indicated by arrows. The solid boxes indicate the locations of the *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-prep $\Delta A$ -

$\Delta B$ -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-prep $\Delta A$ - $\Delta B$ -C) were determined (Fig. 3). Plasmid pRE-prep $\Delta A$ -BC contained  $3.1 \pm 0.98$  plasmid copies per chromosome, slightly more than pH3 ( $1.9 \pm 0.09$  copies per chromosome), and

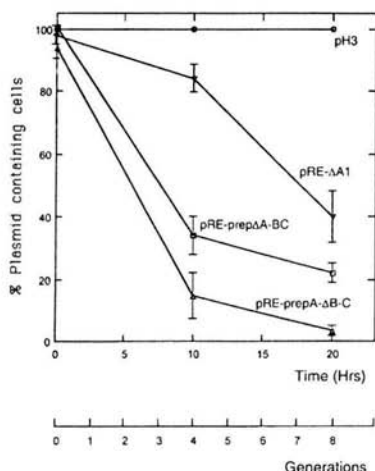


FIG. 2. Plasmid stability. Plasmid loss from populations of cells carrying different constructions with chloramphenicol resistance genes. ○, CFNX107 cells carrying plasmid pH3; □, CFNX107 cells carrying plasmid pRE-prepΔA-BC; ▽, CFNX107 cells carrying plasmid pRE-ΔA1; △, CFNX107 cells carrying plasmid pRE-prepA-ΔB-C. The graph shows the plasmid retention means ( $\bar{x}$ ) of three independent experiments  $\pm$  the standard deviations.

plasmid pRE-prepA-ΔB-C contained  $1 \pm 0.02$  copies per chromosome. Surprisingly, plasmid pRE-ΔA1 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 (*inca*) and the other (*incβ*) 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 *inca* and *incβ* 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-prepΔA-B), and (iii) the upstream *repA* region and the *repA* and *-B* genes but with *repB* containing an internal deletion (pKRE-prepA-ΔB) 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.

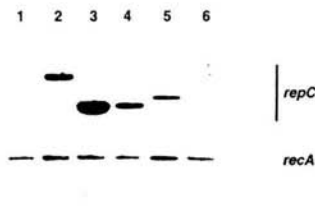


FIG. 3. Plasmid copy number. Autoradiogram of a Southern blot of total DNA digested with *Eco*RI and *Hind*III and probed simultaneously with a chromosomal detector (*recA*) and with a *repC* detector. The plasmid copy number of each strain was calculated as the ratio of the integrated hybridization signal of *repC* (plasmid) and the integrated hybridization signal of *recA* (chromosome). Lane 1, CFNX107; lane 2, CFNX107(pH3); lane 3, CFNX107(pRE-ΔA1); lane 4, CFNX107(pRE-prepΔA-BC); lane 5, CFNX107(pRE-prepA-ΔB-C); and lane 6, CFNX107.

The *cis*-acting incompatibility region and its relation with replication and/or partitioning. The *incA* and *incB* 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 *incB* region or the *incA* intergenic sequence (pRE- $\Delta$ *incB* and pRE- $\Delta$ *incA*, respectively) and crossed them with CFNX107. Transconjugants were exclusively obtained with derivatives lacking *incA* and only when a low concentration ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 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 *incB* 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 pRL81J (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  $\Omega$ Km 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  $\Omega$ Km 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- $\Delta$ A1 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- $\Delta$ A1 compared with that of the deletion derivatives of *repA* and *repB* is that the elevated copy number of pRE- $\Delta$ A1 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* (*incB*). 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 *incB* 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 *incB*.

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 *incB* 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 *incB* 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-

location 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 overexpression that the A and B products exert on the transcription of their respective operons (1, 8, 13, 23, 29). In the *R. etli* 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 (*inca*). We propose, as a working hypothesis, that (i) the RepA and *-B* products and their *cis*-acting site, *inca*, 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 IN214898.

#### REFERENCES

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Funnell, B. E. 1988. Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmid containing the centromere *parS*. *J. Bacteriol.* 170:954-960.
- García-de los Santos, A., S. Brom, and D. Romero. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:119-125.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-560.
- Hooykaas, P. J. J., A. A. N. van Brussel, H. den Dulk-Ras, G. M. S. von Slogteren, and R. A. Schilperoord. 1981. Sym-plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* (London) 291:351-353.
- Hooykaas, P. J. J., H. den Dulk-Ras, A. J. G. Regensburg-Tuinik, A. A. N. van Brussel, and R. A. Schilperoord. 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.
- 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.
- Jonathan, D. G., and N. Guttererson. 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.
- 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.
- Li, P., and S. K. Farrand. 2000. The replicator of the nopaline-type T1 plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing system. *J. Bacteriol.* 182:179-188.
- 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.
- Martin-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.
- Mercado-Blanco, M., and N. Toro. 1996. Plasmids in *Rhizobia*: the role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:535-545.
- Mercado-Blanco, J., and J. Olivares. 1994. The large nonsymbiotic plasmid pRmcGR4 of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid* 32:75-79.
- 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.
- 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.
- Nishiguchi, R., M. Takamami, and A. Oka. 1987. Characterization and sequence determination of the hairy root inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.* 206:1-8.
- 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.
- Novick, R. P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51:381-395.
- 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 *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.
  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.