



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL
REPLICADOR BÁSICO DEL PLÁSMIDO
CRÍPTICO RmeGR4a DE *Sinorhizobium meliloti*
GR4”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A :
JAVIER IZQUIERDO SÁNCHEZ

TUTOR: Miguel A. Cevallos Gaos



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.

“Es tentador para un biólogo, el comparar la evolución de las ideas a la de la biosfera.

Puesto que si el reino abstracto trasciende la biosfera más aún que este universo no viviente, las ideas han conservado ciertas propiedades de los organismos. Como éstos, ellas tienden a perpetuar y a multiplicar su estructura; como ellos, ellas pueden fusionarse, recombinarse, segregar su contenido; como ellos, en fin, ellas evolucionaran y en esta evolución, la selección sin duda alguna juega un papel. No intentaré proponer una teoría de la selección de las ideas. Pero podemos por lo menos...”

Monod J.

“En la naturaleza el papel de lo infinitamente pequeño es infinitamente grande”

Pasteur L.

DEDICATORIA:

A Gina por ser mi compañera y cómplice... ¡¡¡Gracias por compartir conmigo esta aventura a la que llamamos vida... !!!

A mis padres Estela Sánchez y Alejandro Izquierdo por todo el apoyo, amor y las palabras de aliento que siempre me han brindado, por darme un espacio a donde sé que siempre puedo llegar. ¡¡¡ Los amo!!!

A mis hermanos: Victor, Alejandra y Gabriel, por que además de ser mis hermanos son mis amigos y confidentes. ¡¡¡Gracias por que sé que siempre puedo contar con ustedes!!!

A Moni, Bere y por ser parte de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento es para MAC, por brindarme la oportunidad de formar parte de su excelente grupo de trabajo, así como su amistad, su apoyo y el conocimiento que me transmitió cada día sin reserva.

A los Dres. Patricia León y Guillermo Dávila por haber sido parte de mi comité tutorial y haber contribuido a mi formación con cada una de sus atinadas observaciones.

A mis revisores de tesis: Dra. Carmen Gómez, Dra. Gloria Soberón, Dra. Laura Camarena, Dr. Guillermo Dávila, Dr. Enrique Merino, Dr. David Romero y Dr. Miguel A. Cevallos, por los comentarios a este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Angeles, Ramón, Diana, Gaby, Dianita, (y a los que en algún momento formaron parte de este excelente grupo), Juan, Miguelón, Nora, Gina, Héctor, Vania, Grisel, Angie, Celia, y Tania, quienes desinteresadamente me brindaron su tiempo, su experiencia y sobre todo su amistad.

A la Dra Tatiana Venkova-Canova por la excelente revisión a este manuscrito y sus valiosas aportaciones. Así como esas tazas de café que amenizaron nuestras inolvidables charlas.

A los Dres. Juan Téllez, Miguel A. Ramírez Victor González e Ismael Hernández Lucas, Por todas esas horas de discusión sobre ciencia, deportes, política y tantas cosas más... Pero sobre todo por su amistad!!!!!!!!!!

A mis cuates del laboratorio de evolución genómica: Joe, Lupita, Ara, Paty, José Luis, Isamel, Rosy, Rosa Helena, Gama y Charly, con quienes siempre se puede entablar una plática interesante y de quienes siempre se puede obtener una visión diferente del mundo.

A José Espíritu y a Laura Cervantes, por su valioso apoyo técnico y su gran amistad.

A mis siempre amigos del CCG e IBT: Emmanuel, Eliza, Brenda, Mere, Sergio, Josué, Neto, Manuel, Jacobo, Vero, Karina, Mela, Gustavo, Julio Páez y Alfredo por compartir conmigo su tiempo, su espacio y su amistad.

A mis amigos de toda la vida: Javier Conde, Mario, Enrique, Omar, Paquito, Alfredo y a los José Luis Martínez. Por que siempre están conmigo en estos momentos importantes!!!

Al Dr. Sergio Encarnación por el gran apoyo académico y su valiosa amistad, así como a Dolores Cuellar por la ayuda con todos los trámites pues hasta los más tediosos los realizó siempre con buena disposición.

A mis suegros Fernando y Amparo... y a mis cuñados: Mary, Fer, Amparo y Toño., por permitirme ser parte de su familia.. ¡¡¡los quiero!!!!

A la Universidad Nacional Autónoma de México:
"Por mi raza hablará el espíritu y por mi Universidad sus Hombres"

RESUMEN

Los rhizobia se caracterizan por la presencia de plásmidos muy estables y de gran tamaño, sin embargo se conoce poco acerca de los mecanismos que regulan su inicio de replicación. En este trabajo, se describe la región mínima para la replicación estable del plásmido RmeGR4a de *Sinorhizobium meliloti* GR4. El fragmento mínimo posee solo dos genes: uno que codifica para la proteína de inicio de replicación (RepC) y otro, que codifica para un RNA antisentido de 67nt. Se identificaron los promotores y los inicios de la transcripción de ambos genes.

El RNA antisentido se localizó dentro de la región líder del RNA mensajero de *repC* y tuvo un efecto negativo sobre la expresión del *repC*. Además, se demostró que el RNA antisentido completo es un fuerte determinante *trans* incompatible. La única estructura secundaria presente en el RNA antisentido, es un terminador transcripcional independiente de Rho. La ausencia del RNA antisentido provocó un efecto negativo en la replicación del plásmido. En éste trabajo se plantea una hipótesis del mecanismo de acción del RNA antisentido.

Los replicadores mínimos de los plásmidos pSym de *Rhizobium tropici* y pRmeGR4b de *S.meliloti* tienen la misma organización que el pRmeGR4a. Basados en similitudes funcionales y estructurales entre los miembros de las familias de plásmidos *repC* y *repABC*, se propuso un modelo que explica sus relaciones evolutivas.

ABSTRACT

A characteristic of the rhizobia is the presence of stable and large plasmids. However, little is known about the mechanisms that regulate the replication initiation. Here we describe the minimal region required for stable replication of the *Sinorhizobium meliloti* plasmid RmeGR4a GR4. The minimal fragment contains only two genes: one encoding the initiator protein (RepC) and the other, encoding an antisense RNA of 67nt. The promoters and the transcriptional start sites of both genes were identified.

The antisense RNA was located within the *repC* mRNA leader region and it had a negative effect on *repC* expression. Furthermore, we demonstrated that the complete antisense RNA was a strong *trans*-incompatibility factor. The antisense RNA forms only a secondary structure that acts as an intrinsic rho-independent terminator. The absence of the antisense RNA provoked a negative effect in plasmid replication. In this work we propose a hypothesis about of the antisense RNA action mechanism.

The pSym *Rhizobium tropici* and the pRmeGR4b *S. meliloti* minimal replication plasmids have the same organization than the pRmeGR4a. Based on structural and functional similarities between members of the *repC* and *repABC* families we propose a model of their evolutionary relationship.

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS PLÁSMIDOS.....	1
1.1 Información genética codificada en plásmidos.....	1
1.2 Plásmidos y evolución.....	2
1.3 Plásmidos como herramientas moleculares.....	2
2.- ANATOMÍA DE LOS PLÁSMIDOS.....	3
3.- TIPOS DE REPLICACIÓN.....	4
3.1 Replicación tipo theta.....	4
3.2 Replicación círculo rodante.....	4
3.3 Replicación por desplazamiento de cadena.....	5
4.- CICLO BIOLÓGICO DE LOS PLÁSMIDOS.....	7
4.1 Replicación.....	7
4.1.1 Inicio de replicación y el replicador básico.....	7
4.1.1.1 Origen de replicación (ori).....	8
4.1.1.2 Proteínas de inicio de replicación.....	8
4.1.1.3 Inicio de replicación que utiliza un primero de RNA: el caso ColE1.....	9
4.2 Resolución de dímeros.....	10
4.3 Partición.....	11
4.3.1 Sistemas de muerte post-segregacional.....	11
4.3.2 Sistemas de partición activa.....	12
4.3.2.1 El sistema ParAB.....	12

4.3.2.2 <i>El sistema ParMR</i>	14
4.3.2.3 <i>El sistema ParFG</i>	15
5. CONTROL DE LA REPLICACION	15
5.1 Los RNA antisentido	16
5.1.1 Inhibición de la formación del primero (ColE1).....	17
5.1.2 Inhibición traduccional.....	18
5.1.3 Pseudonudo.....	21
5.1.4 Atenuación transcripcional.....	23
5.1.5 Otros.....	24
5.2 Iterones	27
5.3 Control por un represor transcripcional y un RNA antisentido	27
5.4 Control de la replicación por una proteína inhibidora	30
5.5 Regulación de la replicación y DNA hemimetilado	31
6.- INCOMPATIBILIDAD	31
6.1 Incompatibilidad por replicación.....	32
6.2 Incompatibilidad por partición.....	32
6.3 Incompatibilidad por regulación.....	33
ANTECEDENTES	36
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	41
OBJETIVOS	43

DISCUSIÓN.....44

PERSPECTIVAS.....48

INTRODUCCIÓN

1.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS PLÁSMIDOS

Las bacterias tienen organizado su con replicación autónoma. genoma en dos compartimentos: el Tradicionalmente se les ha asociado con cromosoma y los plásmidos. Los fenotipos que, bajo ciertas circunstancias, plásmidos son elementos le confieren ventajas selectivas a la extracromosomales de DNA bicatenario bacteria que los posee (Summers 1996).

1.1 Información genética codificada en plásmidos.

Después de la segunda guerra mundial, el las bacterias adquieren información uso indiscriminado de los antibióticos genética de otras mediante un contacto propició la proliferación de cepas célula-célula). bacterianas mutantes resistentes a estos

fármacos. En la década de los cincuentas y principios de los sesentas se descubrió Además de la resistencia a los antibióticos y la conjugación, los plásmidos codifican una enorme variedad de funciones que incrementan la capacidad de las bacterias para colonizar nuevos nichos, y/o para adaptarse a ambientes poco favorables. Algunos ejemplos son: la resistencia a metales pesados, las adhesinas (proteínas que le permiten a las bacterias adherirse a

superficies para una óptima colonización), la resistencia a radiaciones ionizantes, la degradación de

hidrocarburos, la fijación de nitrógeno, etc. (Summers 1996).

1.2 Plásmidos y evolución

Puesto que una de las cualidades que caracterizan a los plásmidos es su permanencia en las células, uno pensaría que su transmisión está confinada a sus células hijas (transferencia vertical). Sin embargo, por medio de la conjugación algunos plásmidos se pueden transferir de una célula a otra sin importar la especie,

fenómeno que se conoce como transferencia horizontal. La movilidad de los plásmidos contribuye de manera importante a la evolución de las especies bacterianas, debido a que pueden conferir una adaptación instantánea a ambientes con cambios constantes (Amabile-Cuevas y Chicurel 1992; Kado, 1998).

1.3 Plásmidos como herramientas moleculares

Algunos plásmidos son utilizados como herramientas moleculares para clonar material genético, debido a que poseen propiedades que los hacen útiles para éste fin. Estas propiedades incluyen: Su tamaño pequeño (que facilita su manipulación), su alto número de copias (lo que ocasiona una mayor cantidad de

DNA por célula), la presencia de marcadores seleccionables (tales como genes de resistencia a antibióticos) y sitios únicos de restricción (que permite insertar DNA foráneo); además, muchos plásmidos se han modificado para atender necesidades particulares tales como: la expresión de proteínas, la movilización a

otras cepas, la recombinación genética etc. Por otro lado, los plásmidos también se utilizan como sistemas modelo para el estudio de la replicación, la conjugación,

la partición, la recombinación y la incompatibilidad por su dispensabilidad en la célula que los posee (Sambrook *et al.*, 1989).

2.- ANATOMÍA DE LOS PLÁSMIDOS.

Los plásmidos tienen características propias, es decir, pueden variar en su forma, en su tamaño y en su número de copias. La mayoría de los plásmidos, hasta ahora descritos, son circulares, aunque también existen muchos plásmidos lineales reportados en géneros tan diversos como: *Borrelia*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Escherichia*, etc. (Summers, 1996). En cuanto a su tamaño podemos encontrar ejemplos: desde pequeños, de tan solo unas pocas kilobases, hasta muy grandes como los megaplásmidos de *Sinorhizobium meliloti* de 1.7 y 1.4 Mb (Honeycutt *et al.*, 1993,

Margolin y Long, 1993). Algunos incluso llegan a ser del tamaño del genoma completo de algunas bacterias, como por ejemplo *Haemophilus influenzae* de 1.8 Mb (Fleischmann *et al.*, 1995) o el de *Mycoplasma genitalium* de 0.58 Mb (Fraser *et al.*, 1995).

Otras de las características particulares de los plásmidos es sin duda su número de copias. En condiciones normales de crecimiento cada plásmido controla su número de copias, que puede ser: bajo, mediano o alto, esto se debe a un estricto control en sus sistemas de replicación (ver más adelante).

3.- TIPOS DE REPLICACIÓN.

A la fecha, se han descrito solo tres tipos diferentes de replicación plasmídica: la replicación tipo theta, la replicación tipo

círculo rodante, y la replicación por desplazamiento de cadena (del Solar *et al.*, 1998).

3.1 Replicación tipo theta

En replicones bacterianos, la replicación tipo theta es la que se encuentra más comúnmente. Ésta comienza con la apertura de la doble cadena en la región del origen de replicación (*ori*), semejando una estructura que recuerda a la letra griega theta (θ), de aquí el nombre de este modo de replicación (figura 1). En este proceso, un primer de RNA sirve como iniciador para que dé comienzo la replicación, la cual puede proceder en una o en ambas direcciones. En el primer

caso, una sola horquilla de replicación se mueve alrededor de la molécula plasmídica hasta que ésta retorna al punto de inicio. En ese momento las dos hebras de DNA (la molécula molde y la recién replicada) se separan. En el otro caso (replicación bidireccional) las dos horquillas de replicación se mueven a partir del origen de manera divergente hasta que se encuentran en un punto de la molécula diametralmente opuesto al origen de replicación (del Solar *et al.*, 1998; Summers 1996).

3.2 Replicación círculo rodante

A la fecha, se han identificado alrededor de 200 plásmidos que se replican por el

mecanismo conocido como círculo rodante. La mayoría de ellos pertenecen

al grupo de las Gram positivas, aunque también se han encontrado en Gram negativas y en Arqueas (Barran *et al.*, 2001; del Solar *et al.*, 1993; Khan, 2005).

Los plásmidos pT181 y pC194 de la bacteria Gram positiva *S. aureus*, son los ejemplos clásicos de este tipo de replicación. Utilizaremos el caso del pT181 para ejemplificar el proceso. La replicación de este plásmido requiere de la síntesis de la proteína de inicio de replicación llamada RepC, la cuál se une al origen de replicación y corta el DNA en cadena sencilla, RepC queda covalentemente unida a su extremo 5'. El extremo 3'OH terminal sirve para que la DNA polimerasa comience la replicación de la cadena líder a lo largo de toda la

molécula. La replicación de la cadena retardada, se inicia por desplazamiento de cadena. Esto sucede, cuando la RNA polimerasa reconoce una estructura de tipo tallo-asa en la cadena retrasada que se forma en el locus *pala* (conocido como *ori* de cadena retardada), y forma un primero de RNA. El extremo 3'OH del primero permite para que la DNA polimerasa comience la replicación. Si la síntesis de la cadena retardada comienza después que se completó la replicación de la cadena líder, los intermediarios de cadena sencilla pueden acumularse. La detección de moléculas de cadena sencilla puede servir como diagnóstico de la replicación círculo rodante (figura1) (del Solar *et al.*, 1993, Khan 2005).

3.3 Replicación por desplazamiento de cadena

El ejemplo clásico, es el plásmido RSF1010 del grupo de incompatibilidad

IncQ. El pRSF1010 requiere tres proteínas codificadas por el plásmido para

iniciar la replicación del DNA: RepA que es una proteína con actividad helicasa; RepB que es una proteína con actividad de primasa; y RepC que es la proteína iniciadora (del Solar *et al.* 1998).

La replicación en el plásmido RSF1010 ocurre a partir de dos orígenes de replicación adyacentes de cadena sencilla (*ssiA* y *ssiB*) posicionados en diferentes cadenas de DNA. La replicación comienza, cuando un dímero de RepC con ayuda de la helicasa RepA, interaccionan con el *ori*. Esto induce la desnaturalización de los sitios *ssi* dejándolos como DNA de cadena

sencilla; RepB aprovecha esta situación y sintetiza el primero necesario para iniciar la replicación. 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 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. (Sakai *et al.*, 1996; del Solar *et al.*, 1998).

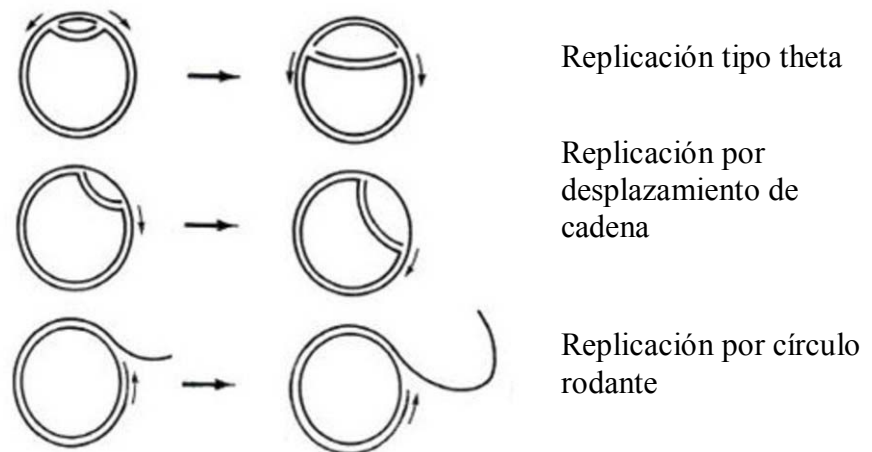


Figura 1.- Tipos de replicación. Tomada y modificada de Kornberg y Baker 1992.

4.- CICLO BIOLÓGICO DE LOS PLÁSMIDOS.

El éxito de los plásmidos para mantenerse establemente en las células que los poseen, se debe a que cumplen con tres

propiedades básicas: La replicación, la resolución de los dímeros y la segregación.

4.1 Replicación.

La replicación se define como el proceso mediante el cual, una molécula de DNA se duplica para formar una copia idéntica a la original. El proceso puede dividirse en tres etapas; la iniciación, la elongación y la terminación. Para que un plásmido pueda mantenerse estable en una línea

celular, es necesario que tenga un estricto control en sus rondas de replicación por ciclo celular (ver más adelante), este control, se regula en la etapa de inicio de replicación (Kornberg y Baker 1993). Nuestro estudio se centra solamente en la etapa de inicio,

4.1.1 Inicio de replicación y el replicador básico

El fragmento más pequeño de un plásmido que es capaz de replicarse con el mismo número de copias que el plásmido completo se le denomina replicador básico y debe contener todos los elementos necesarios para que dé inicio a la replicación, es decir, un origen de replicación (*ori*); al menos una proteína involucrada en el inicio de la replicación (cabe mencionar que el pColE1 de *Escherichia coli* no requiere de una

proteína de inicio de replicación, ver más adelante) y uno o más fragmentos de DNA que llevan la información genética involucrada en el control de la replicación. La mayoría de los plásmidos presentan únicamente un replicador básico; sin embargo, se han descrito plásmidos que tienen dos o más replicadores básicos a los cuales se les conoce como plásmidos compuestos (Mazaitis *et al* 1981; Bartosik *et al* 1997).

4.1.1.1 Origen de replicación (*ori*)

El *ori* puede se puede definir como: (i) La región en donde la doble cadena de DNA se desnaturaliza para que dé inicio el proceso de replicación; (ii) la primera base que incorpora la DNA polimerasa en la cadena líder; (iii) toda aquella región necesaria para que las proteínas de inicio se unan al DNA y recluten a la maquinaria de replicación para formar el replisoma (complejo de proteínas de

inicio de replicación y DNA). El *ori* considerado como la última definición presenta elementos comunes en algunos de estos sitios como son: regiones ricas en Adenina-Timina; secuencias directas repetidas llamadas iterones; uno o más sitios blanco para la proteína de inicio de replicación del hospedero (cajas DnaA), secuencias de metilación múltiple (Dam metilasas) y sitios de unión para las

proteínas IHF y Fis (proteínas encargadas de hacer el doblado del DNA) (Helinski

et al., 1996).

4.1.1.2 Proteínas de inicio de replicación

Las proteínas de inicio de replicación (proteínas Rep's) reconocen secuencias específicas en el origen de replicación para generar el complejo de inicio, e inducen un conjunto de interacciones macromoleculares que traen como consecuencia el inicio de la replicación (Rep-DNA, Rep-Rep, y Rep-con otras proteínas iniciadoras del huésped). Además, muchas proteínas Rep, pueden generar complejos que regulan negativamente su síntesis por lo tanto la frecuencia con que inician la replicación (del Solar *et al.*, 1998).

(HTH), presente en muchas de las proteínas que se unen a DNA (del Solar *et al.*, 1998).

Las proteínas de inicio se encargan de reclutar al replisoma. En el caso particular de la proteína de inicio de replicación π del plásmido R6K, se localizaron las regiones de la proteína, que contactan con proteínas del aparato de replicación del huésped, como la helicasa, DnaB, la primasa, DnaG y la proteína de inicio de replicación cromosomal de *E.coli*, DnaA (Tougu *et al.*, 1994., Ratnakar *et al.*, 1996).

En muchas proteínas de inicio se han localizado la(s) región(es) de la proteína involucrada(s) con el contacto con el DNA. En algunos casos, esta región es un motivo denominado hélice vuelta hélice

Algunas proteínas de inicio regulan su función de reprimir o de iniciar la replicación, dependiendo de su estado de

oligomerización, el cual fluctúa entre monómero-dímero (P1, F, R6K, pSC101). En este sentido, se ha localizado el dominio de la proteína responsable de la dimerización, a este motivo se le conoce como cierre de leucinas. En la proteína de inicio de replicación (RepA) del plásmido

pPS10 se sustituyeron las dos primeras leucinas por valinas en el motivo cierre de leucinas y como resultado se evitó la formación de dímeros, con ello, se disminuyó 13 veces la constante de asociación de RepA con su *oriV* (del Solar *et al.*, 1998).

4.1.1.3 Inicio de replicación que utiliza un primer de RNA: el caso ColE1.

El plásmido multicopia ColE1 de *E.coli*, no requiere de una proteína de inicio de replicación, pero necesita la síntesis de un preprimer de RNA llamado RNAII, el cual es el blanco para el control del número de copias (ver más adelante). Inicialmente la RNA polimerasa sintetiza un preprimer de 550nt de longitud (RNAII), durante este proceso el preprimer adopta una conformación específica, requerida para su actividad. La

conformación activa forma un híbrido de DNA-RNA muy estable dentro de la región de origen de replicación. Posteriormente la proteína RNasaH actúa sobre este híbrido y libera un extremo OH-3' en el RNA al cual se une la DNA polimerasa I para iniciar la síntesis de DNA (figura 3) (Tomizawa *et al.*, 1981; Novick *et al.*, 1987; Cesareni *et al.*, 1991).

4.2 Resolución de dímeros

La resolución de dímeros es el proceso mediante el cual se efectúa la conversión de dímeros plasmídicos recién replicados a monómeros. La importancia de este proceso se ha evaluado en plásmidos de alto número de copias (como ColE1). Las mutaciones que impiden la resolución de los dímeros, conllevan a un alto porcentaje de pérdida de plásmidos por generación. Se sabe que una correcta resolución de los dímeros favorece la estabilidad de los plásmidos de alto y de bajo número de copias (Summers *et al.*, 1993). Por ejemplo: el plásmido ColE1 contiene un sitio de 240 pb llamado *Cer*, en este sitio se lleva a cabo una

recombinación intramolecular, esta recombinación la efectúa una recombinasa heterodimérica (XerC y XerD). Esta recombinasa se une al sitio *cer* y hace 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 (Summers y Sherratt 1984). La remoción 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).

4.3 Partición

El proceso de partición depende en gran medida del número de copias en el que se encuentre el plásmido dentro de la célula, es decir, los plásmidos de mediano o alto

número de copias (50 a 100) no requieren de un mecanismo activo de partición ya que la segregación ocurre básicamente al azar (Summers *et al.*, 1996). Sin

embargo, los plásmidos de bajo número de copias necesitan un mecanismo activo que asegure su permanencia durante la segregación a las células hijas (Austin y Nordstrom 1990). Los sistemas encargados de asegurar la segregación de los plásmidos pueden agruparse en dos categorías: la primer categoría son los

sistemas *killer* o de muerte post-segregacional, encargados de eliminar de la población a las células libres de plásmidos, y la segunda categoría son los sistemas de partición activa, que distribuye específicamente una copia del plásmido a cada una de las células hijas.

4.3.1 Sistemas de muerte post-segregacional

Los sistemas de muerte post-segregacional, funcionan por un sistema conocido como Toxina-Antitoxina (TA). Este mecanismo se basa en la acción antagonista de una molécula letal (toxina) y una capaz de neutralizar la acción de la primera (antitoxina). La toxina es químicamente estable, mientras que la antitoxina no lo es. 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. Las enzimas del huésped degradan rápidamente a la antitoxina

mientras que la toxina permanece intacta. Puesto que la toxina no se inhibe nuevamente, interactúa con un blanco esencial en el huésped produciendo la muerte celular o la inhibición del crecimiento. El blanco con el cual la toxina interactúa varía dependiendo del sistema de cada plásmido. En el caso de los plásmidos F y RP4/RK2 la toxina tiene como blanco a la DNA girasa del huésped, en cambio la toxina (Hok) del plásmido R1 causa daño a la membrana celular (Hayes y Barrilla, 2003; Gerdes, 2000).

De acuerdo a la naturaleza química de la antitoxina, se han identificado dos tipos de sistemas TA: En el tipo I, 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 el sistema *hok/sok* del plásmido R1 ó el del pAD1 de *Enterococcus faecalis*. En ambos casos el RNA antisentido es menos estable que el RNA mensajero de

la toxina (Jensen y Gerdes 1999, Weaver *et al.*, 2004). 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).

4.3.2 Sistemas de partición activa

El sistema de partición activa se refiere al movimiento dirigido de los replicones recién replicados hacia las células hijas. Hasta ahora, se han descrito solo tres

sistemas de partición activa: los sistemas tipo ParAB los sistemas tipo ParMR y los sistemas tipo ParFG

4.3.2.1 El sistema ParAB

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 se asocia a membrana y que hidroliza ATP cuando se encuentra unida al DNA (Watanabe *et al.*, 1992; David *et al.*,

1996; Bignell *et al.*, 2001). 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). Además, en *E.coli*, se demostró que esta proteína forma estructuras helicoidales para posicionar al plásmido en el centro de la célula (Ebersbach y Gerdes, 2004). El gen B, codifica para una proteína que se une como dímero a una región en el DNA conocida como centrómero (el centrómero se define como: una región en el DNA que tiene secuencias repetidas que reconoce la proteína B). La interacción de la proteína B con el DNA, provoca 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 piensa pudiera

reconocer una maquinaria capaz de dirigir a los plásmidos hacia las células hijas (Bignell y Thomas 2001; Ebersbach y Gerdes 2004).

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 a la proteína A, interactuar con el complejo de partición a través de su unión con la proteína B. Posteriormente, A puede facilitar el movimiento de B a lo largo de las superficie interna de la membrana citoplasmática la cual permite posicionar específicamente a los complejos de partición (Bignell y Thomas, 2001). 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 con la proteína B (Hiraga 1992;

Bounet y Funell 1999; Bignell y Thomas 2001).

4.3.2.2 El sistema ParMR

El plásmido R1 de *E.coli* se ha estudiado ampliamente debido a la capacidad que le proporciona a las bacterias para resistir a los antibióticos. El sistema de partición consiste en dos genes *parR* y *parM* y una secuencia que sirve como centrómero (*parC*). La proteína ParR, se une cooperativamente a la región centromérica *parC*, éste complejo a su

vez lo reconoce la proteína ParM. Esta última proteína forma filamentos dependientes de ATP, y se cree que genera la fuerza motriz para arrastrar a los nucleoides a los polos celulares. Posteriormente, los filamentos de ParM se despolimerizan y el ciclo vuelve a comenzar (figura 2) (Møller-Jensen, *et al.*, 2003; Gerdes *et al.*, 2004).

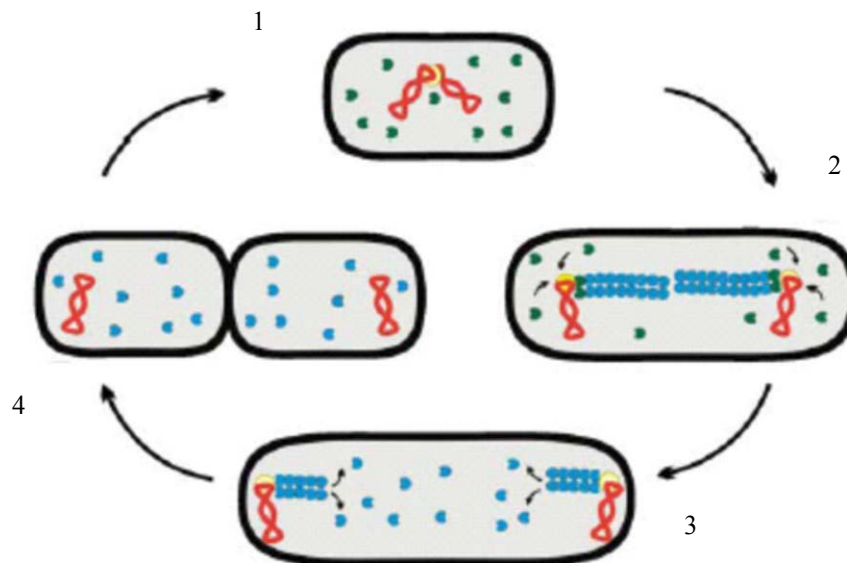


Figura 2. Modelo de partición del plásmido R1 por el sistema ParMR. Los plásmidos se representan en rojo, los puntos verdes son la proteína ParR, los puntos azules son la proteína ParM. 1. Plásmidos recién replicados, 2. Movimiento de los plásmidos hacia los polos por la polimerización de ParM, 3. Despolimerización de ParM, 4. División celular. Figura tomada de Gerdes *et al.* 2003.

4.3.2.3 El sistema ParFG

El plásmido de *E.coli* de bajo número de copias TP228, posee un sistema de partición diferente a los antes descritos. Este sistema está compuesto por dos genes organizados en operón (*parFG*) y un región tipo centrómero que se localiza río arriba de la corriente del operón *parFG* (Hayes 2000). La proteína ParF es miembro de la superfamilia de ATPasas ParA que parece estar más relacionada filogenéticamente con la proteína de división celular MinD que con las proteínas de partición de los plásmidos. Ésta proteína forma filamentos *in vitro* dependientes de ATP (Barrilla *et al.*, 2005). La proteína ParG,

no está relacionada a la familia de proteínas ParB descritas en la sección 4.3.2.1, sin embargo, tiene homología con la proteína CopG que es un represor transcripcional involucrado en el control del número de copias del plásmido pMV158 de *Streptococcus* (sección 5.3) (Hayes 2000 Barrilla y Hayes 2003). El homodímero ParG se une a la región tipo centrómero, posteriormente, a este complejo se le une ParF. El mecanismo de acción todavía no es claro, pero se especula que los filamentos formados por ParF en el complejo son los encargados de dirigir al complejo de partición hacia los polos celulares (Barrilla *et al* 2005).

5. CONTROL DE LA REPLICACION

Los plásmidos no son moléculas del todo independientes, debido a que deben sincronizar su replicación con el

crecimiento y la división de la célula huésped. Un plásmido que se replica menos de una vez por generación sufrirá

una disminución en su número de copias hasta que termine por perderse. Si un plásmido replica más de una vez por generación su número de copias se incrementará de tal manera que la carga metabólica que imponen al huésped provocará tal desequilibrio metabólico que disminuirá la viabilidad. Es por ello que en esta sección hablaremos de los mecanismos que regulan el inicio de la replicación.

La mayoría de los sistemas que se encargan de controlar el inicio de

5.1 Los RNA antisentido

Las interacciones entre RNA pequeños, juegan un papel clave en la regulación de funciones importantes en los plásmidos bacterianos, tales como: la replicación, la segregación y la conjugación.

replicación utilizan un inhibidor que regula la concentración de la proteína de inicio. Los sistemas de control del inicio de la replicación se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su inhibidor, el cual puede ser: un RNA antisentido pequeño, una secuencia corta de DNA repetido (iterones), un represor transcripcional y un RNA antisentido, una proteína inhibidora o, una proteína que secuestra el origen de replicación hemimetilado para prevenir una nueva ronda de replicación.

Los RNA antisentido son moléculas pequeñas no traducibles, con estructuras secundarias (de uno o cuatro estructuras tallo-asa) que se unen a sus RNA blancos (RNA con sentido) para controlar la expresión ciertos genes (Euguchi *et al.*, 1991).

La estructura secundaria de los RNA antisentido es esencial para su funcionamiento, ya que si este carece de una adecuada conformación, podría no interactuar con su RNA blanco y degradarse rápidamente. Un análisis comparativo entre diversos RNAs antisentido reveló una secuencia de reconocimiento denominada 5'YUNR (donde Y es una pirimidina, U es un uracilo, N es cualquier base y R es una purina) la cual se localiza en la misma posición relativa en los RNA antisentido y los RNA blancos. Esta secuencia forma

una estructura *U-turn* que media el apareamiento rápido entre RNA complementarios (Franch y Gerdes 2000). También, se ha observado que las estructuras que forman el “tallo”, suelen estar interrumpidas por “burbujas” (Regiones en la estructura secundaria del RNA que no forman puentes de hidrógeno) mismas que se sugiere previenen su degradación por RNAsas de doble cadena y facilitan la apertura de la estructura para su interacción con el RNA blanco (Brantl, 2002a).

5.1.1 Inhibición de la formación del primero (ColE1).

Como ya se mencionó en la sección 4.1.1.3, el plásmido multicopia ColE1 de *E.coli*, no requiere de una proteína de inicio de replicación, en lugar de ello, utiliza un preprimero de RNA (RNAII) que sirve como sustrato para que la proteína RNasaH, corte el híbrido RNA-DNA y deje el extremo 3'OH listo para

que la DNA polimerasa comience la síntesis de DNA. El control de la replicación lo media una molécula de RNA de 108nt llamada RNAI (compuesta por tres estructuras de tipo tallo-asa, y una pequeña cola de cadena sencilla en su extremo 5'), que se transcribe constitutivamente de la cadena

complementaria en la región del preprímero. La unión del RNAI al RNAII impide la conformación activa evitando la formación estable del híbrido DNA-RNA dentro de la región de origen. Por consiguiente no hay maduración del preprímero y como consecuencia no hay replicación (Tomizawa *et al.*, 1981; Novik *et al.*, 1987; Cesareni *et al.*, 1991).

Adicionalmente existe otro sistema de control que consiste en una proteína moduladora llamada Rom, la cual se codifica por un gen ubicado río abajo del origen de replicación. El dímero Rom incrementa la interacción entre RNAI y RNAII y favorece la inhibición de la replicación (Cesareni *et al.*, 1991, Brantl 2002b).

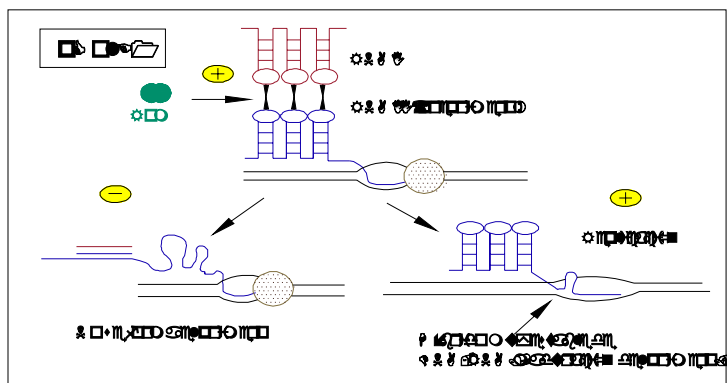


Figura 3.- Control de la replicación del pColE1. Estructuras en rojo RNA antisentido (RNAI), estructuras en Azul rey RNAII, círculos verdes proteínas Rom, círculo gris, horquilla de replicación Tomada y modificada de Brantl., 2002

5.1.2 Inhibición traduccional

Los plásmidos de la familia incFII (R1, NR1/R100, R6-5) y aquellos con una

organización genética similar (incFIIa, incIFc, incFII, incFVII) son plásmidos de

bajo número de copias de enterobacterias (Summers 1996). El sistema principal de control es una molécula de RNA de 90 ribonucleótidos. El ejemplo mejor estudiado es el del plásmido R1.

El replicador básico de este plásmido está constituido por: un origen de replicación (*oriRI*), dos promotores (P_{copB} y P_{repA}), un sitio blanco para el RNA antisentido (*copT*) y cuatro genes estructurales (*copB*, *tapA*, *repA* y *copA*). CopB, es el represor transcripcional de uno de los dos promotores encargados de transcribir a *repA* (P_{repA}), TapA es un péptido líder de 24aa, RepA es la proteína limitante para el inicio de la replicación y *copA* es un gen que codifica para un RNA antisentido de 90 nt que se transcribe en la cadena complementaria al gen *repA* (figura4a) (Olsson *et al.*, 2004).

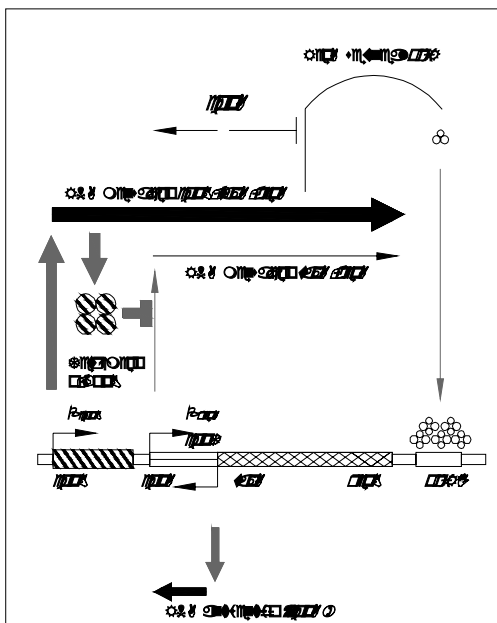
La regulación ocurre a dos niveles: el primer elemento de control es CopA y su

blanco CopT (figura 4 a y b). La unión de CopA a CopT bloquea estéricamente el inicio de traducción de *tapA* (el gen que codifica para el péptido líder). La traducción de *tapA* se requiere para la traducción de *repA* (traducción acoplada) debido a que si *tapA* no se traduce, entonces se forma una estructura secundaria en el líder *repA-mRNA* que oculta el sitio de unión a ribosoma (RBS) de *repA* (figura 4b). Por lo tanto el RNA antisentido CopA, inhibe la traducción de *repA* indirectamente, al impedir que *tapA* se traduzca. El segundo elemento de control, es el represor transcripcional CopB. El control se da como sigue: el gen *repA* se transcribe a partir de dos promotores, P_{copB} y P_{repA} . El primero, es constitutivo y el segundo lo regula negativamente CopB. Debido a la represión que ejerce CopB en el P_{repA} , el transcrito de *repA* se genera a partir del P_{copB} , como consecuencia, el RNA mensajero es policistrónico (RNA

mensajero *copB-tapA-repA*). Sin embargo, cuando el número de copias del pR1 disminuye, también se reduce la concentración intracelular de CopB. Esto ocasiona que se libere la represión transcripcional que ejerce CopB sobre el promotor P_{repA} , y que con ello se incremente la concentración intracelular de RepA, de éste modo, se ejerce una

interferencia parcial con la expresión transcripcional de *copA* (transcripción convergente). De esta manera resulta un incremento en la tasa de replicación y un rápido aumento en el número de copias de R1 hasta que la represión por CopB se reestablece y el número de copias se estabiliza (Figura 4a) (Brantl 2002b, Olsson *et al.*, 2004).

A



B

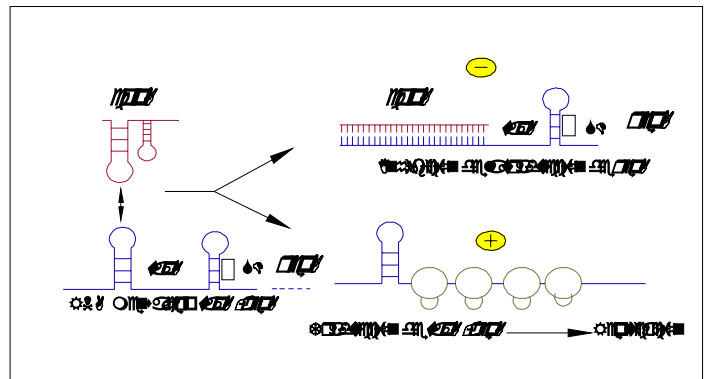


Figura 4.- Control de la replicación del plásmido R1. Para detalles ver el texto. A) Tomada y modificada de Olsson *et al.*, 2004, B) Tomada y modificada de Brantl, 2002b.

5.1.3 Pseudonudo

Los plásmidos de bajo número de copias del grupo *inc B* e *inc α* de las bacterias Gram negativas, son similares al pR1, sin embargo, poseen otro mecanismo de regulación. Los dos ejemplos mejores estudiados son Colb-P9 (*incI*) y pMU720 (*incB*). Aquí un RNA antisentido de 70 nt es el responsable de inhibir la formación de una estructura llamada pseudonudo (*pseudoknot*) en el RNA blanco que se requiere para una traducción eficiente de la proteína limitante para la replicación RepZ (Asano *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1993). Como en el plásmido R1, un péptido líder RepY debe de ser traducido para permitir la síntesis de RepZ. Dos estructuras tipo tallo-asa en el RNAm-*repYZ* que se localizan por arriba de la corriente del RBS *repY* (estructura I) y en medio del gen *repY* (estructura III) son necesarias para el control de la

replicación (Figura 5A y B). La estructura III oculta al RBS *repZ* y a una secuencia pequeña que complementa con el asa de la estructura I. La terminación correcta de la traducción de *repY* impide que la estructura III se forme. En consecuencia, el asa de la estructura I reconoce su secuencia complementaria localizada muy cerca del RBS-*repZ* formando de esta manera el pseudonudo. La formación del pseudonudo permite la unión del ribosoma al RBS *repZ* (Figura 5) (Brantl 2002b, Wagner *et al.*, 1994).

El RNA antisentido (RNAI) que se encuentra codificado río arriba de la corriente del *repY*, tiene una función dual: secuestra al RBS-*repY* bloqueando directamente la traducción de *repY*. Esto impide la activación de la traducción de *repZ*, debido a que el sitio de interacción del RNAI/ RNAm-*repZ* involucra los

nucleótidos comprometidos en la formación de la estructura I (estructura que se requiere para la formación del pseudonudo).

En el caso del los plásmidos *incI*, un hexanucleótido, en la secuencia de la estructura I (involucrada en la interacción inicial), tiene un motivo “U-turn”. Los primeros pasos referentes a la formación del pseudonudo y a la unión del RNA I son similares. Sin embargo, el RNA I

reprime la traducción de *repY* de una manera menos eficiente que la traducción de *repZ*. La represión de la expresión de *repZ* y *repY* está acoplada a diferentes pasos durante el apareamiento entre el RNA I y el RNAm-*repZ* (Asano y Mizobuchi, 2000). Esta represión diferencial, permite que el RNA I mantenga los niveles de expresión de *repZ* iguales, asegurando un número de copias constante (Brantl 2002b; Wagner *et al.*, 1994).

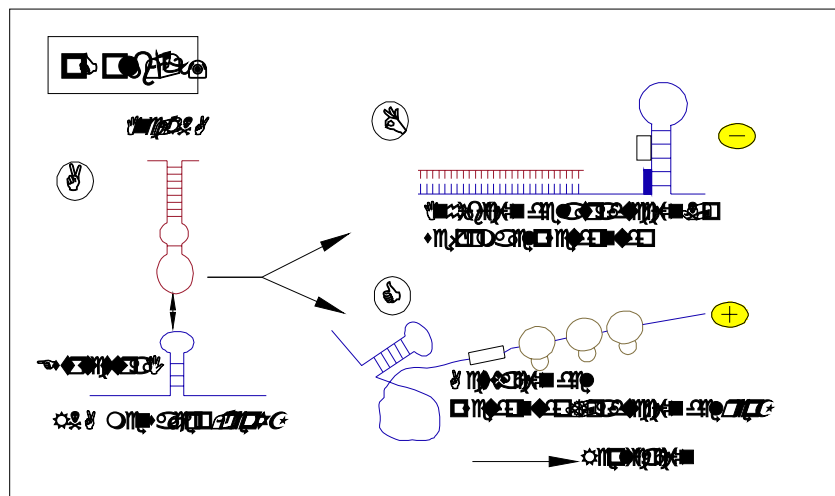


Figura 5.- Regulación de la traducción de la proteína RepZ del plásmido pColb-P9. A) Estructuras secundarias en el RNAmensajero-*repYZ* (azul) y en el RNA antisentido (rojo). B) Inhibición de la traducción por la formación de la estructura III que oculta el SD del *repZ*. C) En ausencia del RNA antisentido, se forma un pseudonudo en el RNA mensajero-*repYZ* que evita que se forme la estructura III. Nota: un pseudonudo es una estructura secundaria que se puede formar en algunos RNA mensajeros, a partir de una estructura secundaria tipo tallo asa que hibrida con un fragmento río arriba de la corriente, en la misma molécula del RNA mensajero. Tomada y modificada de Brantl 2002.

5.1.4 Atenuación transcripcional

La atenuación de la transcripción mediada por un RNA antisentido, se describió por primera vez en el plásmido de *Staphylococcus* pT181 (Novick *et al.*, 1989) y poco después en los plásmidos de *Streptococcus* pIP501 y pAM β 1. El mecanismo funciona de la siguiente manera: El RNA mensajero que codifica para la proteína Rep (RNAm-rep) puede adoptar dos conformaciones, dependiendo de la presencia o ausencia de un RNA antisentido. En presencia del RNA antisentido (85 nt RNAI o 145 nt RNAII en el pT181, 136nt RNAIII en el pIP501), se forma un terminador tipo tallo-asa en

el RNAm-rep, debido a ello la terminación de la transcripción ocurre prematuramente y la proteína RepR no puede sintetizarse. En ausencia del RNA antisentido, el RNAm-rep, se estructura de una manera tal, que no se forma el terminador transcripcional, la elongación transcripcional continúa hasta terminar de sintetizar el mensajero *rep*, el cuál se traduce adecuadamente formando la proteína RepR. En otras palabras, el RNA antisentido afecta la expresión genética por impedir la transcripción del mensajero que codifica para la proteína de inicio de replicación (figura 6) (Brantl 2002a; Brantl 2002b).

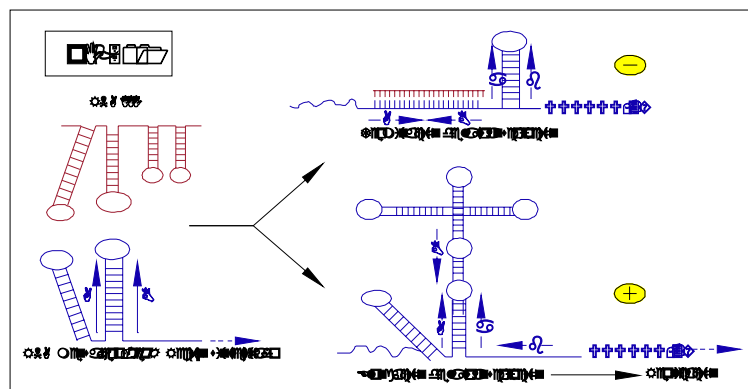


Figura 6.- Regulación de la traducción de la proteína RepR del plásmido IP501. RNA antisentido se representa en rojo, RNA mensajero-repR se representa en azul A y B secuencias inversas repetidas. Tomada y modificada de Brantl 2002b.

5.1.5 El caso de los RNAs antisentido de los plásmidos de rhizobia y bacterias

relacionadas.

Algunos plásmidos de las α -proteobacterias (*Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Parococcus*, *Rugeria*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, etc) se encuentran una familia de plásmidos denominada *repABC*, por los genes que componen su replicador básico (ver más adelante). En tres miembros de esta familia de replicadores (pRetCFN42d de *Rhizobium etli*, pSymA de *Sinorhizobium meliloti* y pTiR10 de *Agrobacterium tumefaciens*), se han encontrado RNAs antisentido que regulan negativamente la expresión de la proteína limitante de la replicación RepC (Venkova-Canova *et al.*, 2004, MacLellan *et al.*, 2005, Chai y Winans 2005).

Los elementos involucrados en la regulación son cuando menos tres: 1) El

RNA antisentido, 2) una estructura secundaria presente en la región líder del RNA mensajero de RepC que oculta su sitio de unión al ribosoma (elemento S) que es un atenuador transcripcional y 3) un pequeño péptido codificado entre el promotor del RNA antisentido y el inicio de traducción de *repC*. Todos estos elementos son indispensables para la replicación del plásmido (figura 7) (Venkova-Canova, *et al.*, 2004).

El RNA antisentido mide entre 55 y 59 nt de longitud, su promotor es constitutivo y se localiza en la región río arriba de *repC*, éste RNA es complementario con el RNA mensajero líder de *repC*. La presencia del RNA antisentido es capaz de desplazar al plásmido silvestre, es decir, actúa como un factor *trans* incompatible (ver más

adelante). También se demostró que una estructura de tipo tallo-asa presente en el RNA antisentido, funciona como terminador transcripcional *rho*-independiente. El mecanismo por el cual el RNA antisentido, el elemento S, y el pequeño péptido regulan la transcripción de *repC*, todavía no es claro, es más, es particularmente interesante, que la ausencia del RNA antisentido afecte de manera negativa la replicación, mientras que en los otros sistemas, la ausencia del RNA antisentido incrementa el número de copias. Cabe mencionar que la secuencia codificante del RNA antisentido, y su posición relativa en el replicador, están conservadas en otros plásmidos de la familia *repABC* (Venkova-Canova *et al.*, 2004; MacLellan, *et al.*, 2005).

Recientemente se caracterizó el RNA antisentido del plásmido Ti de

A.tumefaciens Los autores proponen que el RNA antisentido es un inhibidor transcripcional del *repC*. El modelo de acción propuesto con base en la predicción de estructuras secundarias, es el siguiente: Cuando el RNA antisentido está presente, se une a una región complementaria del RNA mensajero *repABC* que se localiza río arriba de la corriente del inicio de traducción del *repC*, esta acción provoca que se generen tres estructuras secundarias en el mRNA-*repABC* en la región que abarca al SD y el codón de inicio del *repC*. Una de las estructuras se propone como un terminador transcripcional Rho-independiente, en consecuencia, *repC* no se transcribe. En ausencia del RNA antisentido, estas estructuras no se forman y el mensajero de *repC* se puede transcribir (Chai y Winans, 2005).

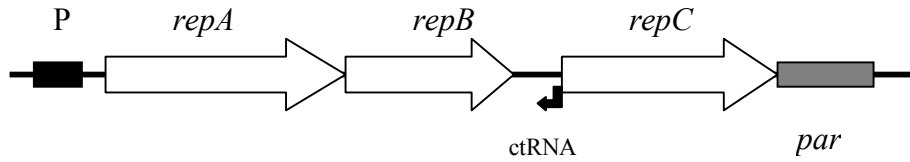


Figura 7.- Esquema que representa a el replicador básico del pRetCFN42d de *R. etli*.

5.1.6 Otros

El plásmido R1162 del grupo de incompatibilidad *incQ* es de amplio rango de hospedero, mide 8.75 Kb, tiene alto número de copias en *E. coli*. Su replicación necesita de la proteína RepIA cuya expresión se regula postranscripcionalmente por un RNA antisentido de aproximadamente 75 nt de longitud, que es complementario a el RBS del RNA mensajero que codifica para el *repIA* (RNAm_*repIA*). La ausencia del RNA antisentido, incrementa el número de copias en un 35%, de tal modo que el papel biológico de este RNA antisentido no queda claro (Kim y Meyer 1985).

Los RNA antisentido no regulan exclusivamente proteínas de replicación, también se han encontrado en muchos organismos. Por ejemplo, recientemente se hizo una búsqueda de pequeños RNA no codificantes en *E. coli*, y se identificaron más de 50, muchos de ellos pertenecen a una clase de RNA que utilizan a la chaperona de RNA Hqf. Todos éstos actúan apareándose con un RNA mensajero. Entre los miembros de esta clase están DsrA y RprA los cuales regulan positivamente la traducción de RpoS (el factor sigma de fase estacionaria), OxyS (regula la traducción de *rpoS* y *fhIA*), RyhB (tiene que ver con el equilibrio de Fe usado en la célula por regular negativamente la traducción de

muchos genes que codifican proteínas que contienen Fe) y Spot42 (cambia la

polaridad de la traducción del operón *gal*) (Gottesman 2004).

5.2 Iterones

En muchos casos los orígenes de replicación tienen secuencias directas repetidas llamadas iterones, los cuales son sitios de unión para las proteínas Rep. Los iterones generalmente están arreglados en “tandem” es decir, que están dispuestos uno a continuación del otro, y están situados a una distancia que es, en general, múltiplos de 11 pb. Esto implica que el complejo Rep-iteron se encuentra alineado en la misma cara del DNA (del Solar 1998).

El control de la replicación mediado por iterones, se lleva a cabo mediante un mecanismo llamado esposado

(*handcuffing*), que ocurre cuando hay una interacción entre las proteínas iniciadoras que están unidas a los iterones. 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, impidiendo así la formación del complejo necesario para dar inicio a la replicación. (Chattoraj *et al.*, 1997).

5.3 Control por un represor transcripcional y un RNA antisentido.

El control del inicio de replicación por la acción conjunta de un represor

transcripcional y un RNA antisentido se ha reportado para varios plásmidos como:

el R1, el MV158 y el IP501, sin embargo, el mecanismo de acción en cada caso es diferente.

Recordemos el ejemplo de la regulación del plásmido R1 descrito en la sección 5.1.2, En ese caso, el principal regulador es un RNA antisentido llamado CopA, mientras que CopB, es un represor transcripcional del promotor P_{repA} . Este represor transcripcional juega un papel auxiliar en el control de la replicación del pR1, de hecho, una remoción del gen $copB$, provoca solo un incremento moderado en el número de copias, y $copB$ expresado a partir de un plásmido compatible, no ejerce incompatibilidad hacia el plásmido R1, sin embargo, la tasa de pérdida por generación se incrementa siete veces (Olsson, *et al.*, 2003).

El plásmido MV158 de *Streptococcus*, también se regula por un sistema dual, es decir, por una proteína represora y un RNA antisentido, su sistema de

regulación se compone de los siguientes elementos: tres genes ($copG$, $repB$ y $rnalII$), dos promotores (P_{cr} y P_{cII}) y un origen de replicación de doble cadena (dso). CopG es un represor transcripcional, RepB es la proteína de inicio de replicación de doble cadena, y el RNAlI es un RNA antisentido. Por otro lado, $copG$ y $repE$ son co-transcritos a partir del promotor P_{cr} , mientras que el $rnalII$ se transcribe a partir del P_{cII} (Figura 8) (del Solar *et al.*, 1998; del Solar y Espinosa 2000).

La regulación se efectúa de la siguiente manera: El represor transcripcional CopG, se une a una región en el DNA que incluye al promotor P_{cr} , de esta manera, inhibe la transcripción del operón $copG$ - $repB$, en consecuencia, la proteína de inicio de replicación no se transcribe (del Solar *et al.*, 1989). Las mutaciones o remociones en $copG$, ocasionan un incremento en el número de copias,

además, CopG ejerce una débil incompatibilidad hacia el pMV158 cuando se provee en *trans*, en un vector de alto número de copias (Acebo *et al.*, 1996; del Solar y Espinosa 1992).

Un segundo elemento involucrado en el control del número de copias es el RNAII, el cual se transcribe a partir del P_{cl} . El RNAII, es complementario a la región del RNA mensajero *copG-repB* que se localiza entre los genes *copG* y *repB* (figura 8), probablemente inhibe la expresión de la proteína de inicio por aparearse directamente con el inicio de la

traducción del RNAm-*repB*, además, el RNAII es un fuerte determinante de incompatibilidad (para más detalles sobre el fenómeno de incompatibilidad ver sección 6) cuando se provee en *trans* en un vector compatible de alto número de copias. Las mutaciones que eliminan la síntesis del RNAII también incrementan el número de copias pero aún CopG controla la replicación (del Solar *et al.*, 1995). Una organización similar se encuentra en los plásmidos de la familia pMV158 (del Solar *et al.*, 1998; del Solar y Espinosa 2000).

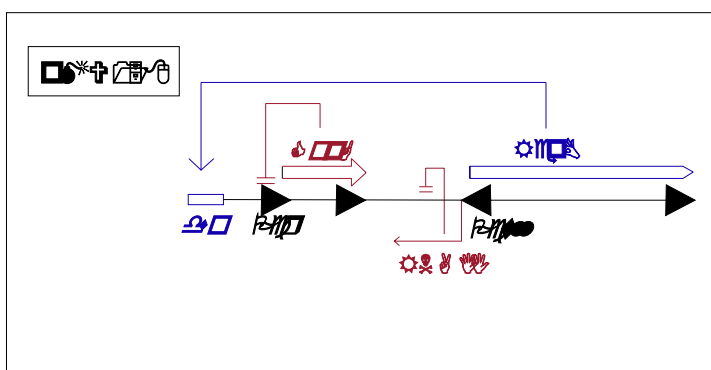


Figura 8.- Modelo de replicación del plásmido pMV158 para detalles ver el texto. Tomada y modificada de del Solar y Espinosa 2000.

La regulación del pIP501 de *Streptococcus*, muestra características muy parecidas a las presentes en los plásmidos R1 y MV158, y similar a los del pR1: la proteína CopR del pIP501 no autorregula su transcripción, pero reprime la transcripción del promotor *rep*, que se localiza abajo de la corriente del gen *copR*. Sin embargo, a diferencia del

sistema del pR1, CopR solo reprime parcialmente el promotor *rep*, situación que recuerda al sistema del pMV158 (del Solar *et al.*, 1998). El segundo elemento de regulación es un RNA antisentido que inhibe la expresión de RepR por atenuación transcripcional que ya se describió en la sección 5.1.4.

5.4 Control de la replicación por una proteína inhibidora

La regulación por medio de una proteína inhibidora es poco común, un ejemplo es la regulación del replicón de λ -dv. Este replicón requiere la síntesis de las proteínas O y P para iniciar la replicación. Estas dos proteínas se transcriben en un mismo RNA mensajero, que contiene, además, la región codificante para otra proteína llamada Cro. Ésta última se une a la región operadora O_R del promotor P_R y actúa como un inhibidor de la

transcripción (Murotsu y Matsubara 1980).

También se reportó un plásmido críptico de *E. coli*, llamado pKL1 que parece estar regulado 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 induce 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 RepA y la formación de oligómeros o los dímeros determinan el número de copias del plásmido. (Burian *et al.*, 1999)

5.5 Regulación de la replicación y DNA hemimetilado.

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). El *ori* recién replicado se halla hemimetilado y la proteína SeqA, lo secuestra dentro de la membrana celular, para prevenir el

inicio de una nueva ronda de replicación (Chattoraj y Schneider 1997), 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).

6.- INCOMPATIBILIDAD

La incompatibilidad se define como la incapacidad de dos plásmidos para coexistir establemente en la misma línea celular. Esto como consecuencia de

compartir uno o más elementos relacionados con la replicación y/o con la partición y/o con la regulación de alguno de estos procesos. La principal virtud de

las pruebas de incompatibilidad es la localización del o los elementos claves en la regulación de la replicación y/o de la partición, es decir, plásmidos incompatibles están genéticamente relacionados (Summers 1996).

Generalmente, si dos plásmidos son del mismo grupo de incompatibilidad la introducción de uno de ellos a la célula huésped provoca la desestabilización del

6.1 Incompatibilidad por replicación

Los orígenes de replicación que poseen iterones expresan incompatibilidad (Abeles *et al.*, 1984, Shafferman *et al.*, 1981, Tsutsui *et al.*, 1983), ejemplo de ello son los orígenes de replicación de los plásmidos pT181 y pLS32 de *Streptococcus* y *Bacillus* respectivamente

plásmido residente, si es que se ejerce una presión selectiva para el plásmido entrante (Summers 1996).

Existen cuando menos tres mecanismos bien caracterizados de cómo se ejerce la incompatibilidad: La incompatibilidad por replicación, la incompatibilidad por partición y la incompatibilidad por regulación.

(Novik *et al.*, 1984, Tanaka *et al.*, 2005), Sin embargo, los orígenes de replicación de los plásmidos regulados por RNA antisentido no ejercen incompatibilidad, por ejemplo: los plásmidos ColE1 e IncFII (Hashimoto-Gotoh; Inselburg 1979; Timmis *et al.*, 1978).

6.2 Incompatibilidad por partición

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 el F y P1 se ha observado que la sobreproducción de las proteínas de partición también provocan incompatibilidad (Tolmasky *et al.*, 1992). 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 manera que modifica la estructura del complejo y con ello, impide una correcta partición. 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 forma una estructura compleja en el sitio centromérico, lo que también ocasiona silenciamiento de los genes de replicación aledaños al modulo de partición (Lynch y Wang 1995).

6.3 Incompatibilidad por regulación

La incompatibilidad se debe principalmente a la interferencia entre los sistemas de replicación. Muchos plásmidos producen represores de acción *trans* que interfieren con el inicio de la replicación, cuya concentración es

proporcional al número de copias del plásmido. La interacción del represor con su blanco, inhibe el inicio la replicación y se establece un control por concentración del inhibidor llamado retroalimentación o “feedback loop” el

cual regula el número de copias. Cuando el número de copias y la concentración del represor son altas, la replicación plasmídica se inhibe, pero cuando el número de copias y la concentración del represor es baja, la replicación procede.

En el caso de que una célula tenga dos plásmidos compatibles, cada plásmido produce su propio inhibidor de la replicación, el cual no afecta la replicación del otro plásmido. Esto provoca que ambos plásmidos mantengan su número de copias y que ambos sean independientes uno del otro. En contraste, dos plásmidos incompatibles producen cada uno su inhibidor, el cual no solo regula su propia replicación, sino también la replicación del otro plásmido. Una consecuencia de la inhibición cruzada, es que el número total de copias de ambos plásmidos incompatibles en la célula, es menor que la suma individual de número de copias de cada uno de ellos, debido a

que cada plásmido responde a la concentración total del inhibidor, ajustando la replicación y el número de copias, en consecuencia cuando la segregación ocurre el sistema de control del número de copias falla en distinguir entre dos plásmidos los cuales constituyen una sola poza. Ambos plásmidos se distribuyen azarosamente a las células hijas. Los plásmidos heredados se utilizan como moldes para la replicación, en este caso, el mecanismo de replicación, no distingue diferencias entre los dos plásmidos. Además, la distribución azarosa puede generar más moléculas de uno o de otro plásmido en cada célula huésped. Esta desproporción puede amplificarse en subsecuentes rondas de replicación, puesto que los plásmidos con mayor copias en la célula tienen mayor probabilidad de ser seleccionados como templados, en la siguiente ronda de replicación, eventualmente conducirá a la aparición de

líneas celulares con un solo tipo de plásmidos (Summers 1996).

Como ya se mencionó en la sección 5.3, los RNA antisentido que regulan la traducción de las proteínas de inicio de replicación son fuertes determinantes de incompatibilidad. En el caso ColE1, el RNA antisentido (RNAI) es el determinante de incompatibilidad. (Tomizawa e Itoh 1981). En el caso del pT181 y pMV158, el determinante de incompatibilidad es el RNAII (Projan y Novick 1986, del Solar *et al.*, 1995), y para el pR1 *copA* induce incompatibilidad (Olsson *et al.*, 2004).

Wagner y Simons (1994) proponen que la mayoría de las mutaciones que alteran el número de copias y las propiedades de incompatibilidad se localizan en el asa del

la estructura secundaria del RNA antisentido, o del RNA blanco.

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.

Por otra parte, no todos los represores transcripcionales de los promotores encargados de transcribir las proteínas de inicio de replicación, son determinantes de incompatibilidad, por ejemplo: el represor CopB del plasmido R1 no ejerce incompatibilidad hacia el pR1, mientras que el represor transcripcional CopG del plásmido MV158 si ejerce incompatibilidad con el plásmido parental (sección 5.3).

ANTECEDENTES

Las bacterias que pertenecen a los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Azorhizobium* (comúnmente conocidas como rhizobia), crecen en vida libre y tienen la capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno cuando se asocian a las raíces de plantas de las leguminosas. Estos géneros de bacterias se caracterizan por la presencia de plásmidos que varían en tamaño y en número de copias (Zahran *et al.*, 2001). De hecho, la mayoría de los genes cuyos productos están relacionados con el establecimiento de la bacteria en la planta, la fijación de nitrógeno y la competencia, residen en plásmidos (García de los Santos *et al.*, 1996). Hasta ahora se han encontrado solo tres familias diferentes de replicadores básicos plasmídicos en éstas bacterias, los de la familia pRm1132f, los de la familia *repABC* y los de la familia *repC*. La

primer familia incluye solo un miembro el pRm1132f de 7.2 Kb, este replicón se aisló de la cepa 1132 de *S.meliloti* y pertenece al grupo III de los plásmidos que replican por el mecanismo círculo rodante. El replicador básico se compone de los siguientes elementos: dos probables orígenes de replicación (*dso* y *sso*) y un gen *rep*, cuyo producto proteico tiene de 30 a 34% de identidad con proteínas de inicio de replicación de plásmidos que replican por un mecanismo de círculo rodante (Barran *et al.*, 2001).

La segunda familia llamada *repABC*, es quizá la más ampliamente distribuida y se encuentra representada en plásmidos de *Shinorhizobium*, *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Agrobacterium* (Kaneko *et al.*, 2000; Li y Farrand 2000; Nishigushi *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1998; Tabata *et al.*, 1989), en uno de los

dos cromosomas del patógeno *Brucella suis* y *B. melitensis* (Paulsen *et al.*, 2002; DeIVecchio *et al.*, 2002), en *Rhodobacter sphaeroides*, *Oligotropha carboxidovorans*, *Gluconobacter oxydans* (Prust *et al.*, 2005), *Nitrobacter hamburgensis*, en bacterias del suelo como *Paracoccus versutus* y *P. pantotrophus* y en la bacteria marina *Ruegeria* cepa PR1b. (Fuhrmann, *et al.*, 2003; Bartosik *et al.*, 1998; Bartosik *et al.*, 2002; Zhong, *et al.*, 2003).

Como se mencionó en la sección 5.1.5, la familia de replicadores *repABC*, se compone de tres genes dispuestos en operón llamados *repA*, *repB* y *repC*, un sitio *par* ubicado río abajo de *repC* y de un gen que codifica para un RNA antisentido ubicado entre *repA* y *repB* (Ramírez-Romero *et al.*, 2000; Bartosik *et al.*, 2001; Pappas and Winans 2003a; Soberón *et al.*, 2004; Venkova-Canova, *et*

al., 2004; MacLellan, *et al.*, 2005, Chai y Winans, 2005).

Las proteínas RepA y RepB están involucradas en la estabilidad del plásmido, debido a que una remoción que pierde gran parte de los genes *repA* y de *repB* aún es capaz de replicar, pero se pierde rápidamente. Estos datos correlacionan con el hecho de que RepAB son homólogos a las proteínas de la familia SopA/ParA y SopB/ParB requeridas para la partición de los plásmidos F y P1 (Tabata *et al.*, 1989). Además, experimentalmente se demostró que la proteína RepB se une a su sitio *par* localizado río abajo del gen *repC* en los plasmidos pCFN42d de *R. etli* y en uno de los dos replicadores básicos del pTAV1 de *P. versutus* (Bartosik *et al.*, 2001; Soberón *et al.*, 2004). Por otra parte, RepA, o RepA con ayuda de RepB son reguladores transcripcionales negativos del operón (Ramírez-Romero *et al.*, 2000;

Ramírez-Romero *et al.*, 2001; Pappas and Winans 2003b). Asimismo, se ha descrito que RepC es la proteína que limita la replicación debido a que mutaciones como: inserciones, remociones, o cambios de marco de lectura del gen *repC*, impiden que el plásmido replique (Ramírez-Romero *et al.*, 2000). Un gen localizado entre *repB* y *repC* cuyo producto es un ctRNA, actúa postranscripcionalmente como regulador negativo de la expresión de *repC* y también se requiere para la replicación (sección 5.1.5) (Venkova-Canova *et al.*, 2004; Chai y Winans, 2005).

Algunos plásmidos de la familia *repABC*, regulan su número de copias en respuesta a densidad celular. La primera evidencia de ello, la sugirió Li y Farrand, al encontrar cajas *tra* (las cajas *tra* se han descrito con detalle para promotores que responde a respuesta en quorum) en la región río arriba del inicio de traducción

de RepA en el plásmido pTiC58 de *A. tumefaciens* (Li y Farrand, 2000).

Pappas y Winans reportaron que en el plásmido TiR10 de *A. tumefaciens*, existen dos cajas *tra* río arriba de *repA* y cuatro promotores encargados de transcribir el operón *repABC*, tres de ellos, se inducen por la expresión de TraR y su inductor asociado, la acil-homoserin lactona (AAI) y el restante lo regula RepA. El número de copias del plásmido aumenta de cinco a siete veces en cepas que expresan *traR*, pero solo si esta presente su inductor AAI. La arquitectura del plásmido TiR10 también se ha encontrado en otros plásmidos Ti: pTi-SAKURA y pTiC58. El plásmido pRL8JI de *R. leguminosarum* tiene una estructura similar, pero solo posee una caja *tra* (Li y Farrand 2000; Pappas y Winans 2003a y 2003b).

Con respecto a la incompatibilidad en los plásmidos de la familia *repABC*, podemos mencionar que existen dos determinantes *trans* incompatibles, RepA y el ctRNA (counter-transcribed RNA), y solo un determinante *cis*, el sitio *par* (Ramírez-Romero, *et al.*, 2000; Venkova-Canova, *et al.*, 2004; MacLellan, *et al.*, 2005).

La tercera familia la conforman los plásmidos llamados *repC*, los cuáles están evolutivamente relacionados con los *repABC*, ya que tienen a RepC como proteína de inicio de la replicación, pero a diferencia de éstos carecen de las proteínas RepA y RepB (Mercado-Blanco y Olivares, 1994a).

El primer miembro de esta familia se aisló del plásmido críptico pRmeGR4a de *S. meliloti* cepa GR4 y después se demostró que la familia está ampliamente distribuida en *S. fredii*, en un conjunto de cepas de *S. meliloti* aisladas de suelos de

Granada (España) y al menos en el pSym de *R. tropici* (Burgos *et al.*, 1996).

S. meliloti GR4 además de sus dos megaplásmidos (pSymA y B), tiene dos plásmidos crípticos altamente estables (Toro y Olivares 1986), el pRmeGR4a de 175 kb sujeto de nuestro estudio, y el pRmeGR4b de 205 kb. El pRmeGR4a es autotransferible y responsable de cootransferir al pRmeGR4b (Mercado-Blanco *et al.*, 1993; Herrera-Cervera *et al.*, 1996).

En 1993 Mercado-Blanco y Olivares aislaron un fragmento *Pst*I de 4.8Kb (*oriV*) del pRmeGR4a capaz de replicar en *S. meliloti*, en *R. etli*, en *A. tumefaciens* y en *R. leguminosarum*, con el mismo número de copias que el plásmido silvestre (2-3 por cromosoma). El análisis de secuencia de esta región revela seis ORF's. Sólo el ORF3 es indispensable para la replicación debido a que una

mutación en un sitio *MluI* que cambia el marco de lectura provoca que el plásmido no replique (figura 8). Este ORF tiene 29.47% y 26.20% de identidad total a la proteína RepC del plásmido RiA4b de *A. rhizogenes* y a la RepC del plásmido de *A. tumefaciens* pTiB6S3 respectivamente

(Nishigushi *et al.*, 1987), por ésta razón al ORF3 se le llamó *repC*. También se encontró un probable motivo HTH acorde a Chou y Fasman (1978) entre la posición 85 a 105 aa. (Mercado Blanco y Olivares 1993).

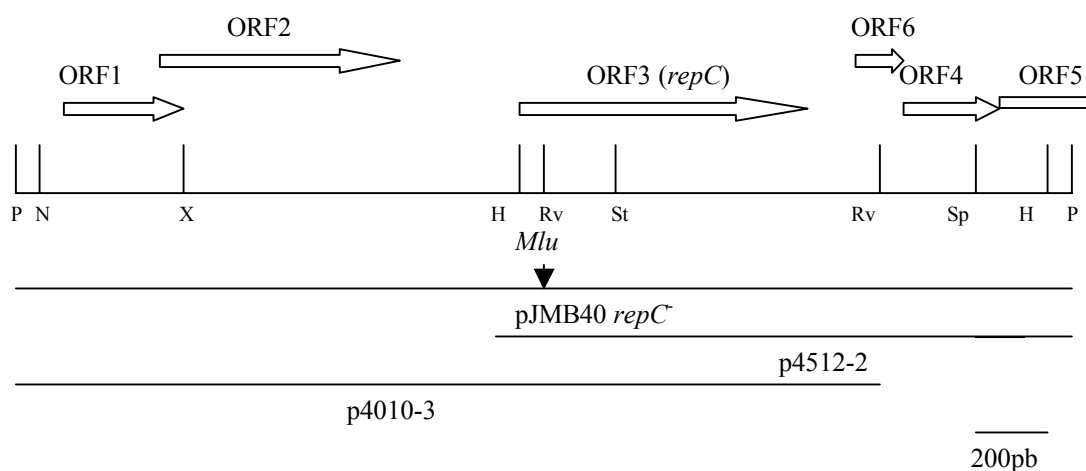


Figura 9.- Mapa físico de la región *oriV* del plásmido RmeGR4a de *S.meliloti*. Los seis ORF se encuentran representados por flechas huecas. Las construcciones p4512-2 y p4010-3 se obtuvieron por remociones de la clona parental pJMB40. P.- *PstI*, N.- *NotI*, X.- *XhoI*, H.- *HindIII*, Rv.- *EcoRV*, St.- *SstI*, Sp.- *SspI*. Tomada y modificada de Mercado-Blanco y Olivares 1994.

Por otro lado, a la región río arriba de *repC*, en especial al ORF2, se le asignó un probable papel en la estabilización del plásmido, debido a que cuando se eliminaron 1980 pb, río arriba de *repC*

del fragmento *PstI* (p4512-2 figura 9), el plásmido replica, pero el porcentaje de estabilidad disminuye 10 veces (Mercado-Blanco y Olivares, 1994b).

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

La presencia de plásmidos de gran tamaño, es una de las principales características de los rhizobia. Los principales genotipos asociados a los plásmidos de este grupo de bacterias son: la fijación de nitrógeno, la producción de melalina, la competencia, la eficiencia y formación del nódulo, las diferentes velocidades de crecimiento en condiciones de vida libre, etc.

El interés por estudiar los replicadores básicos de los plásmidos de los rhizobia, comenzó desde 1986 (Neilan *et al.*, 1986) con la finalidad de utilizarlos como vectores de clonación aprovechando su gran estabilidad. Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado más de una veintena de replicadores básicos de este grupo de bacterias. Sin embargo, todavía falta mucho por conocer acerca de los

mecanismos que gobiernan la regulación en el inicio de replicación.

Shinorhizobium meliloti es una bacteria Gram negativa que pertenece al grupo de las α -proteobacterias y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico en asociación con raíces de las plantas de alfalfa (*Medicago* y *Melilotus* spp.). La cepa de *S. meliloti* GR4, posee además de sus plásmidos simbióticos, dos plásmidos crípticos, el pRmeGR4a y el pRmeGR4b, ambos pertenecen a la familia de replicadores *repC*. Como ya se mencionó, la mayoría de los replicadores básicos de los rhizobia pertenece a la familia de replicadores tipo *repABC*, recordemos que esta familia de replicadores tienen el módulo de replicación y partición en el mismo operón, además tienen varios mecanismos para regular la expresión su proteína de inicio (*repC*) (Pappas y Winans, 2003a y

2003b; Ramírez-Romero *et al.*, 2000; Venkova-Canova *et al.*, 2004; MacLellan *et al.*, 2005; Chai y Winans, 2005). En contraste, el replicador mínimo del plásmido RmeGR4a, aparentemente solo necesita a RepC para poder replicar lo que lo convierte en un modelo de estudio atractivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el replicador básico del plásmido RmeGR4a de *S.meliloti* GR4

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Delimitar la región mínima encargada de la replicación
2. Definir la(s) región(es) mínima(s) de incompatibilidad.
3. Identificar y analizar los elementos involucrados en la regulación de la proteína de inicio RepC
4. Analizar y discutir el origen evolutivo de los plásmidos de la familia *repC* y *repABC*.

RESULTADOS



An antisense RNA plays a central role in the replication control of a *repC* plasmid

Javier Izquierdo ^a, Tatiana Venkova-Canova ^{a,1}, Miguel A. Ramírez-Romero ^a,
 Juan Téllez-Sosa ^{a,2}, Ismael Hernández-Lucas ^{b,2}, Juan Sanjuan ^c,
 Miguel A. Cevallos ^{a,*}

^a Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^c Departamento Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

Received 17 April 2005, revised 17 May 2005

Abstract

The widespread replicons of *repABC* and *repC* families from α -proteobacteria share high similarity in their replication initiator proteins (RepC). Here we describe the minimal region required for stable replication of a member of the *repC* family, the low copy-number plasmid pRmeGR4a from *Sinorhizobium meliloti* GR4. This region contains only two genes: one encoding the initiator protein RepC (46.8 kDa) and other, an antisense RNA (67 nt). Mapping of transcriptional start sites and promoter regions of both genes showed that the antisense RNA is nested within the *repC* mRNA leader. The constitutively expressed countertranscribed RNA (ctRNA) forms a single stem-loop structure that acts as an intrinsic *rho*-independent terminator. The ctRNA is a strong *trans*-incompatibility factor and negative regulator of *repC* expression. Based on structural and functional similarities between members of the *repC* and *repABC* families we propose a model of their evolutionary relationship.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Plasmid incompatibility; Plasmid replication; Antisense RNA; *repC*; *Sinorhizobium meliloti*

* Corresponding author. Fax: +77 73 17 55 81.

E-mail address: mac@ccg.unam.mx (M.A. Cevallos).

¹ Present address: Laboratory of Biochemistry, National Institutes of Health, National Cancer Institute, Bldg. 37/6044, 37 Convent Drive, Bethesda, MD 20892, USA.

² Present address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

1. Introduction

Three families of extrachromosomal basic replicons have been isolated from a group of native strains of the α -proteobacteria, collectively known as rhizobia, which are able to induce nitrogen-fixing nodules on roots of legume plants.

The first family includes only one member, plasmid pRm1132f (7.2 kb). This plasmid was isolated from *Sinorhizobium meliloti* 1132, and belongs to group III of rolling-circle-replicating (RCR) plasmids (Barran et al., 2001).

The *repABC* family, probably the most widely distributed, is commonly found in plasmids of *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Sinorhizobium* (Freiberg et al., 1997; Ramírez-Romero et al., 1997; Turner and Young, 1995). It is also present in plasmids and in the linear chromosome of the plant pathogen *Agrobacterium* (Kaneko et al., 2000; Li and Farrand, 2000; Nishiguchi et al., 1987; Suzuki et al., 1998; Tabata et al., 1989), and in one of the two chromosomes of the animal pathogens *Brucella suis* and *Brucella melitensis* (DelVecchio et al., 2002; Paulsen et al., 2002). The *repABC* plasmid family has been also found in *Rhodobacter sphaeroides*, *Oligotropha carboxidovorans*, in the soil bacteria *Paracoccus versutus* and *Paracoccus pantotrophus* and in the marine bacterium *Ruegeria* isolate PR1b, all belonging to the α -proteobacteria subdivision (Bartosik et al., 1998, 2002; Fuhrmann et al., 2003; Zhong et al., 2003).

The *repABC* basic replicons consist of an operon of three protein-encoding genes *repA*, *repB*, and *repC*, a *par*-site situated downstream of the latter gene, and a highly conserved small antisense RNA (ctRNA) gene located between *repB* and *repC* (Bartosik et al., 2001; MacLellan et al., 2005; Pappas and Winans, 2003a; Ramírez-Romero et al., 2000; Soberón et al., 2004; Venkova-Canova et al., 2004). The *repA* and *repB* products are involved in the partitioning of the plasmids. RepC is essential for replication and it is considered as the initiator protein (Bartosik et al., 1998; Ramírez-Romero et al., 2000; Tabata et al., 1989).

The replication of *repABC* plasmids is influenced by both negative and positive regulatory mechanisms. Negative regulation at transcriptional level was described in the *repABC* replicons since

RepA or RepA and RepB are repressors of the transcription of the operon (Pappas and Winans, 2003b; Ramírez-Romero et al., 2000; Ramírez-Romero et al., 2001). An antisense RNA encoded by the *repB*–*repC* region acts post-transcriptionally as a negative regulator of *repC* expression, but unexpectedly is also required for plasmid replication (Venkova-Canova et al., 2004). RepA and the ctRNA were found to be strong incompatibility determinants (MacLellan et al., 2005; Ramírez-Romero et al., 2000; Venkova-Canova et al., 2004). The copy-number of some *repABC* plasmids is positively regulated by a quorum-sensing mechanism mediated by TraR and its associate autoinducer (Li and Farrand, 2000; Pappas and Winans, 2003a).

The third family of basic replicons or *repC*-plasmids is evolutionary related to the *repABC* family because they share RepC as an initiator protein but, in contrast to the *repABC* organization, *repC* plasmids are not associated with *repA* and *repB* genes (Mercado-Blanco and Olivares, 1994b). The first member of this family was isolated from pRmeGR4a, an auto-transferable cryptic plasmid of *S. meliloti* GR4, and later it was shown that this family of replicons is widely spread in *S. meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, and *Rhizobium tropici* natural populations (Burgos et al., 1996; Mercado-Blanco and Olivares, 1993; Villadas et al., 1995). However, little is known about the regulatory mechanism of replication of the *repC* family.

In this work, we identified the regulatory elements involved in the replication control of the *repC* plasmid pRmeGR4a. An antisense RNA plays a central role as a negative regulator of the expression of *repC* and is a *trans*-incompatibility determinant of this plasmid. We also propose a model explaining the evolutionary relationships between *repC* and *repABC* plasmids.

2. Methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1.

Table 1

Bacterial strains/ plasmids	Relevant characteristics	Source/references
<i>Strains</i>		
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
GR4	Wild-type	Casadesús and Olivares (1979)
GRM8SR	A GR4 derivative cured of plasmid pRmeGR4a and pRmeGR4b. Spontaneous resistance to Streptomycin and Rifampicin.	Mercado-Blanco and Olivares (1993)
Rm1021	Streptomycin-resistant derivative of 2011.	Meade et al. (1982)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Host strain for plasmids	Hanahan (1983)
S17-1	Donor strain for plasmids	Simon et al. (1983)
<i>Plasmids</i>		
pUX19	Derivative of pUK21 with an <i>oriT</i> from pSUP202. Suicide vector for <i>S. meliloti</i> . Kanamycin-resistant	Zhang et al. (2001)
pBBR1MCS-5	Gm ^R cloning vector replicable in <i>Rhizobium</i>	Kovach et al. (1995)
pBBMCS53	pBBR1MCS-5 derivative carrying a promoter-less β -glucuronidase gene (<i>gusA</i> gene)	Corvera et al. (1999)
pRK415	Derivative of pRK290 Tetracycline resistant	Keen et al. (1988)
pR2	pUX19 derivative carrying a 6726 bp fragment containing the replication region of pRmeGR4a	This work
pXKR2	pUX19 derivative containing a 4182 bp PCR product of pR2. The insert carries the <i>repC</i> gene, 1702 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 1202 bp downstream from the stop codon of <i>repC</i>	This work
pXKR4	pUX19 derivative containing a 2402 bp PCR fragment of pR2. The insert carries the <i>repC</i> gene, 1702 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 338 bp downstream from the stop codon of <i>repC</i>	This work
pXKR4-M10	pXKR4 derivative, but with mutated –10 element from P2. The –10 element was changed from [GAGAAA] to [GCCTCG]	This work
pXKR4-M35	pXKR4 derivative, but with mutated –35 element from P2. The –35 element was changed from [TTGACA] to [GCTTTG]	This work
pXKR5	pUX19 derivative carrying a 1735 bp PCR fragment from pR2. The insert contains the <i>repC</i> gene and 290 bp upstream from the start codon of <i>repC</i>	This work
pXKR6A	pUX19 derivative carrying a 1891 bp PCR fragment from pR2. This insert contains, the <i>repC</i> gene, 275 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 338 bp downstream from the stop codon of the same gene	This work
pXKR6A-M35	pXKR6A derivative carrying a mutation in the –35 element of P1. The –35 element was changed from [TTGCAC] to [GCTTTG]	This work
pXKR7	pUX19 derivative carrying a 1851 bp PCR fragment of pR2. This insert contains the <i>repC</i> gene, 235 bp upstream the start codon of <i>repC</i> and 338 bp downstream from stop codon of the same gene	This work
pSR2	pRK415 derivative carrying the basic replicon from pRmeGR4a (6.7 kb fragment)	This work
pB2	pRK415 derivative carrying a 450 bp <i>Bam</i> HI restriction fragment from pR2	This work
pHB1	pRK415 derivative carrying a 2640 bp <i>Bam</i> HI– <i>Hind</i> III restriction fragment from pR2	This work
pB7	pRK415 derivative carrying a 1055 bp <i>Bam</i> HI restriction fragment from pR2	This work

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Bacterial strains/ plasmids	Relevant characteristics	Source/references
pB7	pRK415 derivative carrying a 1055 bp <i>Bam</i> HI restriction fragment from pR2	This work
pRM1	pRK415 derivative carrying a 1798 bp PCR product. The insert contains the <i>repC</i> gene, 184 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 338 bp downstream from the stop codon of <i>repC</i>	This work
pNH1	pRK415 derivative carrying a 2112 bp <i>Nsi</i> I– <i>Hind</i> III restriction fragment from pR2	This work
pORFB	pRK415 derivative carrying a 2253 bp PCR product. The insert contains the complete ORFB	This work
pMUP1	pRK415 derivative carrying a 424 bp PCR product. The insert contains 185 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 239 bp of the 5' coding region of <i>repC</i>	This work
pREPC	pRK415 derivative carrying a 1278 bp PCR product with the <i>repC</i> coding region	This work
pCT186	pRK415 derivative carrying a 146 bp PCR product. The insert contains 164 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 22 bp of the 5' coding region of <i>repC</i>	This work
pCT138	pRK415 derivative carrying a 137 bp PCR product. The insert contains 115 bp upstream the start codon of <i>repC</i> and 22 bp to the 5' coding region of <i>repC</i>	This work
pCT186-M10	pCT186 derivative carrying a mutation in the –10 element of P2. The –10 element was changed from [GAGAAA] to [GCCTCG]	This work
pCT186-M35	pCT186 derivative carrying a mutation in the –35 element of P2. The –35 element was changed from [TTGACA] to [GCTTTG]	This work
pPT138	pBBMCS53 derivative carrying the same insert as pCT138	This work
pPT138-M10	pBBMCS53 derivative carrying a similar insert to pCT138 but with a mutated –10 element of P2. The –10 element was changed from [GAGAAA] to [GCCTCG]	This work
pPT138-M35	pBBMCS53 derivative carrying a similar to insert pCT138 but with a mutated –35 element of P2. The –35 element was changed from [TTGACA] to [GCTTTG]	This work
pPT207	pBBMCS53 derivative carrying a 207-bp PCR product. The insert contains 185 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 28 bp of the 5' coding region of <i>repC</i>	This work
pFT4	pBBMCS53 derivative carrying a 1093-bp PCR product. This insert contains 786-bp upstream the from start codon of <i>repC</i> and 307 bp of the 5' coding region of <i>repC</i>	This work
pFT6	pBBMCS53 derivative with a 597-bp PCR product, containing 29 bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 307 bp of its 5' coding region	This work
pFTS4	pBBMCS53 derivative with a 640-bp PCR product, spanning from 146 bp upstream from the <i>repC</i> start codon to 786-bp upstream to the <i>repC</i> start codon	This work
pFTS5	pBBMCS53 derivative with a 311-bp PCR product, spanning from 146-bp upstream from the <i>repC</i> start codon to 457-bp upstream from <i>repC</i> start codon	This work
pFTS6	pBBMCS53 derivative with a 144-bp PCR product, spanning from 146 bp upstream from the <i>repC</i> start codon to 290-bp upstream from to <i>repC</i> start codon	This work

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Bacterial strains/ plasmids	Relevant characteristics	Source/references
pFTS6A	pBBMCS53 derivative with a 129-bp PCR product, spanning from 146-bp upstream from the <i>repC</i> start codon to 275-bp upstream from to <i>repC</i> start codon	This work
pFTS7	pBBMCS53 derivative with a 89-bp PCR product, spanning from 146-bp upstream from the <i>repC</i> start codon to 235-bp upstream from to <i>repC</i> start codon	This work
pFT6-M10	pFT6 derivative carrying a mutation in the –10 element of P2. The –10 element was changed from [GAGAAA] to [GCCTCG]	This work
pFT6-M35	pFT6 derivative carrying a mutation in the –35 element of P2. The –35 element was changed from [TTGACA] to [GCTTTG]	This work
pFT6A-M10	pBBMCS53 derivative with a 582-bp PCR product. This insert contains 275-bp upstream from the start codon of <i>repC</i> and 307-bp of its 5' coding region. The P2 –10 elements was changed from [GAGAAA] to [GCCTCG]	This work
pFT6A-M1035	pFT6A-M10 derivative carrying a mutation in the –35 element of P1. The P1 –35 elements was changed from [TTGCAC] to [GCTTTG]	This work

Escherichia coli strains were grown at 37°C in Luria–Bertani medium, and *S. meliloti* strains were grown at 30°C in PY (Peptone/Yeast) medium supplied with 1 mM CaCl₂ (Noel et al., 1984). When needed antibiotics were added at the following concentrations (in µg/ml): nalidixic acid, 20; gentamicin, 30; and tetracycline 10. Kanamycin was used at 30 for *E. coli* and 180 for *S. meliloti*.

2.2. Bacterial mating

Constructs based on pRK415, pUX19, and pBBMCS53 were introduced into *S. meliloti* using *E. coli* S17-1 as donor strain (Simon et al., 1983). Strains were grown in liquid medium to stationary phase, mixed in a donor–recipient ratio of 1:2 on PY plates, and incubated at 30°C overnight. Cells were resuspended in PY medium and serial dilutions were plated on the appropriate selective medium.

2.3. Plasmid profiles

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

2.4. DNA isolation and manipulation

Plasmid DNA was isolated as described by Sambrook et al. (1989) Ligase and restriction reac-

tions were carried out under the conditions specified by the enzyme manufacturer. *Taq* polymerase High fidelity or ThermalAce DNA Polymerase (Invitrogen) were used for PCR. The amplified products were cloned using TOPO vector kit (Invitrogen).

2.5. Site-directed mutagenesis

The method described by Ito et al. (1991) was utilized to obtain constructs carrying mutations in the P2 promoter: construct pXKR4-M10 contained a mutation in the –10 box and pXKR4-M35 in the –35 box. Two sets of complementary primers JM10 [5'-T AAGCCGAATCCCGAGGCGCAGACCC-3'], JM10R [5'-GGGTCTGCGCCTCGGGATT CGGCTTA-3'], and JM35 [5'-CCCTTCCCCAA AGCTTGCAAAGCACCT-3'], JM35R [5'-AG GTGCTTTTGCAAGCTTTGGG GAAGGG-3'], covering the –10 and –35 boxes, respectively, were used as a source of mutations. Two external primers: XKR4 [5'-GCTCTAGAGGTACCGAACTT TCGGTGGCCG-3'] and QEB-1 [5'-GAATTCG GATCCTTACCATCG CAAGGC-3'], encompassing the *inc1* region (from 786-bp upstream of the start codon of *repC* to 338 bp downstream of the stop codon of *repC*) were used in the PCRs. The final PCR product of each reaction was utilized as a template for synthesizing the desired fragments for cloning into vector pUX19.

2.6. RNA isolation and determination of the transcriptional start site

Total RNA was isolated using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche). For primer extension analysis 10 µg of total RNA isolated from *S. meliloti* Rm1021 harboring pPT138 or pFTS4 was denatured at 90°C for 3 min, and then slowly cooled to 45°C. The RNA was annealed with a [³²P]-labeled primer [5'-GTAACATAAGGGAC TGACCTGC-3'], complementary to the *gusA* mRNA. The primer was extended with Moloney murine Leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) at 37°C for 2 h, and the extended products were collected with a Microcon-30 micro-concentrator (Amicon) and analyzed by electrophoresis in 8% urea-containing polyacrylamide gels.

2.7. Construction of the *gusA* fusions

To determine the position of the *repC* promoter (P1), two collections of PCR products were obtained. The first collection contains *repC* upstream regions of several lengths, and the first 307 bp of the *repC*-coding region. The second one consists of PCR products that share their 3' end, located 146 bp upstream of the *repC* initial codon, but differing in their 5' end. All these PCR products were transcriptionally fused to the promoterless *gusA* gene of plasmid pBBMCS-53. To measure the activity of the P2 promoter, a PCR product of 137 bp containing P2 was cloned in the adequate direction into pBBMCS-53. To evaluate the transcription termination efficiency of the stem-loop structure of the ctRNA a PCR product including P2 and the putative terminator were cloned in the proper orientation into pBBMCS-53 to obtain pPT207.

The insert of plasmid pFT6A-M1035, carrying mutations in the P1 and P2 promoter was obtained by PCR using as a primer MUTP1 [5'-TAGCAC GTTGGCTTTGCTTTTTGG-3'], carrying a mutation in the -35 box of the P1 promoter (underlined) and primer FRM3 [5'-GCGTCGAC ATAGCATGCGGCTGAC-3']. This amplification product was obtained using as template construct pXKR4-M10, containing a mutation in the

-10 box of the P2 promoter. The insert of pFT6-M35 was obtained by PCR using primer XKR6 [5'-GCTCTAGAACAGGCTTTTGC GTG-3'] and primer FRM3, and construct pXKR4-M35 as a template. Construct pFT6-M10 was obtained in a similar way but using pXKR4-M10 as a template. The insert of pFT6A-M10 was obtained by PCR using primers WTP1 [5'-TAGCACGTTGTT GCACCTTTTTG G-3'] and FRM3 and pXKR4-M10 as a template.

All the primers used to construct these fusions contain, at their 5' ends, an *Xba*I restriction site, and at their 3' ends a *Sal*I restriction site. The amplification products were cloned into plasmid pBBMCS53 utilizing the introduced *Xba*I and *Sal*I restriction sites, which are also present in the vector. The *gusA* fusions were introduced into *S. meliloti* Rm1021 by conjugation and their β-glucuronidase activities determined as described below.

2.8. β-Glucuronidase activity measurements

Overnight cultures of the strains carrying the desired constructs were grown in the presence of gentamicin. Cultures were diluted in fresh PY medium to OD_{540nm} 0.01 and grown to a final OD_{540nm} 0.4. One milliliter of culture was centrifuged and resuspended in a salt wash solution supplemented with chloramphenicol (100 µg/ml). Quantitative β-glucuronidase assays were performed with *p*-nitrophenyl glucuronide as a substrate as described previously (Wilson et al., 1992). Data were normalized to total cell protein concentration by the Lowry method (Sambrook et al., 1989). The results shown here are the means of three independent experiments.

2.9. Plasmid stability

Plasmid stability was calculated according to the procedure described by Durland and Helinski (1987). Overnight cultures grown in the presence of the appropriate antibiotic were diluted in fresh medium without selection to give an initial optical density of 0.01 at 620 nm and cultivated for 30 h (15 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. Calculation of theoretical efficiency of transcription termination

Free energy of the hairpin RNA structure formation was calculated following the method of Freier et al. (1986) meanwhile the theoretical efficiency of termination was calculated using the algorithm reported by d'Aubenton-Carafa et al. (1990).

2.11. Plasmid incompatibility

To identify regions involved in incompatibility, a collection of PCR products and restriction fragments that covered the basic replicon of pRmGR4a and its surrounding regions was cloned in pRK415, a vector carrying a tetracycline resistance determinant. The resultant constructs were introduced into *S. meliloti* GRM8SR carrying a construct with the basic replicon of pRmGR4a and a kanamycin resistance determinant (pR2). It is important to point out that the replication of pR2 in *S. meliloti* depends on pRmGR4a basic replicon. Transconjugants were obtained selecting the incoming plasmid. The plasmid profiles of at least four transconjugants from each cross were analyzed. The incoming plasmid was considered to carry an incompatibility determinant if it was able to displace pR2 and lost its capacity to grow on PY kanamycin plates.

2.12. Plasmid replication in *S. meliloti*

To determine the minimal region able to replicate in *S. meliloti*, a collection of PCR products of different lengths, but all containing the complete *repC* gene, was cloned in pUX19, a vector unable to replicate in *Sinorhizobium*. These constructs were mobilized into *S. meliloti* GRM8SR and the plasmid profiles of at least four transconjugants of each cross were analyzed. A recombinant plasmid was considered to have the ability to replicate in *S. meliloti* if the plasmid profile of the transconjugants showed a new band of the expected size, and if the new band hybridized with *repC*.

2.13. Computer work

Searching for Shine–Dalgarno sequences inside the *repC* leader region was done using the program RBSFinder (<ftp://ftp.tigr.org/pub/software/RBSfinder/>) available from TIGR (<http://www.tigr.org/>) (Suzek et al., 2001).

The RepC protein sequences were aligned using the Clustal-W program, using default values (Thompson et al., 1994) at the WWW Service of the European Bioinformatics Institute (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>). The phylogenetic analysis was made using PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c created by Joseph Felsenstein (Department of Genome Sciences) at the University of Washington, Seattle (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/oldversions.html>).

To construct the phylogenetic tree with bootstrap (1000 replicate trees), the Protein Sequence Parsimony Method (PROTPARS) and SEQBOOT program were used. The tree was built utilizing only the regions in the alignment without gaps. Trees were drawn using the TREEVIEW program (Page, 1996).

3. Results

3.1. Sequence analysis of the region surrounding the *repC* gene of plasmid pRmeGR4a

It has been shown that the basic replicon of the *S. meliloti* GR4 cryptic plasmid pRmeGR4a is located within a 4.8 kb *PstI* restriction fragment (Fig. 1A). A recombinant plasmid, pJMB40, carrying this insert is capable of autonomous replication in *S. meliloti* (Mercado-Blanco and Olivares, 1993).

During our initial analysis of the pJMB40 insert we found data suggesting the presence of some DNA sequencing errors. To identify and correct these possible differences, the 4.8 kb *PstI* fragment was re-sequenced. To extend the analysis of the region surrounding the basic replicon, we cloned and sequenced a 3.6 kb *ApaI* fragment from plasmid pRmeGR4a that overlaps with the 4.8 kb *PstI* fragment (GenBank Accession No. AY682089). The Fig. 1A shows a map generated with the most recently obtained DNA sequence.

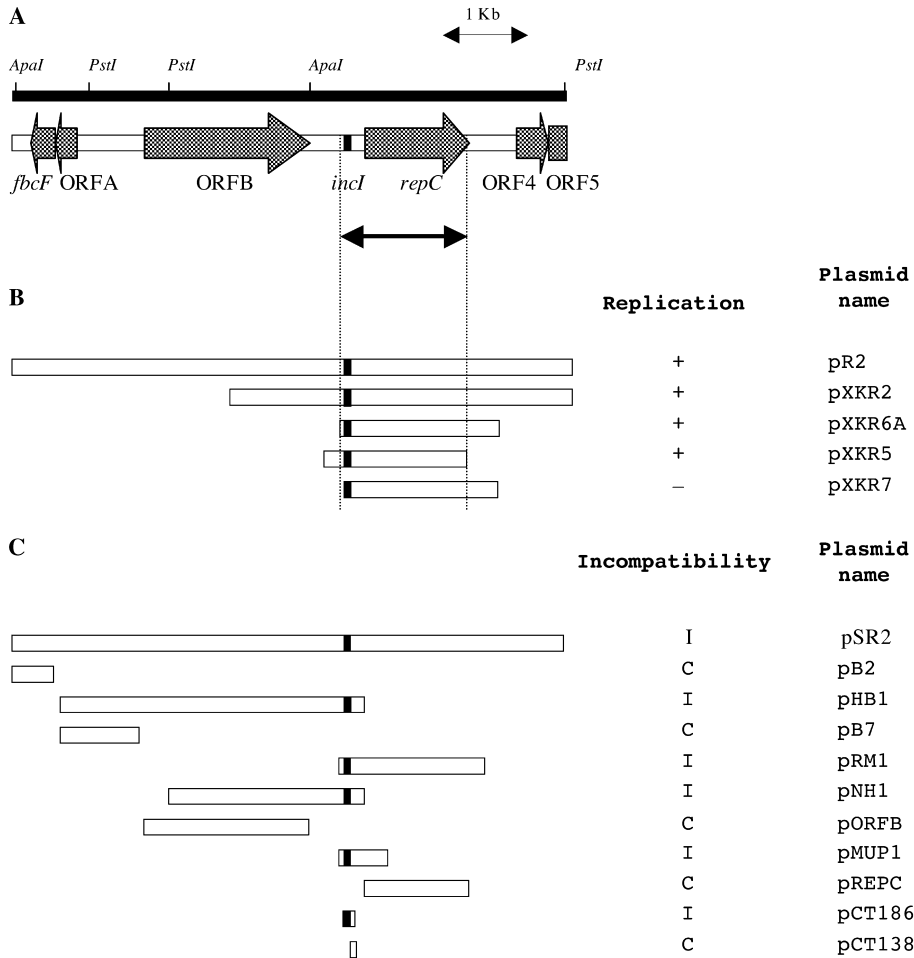


Fig. 1. Replication and incompatibility properties of plasmid derivatives containing different regions of the basic replicon of pRmeGR4a. (A) Map of pRmeGR4a fragment carrying its replicator region. The black line is a restriction map containing *PstI* and *Apal* restriction sites. The shaded thick arrows represent the open reading frames (ORFs), and the shaded rectangle the truncated ORF5. A small black box represents the minimal region able to exert incompatibility (*inc*). (B) Delimitation of the minimal fragment capable of autonomous replication. The open boxes represent the DNA insert contained in each construct. In the column labeled “Replication” the symbol + indicates that the plasmid derivative has the ability to replicate in the GRM8SR strain, and the symbol – indicates that the plasmid is unable to do so. Plasmid names are listed in the column on the right. The thick black two-head arrow demarcates the minimal region capable of autonomous replication. (C) Delimitation of the minimal region able to exert incompatibility against the pR2. In the column labeled “Incompatibility” I indicates that the derivative plasmid is incompatible against pR2 and C indicates that the construct is compatible. The small black box shows the position of the incompatibility determinant.

3.2. Determination of the minimal DNA region of pRmeGR4a able to replicate autonomously

Previously, it has been shown that *repC* is essential for replication and that the genes located upstream of *repC* have a role in plasmid stability (Mercado-Blanco and Olivares, 1994a,b).

To delineate precisely the boundaries of the minimal replicon of plasmid pRmeGR4a, a collection of PCR products containing the *repC* gene and different sequences of its upstream and downstream regions were cloned into a vector unable to replicate in *S. meliloti* (pUX19). These constructs were introduced by conjugation into *S. meliloti* GRM8SR to

test their replication ability. The results, summarized in Fig. 1B, show that two small overlapping clones, pXKR5 and pXKR6A, retain the ability to replicate. The minimal region able to confer autonomous replication must lie within the shared region between these two constructs. This means that the minimal region includes the complete *repC* gene and 275 bp of its upstream region. In agreement with this observation, plasmid pXKR7 that contains an insert 40-bp smaller in its 5' end than the insert of pXKR6A is incapable to replicate. These results suggest that the *repC* promoter reside within the 275-bp upstream the *repC* initial codon (see Section 3.5).

3.3. The basic replicon of plasmid pRmeGR4a contains one incompatibility region

Plasmid incompatibility, or the inability of two replicons to coexist in the same cell line is the result of sharing some elements involved in plasmid replication, plasmid partitioning or their control (Novick, 1987). Thus, incompatibility tests can be used to map regions relevant for plasmid maintenance. For this reason a collection of PCR products and restriction fragments covering different parts of the pRmeGR4a minimal replicon was obtained and cloned in pRK415, a vector able to replicate in *Sinorhizobium*. Constructs were introduced by con-

jugation into *S. meliloti* GRM8SR containing pR2, a plasmid with the basic replicon of pRmeGR4a (see Fig. 1C). The incompatibility properties of the constructs were determined by analyzing the plasmid profiles of the transconjugants and the presence or absence of the kanamycin resistant phenotype associated with pR2. As shown in Fig. 1C, the insert of construct pCT186 carries the smallest incompatibility region (186-bp). This region comprises the first 22-bp of *repC* gene and 164 bp of its upstream region, and was named *incl*.

3.4. The incompatibility region encodes a small antisense RNA

The *incl* region of plasmid pRmeGR4a has strong DNA sequence similarity with the antisense RNA gene located between *repB* and *repC* of *repABC* plasmids (MacLellan et al., 2005; Venkova-Canova et al., 2004), which is responsible of the strong incompatibility phenotype exhibited by this region. The sequence alignment of Fig. 2 indicates that *incl* could contain a σ 70-like promoter [TTGACA(N₁₄)TGNGAGAAA] with an extended -10 box and some conserved motifs found in the *repABC* ctRNAs (MacLellan et al., 2005; Venkova-Canova et al., 2004).

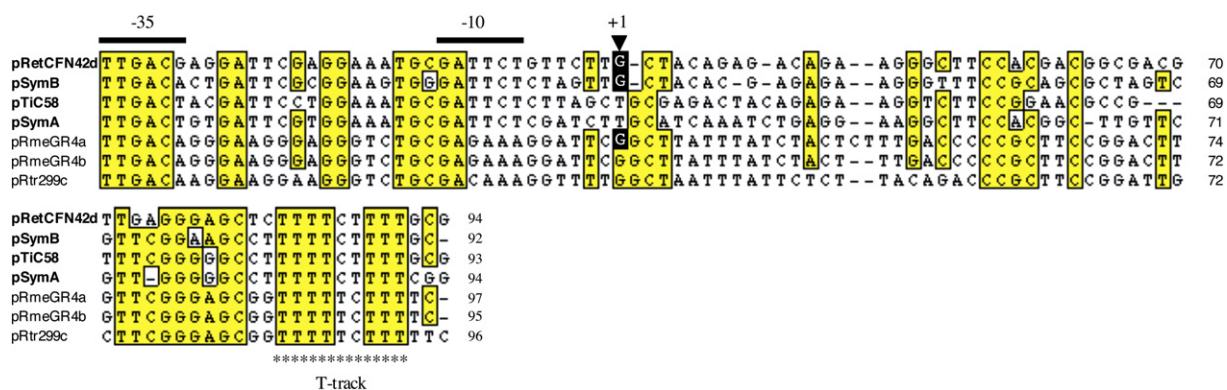


Fig. 2. DNA alignment of the ctRNA genes from some *repABC* and *repC* plasmids. Plasmid names are at the left of the figure, and those in bold letters belong to the *repABC* plasmid family. The -35 and -10 boxes of the ctRNA promoter gene are shown below thick bars and labeled accordingly. The experimentally determined transcriptional start sites are indicated with are boxed in black, and the T-track regions are indicated with asterisks. The identities of 65% or higher are shown within yellow boxes. Plasmid pRetCFN42d belong to *Rhizobium etli*; plasmid pTiC58 to *Agrobacterium tumefaciens*; plasmid pSymA and pSymB to *S. meliloti*; plasmid pRmeGR4a and pRmeGR4b to *S. meliloti* GR4; and plasmid pRtr299c to *R. tropici*. Numbers at the right indicate the size of the DNA included in the alignment.

To probe for the presence of an antisense RNA within the *incl* region the putative promoter was cloned in the proper direction in front of a promoter-less *gusA* gene, in a vector capable of replicating in *S. meliloti* (pBBMCS53) to generate pPT138. This construct was introduced into *S. meliloti* 1021 and β -glucuronidase activity of the transconjugant was easily detected (Fig. 3A).

To demonstrate that the proposed promoter sequence encodes a functional promoter, the -10 and -35 hexameric elements were modified. The -10 element was changed from [GAGAAA] to [GCCTCG] and cloned into pBBMCS53 to create pPT138-M10, and the -35 element was altered from [TTGACA] to [GCTTTG] and cloned into pBBMCS53 to generate pPT138-M35. The constructs were independently introduced into *S. meliloti* 1021, but no β -glucuronidase activity was detected in the transconjugants, indicating that the promoter (P2) was identified adequately (Fig. 3A).

The P2 transcription start site (+1) was identified as a “G” nucleotide located 7-bp immediately downstream of the -10 promoter element (Fig. 4A’).

To determine if products encoded in the parental plasmid pRmeGR4a regulate the P2 promoter, the P2::*gusA* fusion present in pPT138 was introduced into two *S. meliloti* strains: one carrying the parental plasmid pRmeGR4a (GR4), and the other lacking it (Rm1021). The β -glucuronidase activity of the two transconjugants was the same (data not shown) indicating that products encoded on pRmeGR4a do not modulate P2 activity, and suggesting that this promoter is constitutively expressed.

The predicted folding of the putative antisense RNA shows only one stem–loop structure resembling a *rho*-independent transcriptional terminator (Fig. 5A’). The hairpin consists of a stem of 10 bp, rich in GC, a loop of eight nucleotides exhibiting a 5'-YURN-3' consensus U-turn motif, common in other plasmid-encoded antisense RNAs and a 3' U-tail typical for the *rho*-independent terminators (d’Aubenton-Carafa et al., 1990; Franch and Gerdes, 2000). The free energy involved in the formation of this structure was estimated in $\Delta G = -15.1$ kcal/mol (Freier et al., 1986). The parameter d , associated with *rho*-independent

terminators, was estimated as 32.58, correlating with 83% theoretical efficiency of termination (d’Aubenton-Carafa et al., 1990).

To determine the ability of this structure to terminate transcription, two *gusA* fusions were introduced into *S. meliloti* Rm1021: one containing the P2 promoter (pPT138) and the other containing P2 and the stem–loop structure (pPT207). The β -glucuronidase activity of the transconjugants was determined. The results shown in Fig. 3A demonstrate that the stem–loop structure caused transcription termination with an efficiency of 94.3%. With these data we can estimate the ctRNA size is no longer than 67 nt. Absence of activity of the promoter in *E. coli* did not allow us to measure the length of the RNA in vitro by run-off transcription experiments.

To discern if the incompatibility mechanism of *incl* is the result of the presence of a *cis* acting-site located within this region, or if the antisense RNA acts as a *trans*-incompatibility factor, we introduced into *S. meliloti* GRM8RS (pR2) three plasmids: one carrying the complete and active antisense RNA gene (pCT186), and the other two carrying the same region but with mutations disrupting the promoter -10 element (pCT186-M10) or the -35 element (pCT186-M35). The plasmid profile analysis of the transconjugants demonstrated that only plasmid pCT186 was able to exert incompatibility against pR2, demonstrating the *incl* encodes a *trans*-incompatibility factor, the antisense RNA (ctRNA).

3.5. Identification of the *repC* promoter

The minimal region of plasmid pRmeGR4a required for replication encompasses the *repC* gene and 275 bp upstream of its start codon. This upstream region includes the ctRNA gene and all the elements required for the proper expression of *repC*.

To map the *repC* promoter two *gusA* transcriptional fusions were made: pFT4 and pFT6. Both of them carry fragments sharing 307 bp of the *repC*-coding region on their 3’ ends. However, the first contains 786 bp upstream of the start codon of *repC* and the second 290 bp. The constructs were introduced into *S. meliloti* 1021. Unexpectedly, the β -glucuronidase activities of the transconjugants

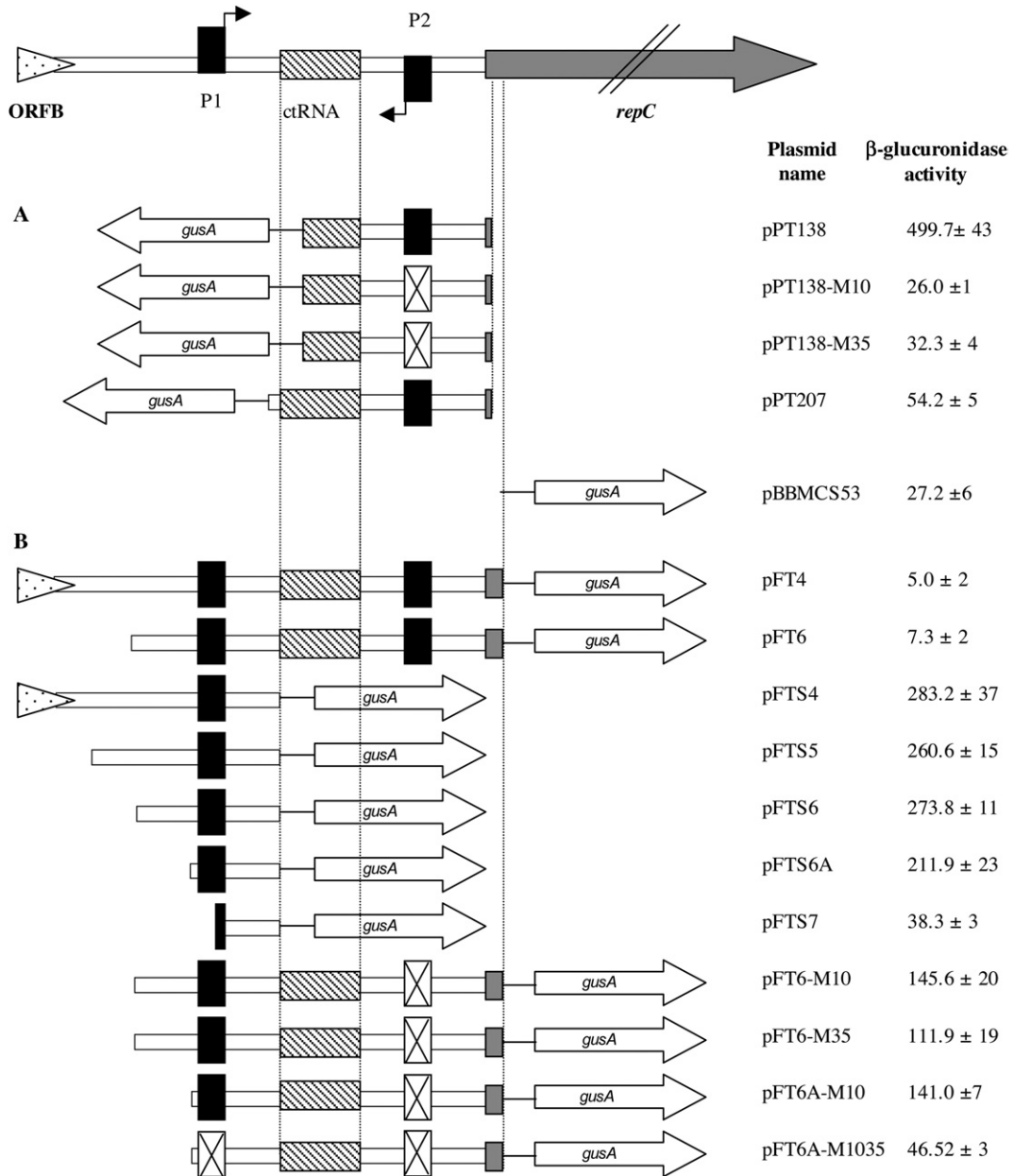


Fig. 3. Transcriptional analysis of the P1 and P2 promoters. The elements involved in the regulation and in the replication of the basic replicon of pRmeGR4a are represented in the upper part of the figure: the shaded rectangle shows the position of *ctRNA* gene, and the gray arrow the *repC* gene. The black boxes with their associated thin arrows represent the P1 and P2 promoters, and the direction of their transcription. The triangle at the left shows the 3' end of ORFB. (A) The transcriptional analysis of the P2 promoter, and (B) the analysis of the P1 promoter. White arrows labeled with *gusA* represent the reporter gene. The black boxes show the wild type promoters, and the crossed boxes represent mutations in the -10 or -35 elements of the P1 or P2 promoters. The shaded rectangle represents the *ctRNA* gene or fragments of it. Plasmid names are listed in the inner column at the right, and beside it, the β -glucuronidase activity expressed in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, of each construct measured in a *S. meliloti* 1021 genetic background. The standard deviations are given as \pm and represent measurements of at least three independent experiments.

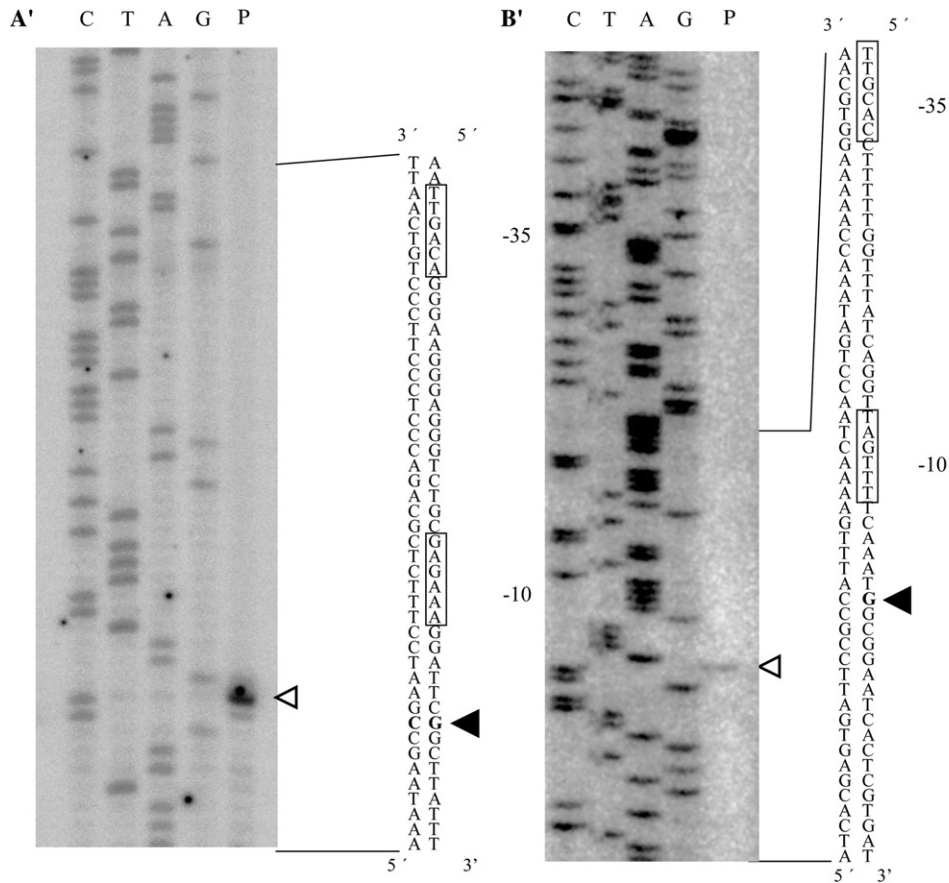


Fig. 4. Identification of transcriptional start site of ctRNA and *repC* mRNA by primer extension. (A' and B') The primer extension analyses of P2 and P1, respectively. Lanes labeled with A, C, G, and T, are sequencing reactions of the plasmid. White arrowheads point to the primer extension products. The DNA sequence obtained from the gel and its complementary sequence are shown on the right side of the figure. Black arrowheads indicate the transcriptional start sites. The -10 and -35 promoter elements are enclosed within boxes.

were even lower than those obtained with the empty-vector (pBBMCS53).

We hypothesized that the ctRNA was masking the activity of the putative *repC* promoter, as the result of convergent transcription between promoters P1 and P2. To avoid these problems, we constructed five new *gusA* fusions (pFTS4, pFTS5, pFTS6, pFTS6A, and pFTS7). The 3' ends of all of them were located 146 bp upstream of the *repC* initiation codon, eliminating almost completely the ctRNA gene, and their 5' ends were increasingly smaller (Fig. 3B). These constructs were introduced by conjugation into *S. meliloti* Rm1021. The activity of the reporter gene was detected in all trans-

conjugants except one: the strain carrying the *gusA* fusion with the smallest insert, pFTS7. This result indicates that the complete promoter is contained in plasmid pFTS6A, a construct containing a 40-bp larger insert at its 5' end than that in pFTS7. A summary of the results is shown in Fig. 3B.

To identify the transcription start site of the *repC* gene a primer extension analysis was performed using total RNA from *S. meliloti* strain 1021 carrying pFTS4. The signal was obtained at a G nucleotide 229-bp upstream the *repC* initiation codon (Fig. 4B'). A sequence [TTGCAC (N₁₈) TAGTTT] resembling an *E. coli* σ 70 consensus promoter was found 7-bp upstream of the transcription start site.

in the reporter gene activity in comparison with that detected in the strain carrying pFT6 (Fig. 3B).

On the other hand, the introduction of pCT186, a plasmid carrying a complete ctRNA gene, into these strains produced a 5.4-fold reduction of β -glucuronidase activity. These results demonstrate that the ctRNA regulates negatively the *repC* gene, but convergent transcription between P1 and P2 promoters has a relevant role in regulation.

3.7. Plasmid replication and the ctRNA

To establish the role of the ctRNA in determining plasmid copy-number and stability of pRmeGR4a, the mutations that disrupt the P2 promoter described above, were introduced independently into plasmid pXKR4, carrying the pRmeGR4a basic replicon, to generate constructs pXKR4-M10 and

pXKR4-M35. These construct were conjugated into *S. meliloti* GRM8SR but transconjugants were never recovered. In contrast, transconjugants of pXKR4 were easily obtained. This observation can be interpreted in two ways: first, the lack of the ctRNA, a negative regulator of the *repC* expression conduces to a runaway replication, which is lethal or second, the ctRNA is required, some how, in the formation of the initiation complex.

3.8. Comparative structural analysis of other members of the *repC* plasmid family

During two independent plasmid sequencing projects two new members of the *repC* plasmid-family were identified: one of them was found in the symbiotic plasmid of *R. tropici* 299 (pRtr299c), and the other in pRmeGR4b, the second cryptic

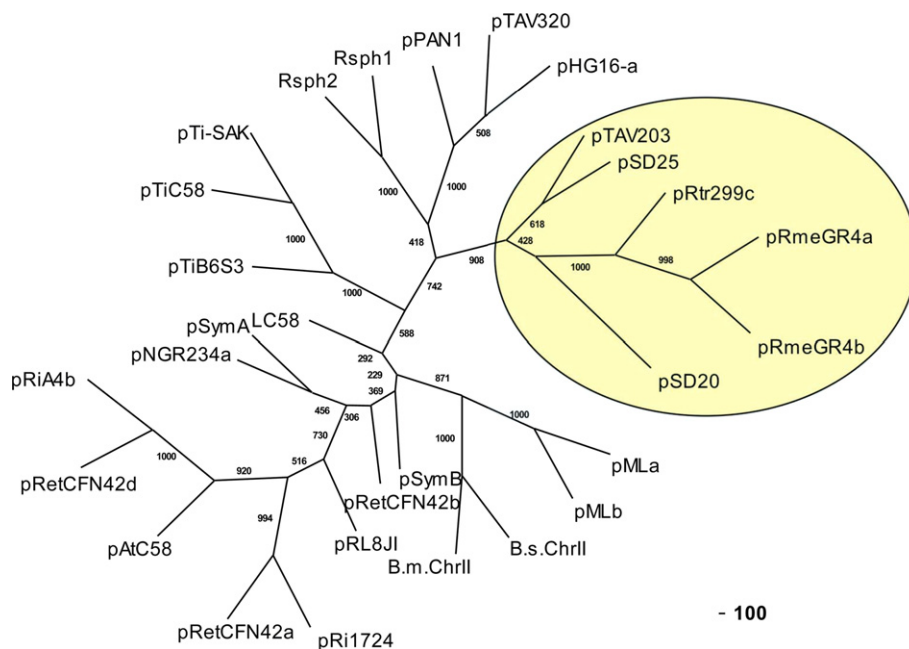


Fig. 6. Phylogenetic relationships among RepC proteins. An unrooted phylogenetic tree of RepC, generated by parsimony is presented. The bar indicates the number of “steps.” Numbers within the trees are the bootstrap values. Cluster encircled in gray contain *repC* family members. The RepC sequences of the following molecules were included in the analysis: the *A. tumefaciens* plasmids pTi-SAK-URA, pTiC58, pAtC58, and its linear chromosome LC58. Plasmids pTiB6S3, pRi1724, and pRiA4b from *A. rhizogenes*. Plasmids pHG16-a, pPAN1, pTAV320, and pTAV203 from *P. versutu* and *P. pantotrophus*. Plasmids pRetCFN42a, p42RetCFN42b, and pRetCFN42d from *Rhizobium etli*. Plasmids pMLa and pMLb from *Mesorhizobium loti*. Plasmids pSymA, pSymB, pRmeGR4a, and pRmeGR4b from *S. meliloti*. Plasmid pRL8JI from *Rhizobium leguminosarum*. Plasmids Rsph1 and Rsph2 from *Rhodobacter capsulatus*. Plasmids pSD25 and pSD20 from *Ruegueria* sp. Plasmid pRt299c from *R. tropici*. pNGR234a from *Rhizobium* NGR234. The chromosomes of *Brucella suis* (B.s.ChrII) and *B. melitensis* (B.m.ChrII).

plasmid of *S. meliloti* GR4. The DNA sequence of *repC* and their upstream and downstream regions were obtained for both plasmids and deposited in GenBank (Accession Nos. AY795967 and AY677378). A comparative representation of these two new members and the basic replicon of plasmid pRmeGR4a show that they share only *repC* and the ctRNA gene, supporting the idea that the basic replicon of the *repC* family is restricted to these elements. In Fig. 6, we present an unrooted phylogenetic tree constructed using RepC sequences of members of *repABC* and *repC* plasmid families. The *repC* members are clustered in a clade, but associated with members of the *repABC* family suggesting a DNA interchange between members of the two plasmid-families.

4. Discussion

The *S. meliolti* cryptic plasmid pRmeGR4a belongs to the *repC* plasmid family, which is widely spread in native populations of *S. meliloti*, *S. fredii*, and *R. tropici* (Burgos et al., 1996; Villadas et al., 1995). The structure of the pRmeGR4a minimal replicon consists of the gene encoding the protein limiting for replication (*repC*), and a gene encoding a small antisense RNA which is transcribed in the opposite direction of *repC*, and its product is complementary to the leader region of *repC* mRNA.

A comparative DNA sequence analysis of the replication region of two new members of the *repC* plasmid family (pRmeGR4b and pRtr299c) showed that they only share *repC* and the antisense RNA gene, both organized in the same way, supporting the idea that the basic replicon of the *repC* plasmid family is composed exclusively of these two elements. Moreover, a close inspection to the DNA sequences around the *repC* gene located in plasmid pTAV203 of *Paracoccus versutus* (Bartosik et al., 1997) showed the presence of a ctRNA gene, upstream of *repC* and encoded on the opposite DNA strand, indicating that this plasmid also belongs to the *repC* family.

Several lines of evidence demonstrated the presence of a ctRNA within the pRmeGR4a minimal replicon: (I) A constitutive σ_{70} -like promoter was located upstream of the *repC* gene, but transcribed

in the opposite direction (P2). (II) The transcriptional start site of the ctRNA was determined by primer extension, a method requiring the physical presence of the ctRNA. (III) The putative *rho*-independent terminator present in the ctRNA was mapped genetically, indicating that the ctRNA is approximately of 67 nt long. (IV) The introduction of a DNA fragment expressing the ctRNA gene but not an equivalent construct with a mutated P2 promoter, exerted incompatibility towards pR2. This observation also demonstrates that the ctRNA is a *trans*-incompatibility factor.

The P2 promoter has a negative influence on the *repC* gene promoter activity (P1), because of the convergent transcription occurring between them. The presence of product of this gene, the ctRNA in *trans* knocks down the expression of the *repC* promoter, a common property of ctRNAs involved in the control of initiator-encoding genes of bacterial plasmids (Brantl, 2002; del Solar et al., 1998).

A computer model of the secondary structure of the leader region of the *repC* mRNA shows the presence of four possible stem-loop structures, three of them (SI, SII, and SIV) seem to be stable (Fig. 5B').

The ctRNA is complementary to the mRNA region embraced in the stem-loop structure SII (Fig. 5), suggesting that this structure is the target of the ctRNA, inferring that the interaction of these two molecules might occur through the formation of a “kissing complex” described in other plasmid replication systems (i.e., Tomizawa, 1984). The mechanism of how the ctRNA exerts its regulatory role is not clear, however, we can discard two known possibilities: (i) the ctRNA sequence does not overlap the sequence complementary to the *repC* Shine–Dalgarno as found in other plasmids (del Solar et al., 1998; Venkova-Canova et al., 2003). (ii) The sequence of the *repC* mRNA leader does not allow alternative foldings conducting to the formation of an intrinsic transcriptional terminator as it has been described for the *Staphylococcus aureus* plasmid pT181 (Novick et al., 1989) (data not shown).

On the other hand, we cannot rule out that the mRNA–ctRNA duplex formation indirectly facilitates the degradation of the *repC* transcript (i.e., Blomberg et al., 1990).

We were unable to obtain transconjugants with derivatives of the pRmeGR4a basic replicon carrying mutations that abolish P2 activity. This situation can be explained in several ways: first, the absence of the ctRNA lead to an uncontrolled replication of the plasmid (runaway-replication) eventually killing the cell as found in plasmid R1 (Uhlin and Nordström, 1978) and pT181 (Iordanescu, 1983). This seems the most obvious hypothesis. However, a construct carrying exclusively the *repC* gene from plasmid pRetCFN42d (homologous in structure and function to the *repC* gene of pRmeGR4a), under the control of the *E. coli* Plac promoter, replicates in *Rhizobium* as a high copy number plasmid. A fact, denying a deleterious defect to the cell and implying that the origin of replication most probably resides within the *repC* coding region as it has been shown for plasmids of the *repABC* family carrying also a homologous *repC* gene (Bartosik et al., 1998; R. Cervantes and M. A. Cevallos, unpublished results).

The second way to interpret the results is to consider that the ctRNA gene, its promoter or its product has a direct influence on the replication of the plasmid. For example, it has been shown for the *E. coli* chromosome that a transcription activity near or crossing the *oriC* has a positive effect on replication (Baker and Kornberg, 1988). The transcription of P2 of the ctRNA gene could change locally the superhelicity of the plasmid promoting its replication, as reported in other systems as well (Leng and McMacken, 2002). Another possibility is that the ctRNA is involved directly or indirectly in the formation of the initiation complex.

A ctRNA with sequence and secondary structure similarities present in the basic replicon of pRmeGR4a has been found between the *repB* and *repC* genes in all the members of the *repABC* plasmid family. In this family, the ctRNA is a *trans*-incompatibility factor that participates in the negative regulation of the *repC* gene and is also required for replication (Venkova-Canova et al., 2004). The promoter regions of the ctRNAs of *repABC* plasmids and pRmeGR4a are similar, and the relative position of the antisense RNA genes in relation to the *repC* gene is equivalent in the two plasmid-families.

The most important difference between the *repABC* and *repC* families consists in the presence of an active partitioning system in the former. In the *repABC* plasmids the *repA* and *repB* genes encode proteins involved in plasmid partitioning and in the negative regulation of the transcription of their operon (Pappas and Winans, 2003b; Ramírez-Romero et al., 2001). They also have a sequence essential for their stability (*par* site) located downstream of *repC* that binds RepB and also acts as a strong *cis*-incompatibility factor (Bartosik et al., 2001; Ramírez-Romero et al., 2000; Soberón et al., 2004). Neither of those genes or a *par* equivalent region is present in pRmeGR4a, however its stability is very high.

The sequence of plasmid pSD20 of *Ruegeria* PR1b revealed a replication region consisting of three genes: the first is similar to initiation protein from the iteron-containing plasmid pSW500 of *Erwinia stewartii*. The products of the other two, transcribed in the opposite direction, show similarity to the RepA and RepB proteins of the *repABC* plasmids (Zhong et al., 2003). These observations indicate that the *repAB* genes and the *ctRNA-repC* genes are two independent functional cassettes.

The RepA and RepB proteins share homology with the A and B partitioning proteins (*par/sop*) of P1 and F plasmids (Bignell and Thomas, 2001). In these plasmids the genes that encode the A and B proteins are organized in an operon and their acting site (*par* site) is situated downstream of the gene encoding B. Also, A and B proteins negatively autoregulate their transcription.

With these observations we propose a hypothesis for the origin of *repABC* plasmids: In the ancestral situation the *repAB* genes were encoded in a negatively autoregulated operon. The RepA and RepB action site (*par* site) was located immediately downstream of the *repB*, gene as found in active partitioning systems of other plasmids. Meanwhile, the *ctRNA-repC* genes were organized in the same way as found in pRmeGR4a. Then, the *ctRNA-repC* cassette was integrated between the *repAB* genes and the *par* site, separating the *repAB* genes from the *par*-site and their associated transcription terminator. Finally, the weak promoter of the *repC* gene was eliminated by the acquisition of some deleterious mutations. In some plasmid lineages (as in

the case of the tumor-inducing plasmids) a quorum-sensing dependent replication was gained when a *repABC* operon was integrated, in the proper orientation, in the vicinity of a TraR dependent promoter.

The analysis of a phylogenetic tree constructed with the RepC protein sequences of members of *repC* and *repABC* plasmid families showed that all members of the *repC* plasmid family are located in the same clade, but shared with other members of the *repABC* plasmid family, supporting the hypothesis that the *repABC* family could have originated from the fusion of *repAB* partitioning cassette with a *ctRNA-repC* replication module, and that this fusion probably occurred more than once (Fig. 6).

The architecture of the basic replicon of pRmeGR4a is very simple: with a gene encoding an initiator protein that is tightly regulated by the interplay of an antisense RNA and a weak promoter and is surprisingly stable. In this moment we are interested to determine how a low copy-number plasmid is stable without the presence of true partitioning machinery or other stabilization system.

Acknowledgments

We thank Michael Dunn for his critical comments. We are also greatly indebted to Paul Gaytán and Eugenio López for the primers synthesis, and Ángeles Pérez-Oseguera and Ismael Hernández for their technical assistance. This work was supported by DGAPA/PAPIIT Grant IN209601.

References

- Baker, T.A., Kornberg, A., 1988. Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origin: an RNA–DNA hybrid near *oriC*. *Cell* 55, 113–123.
- Barran, L.R., Ritchot, N., Bromfield, E.S., 2001. *Sinorhizobium meliloti* plasmid pRm1132f replicates by a rolling-circle mechanism. *J. Bacteriol.* 183, 2704–2708.
- Bartosik, D., Baj, J., Piechucka, E., Waker, E., Wlodarczyk, M., 2002. Comparative characterization of *repABC*-type replicons of *Paracoccus pantotrophus* composite plasmids. *Plasmid* 48, 130–141.
- Bartosik, D., Baj, J., Wlodarczyk, 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., Wlodarczyk, M., Thomas, C.M., 1997. Complete nucleotide sequence of the replicator region of *Paracoccus (Thiobacillus) versutus* pTAV1 plasmid and its correlation to several plasmids of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Plasmid* 38, 53–59.
- Bartosik, D., Szymanik, M., Wysocka, E., 2001. Identification of the partitioning 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. Biotechnol.* 91, 1–34.
- Blomberg, P., Wagner, E.G.H., Nordstrom, K., 1990. Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically in vivo and in vitro by RNase III. *EMBO J.* 9, 2331–2340.
- Brantl, S., 2002. Antisense RNAs in plasmids: control of replication and maintenance. *Plasmid* 48, 165–173.
- Burgos, P.A., Velázquez, E., Toro, N., 1996. Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 843–849.
- Casadesús, J., Olivares, J., 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 174, 203–209.
- Corvera, A., Promé, D., Promé, J.C., Martínez-Romero, E., Romero, D., 1999. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 236–246.
- d’Aubenton-Carafa, Y., Brody, E., Thermes, C., 1990. Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators: a statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.* 216, 835–858.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–464.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mijer, 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., Hagius, 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.
- Franch, T., Gerdes, K., 2000. U-turns and regulatory RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 159–164.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X., 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387, 394–401.

- Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruthers, M.H., Neilson, T., Turner, D.H., 1986. Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9373–9377.
- Fuhrmann, S., Ferner, M., Jeffke, T., Henne, A., Gottschalk, G., Meyer, O., 2003. Complete nucleotide sequence of the circular megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*: function in the chemolithoautotrophic utilization of CO₂, H₂ and CO₂. *Gene* 322, 67–75.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Iordanescu, S., 1983. *Staphylococcus aureus* chromosomal mutation specifically affecting the copy number of Inc3 plasmids. *Plasmid* 10, 130–137.
- Ito, W., Ishiguro, H., Kurosawa, Y., 1991. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* 102, 67–70.
- 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.
- Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D., Trollinger, D., 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70, 191–197.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., Peterson, K.M., 1995. Four new derivatives of the broad-host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.
- Leng, F., McMacken, R., 2002. Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9139–9144.
- 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.
- MacLellan, S.R., Smallbone, L.A., Sibley, C.D., Finan, T.M., 2005. The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large *repABC* family of α -proteobacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 55, 611–623.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., Ausubel, F.M., 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149, 114–122.
- Mercado-Blanco, J., Olivares, J., 1993. Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4. *Arch. Microbiol.* 160, 477–485.
- Mercado-Blanco, J., Olivares, J., 1994a. A protein involved in stabilization of a large non-symbiotic plasmid of *Rhizobium meliloti* shows homology to eukaryotic cytoskeletal proteins and DNA-binding proteins. *Gene* 39, 133–134.
- Mercado-Blanco, J., Olivares, J., 1994b. The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid* 32, 75–79.
- Nishiguchi, R., Takamami, M., Oka, A., 1987. Characterization and sequence determination of the hairy root inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.* 206, 1–8.
- Noel, D.K., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., Cevallos, M.A., 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertion. *J. Bacteriol.* 158, 148–155.
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51, 381–395.
- Novick, R.P., Iordanescu, S., Projan, S.J., Kornblum, J., Edelman, I., 1989. plasmid replication is regulated by a counter-transcript-driven transcriptional attenuator. *Cell* 59, 395–404.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357–358.
- Pappas, K.M., Winans, S.C., 2003a. A 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., Winans, S.C., 2003b. 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.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 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.
- Soberón, N.E., Venkova-Canova, T., Ramírez-Romero, M.A., Cevallos, M.A., 2004. Incompatibility and the partitioning

- site of the *repABC* basic replicon of the symbiotic plasmid from *Rhizobium etli*. *Plasmid* 51, 203–216.
- Suzek, B.E., Ermolaeva, M.D., Schreiber, M., Salzberg, S.L., 2001. A probabilistic method for identifying start codons in bacterial genomes. *Bioinformatics* 17, 1123–1130.
- Suzuki, K., Ohta, N., Hattori, Y., Uraji, M., Kato, A., Yoshida, K., 1998. Novel structural difference between nopaline- and octopine-type *trbJ* genes: construction of genetic and physical map and sequencing of *trbI/trbA* and *rep* gene clusters of a new Ti plasmid pTi-SAKURA. *Biochim. Biophys. Acta* 1396, 1–7.
- 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.
- Tomizawa, J., 1984. Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell* 38, 861–870.
- Turner, S.L., Young, J.P.W., 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8J1. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 53–58.
- Uhlin, B.E., Nordström, K., 1978. A runaway-replication mutant of plasmid R1drd-19: temperature-dependent loss of copy number control. *Mol. Gen. Genet.* 165, 167–179.
- Venkova-Canova, T., Patek, M., Nesvera, J., 2003. Control of *rep* gene expression in plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 185, 2402–2409.
- Venkova-Canova, T., Soberón, N.E., Ramírez-Romero, M.A., Cevallos, M.A., 2004. Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure. *Mol. Microbiol.* 54, 1431–1444.
- Villadas, P.J., Velázquez, E., Martínez-Molina, E., Toro, N., 1995. Identification of nodule-dominant *Rhizobium meliloti* strains carrying pRmeGR4b-type plasmid within indigenous soil populations by PCR using primers derived from specific DNA sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17, 161–168.
- 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-Microb. Interact.* 3, 9–17.
- Wilson, K.J., Huges, S.G., Jefferson, R.A., 1992. The *Escherichia coli* *gus* operon, induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In: Gallagher, S.R. (Ed.), *GUS Protocols, Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 7–23.
- Zhang, Y., Pohlmann, E.L., Ludden, P.W., Roberts, G.P., 2001. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. *J. Bacteriol.* 183, 6159–6168.
- 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.

DISCUSIÓN

En este trabajo delimitamos el replicador mínimo del plásmido RmeGR4a de *S. meliloti*. Los elementos que componen al replicador son dos: un gen *repC* cuyo producto proteico es un factor limitante para la replicación y un RNA antisentido que tiene una secuencia complementaria al RNA mensajero *repC* y tiene un efecto negativo sobre la expresión de RepC.

La organización de la familia de replicadores *repC* se conserva en los

replicadores analizados ((pRmeGR4a, pRmeGR4b y pRtr299) (figura 10) y en uno de los dos replicadores básicos del pTAV1 de *Paracoccus versutus* (Bartosik et al., 1997). En otros trabajos se han reportado plásmidos de esta familia en cepas de *R. tropici*, *S. meliloti*, *S. fredii*, *P. versutus* y *P. pantotrophus* distribuidos en suelos de Europa y América (Burgos et al., 1996 y Bartosik et al., 2002), lo que es prueba de su amplia distribución.

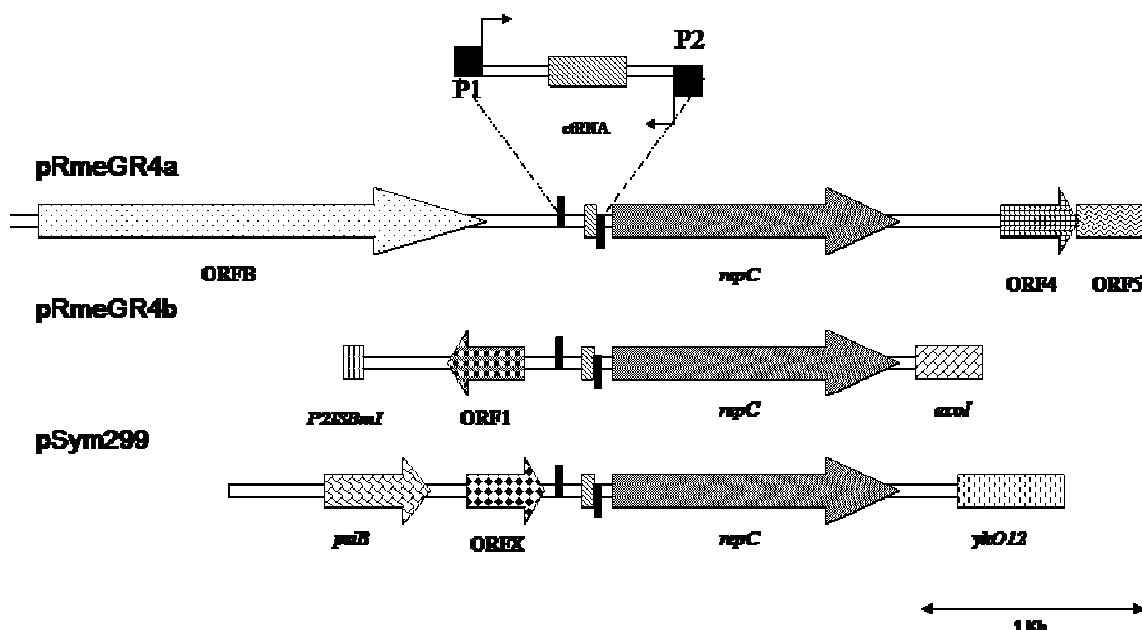


Figura 10.- Representación esquemática de las regiones de replicación de los plásmidos RmeGR4a, RmeGR4b de *S. meliloti* GR4 y del pSym299 de *R. tropici*.

El gen *repC* y el RNA antisentido son genes ortólogos presentes en los plásmidos de la familia *repABC*. En el caso del pRetCFN42d, los autores encuentran por análisis computacional, una estructura secundaria tipo tallo asa en el RNA mensajero *repABC* que oculta el SD de *repC* a la que llamaron elemento S. Por análisis experimentales se demostró que esta estructura, es un regulador negativo de la transcripción de *repC* pero se requiere para la replicación y se sugiere que puede codificar un posible elemento que ayude a la traducción de *repC* (Venkova-Canova, *et al.*, 2004). En los tres replicadores aislados en este trabajo, no se encontró ninguna secuencia que recuerde al elemento S presente en el plásmido pRetCFN42d, Sin embargo, en el RNA mensajero *repC* del pRmeGR4a, encontramos una estructura secundaria (SIV) que oculta al SD *repC* (figura 5 del artículo) que también pudiera ser un elemento de regulación negativa para la

expresión de *repC*. Por otra parte en el caso del plásmido Ti, los autores proponen que el RNA antisentido se une a su región complementaria en el RNA mensajero *repABC*, esta interacción, favorece que se forme una estructura tipo tallo asa que pudiera ser un terminador transcripcional Rho independiente, en ausencia del RNA antisentido, el terminador transcripcional no se forma y *repC* se puede traducir (Chai y Winans, 2005). El RNA líder del mensajero *repC*, no forma una estructura parecida a la que se reportó para el pTi, tampoco existe un “poly U” característicos de los terminadores transcripcionales independientes de Rho.

La similitud entre los sistemas de los plásmidos antes mencionados es, sin duda, que en los RNA mensajeros se forma una estructura tipo tallo asa que oculta el SD del gen para la proteína de inicio

El mecanismo de acción del RNA antisentido no queda claro. Como se comenta en la discusión del artículo existen varias hipótesis que se pueden explorar para explicar su funcionamiento. Aquí se proponen dos hipótesis adicionales. La primera es que el RNA líder mensajero pudiera estructurarse diferente dependiendo de la presencia o ausencia del RNA antisentido. Para ello, se realizó un análisis *in silico* del RNA líder del mensajero *repC* del plásmido RmeGR4a. Con base a este análisis, sugerimos que en ausencia del RNA antisentido el líder mensajero *repC* adquiere una estructura secundaria que deja al SD libre para que el ribosoma pueda unirse e iniciar el proceso de traducción (figura 11A). En el caso de que el RNA antisentido se una al RNA líder del mensajero *repC*, éste adquiere una estructura secundaria diferente que oculta al SD de *repC* y con ello impide que el ribosoma se una al SD (figura

11B), con esta visión, el papel del RNA antisentido sería un regulador negativo por impedir que *repC* se traduzca. A diferencia del modelo propuesto para el pTi de *A.tumefaciens* (Chai y Winans, 2005), la regulación se controlaría a nivel de la traducción.

La segunda hipótesis, surge a partir de la observación de la distancia que existe entre la estructura SIV (figura 5 del artículo) y el sitio de acción del RNA antisentido, lo que hace posible que ahí pueda codificarse un pequeño péptido que pudiera favorecer por traducción acoplada la traducción de *repC* como se ha sugerido en otros sistemas (Brantl 2002b, Olsson *et al.*, 2004). En esta línea, nosotros hicimos una inspección de la región líder del RNA mensajero *repC* y encontramos la presencia de un ORF de 55 a.a. El probable SD (GGGG) y el posible codón de inicio de traducción (AUA) sobrelapan la región

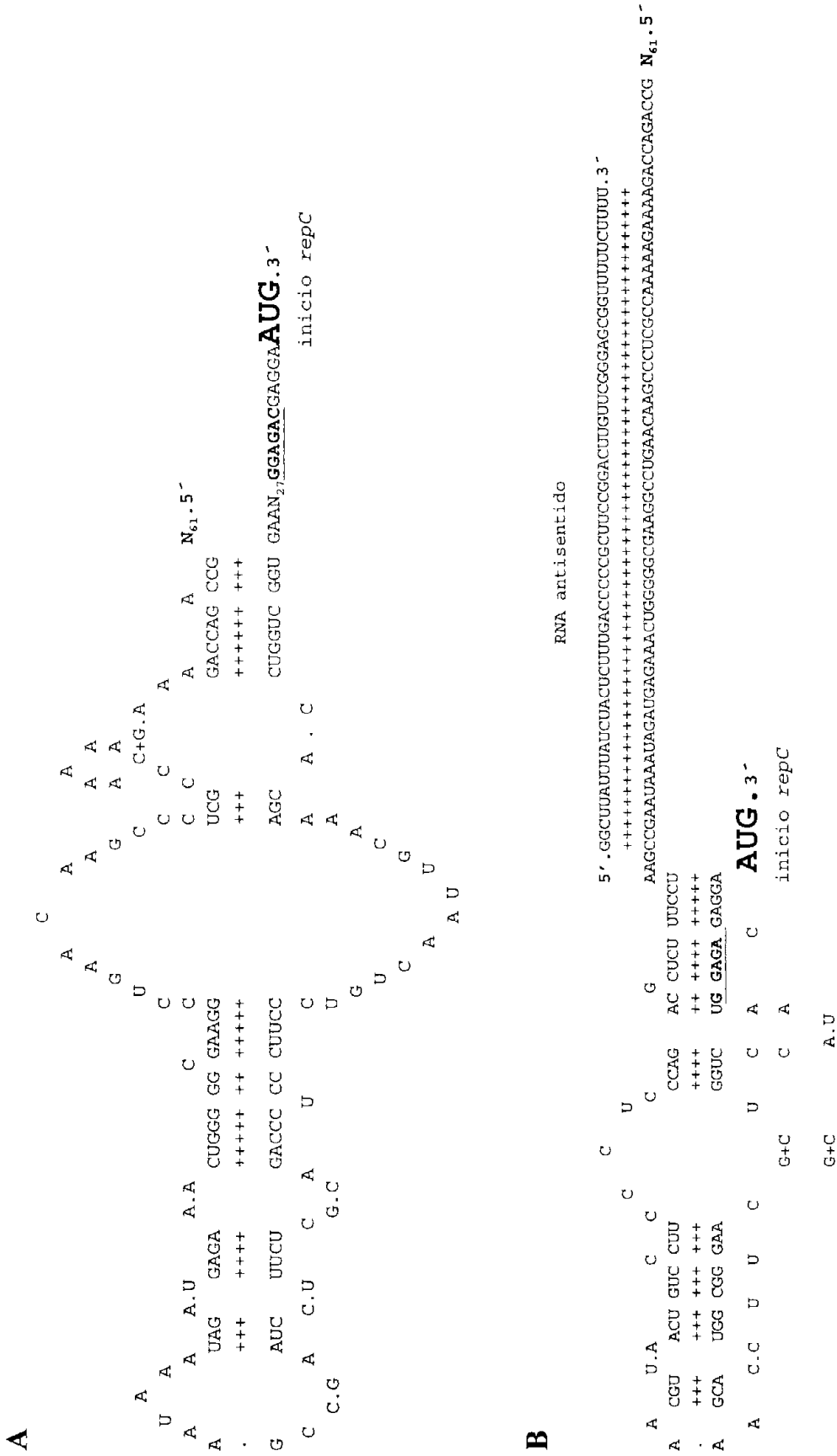


Figura 11.- Modelo computacional de las estructuras alternativas del RNA mensajero líder repC en presencia y ausencia del RNA antisentido. Para detalles ver el texto.

complementaria del RNA antisentido. El codón de término se localiza a 43 pb río abajo del codón de inicio de traducción *repC*. Si esta hipótesis es cierta, el mecanismo de acción pudiera ser que el RNA antisentido regule la traducción del péptido líder y con ello indirectamente la traducción de *repC*, como en el caso del sistema *cop* del plásmido R1 (Brantl 2002b, Olsson *et al.*, 2004) (figura 12).

Los plásmidos de la familia *repABC*, están compuestos por dos módulos: el módulo de replicación y el módulo de partición. En el caso de los plásmidos de la familia *repC*, carecen del módulo de partición, sin embargo, son muy estables. Se desconoce el mecanismo por el cual esta familia de plásmidos es muy estable,. Una posibilidad es que dentro del replicador básico exista un sitio *par* que sea reconocido por una proteína de partición codificada en otro replicón que funcione en *trans*. Sin embargo, es

necesario hacer experimentos al respecto para comprobar esta hipótesis

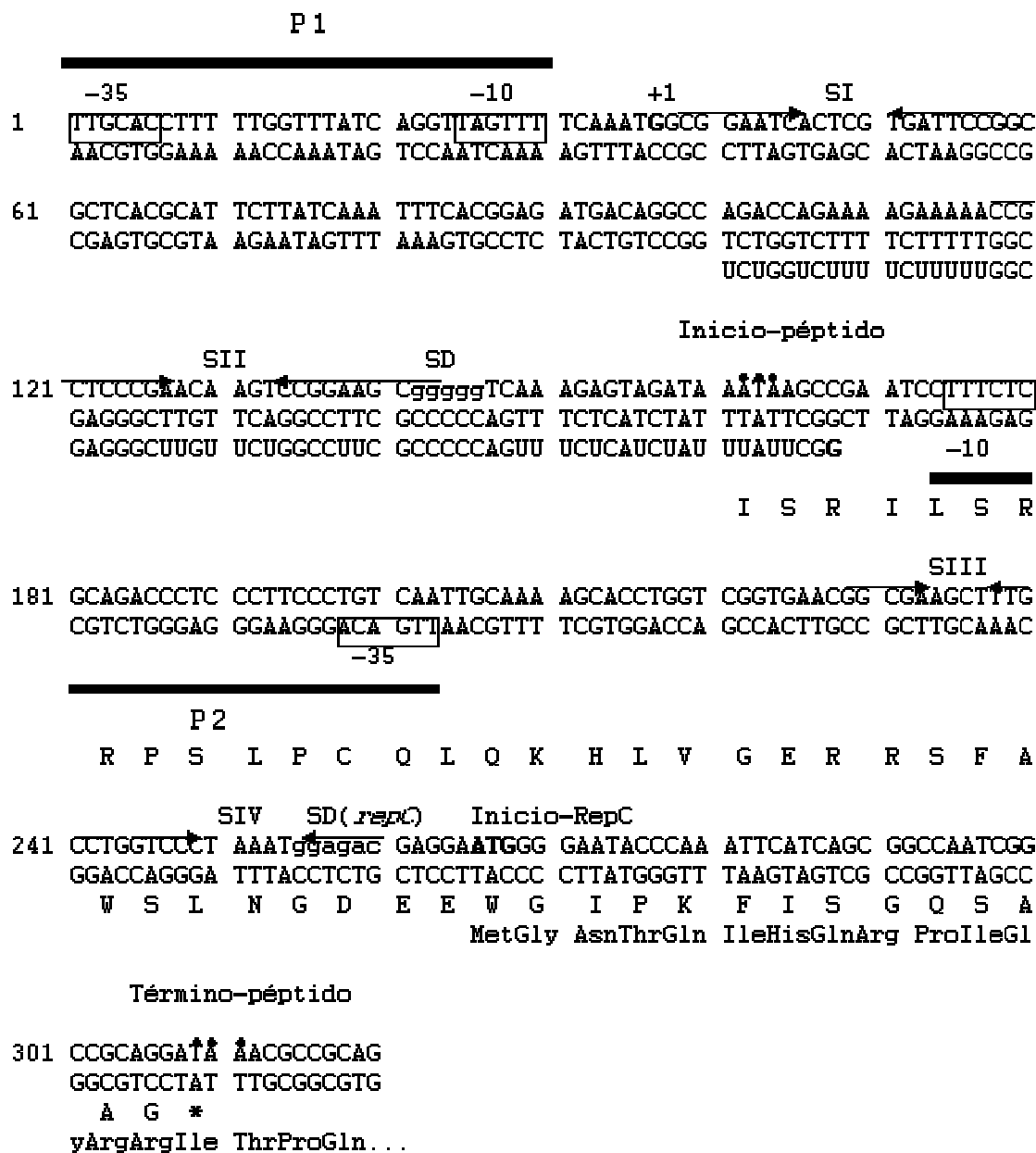


Figura 12.- Análisis de secuencia de la región líder del RNAmensajero *repC* del pRmeGR4a.

PERSPECTIVAS

Como se mencionó en la discusión, es posible que en la región líder del RNA mensajero-*repC* exista un péptido líder cuya regulación postranscripcional se controle por el RNA antisentido (figura 9). Para probar ésta hipótesis, nosotros proponemos hacer una mutación puntual en el ORF del probable péptido para generar un codón de término prematuro sin alterar ninguna de las estructuras secundarias (SIII y SIV). Si esta mutación puntual altera el fenotipo de replicación, es posible que el péptido sea verdadero. Posteriormente proponemos la construcción de fusiones traduccionales para identificar si la regulación del péptido ésta dada a nivel postranscripcional.

Por otra parte, es importante conocer si el blanco del RNA antisentido es la estructura II (SII), para ello, se pueden

hacer dos tipos de experimentos: el primero un ensayo de hibridación RNA-RNA (*Western blot*). El segundo, mutantes supresoras, para ello, se propone generar mutantes en el RNA antisentido que no causen incompatibilidad. Posteriormente, se plantea, hacer mutantes supresoras en el replicador básico que restauren la incompatibilidad, esto nos indicaría donde están los sitios de interacción de ambos RNAs.

Otro aspecto interesante de abordar es la estabilidad del replicador básico del pRmeGR4a,

Una posibilidad sería conjugar al replicador básico, en diferentes cepas de *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium* para descartar la posibilidad de que algún replicón, suministre en *trans* una proteína de partición. Otra posibilidad es identificar

por microscopía de fluorescencia la posición del plásmido durante el ciclo celular y observar si éste plasmido posee un sistema de partición activa como se ha

demostrado en plásmidos de la familia *repABC* de bacterias de los géneros *Agrobacterium* y *Sinorhizobium* (Kahng y Shapiro, 2003).

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., Snyder, K.M., Chatteraj, D.K. (1984) P1 plasmid replication: replication structure. *J. Mol. Biol.* 173:307-324.
- *Acebo, P., M., Alda, T., Espinosa, M., del Solar, G. (1996) Isolation and characterization of pLS1 plasmid mutants with increased copy numbers. *FEMS Microbiol. Lett.* 140:85–91.
- *Amabile-Cuevas, C.F., Chicurel, M.E. (1992) Bacterial Plasmids and gene flux. *Cell* 70:189-1999.
- *Asano, K., Kato, A., Moriwaki, H., Hama, C., Shiba, K., Mizobuchi, K.A. (1991) Positive and negative regulations of plasmid Collb-P9-*repZ* gene expression at the translational level. *J. Biol. Chem.* 266, 3774–3781.
- *Asano, K., Mizobuchi, K. (2000) Structural analysis of late intermediate complex formed between plasmid Collb-P9 Inc RNA and its target RNA. How does a single antisense RNA repress translation of two genes at different rates? *J. Biol. Chem.* 275, 1269–1274.
- *Austin, S., Abeles, A. (1985) The partition functions of P1, P7 and F miniplasmids, p. 215-226. *In* D. R. Helinski, S. N. Cohen, D.B. Clewell, D.A. Jackson y Hollaender (ed), *Plasmids in bacteria*. Plenum Publishing Corp., New York.
- *Austin, S., Nordstron, K. (1990) Partition-Mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell.* 60: 351-354.
- *Barilla` D, Hayes F. (2003) Architecture of the ParF–ParG protein complex involved in procaryotic DNA segregation. *Mol Microbiol.* 49: 487–499.
- *Barilla` D, Rosenberg, M., Nobbmann, U., Hayes, F. (2005) Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF. *EMBO.* 24: 1453-1464.
- *Barran, L.R., Ritchot, N., Bromfield, E. S. (2001) *Sinorhizobium meliloti* plasmid pRm1132f replicates by a rolling-circle mechanism. *J. Bacteriol.* 183, 2704-2708.
- *Bartosik, D., Baj, J., Piechuka, E., Waker, E., Wlodarczyk, 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 partitioning site within the *repABC*-type replicon of the composite *Paracoccus versutus* plasmid pTAV1. *J. Bacteriol.* 183, 6234–6243.
- *Bartosik, D., Wlodarczyk, M. 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.

- *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 plasmid. *Plasmid*. 48: 130-141.
- *Bignell, C., Thomas, C. M. (2001) The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J. Bacteriol.* 91: 1-34.
- *Blakely, G., Colloms, S., May, G., Burke, M. Y Sherratt, D. (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation and cell division. *New Biologist*. 3:789-798.
- *Bramhill, D., Kornberg, A. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54:915-918.
- *Brantl, S., Birch-Hirschfeld, E., Behnke, D. (1993) Rep protein expression on plasmid pIP501 is controlled by an antisense RNA-mediated transcription attenuation mechanism. *J. Bacteriol.* 175:4052–4061.
- *Brantl, S. (2002a). Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim. Biophys. Acta.* 1575, 15–25.
- *Brantl, S. (2002b) Antisense RNAs in plasmids: control of replication and maintenance. *Plasmid*. 48: 165-173.
- *Brendler, T., Abales, A., Austin, S. J. (1991) Critical sequences in the core of the P1 plasmid replication origin. *J. Bacteriol.* 173:3935-3942.
- *Bouet, J. Y., Funell, B. E. (1999) P1 ParA interacts with the P1 partition complex at *parS* and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *The EMBO Journal*. 18: 1415-1424.
- *Burian, J., Stuchlík, S., Kay, W.W. (1999) Replication control of a small cryptic plasmid of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 294:49-65.
- *Burgos, P.A., Velázquez, E., Toro, N. (1996) Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in rhizobia. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 843–849.
- *Chattoraj, D. K., 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.
- *Cesareni, J. L., Helmer-Citterich, M., Castagnoli, L. (1991) Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* 7: 230-235.
- *Chai, Y., Winans, S. C. (2005) A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Molecular Microbiol.* 56: 1574-1585.
- *del Solar, G., Espinosa, M. (1992) The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein RepA. *Mol. Microbiol.* 6:83–94.
- *del Solar, G., Espinosa, M. (2000) Plasmid copy number control: an ever-

growing story MicroReview. Mol. Microbiol. 37: 492-500.

*del Solar, G., Moscoso, M., Espinosa, M. (1993) Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and -negative bacteria: a wall falls. Mol. Microbiol. 8:789-796.

*del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echeverria, M. J., Espinosa, M., Díaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. Microb. and Mol. Biol. Rev. 62:434-464.

*del Solar, G., Acebo, P., Espinosa, M. (1995) Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. Mol. Microbiol. 18:913-924.

*DeVecchio, 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. USA. 99: 443-448.

*Ebersbach, G., Gerdes, K. (2004) Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. Molecular Microbiol. 52: 385-398.

*Eguchi, Y., Itoh, T., Tomizawa, J. (1991) Antisense RNA. Annu. Rev. Biochem. 60, 631-652.

*Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. Science. 28:496-512.

*Franch, T., Gerdes, K. (2000) U-turns and regulatory RNAs. Curr. Opin. Microbiol. 3: 159-164.

*Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R.A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelly, J. M. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalum*. Science. 20: 397-403.

*Friedman, S. A., Austin, S. J. (1988) The P1 plasmid partition system synthesizes two essential proteins from one autoregulated operon. 19: 103-112.

*Fuhrmann, S., Ferner, M., JeVke, T., Henne, A., Gottschalk, G., Meyer, O. (2003) Complete nucleotide sequence of the circular megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*: function in the chemolithoautotrophic utilization of CO, H₂ and CO₂. Gene 322, 67-75.

*Funnell, B. E., Phillips, G. J. (2004) Plasmid biology. ASM press, Washintong D.C. Pp 25-105.

*García-de los Santos, A., Brom, S., Romero, D. (1996) *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. Wordl. J. of Microbiol. And Biotech. 12: 119-125.

- *Gerdes, K. (2000) Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol.* 182: 561-572.
- *Gerdes, K., Moller-Jensen, J., Ebersbach, G., Kruse, T., Nordström, K. (2003) Bacterial Mitotic Machineries. *Cell.* 116: 359-366.
- *Hashimoto-Gotoh, T., 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., 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., Novick, R. P. (1996) Replication control and other stable maintenance mechanism of plasmid. *Escherichia coli* and *Salmonella*, Washington DC: American Society of Microbiology Vol2 pp2295-2324
- *Herrera-Cervera, J., Olivares, J., Sanjuan J. (1996) Ammonia inhibition of plasmid pRmeGR4a conjugal transfer between *Rhizobium meliloti* strains. *App. Env. Microbiol.* 62 :114-1150
- *Hiraga, S. (1992) Chromosome and plasmid partition in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 61:283-306.
- *Honeycutt, R. J., McClelland, M., Sobral, B. W. (1993) Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* 175: 6945-6952.
- *Jensen, R. B. y Gerdes, K. (1999) Mechanism of DNA segregation in prokariotes: ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicon during the cell cycle. *The EMBO Journal.* 18: 4076-4084.
- *Johnson, E. P., Ström, A. R., 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.
- Kahng, L.S., Shapiro, L. (2003). Polar localization of replicon origins in the multipartite genomes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 185: 3384-3391.
- *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., Kim, K., Meyer, R. J. (1985) Copy number of the broad host-range plasmid R1162 is determined by the amount of essential plasmid-encoded proteins. *J. Mol. Biol.* 185:755-767.
- *Kline, B.C. (1985) A review of Mini-F plasmid maintenance. *Plasmid* 14: 1-16.
- *Kornberg, A. y T. Baker 1992. DNA replication. W.H. Freeman & Co. New York, N.Y.

- *Li, P. L., 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. USA.* 92:1896-1900.
- *MacLellan, S.R., Smallbone, L.A., Sibley, C.D., Finan, T.M. (2005) The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large *repABC* family of α -proteobacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 55, 611–623.
- *Margolin, W., Long, S, R. (1993) Isolation and characterization of DNA replication origin from the 1700 kilobases-pair symbiotic megaplasmid pSym of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 175: 6553-6561.
- *Mazaitis, A. J., Mass, R., Maas, W.K. (1981) Structure of a naturally occurring plasmid with genes for enterotoxin production and drug resistance. *J. Bacteriol.* 145: 97-105.
- *Mercado-Blanco, J., Olivares, J. (1993) Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4. *Arch. Microbiol.* 160, 477–485.
- *Mercado-Blanco, J., Olivares, J. (1994a) A protein involved in stabilization of a large non-symbiotic plasmid of *Rhizobium meliloti* shows homology to eukaryotic cytoskeletal proteins and DNA-binding proteins. *Gene* 39: 133–134.
- *Mercado-Blanco, J., Olivares, J. (1994b) The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid* 32, 75–79.
- *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.
- *Møller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Roepstorff, P., Gerdes, K. (2003). Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol. Cell* 12, 1477–1487.
- *Murotsu, T., Matsubara, K. (1980) Role of an autorepression system in the control of lambda dv plasmid copy number and incompatibility. *Molec. Gen. Genet.* 179:509-519.
- *Nishiguchi, R., Takanami, M., Oka, A. (1987) Characterization and sequence determination of the hairy root inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.* 206, 1–8.
- *Novik, R.P. (1987) Plasmid Incompatibility *Microbiol. Rev.* 51:381-395.
- *Novik, R.P., Alder, G. K., Projan, S. J., Carleton, S., Highlander, S., Gruss, A., Khan, S. A., Jordanescu, 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.

*Novik, R. P. (1989) Staphylococcal plasmid and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:537-565.

*Olsson, J., Paulsson, J., Nordström, J. (2004) Effect of the CopB auxiliary replication control system on stability of maintenance of Par⁺ plasmid R1. *J. Bacteriol.* 186: 207-211.

*Pappas, K. M., Winans, S. C. (2003a) 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., Winans, S. C. (2003b) 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., 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., 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.

*Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Deppenmeier, U. (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter*. *Nat. Biotechnol.* 23:195-200

*Projan, S.J., Novick, R.P. (1986) Incompatibility between plasmids with independent copy control. *Mol. Gen. Genet.* 204: 341-348.

*Ramirez-Romero, M.A., Soberón, N., Perez-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.

*Ramirez-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.

*Ratnakar, P. Mohanty, B. K., Lobert, M., Bastia, D. (1996) The replication initiator protein of the plasmid R6K specifically interacts with the host-encoded helicase DnaB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93. 5522-26.

*Sakai, H., y T. Komano (1996) DNA replication of the IncQ broad-host-range plasmid in gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:39-71

- *Sambrook, j., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, N.Y..
- *Shafferman , A., Stalker, D.M., Tolun, A., Kolter, R., 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.
- *Soberón, N.E., Venkova-Canova, T., Ramírez-Romero, M.A., Cevallos, M.A. (2004) Incompatibility and the partitioning site of the *repABC* basic replicon of the symbiotic plasmid from *Rhizobium etli*. Plasmid 51: 203–216.
- *Summers,D. K. (1996) The biology of plasmids. Pp 1-91. Blackwell Science, Inc., USA.
- *Summers, D.K., Sherratt, D. J. (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability. Cell 36: 1097-1103.
- *Suzuki, K., Ohta, N., Hattori, Y., Uraji, M., Kato, A., Yoshida, K. (1998) Novel structural diVerence between nopaline- and octopine-type *trbJ* genes: construction of genetic and physical map and sequencing of *trb/traI* and *rep* gene clusters of a new Ti plasmid pTi-SAKURA. Biochim. Biophys. Acta 1396, 1–7. the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. Mol. Plant-Microb. Interact. 3: 9–17.
- *Tabata, S., Hooykaas, P.J.J.,Oka, A. (1989) Sequence determination and caracterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. J. Bacteriol. 171: 1665-1672.
- *Tanaka, T., Ishida, H., Maehara, T. (2005) Characterization of the region of plasmid pLS32 from the natto strain of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 187: 4315-4326.
- *Timmis, K., Andres, L., Slocombe, P. (1978) Plasmid incompatibility: cloning of an IncFII determinant of R6-5 Nature (London) 71: 4556-4560.
- *Tolmasky , M.E., Actis, L.A., Crosa J.H. (1992) Replication of DNA. Enc. Microbiol 3: 431-442
- *Tomizawa, J., Itoh, T. (1981) Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6096-6100.
- *Toro, N., Olivares, J. (1986) Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. Mol. Gen. Genet.202:331-335.
- *Tougu, K., Peng, H., Marians, K.J. (1994) Identification of a domain of *Escherichia coli* primase requerid for functional interaction with the DnaB helicase at the replication fork. J. biological chemistry. 269:6, 4675-82.

*Tsutsui, H., Fujiyama, A., Murotsu, T., 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. Bacterio.* 155:337-334.

cryptic plasmids from the marine bacterium *Ruegeria* isolate PR1b. *Plasmid.* 49:233-252.

*Venkova-Canova, T., Soberón, N.E., Ramírez-Romero, M.A., Cevallos, M.A. (2004) Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure. *Mol. Microbiol.* 54, 1431–1444.

*Wagner, E.G., Simons, R. W. (1994) Antisense RNA control in bacteria, phages and plasmids. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 713-742.

*Weaver, K., Ehli, E. A., Nelson, J. S., Patel, S. (2004). Antisense RNA regulation by stable complex formation in the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 *par* addiction system. *J. Bacteriol.* 186: 6400-6408.

*Wilson, I.W., Praszker, J., Pittard, A.J. (1993). Mutations affecting pseudoknot control of the replication of B group plasmids. *J. Bacteriol.* 175: 6476–6483.

*Zahran H. H. (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotech.* 91: 143-153.

*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

ANEXO



ACADEMIC
PRESS

Plasmid 48 (2002) 104–116

PLASMID

www.academicpress.com

Rhizobium etli CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis

Miguel A. Cevallos,^{a,*} Helena Porta,^c Javier Izquierdo,^a
Cristina Tun-Garrido,^b Alejandro García-de-los-Santos,^b
Guillermo Dávila,^a and Susana Brom^b

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

^b Programa de Genética molecular de plásmidos bacterianos, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México

^c Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, México

Received 21 September 2001, revised 5 June 2002

Abstract

In this paper, we report the identification of replication/partition regions of plasmid p42a and p42b of *Rhizobium etli* CFN42. Sequence analysis reveals that both replication/partition regions belong to the *repABC* family. Phylogenetic analysis of all the complete *repABC* replication/partition regions reported to date, shows that *repABC* plasmids coexisting in the same strain arose most likely by lateral transfer instead of by duplication followed by divergence. A model explaining how new incompatibility groups originate, is proposed. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: *repABC* plasmid; Plasmid evolution; *Rhizobium etli*; Incompatibility

1. Introduction

Rhizobium etli is a soil bacterium with the ability to recognize and induce nitrogen-fixing nodules on bean plant roots. Most of the genes involved in this symbiotic interaction reside on a large plasmid of low copy number called the symbiotic plasmid or pSym. This plasmid may coexist with up to 10 large “cryptic” plasmids

(García-de los Santos et al., 1996). Beside the pSym (p42d), *R. etli* CFN42 contains five other plasmids, of which p42b is also indispensable for nodulation (García-de los Santos and Brom, 1997). Some of the other plasmids have a role in the symbiotic process: cured derivatives of plasmid p42c or p42f and large deletions of p42e are drastically affected in competitiveness for nodulation (Brom et al., 1992, 2000). The six plasmids of *R. etli* CFN42 are able to replicate in *Agrobacterium* but one of them (p42a) exhibits incompatibility towards pTiC58, an *Agrobacterium* plasmid harboring pathogenicity determinants

* Corresponding author. Fax: +011-7773-11-46-63.

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

(García-de los Santos and Brom, 1997). This is not an exceptional case since incompatibility has been observed previously between *Rhizobium* and *Agrobacterium* plasmids (Hooykaas et al., 1985; O'Connell et al., 1987).

Recently, the complete sequence of several basic replicons of the Rhizobiaceae family have been reported, most of them belonging to the emerging *repABC* family (see Table 1). The *repABC* plasmids are characterized by the presence of three genes, *repA*, *repB*, and *repC* encoded in the same DNA strand, and by the presence of a conserved large intergenic sequence between the *repB* and *repC* genes (Fig. 1). A genetic analysis of the replication/partition region of the *R. etli* Sym plasmid showed that the *repA*, *B*, and *C* genes are organized as an operon (Ramírez-Romero et al., 2000). The *repA* and *repB* products, which are homologous to the A and B proteins of the *sop/par* partition system of F and P1 plasmids, are involved in the partitioning of the pSym plasmid and in the regulation of plasmid copy number. RepC is essential for replication and is considered to be the initiator protein (Bartosik et al., 1998; Ramírez-Romero et al., 2000; Tabata et al., 1989).

The *repABC* family is not limited to the Rhizobiaceae, since a new *repABC* plasmid (pTAV320) was recently isolated from *Paracoccus versutus* which is a member of the Rhodobacter group (Bartosik et al., 1998).

Two *cis*-acting incompatibility sites in the same relative positions have been described for the Sym plasmid of *R. etli* and for pTAV320 of *P. versutus*. One site is located in the intergenic sequence between *repB* and *repC* genes (*inc α* or *inc1*), and the other within the first 500 bp downstream of *repC* (*inc β* or *inc2*). Additionally, RepA has been identified as a *trans*-acting incompatibility factor in both plasmids (Bartosik et al., 2001; Ramírez-Romero et al., 2000).

Two lines of evidence demonstrate that *repABC* plasmids embrace more than one incompatibility group. First, hybridization studies indicate that some Rhizobia strains contain more than one *repABC* plasmid (Rigottier-Gois et al., 1998). Second, the analysis of genome sequences of three members of the Rhizobiaceae family shows that they encompass more than one replicon of the *repABC* type (Galibert et al., 2001; Goodner et al., 2001; Kaneko et al., 2000). In accordance here, we show that plasmids p42a and p42b of *R. etli* CFN42 belong to the *repABC* family.

To explain how new incompatibility groups arise within the same plasmid family, two alter-

native models can be suggested. In brief, The first model propose that plasmids of the same family but of different incompatibility groups arise within the same strain through the formation of a bireplicon intermediary containing two replication regions of the same incompatibility group. In this form, one of the replication systems of the bireplicon can change, until a functional new incompatibility group emerges, without risking other plasmid-encoded functions. Later, the bireplicon would be resolved into two plasmids of the same plasmid family but belonging to different incompatibility groups (Sykora, 1992). The second model proposes that in the first stage, two strains containing the same plasmid evolve independently. Changes in the plasmid sequences involved in replication and/or partition generate different incompatibility groups by divergent evolution. Next, a plasmid of one of these strains is mobilized to another strain already containing its own member of the involved plasmid family. The resident plasmid and the incoming plasmid can then coexist without interference.

The phylogenetic analysis of the collection of 17 sequenced members of the *repABC* family gives the opportunity to discriminate between the two models. This collection includes different incompatibility groups and, most important, it includes the replication/partition sequences of four strains with more than one *repABC* replicon. These plasmids and strains are: plasmids p42a, p42b, and p42d of *R. etli*; plasmids pTiC58, pAtC58, and the linear chromosome of *A. tumefaciens* C58; plasmids pSyma and pSymb of *S. meliloti* 1021; and plasmids pMLa and pMLb of *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (see Table 1).

To determine which of the models outlined above describes more realistically the evolution of the *repABC* plasmids, phylogenetic trees of each of the *repABC* products were constructed and their topologies compared. In summary, if the proteins of plasmids belonging to one strain (and for this reason, of different incompatibility group) form a tight cluster it indicates that the replication regions of those plasmids originated in the same strain or in closely related strains. This tree topology would support the first model described here (the bireplicon intermediary model). In contrast, if the proteins of plasmids of the same strains do not share the same cluster, and at the same time plasmids belonging to the same incompatibility group are clustered together, this would indicate that the acquisition of the replication/partition regions of those plasmids was

Table 1
The *repABC* replicons which their replicator regions have been sequenced

Species	Replicon	Relevant characteristic	Neighbor genes		References
			At 5' end	At 3' end	
<i>A. tumefaciens</i>	pTiC58	Tumor-inducing plasmid	AGR_pTi_91 <i>traI</i>	AGR_pTi_97Y4CG	Li and Farrand (2000); Goodner et al. (2001)
	pTiB6S3	Nopaline-type	<i>traI</i>	"Probable DNA invertase"	Tabata et al. (1989); and AF242881*
	(pTi)-octopine type)	Tumor-inducing plasmid	<i>tiorf18 traI</i>	<i>tiorf22</i> probable DNA invertase	Suzuki et al. (2000)
	pTi-SAKURA	Octopine-type	<i>tiorf18 traI</i>	<i>tiorf22</i> probable DNA invertase	Suzuki et al. (2000)
<i>A. rhizogenes</i>	pAtC58	Tumor-inducing plasmid	AGR_pAT_816	AGR_pAT_5	Goodner et al. (2001)
	L C58	Nopaline-type	"hypothetical protein"	"AgaE homolog"	Goodner et al. (2001)
	pRiA4b	Linear chromosome	AGR_L_1841	AGR_L_1850	Goodner et al. (2001)
	pRiI 724	Root-inducing plasmid	"unknown protein"	"Hypothetical protein"	Nishiguchi et al. (1987)
<i>R. etli</i>	p42a	Root-inducing plasmid	"a4orf03"	"Hypothetical protein 128"	Nishiguchi et al. (1987)
	p42b	Agropine-type	<i>tiorf131 traI</i>	<i>tiorf135</i> weakly similar to y4aO in pNGR234a	Moriguchi et al. (2001)
	p42d	Mikimopine-type	<i>traI</i>	ND	This work
	pRL8JI	Cryptic plasmid	<i>orf1</i> "putative transcriptional regulator"	<i>lpsβ</i>	This work
<i>R. leguminosarum</i>	pMLa	Symbiotic plasmid	<i>TraI</i> (nonfunctional)	ND	Ramirez-Romero et al. (1997)
	pMLb	Cryptic plasmid	"Putative <i>trbB</i> "	"Putative napD"	Turner and Young (1995)
	pSymb	Symbiotic plasmid	<i>traI</i>	Y4cH "probable cold shock protein"	Freiberg et al. (1997)
	pSymb	Cryptic plasmid	mI9355 "unknown protein"	mI9350 "unknown protein"	Kaneko et al. (2000)
<i>S. meliloti</i>	pSymb	Cryptic plasmid	mI9655 "sensor histidine kinase of two component"	mI9651 "hypothetical protein"	Kaneko et al. (2000)
	pSymb	<i>nod-nif</i> plasmid	SMa002 "probable FdoG formate dehydrogenase-O ₂ α-subunit"	SMa2389 "putative stress induced protein Ohr"	Galibert et al. (2001)
	pSymb	Symbiotic plasmid b	SMB20047 "unknown protein"	SMB20043 "hypothetical protein"	Galibert et al. (2001)
	pTAV320	Cryptic plasmid	ND	"Putative plasmid stabilization protein"	Bartosik et al. (1998)

A. Agrobacterium; *R. Rhizobium*; *M. Mesorhizobium*; *S. Sinorhizobium*; *P. Paracoccus*

ND Not determined.

*GenBank accession number.

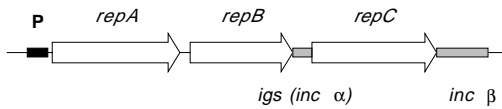


Fig. 1. Schematic representation of the replication/partition region of a *repABC* plasmid. The arrows represent the position of the *repA*, *repB*, and *repC* genes. Hatched boxes show the position of the two *cis*-incompatibility sites. Black box indicates the position of the promoter region of the *repABC* operon.

through horizontal transfer (separately diverging model).

In this paper, we show that the *repABC* plasmids contained in one strain are not closely related, indicating that the plasmids were acquired by lateral transfer from an unrelated strain or species.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983) and S17-1 (Simon et al., 1983) strains were grown at 37°C in Luria–Bertani medium. Two *recA* derivatives strains of *R. etli* CFN42 were utilized: CFNX101 a strain harboring p42d, and CFNX107 lacking plasmid p42d (Martínez-Salazar et al., 1991). These strains and their transconjugant derivatives were grown at 30°C in PY medium (Noel et al., 1984). Antibiotics were added at the following concentrations (in $\mu\text{g ml}^{-1}$): Nalidixic acid 20, kanamycin 30, chloramphenicol 25, carbenicillin 100.

2.2. Bacterial matings

pSUP202 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 phase, mixed in a donor: receptor, 1:2 ratio, 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. Plasmid profiles

High molecular weight plasmids were visualized by the procedure described by Wheatcroft et al. (1990).

2.4. Plasmid incompatibility assays

Plasmid pAO244 contains a 4.6 kb *Bam*HI–*Hind*III restriction fragment containing the replication/partition region of plasmid pRiA4b (Nishiguchi et al., 1987). This fragment was cloned into the transferable plasmid pRK7823 digested with the same enzymes (Jonathan and Gutterson, 1987), to generate plasmid pKRE244. To test if p42d and pRiA4b belong to the same incompatibility group, plasmid pKRE244 was introduced into *R. etli* CFNX101 by mating, using as plasmid donor an *E. coli* S17-1 (pKRE244) strain. The plasmid profiles of at least six transconjugants were analyzed for the presence or absence of plasmid p42d.

2.5. Plasmid replication in *R. etli*

A PCR product of 4.5 kb containing the replication/partition region of plasmid p42a was cloned in the *Bam*HI–*Hind*III sites of plasmid pSUP202 (Simon et al., 1983), a transferable vector incapable to replicate by itself in *R. etli*, to generate pH42a. Similar, a 13 kb *Bam*HI fragment containing the replication/partition region of plasmid p42b was introduced into the *Bam*HI site of plasmid pSUP202 to produce plasmid pH17-1. To determine the replication capabilities of these recombinant plasmids, they were introduced into CFNX107 by mating, using as plasmid donor an *E. coli* S17-1 (pH17-1) strain. A recombinant plasmid was considered to have the capability to replicate in *R. etli* if the plasmid profile of at least six transconjugants showed a new band of the expected size.

2.6. DNA manipulation

Plasmid and cosmid DNAs were isolated from *E. coli* DH5 α 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 described by Sambrook et al. (1989). Plasmids pBluescript II SK+ (Ampicillin resistant, Stratagene) and pBC SK+ (Chloramphenicol resistant, Stratagene) were utilized as vectors in subcloning experiments.

2.7. 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).

2.8. Bioinformatics

The predicted protein products of the *repABC* replication/partition regions were aligned after the elimination of the variable terminal and carboxy-terminal regions, using Clustal-W (Thompson et al., 1994) at the WWW Service of the European Bioinformatics Institute (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>). Unrooted trees were constructed using the maximum parsimony algorithm with bootstrap (1000 replicate trees) by the PAUPsearch program of the Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. Trees were drawn using the TREEVIEW program (Page, 1996).

3. Results and discussion

3.1. Isolation and nucleotide sequence of the replication/partition region of plasmid p42a

A cosmid library of plasmid p42a, constructed in a mobilizable vector able to replicate in *Rhizobium*, was mated into *R. etli* CFN42. A plasmid profile analysis of the transconjugant strains showed that two overlapping cosmids exhibited incompatibility towards endogenous plasmid p42a, indicating that they contained either *trans*-acting incompatibility factors or *cis*-acting targets sites for incompatibility determinants encoded in plasmid p42a.

Among other fragments both cosmids share three *EcoRI* bands of 1.27, 1.7, and 4.5 kb. These fragments were cloned in pBluescript II SK+ and the borders of each insert were sequenced. The complete DNA sequence of those fragments with similarity to the *repABC* genes was obtained, yielding 5427 bp of sequence (GenBank Accession No. AF311739). The sequenced region contains a complete set of the *repABC* genes, and an incomplete ORF, adjacent to *repA* but oriented in the opposite direction highly similar to the *traI* genes of the *Agrobacterium* tumor inducing plasmids (Hwang et al., 1994).

In the intergenic sequence between the *tra I* and *repA* of plasmid p42a, a *tra* box with the sequence CTTGTAGGATTCTACAAC was found, suggesting that the transcription of the *repABC* genes is influenced by the TraR-dependent

quorum-sensing system, as demonstrated for the *repABC* genes of *A. tumefaciens* plasmid pTiC58 (Li and Farrand, 2000).

The DNA region embraced between 247 bp upstream of the initial codon of *repA* and 500 nt downstream the stop codon of *repC* was amplified by PCR, and the product cloned into pSUP202 to generate plasmid pH42a. This recombinant plasmid was introduced into *R. etli* CFNX107. This plasmid had the capability of an independent replication indicating that it contains a functional replication region.

3.2. Isolation and nucleotide sequence of the plasmid p42b replicator/partition region

A *R. etli* CFN42 derivative lacking plasmid p42b is unable to synthesize wild-type lipopolysaccharides (LPS) and to nodulate bean roots (García-de los Santos and Brom, 1997). The wild type phenotype can be restored with plasmid pAGS10 which contains the *lpsβ1* and *lpsβ2* genes and an incomplete ORF highly similar to RepC proteins of other *repABC* plasmids (García-de los Santos and Brom, 1997). This result indicated that the replication/partition region of plasmid p42b probably is linked to the *lpsβ* locus (García-de los Santos and Brom, 1997).

To sequence the complete *repC* and its neighboring genes, a 4.2 kb *Sal I* fragment which hybridizes to a *repC* probe of plasmid pAGS10, was cloned in pBluescript II SK. The DNA sequence of this insert was determined and its analysis showed the presence of two complete ORFs with homology to the *repB* and *repC* genes of other *repABC* plasmids, as well as the 3' end of a *repA* gene. To complete the sequence of *repA* and its upstream regions, an overlapping *PstI* fragment was sequenced. Finally, a continuous DNA sequence of 4905 bp was assembled (GenBank Accession No. AF313446). This region contains a complete set of the *repABC* genes, and a fragment of an ORF with some identity to members of the PBSX (XRE) family of transcriptional regulators (Y4AM/Y4WC subfamily). The DNA sequence of the *repC* gene matches with the DNA sequence reported for the *repC* gene fragment of plasmid p42b.

A recombinant plasmid (pH17-1) containing a 13 kb *BamHI* fragment containing the p42b complete *repABC* operon was capable of independent replication when introduced into *R. etli* CFNX107, demonstrating that the insert of this plasmid carry a functional replication/partition region this plasmid.

The results described here demonstrate that at least three (p42a, p42b, and p42d) of the six plasmids of the *R. etli* CFN42 strain belong to the *repABC* family. A comparative analysis among the *repABC* genes from plasmids p42a, p42b, and p42d showed that the *repA* products have an identity ranging from 53 to 54%; *repB* products from 33 to 35%, and *repC* products from 49 to 59%. However, the *repA* upstream sequences (containing the promoter regions), and the *repC* downstream sequences (containing a *cis*-incompatibility region in plasmid p42d), did not show obvious similarities (Ramírez-Romero et al., 2001). The *repB*–*repC* intergenic sequences (igs) presented some conserved motifs, which are also

present in all the sequenced *repABC* regions (see Fig. 2) (Bartosik et al., 1998; Li and Farrand, 2000; Ramírez-Romero et al., 1997).

3.3. Phylogenetic relationships among *repABC* replicators

As mentioned in Section 1, an intriguing characteristic of members of the Rhizobiaceae family is the wide distribution of *repABC* plasmids that embrace multiple incompatibility groups. To explain how new incompatibility groups arise within the same plasmid family, two alternative models can be suggested. The first is an adaptation of the model proposed by Sykora (1992): where plasmids



Fig. 2. Alignment of the igs region from 17 *repABC* plasmids. Identical bases are shown in gray boxes. The igs aligned here begin with the first nucleotide after the stop codon of *repB* and finish one nucleotide before the initial codon of *repC*.

of the same family, but of different incompatibility groups, arise within the same strain through the formation of a bireplicon intermediary consisting of two plasmids with replicons of the same incompatibility group. The bireplicon can be generated by cointegration of an incoming plasmid with a resident plasmid, by the inhibition of plasmid dimer resolution system, or by duplication of the replication region. Cointegrate formation between incompatible plasmids of the Rhizobaceae family has been frequently reported (Brewin et al., 1980; Hooykaas et al., 1980; Johnston et al., 1982; Ramírez-Romero et al., 1997). Interestingly, these cointegrates are stable. In this state, one of the replication systems of the bireplicon can change. One of the copies of the replication region can accumulate mutations, even lose its functionality without jeopardizing other functions encoded in the plasmid, or alternatively, they can create new replication genes with new incompatibility properties. Next, the bireplicon is resolved into two plasmids of the same plasmid family but belonging to different incompatibility groups. This model can be applied to bacterial species with a clonal type of evolution or with a limited capability of genetic exchange with unrelated species.

The second model is simpler: in the first stage, two strains containing the same plasmid evolve independently, by changes in the plasmid sequences involved in replication and/or partition generating different incompatibility groups by divergent evolution. In the second stage, a plasmid of one of these strains is mobilized to another strain already containing its own *repABC* plasmid. The resident plasmid and the incoming plasmid can then coexist without interference.

A method able to discriminate between these models is to compare phylogenetic trees constructed from sequences of the replication regions of plasmids of the same family but of different incompatibility group. The working set must include sequences from strains each containing at least two plasmids of the same family. The sequenced members of the *repABC* plasmid family fulfill the requirements to perform this analysis.

If the mechanism of evolution followed the first model proposed here (bireplicon intermediary model), plasmids belonging to the same strain are expected to group into the same cluster in a phylogenetic tree because they originated by duplication and divergence of a common replication region. In this perspective, closely related plasmids of different incompatibility groups can share the same cluster.

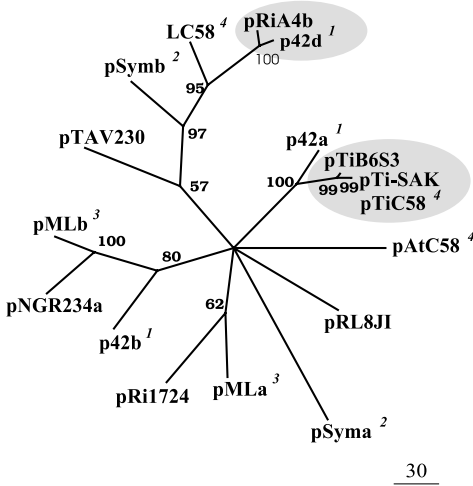
If plasmid evolution proceeded as described in the second model (separately diverging model), plasmids of the same family but isolated from one strain are expected to be positioned in different clusters of a phylogenetic tree. In this scheme, plasmids of the same incompatibility group would share the same cluster in a phylogenetic tree.

To determine the phylogenetic relationship among the sequenced *repABC* replication/partition regions, unrooted phylogenetic trees for each of the three *repABC* gene products and the *repB-repC* igs, were constructed utilizing the maximum parsimony algorithm with bootstrap. The trees are shown in Figs. 3 and 4.

A comparison between the RepA, RepB, RepC, and igs tree topologies (order of the relationships without consideration of the branch length), allows some general observations to be made. First, in all four trees two tight clusters can be always identified. One of them contains the symbiotic plasmid p42d and the root inducing plasmid pRiA4b, while the other is constituted by the tumor inducing plasmids pTiC58, pTi-SAK-URA, and pTiB6S3. Second, in all but one case plasmids of the same bacterial strain do not share the same cluster: plasmids p42a, p42b, and p42d of *R. elii* CFN42, are positioned in different clusters. The same behavior is observed with plasmids pSymA and pSymB of *S. meliloti*, and with the pTiC58, pAtC58, and the *repABC* sequences located in the linear chromosome of *A. tumefaciens* C58. These data support the model propositions that strains containing more than one *repABC* plasmid acquired each one of these replication/partition regions through different events of lateral transfer (separately diverging model), rather than by duplication of a replication/partition region and subsequent divergence. However, we find one exception: plasmids pMLa and pMLb of *M. loti* are located in different clusters in the RepA, RepB, and the igs trees, but forms a compact cluster in the RepC tree. One explanation for this discrepancy is that the replication/partition regions of plasmid pMLa and pMLb are genetic chimeras. Each one of these chimeras is the recombination product of an incoming *repABC* plasmid with a resident *repABC* plasmid. The *repAB* regions of plasmids pMLa and pMLb could have originated from two different *repABC* incoming plasmids, while the *repC* regions came from the same, or a closely related, resident *repABC* plasmid.

Genes sharing the same evolutionary history most render similar (congruent) tree topologies.

RepA



RepB

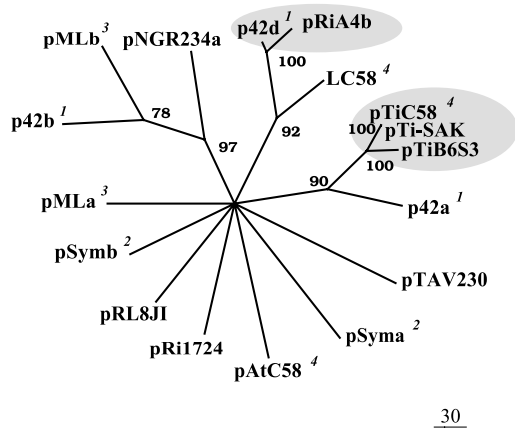
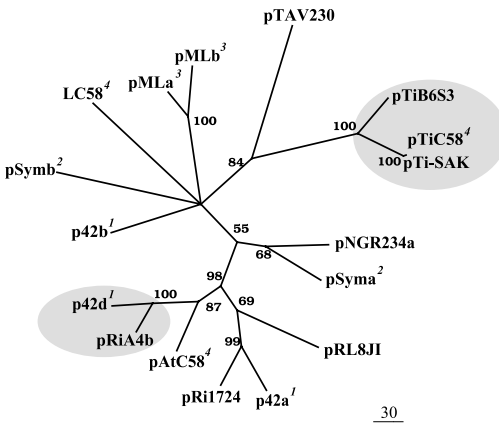


Fig. 3. Phylogenetic relationships among protein products of the *repABC* type replicators. The unrooted trees for RepA and RepB are presented. The bar indicates number of “steps.” Numbers within the trees are the bootstrap values. Constant clusters are encircled in gray. Replicons coexisting in the same strain are marked with the same number: (1) for replicons of *R. etli* CFN42; (2) for replicons of *S. meliloti* 1021; (3) for replicons of *M. loti* MAFF303099; (4) for replicons of *A. tumefaciens* C58.

RepC



IGS

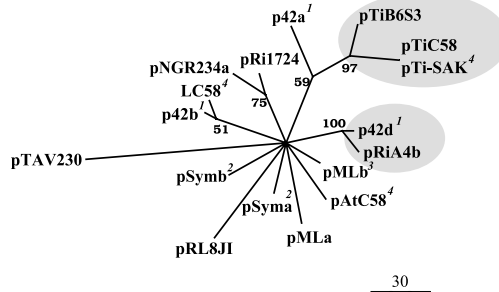


Fig. 4. Phylogenetic relationships among RepC proteins, and the intergenic region located between *repB* and *repC* genes of the *repABC* type replicators. The unrooted trees for RepA, RepB, and RepC are presented. The bar indicates number of “steps.” Numbers within the trees are the bootstrap values. Constant clusters are encircled in gray. Replicons coexisting in the same strain are marked with the same number: (1) for replicons of *R. etli* CFN42; (2) for replicons of *S. meliloti* 1021; (3) for replicons of *M. loti* MAFF303099; (4) for replicons of *A. tumefaciens* C58.

But, if an organism is positioned in two different clades (organisms sharing a common ancestor not shared by the other organisms in the group) in two phylogenetic trees constructed with two gene families using the same set of organisms is an indication of recombination with similar molecules

but with different evolutionary history. The trees constructed with RepA, RepB, RepC, and *igs* show discrepancies indicating that these sequences do not have a strict co-evolution. Recombination played a role in the conformation of these replication/partition regions. As an example, plasmid

p42a is positioned near the cluster conformed by the tumor inducing plasmid in the RepA tree, in the RepB tree and in the tree constructed with the *igs* sequences. But, in the RepC tree forms a cluster with plasmid pRi1724. These observations suggest that RepA and RepB co-evolve, but in some way, independently of RepC. In an extreme, the replication region of plasmid pRmeGR4a of *S. meliloti* GR4 has a *repC* gene but unlinked to *repA* and *repB*, and their absence do not have an effect in plasmid stability (Mercado-Blanco and Olivares, 1994). A selective force that may act to maintain these three genes together is that the transcription of *repC* depends on the promoter of *repA* and *repB*, and in the other hand, the action-site (partition site) of RepA and RepB lies immediately downstream of *repC* (Bartosik et al., 2001; Ramírez-Romero et al., 2001).

3.4. Evolution of the incompatibility determinants

Two *cis*-acting incompatibility sites and one *trans*-incompatibility factor (RepA) have been described for *repABC* plasmids. One of the incompatibility *cis*-acting sites resides in the large intergenic sequence located between *repB* and *repC* genes. Alignment of these intergenic sequences demonstrates the presence of highly conserved domains (Fig. 2). The other incompatibility *cis*-acting site is located immediately downstream of *repC*. But, in contrast with the conservation found in the *repB*-*repC* intergenic regions, the DNA identity among the *repC* downstream sequences is low (Bartosik et al., 2001; Nishiguchi et al., 1987; Ramírez-Romero et al., 2000). The possible role of RepC in incompatibility is currently under investigation.

The tumor inducing (Ti) plasmids pTiC58 and pTiB6S3, belong to the same incompatibility group (*inc* Rh-1) (Hooykaas et al., 1980). To our knowledge, the incompatibility properties of plasmid pTi-SAKURA have not been published, however, the nucleotide sequence of its entire replication/partition region, including the *repA* and *repB* intergenic sequences, and the region immediately downstream of *repC* is virtually identical to that of pTiC58. It is thus reasonable to suggest that pTi SAKURA is also a member of the *inc* Rh-1 incompatibility group. In accordance, these plasmids form a tight cluster in the trees presented here.

Plasmid p42d of *R. etli* CFN42, and the root inducing plasmid pRiA4b are highly similar along their complete replication region, including the

cis-incompatibility determinant located between *repB* and *repC*, suggesting that they belong to the same incompatibility group. To test this assumption plasmid pKRE244, containing the replication/partition region of plasmid pRiA4b was introduced into *R. etli* CFNX101. Analysis of the plasmid profiles of the transconjugants showed that they lost p42d demonstrating that pRiA4b and p42d belong to the same incompatibility group (Fig. 5). The replication/partition regions of these two plasmids form a tight cluster in the phylogenetic trees. These observations support that plasmid incompatibility is linked to common replication and/or partition functions and reflects a close relationship between plasmids (O'Connell et al., 1987).

However, it is important to make a cautionary note: if two plasmids belong to the same incompatibility group it does not necessarily imply that all elements encoded in the replication/partition region share the same phylogenetic origin. Two plasmids can be incompatible if one encodes a *trans*-incompatibility factor while the other harbors only the target-site (the *cis*-incompatibility region). The existence of a *trans*-acting incompatibility factor suffices to exert incompatibility. In contrast, to be sensitive to incompatibility a *cis*-acting site is sufficient. Any other element of the replication/partition regions can be different. For example, plasmid p42a is incompatible with pTiC58 (García-de los Santos and Brom, 1997). The phylogenetic trees constructed with RepA (a *trans*-incompatibility factor), the *igs* (a *cis*-incompatibility factor), and RepB show that plasmid p42a forms a cluster with the Ti- plasmids. But, in the tree constructed with RepC sequences, plasmid p42a forms an independent group, clustering with pRL8JI and pRi1724 plasmids. These results suggest that p42a exhibits incompatibility towards pTiC58 by interference with the partition system (RepA and RepB) but not with RepC, the initiator protein. Moreover, it has been suggested that for *repABC* plasmids, a close relationship among their RepC proteins might indicate that they belong to the same incompatibility group (Palmer et al., 2000; Rigottier-Gois et al., 1998; Turner et al., 1996). Contrary to these suggestions the RepC products of plasmids pMLa and pMLb are highly similar (78% of identity), although the plasmids belong to different incompatibility groups (see Fig. 4).

In summary and almost without exception, *repABC* plasmids isolated from one strain do not form a cluster in a phylogenetic tree constructed with RepA, RepB, RepC, or *igs*. Also, plasmids of

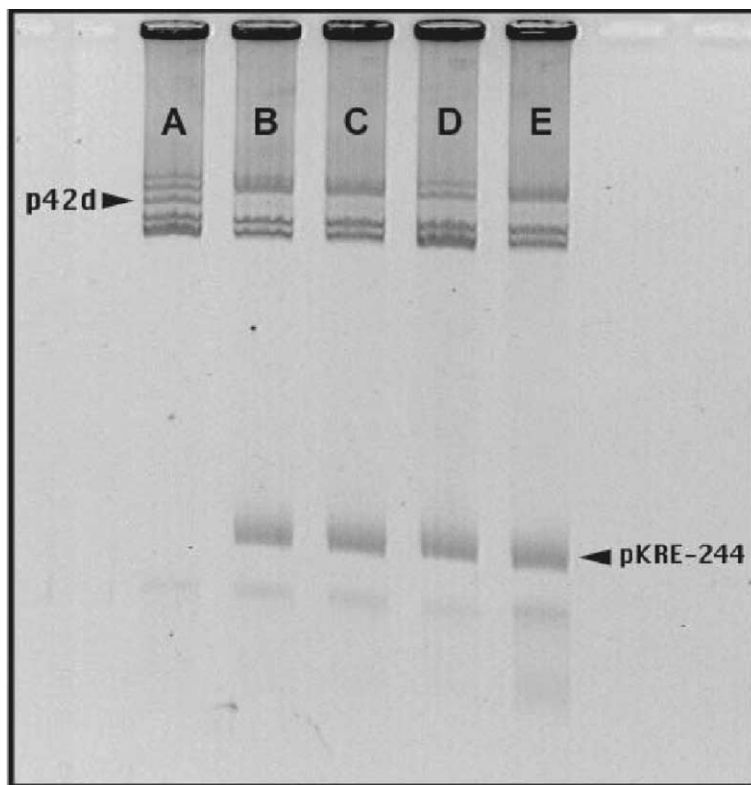


Fig. 5. Plasmid profiles of CFNX101 and their transconjugants containing pKRE-244. Lane A, plasmid profile of the *R. etli* receptor strain CFNX101. Lanes B–E, plasmid profiles of CFNX101 transconjugant strains harboring pKRE-244. Arrows indicate the positions of p42d and pKRE-244 plasmids.

the same incompatibility group share the same cluster in these phylogenetic trees indicating that lateral transfer better explains the existence of several *repABC* plasmids in the same strain.

3.5. Phylogenetic relationships of the *repABC* neighboring genes

The *traI* gene, the first element of the *trb* operon and part of the conjugal transfer system of Ti plasmids, is adjacent to *repA* and oriented in the opposite direction on seven of the 17 replication/partition sequences analyzed in this work (see Table 1) (Li and Farrand, 2000). In the trees constructed with RepA and RepB sequences, five of the seven replication/partition regions containing a *traI* sequence, lie in one cluster conformed by the Ti plasmid and p42a. The rest of the *traI*-containing plasmids are scattered in the phylogenetic trees.

It has been shown that plasmid copy number of pTiC58 is influenced by a quorum-sensing

system in which TraI, TraR, and its *cis*-acting site, and the autoinducer play a central role (Hwang et al., 1994; Li and Farrand, 2000). The observation that in several *repABC* replication/partition regions a *traI* gene is closely associated suggests that these plasmids may also be positively influenced by a quorum-sensing system (Li and Farrand, 2000). Nevertheless, the absence of a *tra* box in close proximity with the *repABC* operon in some plasmids, indicate that this type of regulation seems to be not essential for plasmid replication or partitioning.

In the region upstream of *repA* in plasmid pRL8JI, instead of *traI* (the first gene of the *trb* operon), a gene homologous to the second gene of the *trb* operon (*trbB*) is found but a *tra* box remains in the intergenic region between *trbB* related gene and *repA* (Li and Farrand, 2000). These observations suggest that *traI* was present at one time but was lost later on.

Except for the Ti-plasmids, the regions downstream to *repC* genes are not conserved indicating

that the genetic context of the *repABC* operon has been subject of frequent rearrangements.

In summary, we describe two models that explain how new plasmid incompatibility groups arise within the *repABC* family: the separately diverging model and the bireplicon intermediary model. The phylogenetic analysis presented here supports the former model. Plasmids of the same incompatibility group residing in different cell lines evolve independently. During this process changes in the plasmid sequences involved replication and partition, create new incompatibility groups. The presence of more than one plasmid, of the same family, in one strain, is explained by subsequent events of lateral transfer. The current evidence does not exclude the bireplicon intermediary model. The genetic structure of the bacterial population will determine which of the proposed mechanisms is operating: clonal populations with little or no genetic exchange will be prone to use the mechanism described by the bireplicon intermediary model to generate new plasmid incompatibility groups. On the other hand, the separately diverging model will explain the origin and presence of plasmids of the same family in one strain in “panmictic” populations with frequent genetic interchange. Plasmid exchange has been observed in Rhizobia populations in soil conditions (Demezas et al., 1995; Geniaux et al., 1993; Schofield et al., 1987; Young and Wexler, 1988). But, a clonal genetic structure has been observed in some Rhizobia populations associated with clover, in undisturbed meadows of Sierra Nevada, California (Wernegreen et al., 1997). These results support that the two models described here, are possibly inclusive in bacterial species of the same family.

These models may be useful in other plasmid systems, but to test them, an adequate data set is required. This set must include the DNA sequences of plasmid replication and/or partition regions, of several strains carrying two or more plasmids of the same family.

Acknowledgments

We thank David Romero, Michael Dunn, and Brenda Valderrama for their critical comments, and Angeles Pérez-Oseguera, Nora Soberón, Patricia Bustos, and Rosa E. Gómez for their skilful technical support. We also thank Paul Gaytán and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides, and Dr. Atsuhiko Oka for plasmid

pAO244. This work was supported by DGAPA-PAPIIT grant IN214898.

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., 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.
- Brewin, N.J., Beringer, J.E., Johnston, A.W.B., 1980. Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 120, 413–420.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., Romero, D., 2000. In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* 44, 34–43.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., Palacios, R., 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174, 5183–5189.
- Demezas, D.H., Reardon, T.B., Strain, S.R., Watson, J.M., Gibson, A.H., 1995. Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum*. *Mol. Ecol.* 4, 209–220.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X., 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387, 394–401.
- 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., Vandenbol, M., Vorhölter, 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.
- García-de los Santos, A., Brom, S., Romero, D., 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria–legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 119–125.
- García-de los Santos, A., Brom, S., 1997. Characterization of two plasmid-borne *lps* beta loci of *Rhizobium*

- etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 891–902.
- Geniaux, E., Laguerre, G., Amarger, N., 1993. Comparison of geographically distant population of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol.* 2, 295–302.
- 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., Lappas, 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.
- Hooykaas, P.J.J., Den Dulk-Ras, H., Ooms, G., Schilperoort, R.A., 1980. Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 143, 1295–1306.
- Hooykaas, P.J.J., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuink, A.J.G., van Brussel, A.A.N., 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.
- Hwang, I., Li, P.L., Zhang, L., Piper, K.R., Cook, D.M., Tate, M.E., Farrand, S.K., 1994. TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4639–4643.
- Johnston, A.W.B., Hombrecher, G., Brewin, N.J., Koper, M.C., 1982. Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* 128, 85–93.
- 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., Shimpō, 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.
- 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.
- Martínez-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.
- Mercado-Blanco, J., Olivares, J., 1994. The large non-symbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* encodes a protein involved in replication that has homology with RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid* 32, 75–79.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N.S., Kataoka, M., Tanaka, N., Yoshida, K., 2001. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.* 307, 771–784.
- 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.
- O’Connell, M.P., Hynes, M.F., Puehler, A., 1987. Incompatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and Ri plasmid of *Agrobacterium*. *Plasmid* 18, 156–163.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357–358.
- Palmer, K.M., Turner, S.L., Young, J.P.W., 2000. Sequence diversity of the plasmid replication gene repC in the Rhizobiaceae. *Plasmid* 44, 209–219 (doi:10.1006/plas.2000.1488).
- 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.
- Rigottier-Gois, L., Turner, S.L., Young, J.P.W., Amarger, N., 1998. Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. *Microbiology* 144, 771–780.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schofield, P., Gibson, A., Dudman, W., Watson, J., 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in soil populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2942–2947.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engi-

- neering transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791.
- Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., Kato, A., Yoshida, K., 2000. Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid. *Gene* 242, 331–336.
- Sykora, P., 1992. Macroevolution of plasmids: a model for plasmid speciation. *J. Theor. Biol.* 159, 53–65.
- 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.W., 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8JI. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 53–58.
- Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Power, R.S., Amarger, N., Young, J.P.W., 1996. Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 142, 1705–1713.
- Young, J.P.W., Wexler, M., 1988. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2731–2739.
- Wernegreen, J.J., Harding, E.E., Riley, M.A., 1997. *Rhizobium* gone native: Unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5483–5488.
- Wheatcroft, R., McRae, G.D., W. Miller, 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.

Communicated by D. Chattoraj