

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL
RNA ANTISENTIDO (ctRNA) INVOLUCRADO
EN LA REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN
DEL PLÁSMIDO p42d *de R. etli*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A:
DIANA MIREILLE GÓMEZ MEZA

TUTOR: DR. 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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos por haberme permitido ingresar a su grupo de trabajo y por su apoyo.

Al Biólogo Ramón Cervantes Rivera por su apoyo, consejos y enseñanzas de las técnicas utilizadas en el laboratorio.

A los miembros del jurado evaluador por sus comentarios y críticas de este trabajo:

Dr. José Luis Puente García.

Dr. Víctor Humberto Bustamante.

Dra. Rosa Gutiérrez Ríos.

Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero.

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos. Durante su realización se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 189759

CONTENIDO

Contenido.....	i
Lista de figuras.....	ii
Lista de tablas.....	iii
Lista de abreviaturas.....	iv
Resumen.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Propiedades de los plásmidos.....	2
I.1.1 Replicación.....	2
I. 1.1.1 Tipos de replicación.....	4
I.1.1.2 Control de la replicación de los plásmidos.....	8
I.1.1.2.1 Iterones.....	8
I.1.1.2.2 RNA's reguladores.....	9
I.1.1.2.3 Represores transcripcionales y RNA antisentido.....	17
I.1.2 Partición.....	17
I.1.2.1 Partición pasiva.....	18
I.1.2.2 Partición activa.....	18
I.1.2.3. Los sistemas Killer o de muerte postsegregacional.....	20
I.1.2.4 Los sistemas de resolución de dímeros.....	20
I.1.3 Incompatibilidad.....	21
I.2 Los replicones <i>repABC</i> en α -proteobacterias.....	22
II. Antecedentes.....	23
II.1 Análisis genético de un plásmido <i>repABC</i> : pSim de <i>R. etli</i> CE3.....	23
III. Hipótesis.....	29
IV. Objetivo General.....	29
IV.1. Objetivo particular.....	29
V. Materiales y Métodos.....	30
VI. Resultados.....	44
VII. Discusión.....	60
VIII. Conclusiones.....	66
IX. Perspectivas.....	67
X. Bibliografía.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Horquilla de replicación.....	3
Figura 2. Mecanismos de replicación.....	7
Figura 3. Modelo de inhibición de la replicación llevada a cabo por iterones..	10
Figura 4. El RNA antisentido controla la replicación de un plásmido a través de diferentes mecanismos.....	16
Figura 5. Regulación de la expresión de <i>repC</i>	27
Figura 6. Estructura secundaria del RNA antisentido y del elemento S encontrado en la región <i>inca</i> del plásmido simbiótico p42d de <i>R. etli</i>	28
Figura 7. Ensayo de incompatibilidad en la cepa CFNX101.....	37
Figura 8. Ensayo de replicación en la cepa CFNX107.....	39
Figura 9. Esquema de mutaciones realizadas en el ctRNA del plásmido p42d de <i>R. etli</i>	50
Figura 10. Representación esquemática de la localización de las mutantes en el ctRNA	51
Figura 11. Predicción del plegamiento del ctRNA con las mutaciones en el asa.	52
Figura 12. Perfil plasmídico de las mutantes en el asa del ctRNA.....	53
Figura 13. Predicción del plegamiento del ctRNA con mutaciones en el tallo y eliminaciones en el extremo 5'	54
Figura 14. Perfil plasmídico de mutantes en el ctRNA que cierran la burbuja del tallo y tienen eliminaciones en la primera y segunda parte del extremo 5' del ctRNA.....	55
Figura 15. Alineamiento del ctRNA del plásmido p42d de <i>R. etli</i> y del plásmido pSymA de <i>S. meliloti</i> ; y sus estructuras secundarias.....	56
Figura 16. Predicción del plegamiento del ctRNA que contiene una sustitución en la primera parte del extremo 5'	56
Figura 17. Perfil plasmídico de la mutante que tiene una sustitución en el extremo 5' del ctRNA.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y plásmidos.....	30
Tabla 2. Oligonucleótidos.....	32
Tabla 3. Resultados de incompatibilidad en la cepa CFNX101 de las mutantes en el ctRNA de <i>R. etli</i>	58
Tabla 4. Resultados de replicación en la cepa CFNX107 de las mutantes en el ctRNA de <i>R. etli</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

aa.	Aminoácidos
ATP.	Adenosin trifosfato
°C.	Grados centígrados
Cm.	Cloranfenicol
CR.	Círculo rodante
ctRNA	RNA contratranscrito
dATP.	Deoxyadenosin trifosfato
dCTP.	Deoxycitidin trifosfato
dGTP.	Deoxyguanosin trifosfato
DNA.	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's.	Deoxyribonucleótidos trifosfato
DO.	Densidad óptica
<i>dso.</i>	Origen de doble cadena
dTTP.	Deoxytimidin trifosfato
<i>et al.</i>	Otros colaboradores
FIS.	Factor para la estimulación de la inversión
IHF.	Factor de integración al cromosoma
Kb.	Kilobases
Kpb.	Kilopares de bases
LB.	Medio de cultivo tipo Luria-Bertani
mg.	Miligramos
µg.	Microgramos
min.	Minutos
ml.	Mililitros
mM.	Milimolar
ng.	Nanogramos
nm.	Nanómetros
nt.	Nucleótidos
<i>ori.</i>	Origen de replicación
<i>oriT.</i>	Origen de transferencia
PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa

RACE. (“Rapid Amplification of cDNA End”)
RNA. Ácido ribonucleico
RNAP. RNA Polimerasa
rpm. Revoluciones por minuto
SSB. (“Single-Stranded DNA-Binding protein”)
sso. Origen de cadena sencilla
TA. Sistema toxina-antitoxina
TAE. Tris-acetatos-EDTA
Tris. Tris (hidroximetil) aninometano

RESUMEN

Las bacterias contienen su información genética codificada en plásmidos y cromosomas. Los plásmidos no codifican para funciones esenciales en el crecimiento de la bacteria, pero proveen genes cuyos productos la benefician, ya que le confieren la capacidad para utilizar fuentes de carbono inusuales, para resistir a antibióticos, para nodular y fijar nitrógeno, entre otros.

Los plásmidos tienen la habilidad para replicarse independientemente, por eso se les llama replicones. Los replicones *repABC* están presentes en plásmidos de algunas α -proteobacterias. Algunas de ellas tienen la capacidad para llevar a cabo interacciones planta-bacteria y formar nódulos fijadores de nitrógeno en muchas leguminosas.

El plásmido p42d de *R. etli* CE3 consta de 371,255 pb y contiene 359 genes, y es parte de la familia de replicones *repABC*, los cuales se caracterizan por la presencia de un replicón formado por 3 genes *repA*, *repB* y *repC* organizados en operón. Los productos RepA y RepB juegan un papel en la estabilidad del plásmido, mientras que la proteína RepC es el factor limitante para la replicación. Se han identificado 3 regiones que inducen incompatibilidad. Una se localiza dentro de la región intergénica de los genes *repB* y *repC*, llamada *inca*. La otra, denominada *inc β* se encuentra inmediatamente corriente abajo de *repC*. Y la tercera región corresponde a *repA*.

Un análisis estructural y funcional de la región *inca* del plásmido p42d de *R. etli*, permitió identificar 3 elementos reguladores de la expresión de RepC. Uno de estos elementos es un gen que codifica para un pequeño RNA antisentido (ctRNA) de 59 pb, que se transcribe a partir de un promotor constitutivo (P2), en dirección contraria al operón *repABC*. Se propone que el gen ctRNA codifica para un factor *trans*-incompatible y que este ctRNA regula negativamente la expresión de *repC*, actuando como un RNA antisentido típico. El segundo elemento reportado es una estructura tallo-asa localizada inmediatamente arriba del gen *repC*, que ocluye su secuencia Shine-Dalgarno. El tercer elemento es un péptido codificado dentro de la estructura tallo-asa, el cual tiene una influencia positiva sobre la expresión de *repC*.

Con el fin de entender mejor los mecanismos involucrados en la regulación de *repC*, este estudio se enfocó en determinar la interacción entre el ctRNA y el RNAm-*repC*. Para esto, se estudió el efecto de mutaciones o eliminaciones en el ctRNA en su capacidad de ejercer incompatibilidad y en su replicación. Los resultados indicaron que el extremo 5' del ctRNA es importante para la interacción inicial con el RNAm-*repC*, y se encuentra regulando la replicación e incompatibilidad contra el p42d.

I. INTRODUCCIÓN

En adición al cromosoma, las bacterias contienen plásmidos. Estas moléculas de DNA juegan un papel muy importante en la adaptación y la evolución bacteriana debido a que pueden incorporar genes por recombinación o transposición. Esto favorece el intercambio genético en poblaciones bacterianas. También son considerados como importantes herramientas para estudios de biología molecular (del Solar *et al.*, 1998).

Los plásmidos varían en tamaño y número de copias, a menudo son moléculas circulares de doble cadena de DNA; sin embargo, algunas bacterias tienen plásmidos lineales. Generalmente los plásmidos no codifican para funciones esenciales en el crecimiento de la bacteria, sin embargo, proveen genes cuyos productos pueden beneficiar a la bacteria bajo ciertas circunstancias, ya que le confieren la capacidad para utilizar fuentes de carbono inusuales; de resistir a sustancias como metales pesados y antibióticos, de sintetizar antibióticos, así como toxinas y proteínas que favorecen una infección exitosa en organismos superiores, así como la producción de tumores en plantas, nodulación y fijación de nitrógeno, entre otras muchas cosas (del Solar *et al.*, 1998 ; Snyder and Champness, 2003).

Los plásmidos tienen la habilidad para replicarse independientemente, por eso se les llama replicones. En la mayoría de los plásmidos, las funciones de replicación están codificadas dentro de una región de aproximadamente 1-5 kb, conocida como replicón básico, y está definida como la porción mínima del plásmido capaz de replicar, con las mismas propiedades de estabilidad y número de copias, que el plásmido parental (Summers, D., 1996).

I.1 Propiedades de los plásmidos

I.1.1 Replicación

La replicación implica que a partir de una molécula de DNA progenitora se obtienen dos moléculas hijas idénticas a la original, siguiendo como molde de copia una de las dos hebras de la molécula progenitora, por ello se le llama replicación semiconservativa.

La secuencia de eventos que conducen al inicio de replicación tiene muchas semejanzas entre la mayoría de plásmidos y cromosomas (del Solar *et al.*, 1998).

En la mayoría de los casos, el inicio de replicación comprende el reconocimiento y unión de una proteína iniciadora a una región específica de DNA llamada origen de replicación (*ori*).

Una definición exacta del origen es la posición en la cual se adiciona la primera base deoxiribosa al primer de RNA de la hebra líder en la replicación (Summers, D., 1996).

El desenrollamiento del DNA y el mantenimiento de las dos hebras por separado en la horquilla de replicación para que se puedan sintetizar las dos nuevas hebras requiere de tres tipos de proteínas. Una *helicasa* dependiente de ATP, cataliza el desenrollamiento del DNA de doble hélice. La separación de las cadenas genera una tensión en la estructura helicoidal que eliminan las *topoisomerasas*. La tercera proteína involucrada, la proteína de unión a cadena sencilla (SSB), se une al DNA de cadena sencilla, impidiendo que vuelva a retomar el estado dúplex. La SSB se une como monómero, pero de forma cooperativa. Una vez formada la horquilla de replicación, comienzan a actuar una serie de enzimas. La *primasa* cataliza la síntesis del RNA cebador que permite el comienzo de la replicación. Las *DNA polimerasas* catalizan la síntesis de DNA en dirección 5'-3' utilizando como sustrato dNTP's (deoxinucleótidos trifosfato) y un extremo cebador con un grupo 3'-OH libre. Las

DNA ligasas sellan cortes (enlaces fosfodiéster rotos), y empalman los extremos del DNA en regiones dúplex.

La replicación es ordenada y secuencial, inicia en puntos concretos y transcurre en forma acoplada: la hebra conductora se sintetiza en continuo y la hebra retrasada se sintetiza en fragmentos (fragmentos de Okasaki) a partir de un RNA cebador (Figura 1).

Finalmente, se lleva a cabo el desensamblaje del replisoma y la separación de las moléculas obtenidas (Summers, D., 1996).

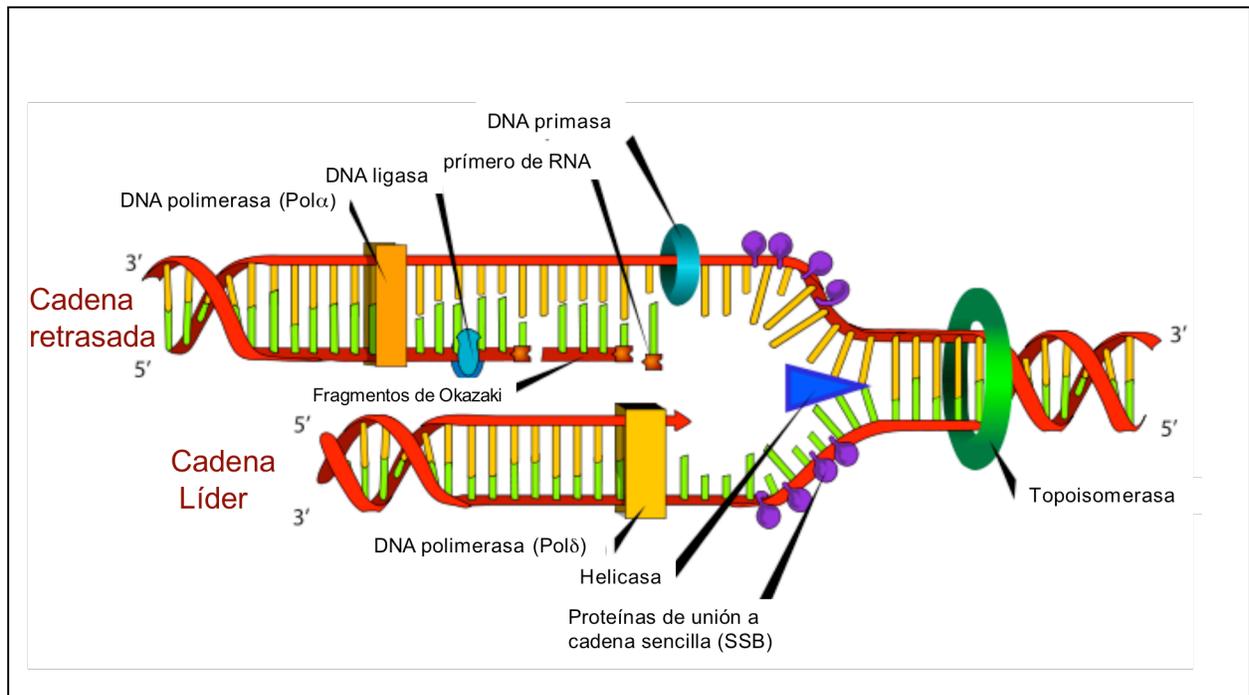


Figura 1. Horquilla de replicación. El DNA progenitor se desenrolla por acción de la helicasa, (triángulo azul) y la topoisomerasa (anillo verde) y se sintetizan las dos hebras de DNA nuevas complementarias a las existentes, con ayuda de la primasa (anillo verde azulado), las DNA polimerasas (barras amarillas) y la DNA ligasa (estructura en forma de cacahuete color verde). Las proteínas de unión a cadena sencilla ayudan a mantener las cadenas abiertas (pequeños círculos morados). Los fragmentos de Okasaki se muestran en color rojo. También se indica cuál es la cadena líder y la cadena retrasada.

I.1.1.1 Tipos de replicación

Replicación tipo theta

El mecanismo de replicación tipo theta ha sido el más estudiado entre los prototipos de plásmidos circulares de bacterias Gram negativas (Summers, D., 1996; del Solar *et al.*, 1998). Sin embargo, este mecanismo también se ha descrito en algunos plásmidos de bacterias Gram positivas. La replicación de DNA a través del mecanismo theta involucra la desnaturalización de las hebras parentales, la síntesis de un primero de RNA y el inicio de la síntesis de DNA por la extensión covalente del primero de RNA. La síntesis de DNA es continua en una de las hebras (hebra líder) y discontinua en la otra (hebra retrasada). La síntesis de DNA tipo theta puede iniciar desde uno o varios orígenes, y la replicación puede ser uni o bidireccional. Las imágenes generadas por microscopía electrónica de los intermediarios de replicación se parecen a la forma de la letra theta (θ), de aquí su nombre (Figura 2).

La mayoría de los replicones tipo theta requieren de al menos una proteína iniciadora Rep, codificada en plásmido, y de la proteína DnaA del hospedero para el inicio de la replicación. Algunas características adicionales que se encuentran en muchos orígenes de replicación de plásmidos que utilizan este mecanismo son: una región rica en AT que contiene secuencias repetidas, donde ocurre la apertura de las hebras y el ensamblaje de las factores de iniciación del hospedero, y uno o más sitios de reconocimiento de la proteína iniciadora DnaA del hospedero (cajas DnaA). El origen de replicación puede contener también sitios de reconocimiento para el pegado de proteínas que doblan el DNA como IHF, HU o FIS.

En muchos casos, el origen de replicación contiene secuencias directas repetidas llamadas iterones, los cuales son sitios de unión para las proteínas Rep codificadas en el plásmido.

Los iterones no sólo son esenciales para la replicación, sino que también son elementos clave para el control de la replicación de plásmidos.

Los iterones se han descrito en varios replicones como P1, F, pSC101, R6K, Rts1, pColIV-K30, RK2/RP4, pCU1 y pSa (Summers, D., 1996; del Solar *et al.*, 1998).

La presencia de iterones no está restringida a plásmidos que se replican por el mecanismo theta, ya que también se han reportado estas secuencias para plásmidos que usan el mecanismo de hebra desplazada o el mecanismo de círculo rodante (Summers, D., 1996; del Solar *et al.*, 1998).

Replicación por desplazamiento de cadena

El ejemplo mejor conocido de plásmidos que se replican por el mecanismo de desplazamiento de cadena son los plásmidos promiscuos de la familia *IncQ*, cuyo prototipo es el plásmido RSF1010. Los miembros de esta familia requieren de tres proteínas codificadas en el plásmido para el inicio de la replicación: RepA (actividad helicasa 5'-3'), RepB (actividad primasa) y RepC (proteína iniciadora) (Summers, D., 1996; 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 empieza cuando estos orígenes se exponen como regiones de cadena sencilla. Esta desnaturalización depende de RepC, que reconoce los iterones y la helicasa RepA, lo cual se facilita por una región rica en AT adyacente a los orígenes. La síntesis del primero necesario para iniciar la replicación lo lleva a cabo RepB. La síntesis de cada una de las cadenas ocurre continuamente y provoca el desplazamiento de la cadena complementaria

(Figura 2). Debido a las actividades de las tres proteínas codificadas por el plásmido (RepA, RepB y RepC), la replicación es independiente de las proteínas del huésped que actúan en las primeras etapas de replicación (DnaA, DnaB, DnaC y DnaG) (Summers, D., 1996; del Solar *et al.*, 1998).

Replicación por círculo rodante

La replicación por el mecanismo Círculo Rodante (CR) tiene que ser unidireccional y está considerada como un proceso asimétrico, ya que la síntesis de la cadena líder y la síntesis de la cadena retrasada no está acoplada. Una de las características más relevantes de la replicación CR es que la hebra recién sintetizada permanece unida covalentemente a la hebra parental. La replicación se inicia cuando la proteína Rep codificada por el plásmido hace un corte sitio-específico en una de las cadenas de DNA, en un sitio llamado origen de doble cadena (*dso*). El corte libera un extremo 3'-OH libre el cual se usa como primero para la síntesis de la cadena líder. La elongación a partir del extremo 3'-OH requiere la participación de proteínas del huésped (DNAPolIII, SSB y helicasa) y continúa hasta que el replisoma alcanza el *dso*. Los productos de la replicación de la cadena líder son una molécula de doble cadena de DNA y un intermediario de cadena sencilla, el cual corresponde a la cadena parental desplazada. Esta última se convierte en una molécula de doble cadena por las proteínas del huésped que inician la replicación a partir de un origen de cadena sencilla (*ssO*), físicamente distinto al *dso*. El último paso sería el superenrollamiento de las moléculas por la DNA girasa del huésped (Figura 2) (Summers, D., 1996; del Solar *et al.*, 1998).

Las proteínas iniciadoras de los plásmidos que se replican por CR tienen una actividad de DNA transferasa, de tal manera que son capaces de cortar y unir moléculas de DNA de la misma manera que lo hacen las topoisomerasas tipo I. Este tipo de replicación es llevado a cabo por los plásmidos pT181, pC221, pUB110, pC194, y pMV158 (Summers, D., 1996; del Solar *et al* 1998).

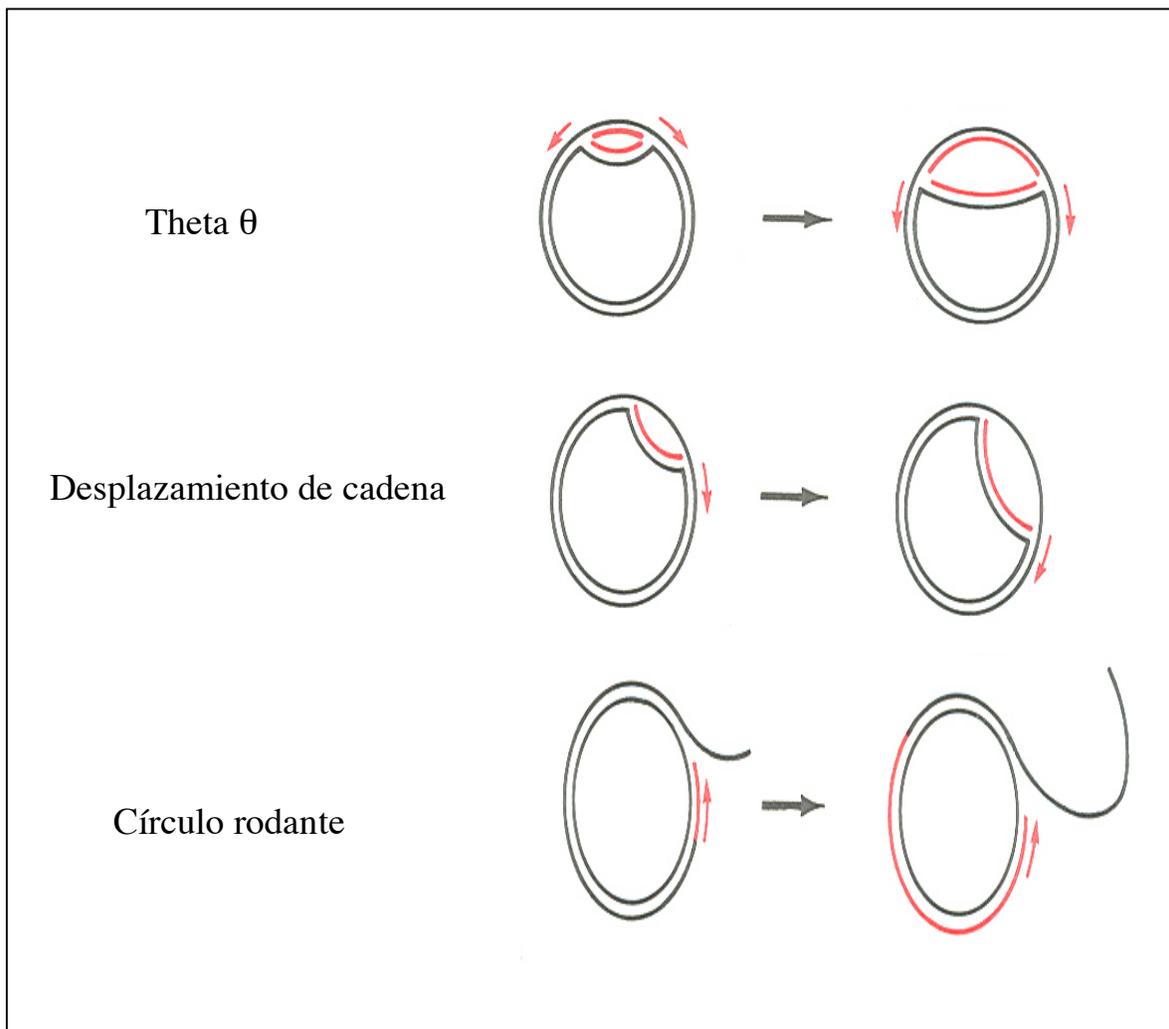


Figura 2. Mecanismos de replicación theta, desplazamiento de cadena y círculo rodante. En negro se muestra la cadena de DNA progenitor y en rojo la cadena de DNA recién sintetizada y las flechas rojas indican la dirección de la replicación.

1.1.1.2 Control de la replicación de plásmidos

Para lograr una coexistencia estable, los plásmidos deben sincronizar su replicación con el crecimiento y la división celular del hospedero. Cada plásmido debe replicarse en promedio una vez por generación. Un plásmido que se replique menos de una vez por generación, sufrirá una disminución en el número de copias hasta llevar a una pérdida progresiva del plásmido durante la división celular. Contrariamente, si el plásmido se replica más de una vez por generación, su número de copias se elevará y la carga metabólica impuesta sobre su hospedero matará a la célula después de algunas generaciones (Summers, D., 1996; del Solar *et al* 1998).

Para definir y mantener el número de copias, los plásmidos usan circuitos reguladores negativos. Entre estos inhibidores que regulan los mecanismos de replicación, se encuentran: i) iterones, ii) RNA's reguladores, iii) Represores transcripcionales y RNA antisentido (Summers, D., 1996, del Solar *et al* 1998).

1.1.1.2.1 Iterones.- Los plásmidos pSC101, F, R6K, P1 y RK-2 son llamados plásmidos iterónicos por su mecanismo de regulación del número de copias. Estos plásmidos contienen varias repeticiones de cierta serie de bases de DNA llamadas iterones, los cuales son típicamente secuencias de 17 a 22 pb de largo y se encuentran de 3 a 7 copias en la región *ori*. Los iterones también pueden encontrarse en regiones fuera del origen de replicación aunque éstos no participan en el inicio de replicación; sin embargo, juegan un papel importante en el control de la replicación (del Solar *et al.*, 1998).

Uno de los plásmidos iterónicos más simple es el pSC101, cuya característica especial de la región *ori*, es el gen *repA* (el cual codifica la proteína RepA) y tres secuencias repetidas R1,

R2 y R3 que reconocen la proteína RepA. La proteína RepA es la única proteína codificada en plásmido, que es requerida para la replicación (Snyder and Champness, 2003). De tal forma que actúa como un activador de la replicación. Sin embargo, RepA reprime su propia síntesis cuando se une a su región promotora y bloquea la transcripción de su propio gen. Por lo tanto, la concentración de RepA es mantenida dentro de los límites y el inicio de la replicación es regulado estrictamente.

Esto no es suficiente para regular el número de copias del plásmido, especialmente en plásmidos de bajo número de copias como F y P1, por lo que existe otro mecanismo llamado *acoplamiento* para regularlo. Cuando las concentraciones del plásmido son altas, llegan a unirse uno con otro mediante la proteína RepA unida a los iterones. Por lo que la inhibición de la replicación de ambos plásmidos está acoplada. Este mecanismo permite que la replicación del plásmido sea controlada no sólo por cuánta RepA esté presente en la célula, sino también por la concentración del plásmido por sí solo o por las secuencias iterónicas en el plásmido (Fig. 3) (Snyder and Champness, 2003).

I.1.1.2.2 RNA's reguladores.- La importancia de RNA's pequeños no codificantes, que actúan como reguladores de transcripción, de modificación o estabilidad del RNA y de la traducción del RNAm, se ha ido evidenciando.

El mecanismo más común por el cual un RNA no codificante regula la expresión de un gen es por apareamiento de bases con su RNA blanco. Los RNA's que actúan por apareamiento de bases pueden estar agrupados en 2 clases generales: los RNA's codificados en *cis*, que son transcritos en la misma localización genética, pero en la hebra contraria a su RNA

blanco, y contienen una complementaridad perfecta con éste; y los RNA's codificados en *trans*, que son sintetizados en una localización cromosomal distinta a su RNA blanco. Estos últimos generalmente tienen un apareamiento de bases imperfecto con su blanco (Gottesman S. 2004; Storz *et al.*, 2005).

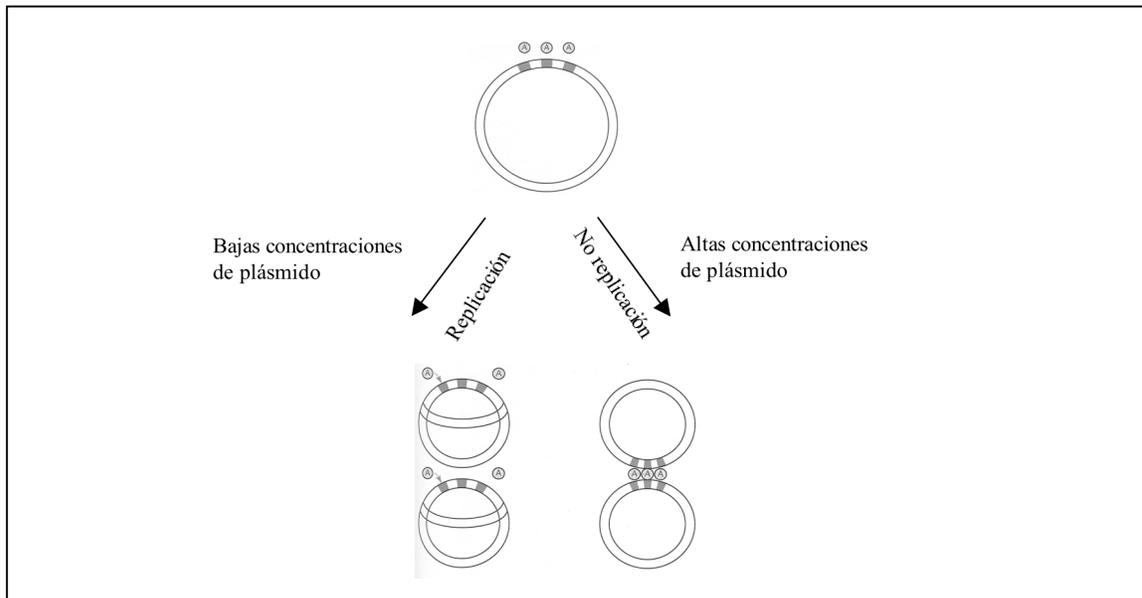


Figura 3. Modelo de Inhibición de la replicación llevado a cabo por iterones (acoplamiento). A concentraciones bajas de plásmido, la proteína RepA se une a los iterones en un solo plásmido para iniciar la replicación. A concentraciones altas de plásmido, la proteína RepA se une a iterones de dos plásmidos simultáneamente, acoplándolos e inhibiendo su replicación. Los iterones se indican con cuadros color gris, y las moléculas de proteína iniciadora están señaladas con la letra A. La molécula de DNA se esquematiza con un círculo (Snyder and Champness, 2003).

Los RNA's antisentido o también denominados como contratranscritos (ctRNA's) son pequeños (35 a 150 nt), difusibles y altamente estructurados (1 a 4 estructuras secundarias de tipo tallo y asa). Un análisis detallado reveló que los RNA's antisentidos eficientes tienen de 5-8 nt GC en el asa. El asa es un determinante importante para la interacción antisentido-blanco, mientras que los tallos son importantes para la estabilidad estructural. A menudo

éstos están interrumpidos por protuberancias para prevenir la degradación por RNAsa y facilitar la interacción entre el RNA antisentido-RNA sentido (Brantl, S., 2002).

Para la mayoría de plásmidos, el apareamiento de un RNA antisentido regula la transcripción, estabilidad o traducción del RNAm que codifica para proteínas críticas para la replicación o estabilidad de un plásmido (Asano *et al.*, 1991). En estos casos, los RNA's antisentido se sintetizan constitutivamente pero son inestables. Como una consecuencia, cambios en las concentraciones en el RNA antisentido se reflejan en cambios en el número de copias del plásmido.

Las interacciones más críticas se dan en regiones cortas de cadena sencilla, usualmente entre las secuencias del asa donde la primera base del RNA antisentido aparea con su blanco, formando un complejo denominado "Kissing complex". La interacción por apareamiento de bases se extiende hasta formar un complejo más estable llamado "extended kissing complex", el cual ejerce el efecto regulador (Gerhart *et al.*, 1998).

La regulación por todos los RNA's antisentido codificados en *trans* caracterizados en *Escherichia coli*, requiere de la proteína chaperona Hfq. Para varios RNA's, la unión con Hfq promueve el apareamiento con su RNAm blanco. En algunos casos induce cambios estructurales en estos RNA's. En adición, Hfq puede proteger contra degradación por ribonucleasa E (Gottesman, S. 2004).

Otros RNA's reguladores actúan modificando la actividad de una proteína; en algunos casos imitando las estructuras de otras moléculas de RNA o DNA (Storz *et al.*, 2005).

El RNA antisentido controla la replicación del plásmido a través de un control negativo. La inhibición se logra por una variedad de mecanismos. El caso más común es la inhibición de la traducción de una proteína esencial para el inicio de replicación (Rep), mediante el

bloqueo del sitio de unión a ribosoma (familia pMV158) (Blomberg *et al.*, 1994). Alternativamente, el RNA antisentido se une al RNAm del péptido líder evitando su traducción (dicho péptido es requerido para la traducción de Rep) (Blomberg *et al.*, 1994). La atenuación transcripcional es otro mecanismo regulado por RNA antisentido, el cual sólo se ha identificado en plásmidos de bacterias Gram positivas (familia *inc18* y pT181) (Brantl, S., 2004). Otro mecanismo de inhibición de un RNA antisentido es la inhibición de la formación de un “primer” típico de ColE1, un plásmido que no necesita proteína iniciadora de replicación (Brantl, S., 2004). El RNA antisentido también es capaz de inhibir la formación de un pseudonudo, requerido para la traducción eficiente de Rep (familia Inc β e Inc α) (Asano and Mizobuchi, 1998). En algunos casos, pueden estar acompañados por proteínas reguladoras como represores transcripcionales –Proteínas Cop (R1, familia *inc18* y familia pMV158) o proteínas de unión a RNA (ColE1) (Brantl, S., 2004).

Atenuación transcripcional mediada por RNA antisentido :Familias inc18 y pT181

La regulación de la replicación de plásmidos por la atenuación transcripcional mediada por un RNA antisentido, se encontró para plásmidos de bacterias Gram negativas, como pT181 y dos plásmidos de la familia *inc18*: pIP501 y pAM β 1 (Blomberg *et al.*, 1994; Brantl, S., 2004).

Todos estos plásmidos codifican para la proteína esencial para la replicación (Rep), que se une a su respectivo origen de replicación. Sin embargo, se ha mostrado que la cantidad de la proteína Rep es una limitante para la replicación del plásmido pT181. En el caso de pIP501, la cantidad de la proteína RepR y la cantidad de la transcripción del RNAm-*repR* son los limitantes de la replicación. Consecuentemente, el RNAm-*rep* que codifica para la proteína

iniciadora de la replicación, es el blanco para el control del número de copias. Durante la transcripción, este RNA puede adoptar 2 estructuras dependiendo de la presencia o ausencia del RNA antisentido. Si el RNAm-*rep* naciente encuentra una molécula de RNA antisentido, la unión lleva a la formación de un terminador transcripcional (atenuador) independiente de *rho*, que lleva a la terminación prematura de la transcripción del RNAm-*rep*. Si el RNAm-*rep* escapa del RNA antisentido durante la transcripción, el RNAm tiene la oportunidad de plegarse por un apareamiento alternativo de bases, en este caso, el terminador transcripcional no se forma, lo que resulta en la transcripción de un RNAm-*rep* completo y, por lo tanto, la síntesis de la proteína Rep (Figura 4). Entonces el RNA antisentido afecta la expresión del gen abortando el transcrito para una proteína esencial (Blomberg *et al.*, 1994; Brantl, S., 2004).

Inhibición de la traducción de un péptido líder: R1 y plásmidos relacionados

El ejemplo mejor estudiado es el plásmido R1 de *E. coli*. Su replicón básico contiene los genes *copA*, *copB*, *tapA* y *repA*, que codifican para el represor transcripcional CopB, un péptido líder de 24 aa (TAP) y la proteína iniciadora de la replicación (RepA), respectivamente. El origen de replicación *oriR* se localiza corriente abajo de *repA*. Dentro de la secuencia correspondiente a la región líder del RNAm-*repA*, a partir de la hebra complementaria se transcribe un RNA antisentido de aproximadamente 90 nt de longitud, CopA, el cual es el principal elemento de control. CopA contiene dos estructuras tallo-asa y es altamente inestable. Su blanco, CopT, es parte de la región líder del RNAm-*repA*. La unión de CopA a CopT bloquea el inicio de traducción del péptido líder TAP, lo que resulta en una degradación del dúplex dependiente de la RNasa III. Esta degradación parece ser un

paso importante en el control de la síntesis de RepA (Blomberg *et al.*, 1992; Blomberg *et al.*, 1994; del Solar *et al.*, 1998).

El RNA antisentido CopA inhibe la traducción de *repA* por la inhibición de la traducción del péptido líder (Figura 4). Recientemente se ha elucidado la vía de unión entre CopA y CopT. La unión inicia con la interacción de las asas entre CopA y CopT. La baja estabilidad del tallo facilita el progreso de la interacción asa-asa. Posteriormente, se forma un dúplex parcial. Este intermediario se convierte en un complejo inhibitor estable y después en un dúplex completo (Praskier *et al.*, 1989 , 1992; Brantl, S., 2004).

Inhibición de la formación del “primer”: Replicón ColE1

El plásmido multicopia de *E. coli*, ColE1, en contraste con otros plásmidos, no requiere de una proteína iniciadora de la replicación codificada en el plásmido (Brantl, S., 2004). El único componente esencial para su replicación, presente en el plásmido, es un primero de RNA (RNAII), el cual es el blanco para el control del número de copias. Primero, se sintetiza un pre-primer de 550 nt de longitud por la RNA polimerasa del hospedero. Durante su síntesis, este pre-primer sufre cambios conformacionales específicos, los cuales se requieren para su actividad. La conformación activa de este RNA forma un híbrido persistente que involucra dos regiones de contacto entre RNAII y el DNA en la región del origen. El RNA del híbrido RNA-DNA es degradado por la RNasaH del hospedero, convirtiéndolo en un primer maduro para la replicación, el cual se agrega al extremo 3'-OH requerido por la DNA polimerasa I. El control de la replicación lo regula el RNAI de 108 nt de long (compuesto de tres estructuras tallo-asas), el cual se transcribe constitutivamente a partir de la hebra complementaria en la región del pre-primer. La unión del RNAI al RNAII

evita el plegamiento del pre-prímero recién sintetizado y, además, la formación de un híbrido RNA-DNA persistente dentro de la región origen. Consecuentemente, se evita la maduración del prímero (Figura 4) (Brantl, S., 2004).

En este caso, el RNA antisentido no afecta la expresión del gen que codifica para una proteína, pero sí la actividad de un RNA blanco por la inducción de una conformación no funcional .

Inhibición de la formación de un pseudonudo: $Inc\alpha/Inc\beta$

Los dos ejemplos mejor caracterizados son los plásmidos ColIb-P9 ($Inc\alpha$) y pMU720 ($Inc\beta$) (Asano *et al.*, 1991; Asano and Mizobuchi, 1998). Aquí, un RNA antisentido de 70 nt de longitud inhibe la formación de un pseudonudo de RNA, que se requiere para la traducción eficiente de la proteína iniciadora de la replicación (Rep). En el plásmido ColIb-P9, el péptido líder *repY* debe ser traducido para permitir la síntesis de RepZ. En el RNAm-*repZ* se encuentran dos estructuras tallo-asa, las cuales se localizan corriente arriba del sitio de unión del ribosoma de *repY* (estructura I) y a la mitad del gen *repY* (estructura III). Dichas estructuras son necesarias para el control de la replicación. La estructura III ocluye el sitio de unión a ribosoma de *repZ* y una secuencia corta complementaria a la región del asa en la estructura I. La terminación apropiada de la traducción de *repY* despliega a la estructura III, lo cual permite la formación de una hélice corta entre el asa blanco y el tallo interrumpido, localizado 100 nt aparte, induciendo la formación del pseudonudo activador por apareamiento intramolecular del asa I con su secuencia complementaria. La formación del pseudonudo facilita la unión del ribosoma al sitio de unión a ribosoma de *repZ* (Asano *et al.*, 1991; Asano and Mizobuchi, 1998).

El RNA antisentido (RNAI) está codificado corriente arriba de *repY* y tiene la función de bloquear el sitio de unión a ribosoma de *repY*, evitando su traducción; y evitar la activación de la traducción de *repZ*, ya que la interacción RNAI/RNA_m-*repZ* involucra los nucleótidos de la estructura I requeridos para la formación del pseudonudo (Figura 4). De esta forma, el RNA antisentido puede reprimir la traducción de *repZ* a nivel de una interacción transitoria con su blanco antes de que se forme el dúplex completo (Asano *et al.*, 1991; Asano and Mizobuchi, 1998; Brantl, S., 2002).

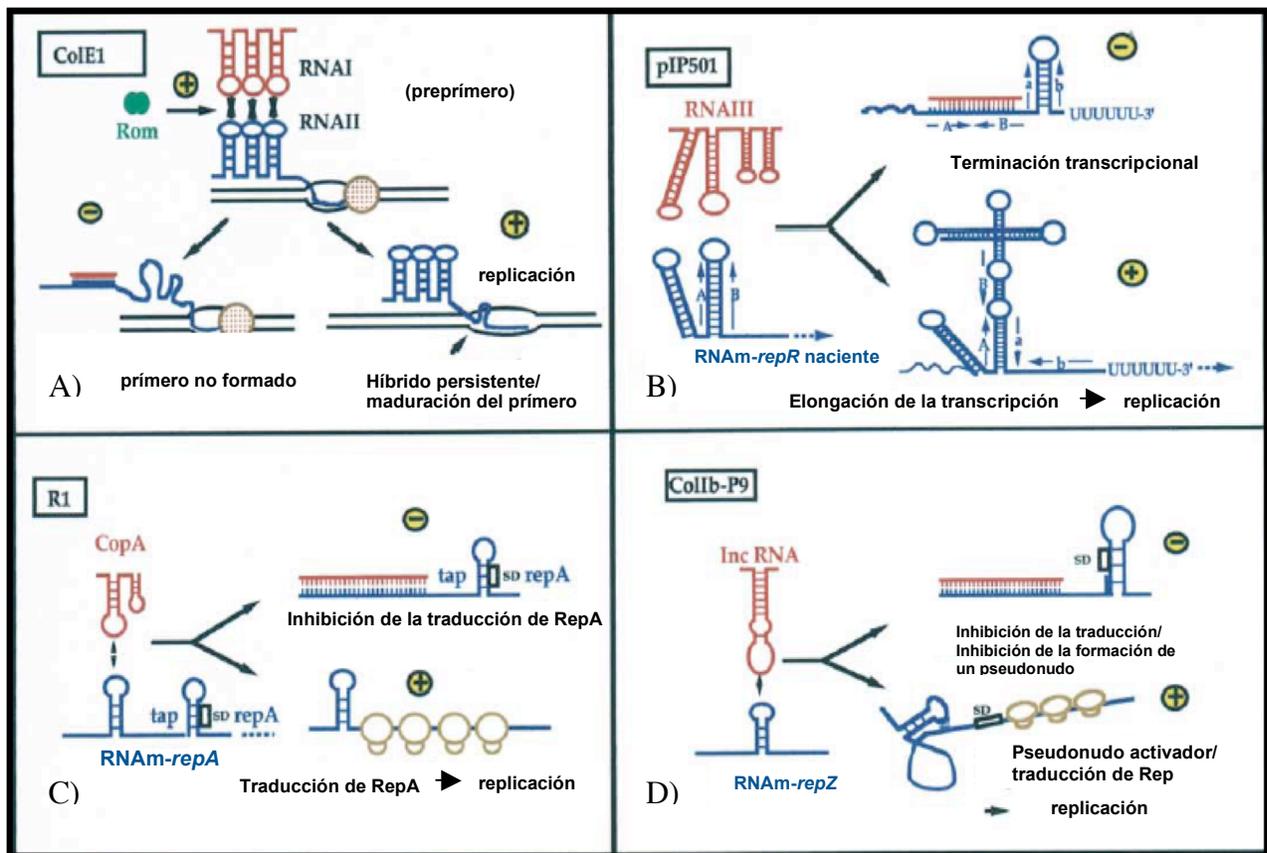


Figura 4. El RNA antisentido controla la replicación de un plásmido a través de diferentes mecanismos: A) La inhibición de la formación de un primer de RNA requerido para el inicio de la replicación, B) Atenuación transcripcional, C) Inhibición de la traducción del péptido líder, D) Inhibición de la formación de un pseudonudo. El RNA antisentido se muestra en rojo en todos los casos. El RNAm de la proteína iniciadora se muestra en azul. En ColE1 se requiere de la proteína Rom (verde) que favorece la unión entre los RNA's blanco y antisentido. También se muestran los ribosomas como unas estructuras amarillas que se encuentran sobre el RNAm blanco (Brantl, S., 2002).

I.1.1.2.3 Represores transcripcionales y RNA antisentido.- El control por la acción conjunta de un represor transcripcional y un RNA antisentido se ha caracterizado para los plásmidos R1, pMV158 y, recientemente, para el pIP501 (del Solar *et al.*, 1998).

En el caso de pMV158, la regulación se basa en la disponibilidad de la proteína iniciadora RepB. Esta disponibilidad se regula a su vez por el producto de los genes *rnaII* y *copG*. El gene *rnaII* codifica para un RNA antisentido de 50 nt que se une al RNAm-*repB*. Por su parte *copG* codifica para el represor transcripcional CopG, que se une al promotor de los genes *copG* y *repB* para reprimir la transcripción de sí mismo y de *repB*. La unión de CopG al promotor incluye una secuencia inversa repetida de 13 pb, la cual comprende la mayor parte de la caja -35 del promotor.

Para el caso del plásmido pIP501, el control del número de copias se lleva a cabo por un represor transcripcional llamado CopR y un RNA antisentido llamado RNAIII. El promotor pI dirige la expresión del gen *copR*, cuyo producto inhibe la transcripción a partir del promotor pII, localizado río abajo de pI. El promotor pII es el único que dirige la expresión del gen *repR*, que codifica para la proteína iniciadora de replicación. Un tercer promotor pIII dirige la síntesis del RNAIII, el cual se une al RNAm de *repR* y provoca una terminación prematura del mensajero (del Solar *et al.*, 1998).

I.1.2 Partición

Partición se refiere al proceso de segregación en bacterias, en el cual los cromosomas hijos son separados y posicionados antes de la formación del septo y la división celular (Schumacher, M.A, 2007).

Hay dos categorías generales de sistemas de estabilidad de plásmidos: sistemas pasivos que dependen de la distribución al azar de los plásmidos hijos y sistemas activos que aseguran que cada célula hija reciba una copia del plásmido en la división celular (Bignell and Thomas, 2001; Schumacher, M.A, 2007).

I.1.2.1 *Partición pasiva*

El control estricto de la replicación es un componente esencial de cualquier sistema de estabilidad de plásmidos. Un plásmido puede incrementar sus oportunidades de ser distribuido a ambas células hijas por la elevación del número de copias, tal que la distribución al azar será suficiente para el mantenimiento de plásmidos a través de la división celular (Gerdes *et al.*, 2000; Bignell and Thomas, 2001; Ghosh *et al.*, 2006; Schumacher, M.A, 2007).

I.1.2.2 *Partición activa*

Este sistema se refiere al movimiento dirigido de los plásmidos recién replicados hacia las células hijas (Schumacher, M.A, 2007).

Los plásmidos bacterianos unicopia o de bajo número de copias como P1, F y R1 codifican para un sistema de partición (*par*) para lograr una segregación exitosa (Gerdes *et al.*, 2000; Bignell and Thomas, 2001; Ghosh *et al.*, 2006; Schumacher, M.A, 2007).

Todos los sistemas de partición activa están compuestos por tres elementos: una región de DNA (centrómero) actuando en *cis* y dos proteínas Par actuando en *trans* y codificadas en operón. El centrómero contiene iterones, múltiples copias de una secuencia que es característica en cada plásmido. Se ha demostrado que los primeros pasos de la partición de plásmidos involucra la unión de una proteína ParB al centrómero. Subsecuentemente,

múltiples moléculas ParB se propagan alrededor, formando una gran estructura nucleoproteica llamada complejo de partición o segregosoma. Esto recluta a la otra proteína ParA, una ATPasa que reconoce al complejo de partición y actúa como un “switch” molecular. La hidrólisis del ATP provee la energía para separar los productos de la replicación del plásmido, en un proceso análogo a la mitosis en células eucariotas. La actividad ATPasa de la proteína ParA es fuertemente estimulada por la proteína ParB y DNA; y puede formar parte de un sitio de reconocimiento de la membrana para plásmidos apareados. El movimiento del plásmido puede resultar de la translocación del DNA más allá del complejo ParA anclado en la membrana celular (Gerdes *et al.*, 2000; Bignell and Thomas, 2001; Ghosh *et al.*, 2006; Schumacher, M.A, 2007).

El sistema *par* codificado en plásmidos puede ser dividido en dos tipos, basado en el tipo de ATPasa que contiene. El sistema tipo I es el más numeroso, y son ATPasas tipo Walker, mientras que el sistema tipo II emplea ATPasas tipo actina. El sistema I, además, puede dividirse en tipo Ia y Ib basado en la homología y tamaño de las proteínas.

El sistema Ia contiene proteínas ParA y ParB, de 321-420 y 312-342 residuos aa respectivamente, mientras que el tipo Ib contiene proteínas más pequeñas, homólogas a ParA (192-308 residuos) y ParB (46-131 residuos) (Gerdes *et al.*, 2000; Bignell and Thomas, 2001; Ghosh *et al.*, 2006; Schumacher, M.A, 2007).

En sistemas Ia, las proteínas ParA también actúan como represores transcripcionales en la autorregulación de su operón *par*, mientras que en el sistema Ib y II, esta función la lleva a cabo ParB. Sorprendentemente, las proteínas ParB muestran poca similitud; por lo tanto, el sistema de clasificación está basado en ParA (Gerdes *et al.*, 2000; Bignell and Thomas, 2001; Ghosh *et al.*, 2006; Schumacher, M.A, 2007).

La eficiencia de segregación es optimizada por sistemas de muerte post-segregacional o por sistemas de resolución de dímeros (Schumacher, M.A, 2007).

I.1.2.3 *Los sistemas “killer” o de muerte post-segregacional*

Se encargan de eliminar de la población a las células que no contienen plásmidos. Este mecanismo de toxina-antitoxina (TA) se basa en la acción antagonista de una toxina químicamente estable y una antitoxina menos estable. Un ejemplo de este sistema es encontrado en el plásmido R1. El plásmido codifica para un RNAm *hok* estable que puede ser reprimido por el RNA antisentido *sok*. Segregantes libres del plásmido permiten que el RNAm *hok* sea traducido en una proteína letal después que el RNA inhibidor es degradado (Gerdes *et al.*, 2000; Bignell and Thomas, 2001; Ghosh *et al.*, 2006; Schumacher, M.A, 2007).

I.1.2.4 *Los sistemas de resolución de dímeros*

Después que se completa la replicación de DNA, las moléculas hijas están a menudo presentes como dímeros circulares. Estas estructuras resultan de una separación topológica incompleta durante la replicación o recombinación homóloga. Por lo tanto, deben separarse completamente para terminar la partición. Los dímeros son resueltos en monómeros por un evento de recombinación sitio específica en la región de término de la replicación (Schumacher, M.A, 2007).

La resolución es catalizada por la recombinasa bacteriana XerC-XerD en el sitio *dif* (ColE1). Los defectos que impiden la separación de las moléculas recién sintetizadas, conducen a porcentajes elevados de pérdida del plásmido por generación (Schumacher, 2007).

I.1.3 Incompatibilidad.

No todos los tipos de plásmidos pueden coexistir establemente en las células de un cultivo bacteriano. Algunos tipos de plásmidos interfieren con la replicación de otros, en su partición, o la regulación de alguno de estos dos fenómenos. De modo que si se introducen dos plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad en la misma célula, uno u otro se perderá en la división celular. Este fenómeno se llama incompatibilidad de plásmidos. Los plásmidos que no pueden coexistir establemente son miembros del mismo grupo de incompatibilidad o grupo *Inc*. Si dos plásmidos pueden coexistir establemente, pertenecen a diferentes grupos *Inc* (Summers, 1996).

La mayoría de los plásmidos produce un represor de la replicación, actuando en *trans*, cuya concentración es proporcional al número de copias del plásmido. La interacción del represor con su blanco rompe una unión en la cadena de eventos que conducen al inicio de la replicación y establece una retroalimentación negativa, la cual regula el número de copias del plásmido. Cuando el número de copias y la concentración del represor son altas, se inhibe la replicación del plásmido. Pero cuando el número de copias y la concentración del represor son bajas, la replicación procede (Summers, 1996).

Considerando una célula conteniendo dos plásmidos compatibles, cada plásmido produce un inhibidor de la replicación, el cual no tiene efecto en la replicación del otro; ellos mantienen su número de copias normal y persisten independientemente uno del otro. En contraste, cada miembro de un par de plásmidos incompatibles produce un inhibidor que regula no solamente su propia replicación, sino la de ambos plásmidos. Si los plásmidos incompatibles son de igual número de copias y si cada inhibidor reprime eficientemente la replicación de ambos, la reacción de incompatibilidad será simétrica y la probabilidad de que cualquiera de

los plásmidos se encuentre en una célula es igual. Algunas veces, el número de copias no es el mismo; el plásmido de alto número de copias puede ser menos sensible al inhibidor de la replicación. Por lo tanto, este plásmido se continuará replicando a concentraciones del inhibidor que eliminen la replicación de su contraparte de bajo número de copias. El plásmido de bajo número de copias se perderá potencialmente de la línea celular (Summers, 1996).

En los plásmidos regulados por RNA antisentido, el primer determinante de incompatibilidad es este RNA que reconoce secuencias específicas en el plásmido (Summers, 1996).

I.2 Los replicones *repABC* en α -proteobacterias

Los replicones *repABC* están presentes en plásmidos de algunas α -proteobacterias como *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Ruegeria*, *Paracoccus*, *Brucella* y *Gluconobacter* (Bartoski *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2002). Algunos de estos géneros tienen la capacidad para llevar a cabo interacciones planta-bacteria y formar nódulos fijadores de nitrógeno en muchas leguminosas. Algunos otros, como los del género *Agrobacterium* inducen tumores en una gran diversidad de plantas dicotiledóneas (plásmido Ti).

La familia de plásmidos *repABC* se caracteriza, por la presencia de un operón formado por los genes *repA*, *repB* y *repC* (Ramírez-Romero *et al.*, 1997; Pappas and Winans, 2003).

Los dos primeros genes del operón codifican para proteínas que muestran homología en secuencia y en función con proteínas del sistema de partición (Bignell and Thomas, 2001).

Otra característica común de estos plásmidos es una región intergénica larga y conservada, localizada entre los genes *repB* y *repC* (Cevallos *et al.*, 2002).

II. Antecedentes

II.1 Análisis genético de un plásmido *repABC*: pSim de *R. etli* CE3.

Rhizobium etli es una especie que nodula y fija nitrógeno en las raíces de frijol. La cepa CE3 contiene seis grandes plásmidos pertenecientes a la familia *repABC*. El plásmido pSim o p42d de la cepa de *R. etli* CE3 es una molécula circular que consta de 371,255 pb y contiene 359 genes. El operón *repABC* se ubica dentro de un fragmento *HindIII* de 5.6 kb, inmerso en la banda *BamHI* 89 del mapa estructural del pSim (plásmido simbiótico), previamente reportado (Ramírez-Romero *et al.*, 1997).

Un análisis genético demostró que los genes *repA*, *repB* y *repC* están organizados en una sola unidad transcripcional (operón) (Ramírez-Romero *et al.*, 2000). Los productos RepA y RepB juegan un papel en la estabilidad del plásmido (función de segregación); además, actúan como el regulador negativo de la transcripción del operón (Fig. 5). El operador del operón es una secuencia invertida repetida que se encuentra entre el promotor y el codón de inicio de RepA (Ramírez-Romero *et al.*, 2001). Las proteínas RepA junto con RepB actúan como un factor *trans*-incompatible (Ramírez-Romero *et al.*, 2000).

La proteína RepC es el factor limitante para la replicación, ya que los derivados del replicón básico que carecen del gen que la codifica, o que portan mutaciones que lo afectan, son totalmente incapaces de replicar (Ramírez-Romero *et al.*, 1997). Por otra parte, una construcción que expresa la proteína RepC a partir de un promotor *Plac* es capaz de replicar independientemente en *Rhizobium*, con muchas más copias que el plásmido silvestre, pero

con una estabilidad pobre. Este resultado corrobora que RepC es el factor único y suficiente para inducir replicación, y demuestra que el origen de replicación (*oriV*) se encuentra dentro de la región codificante para esta proteína (Cervantes, R. sin publicar).

Se han identificado además dos regiones que inducen incompatibilidad (Fig. 5); una se localiza dentro de la región intergénica de los genes *repB* y *repC*, llamada *inca*. La otra, *incβ*, se encuentra inmediatamente corriente abajo de *repC* (Ramírez-Romero *et al.*, 2000).

Un estudio genético-molecular de la región *incβ* determinó que la secuencia responsable del fenotipo de incompatibilidad es únicamente una secuencia palindrómica de 16 pb, que se localiza 40 pb corriente abajo del codón de término de *repC* (Soberón *et al.*, 2004). Este palíndromo se encuentra en la misma región y ejerce el mismo efecto en plásmidos que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad como es el caso del plásmido pRiA4b (Cevallos *et al.*, 2002).

Un análisis estructural y funcional de la región *inca* del plásmido p42d de *R. etli* permitió identificar que esta secuencia contiene al menos tres elementos reguladores adicionales que modulan la expresión de RepC (Fig. 5) (Venkova-Canova *et al.*, 2004). Uno de ellos consiste en un gen que codifica para un RNA antisentido pequeño, que está presente en todos los miembros de la familia *repABC*. Otro elemento es una estructura tallo-asa que se localiza inmediatamente arriba del gen *repC*, que ocluye su secuencia Shine-Dalgarno. El último elemento es un péptido codificado dentro de la estructura tallo-asa, el cual tiene una influencia positiva sobre la expresión de *repC* (Venkova-Canova *et al.*, 2004). El ctRNA es de 59 nt y se transcribe a partir de un promotor constitutivo (P2) que se encuentra en la hebra de DNA complementaria a aquella que codifica al operón *repABC* (P1). La presencia física del ctRNA se demostró identificando el inicio transcripcional por 5' RACE (Venkova-

Canova *et al.*, 2004). El ctRNA tiene una estructura tallo-asa y una secuencia poli-U propia de los terminadores intrínsecos de la transcripción (Fig. 6A). Por medio de experimentos genéticos se demostró que la estructura antes descrita funciona como un fuerte terminador de la transcripción de P2 (Venkova-Canova *et al.*, 2004). También se demostró que la introducción de un fragmento de DNA con el gen del ctRNA activo ejerce incompatibilidad hacia el p42d, pero no una construcción equivalente con el promotor P2 mutado (Venkova-Canova *et al.*, 2004). El gen del ctRNA confiere todas las propiedades de incompatibilidad presentes en *inca*. El ctRNA es un regulador negativo de la expresión de *repC* (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

El segundo elemento regulador es una estructura tallo-asa denominado elemento S, que se forma en el RNAm de *repABC*, en la región *inca* inmediatamente arriba de *repC* (6pb) (Fig. 6B). El elemento S actúa como regulador negativo de la transcripción de *repC* y se requiere para la replicación, por lo tanto probablemente codifica para algunos elementos positivos que incrementan la traducción de *repC* (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

Un análisis bioinformático de la secuencia de DNA de la región completa *inca* reveló la presencia de una secuencia Shine-Dalgarno dentro del extremo 5' del elemento S, seguido por un codón de inicio (GTG) para un pequeño péptido de 10 residuos aminoácidos que termina justo antes del extremo 3' de la secuencia Shine-Dalgarno de *repC*, el cual probablemente permite que el ribosoma abra el elemento S y libere la secuencia Shine-Dalgarno. Las mutaciones que cambian el GTG por un codón de alanina impiden la replicación del plásmido (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

La presencia de estos tres elementos reguladores: un RNA antisentido, una estructura tallo-asa en el RNAm que secuestra la secuencia Shine-Dalgarno del gen iniciador, y la presencia

de un péptido pequeño requerido para la traducción de una proteína iniciadora se han descrito en tres sistemas de plásmidos no relacionados: ColIb-P9, pMU720 y R1.

(Hama *et al.*, 1990; Blomberg *et al.*, 1992; Praskier and Pittard, 2002).

En un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* se encontró que un pequeño RNA antisentido (*repE*), codificado entre los genes *repB* y *repC*, regula negativamente la expresión de una proteína esencial para la replicación (Chai and Winans, 2005). En este plásmido, en la región intergénica *repB-repC* también se encontró una estructura tallo-asa que se forma en el RNAm del operón y que bloquea el Shine-Dalgarno de *repC*. Chai y Winans (2005) proponen que el producto de *repE* fomenta la formación de la estructura tallo-asa que bloquea el SD de *repC*. Sin embargo, en ausencia de *repE* se forma en el RNAm del operón una estructura alternativa que libera el SD de *repC* permitiendo su traducción.

Dadas las características de un RNA antisentido y las evidencias de la presencia de 3 elementos requeridos para la replicación del plásmido p42d de *R. etli*, es evidente que éstos interactúan para regular el nivel de expresión de *repC* y el inicio de replicación del plásmido, aunque el mecanismo de acción parece ser diferente a los mencionados anteriormente (ColIb-P9, pMU720 y R1).

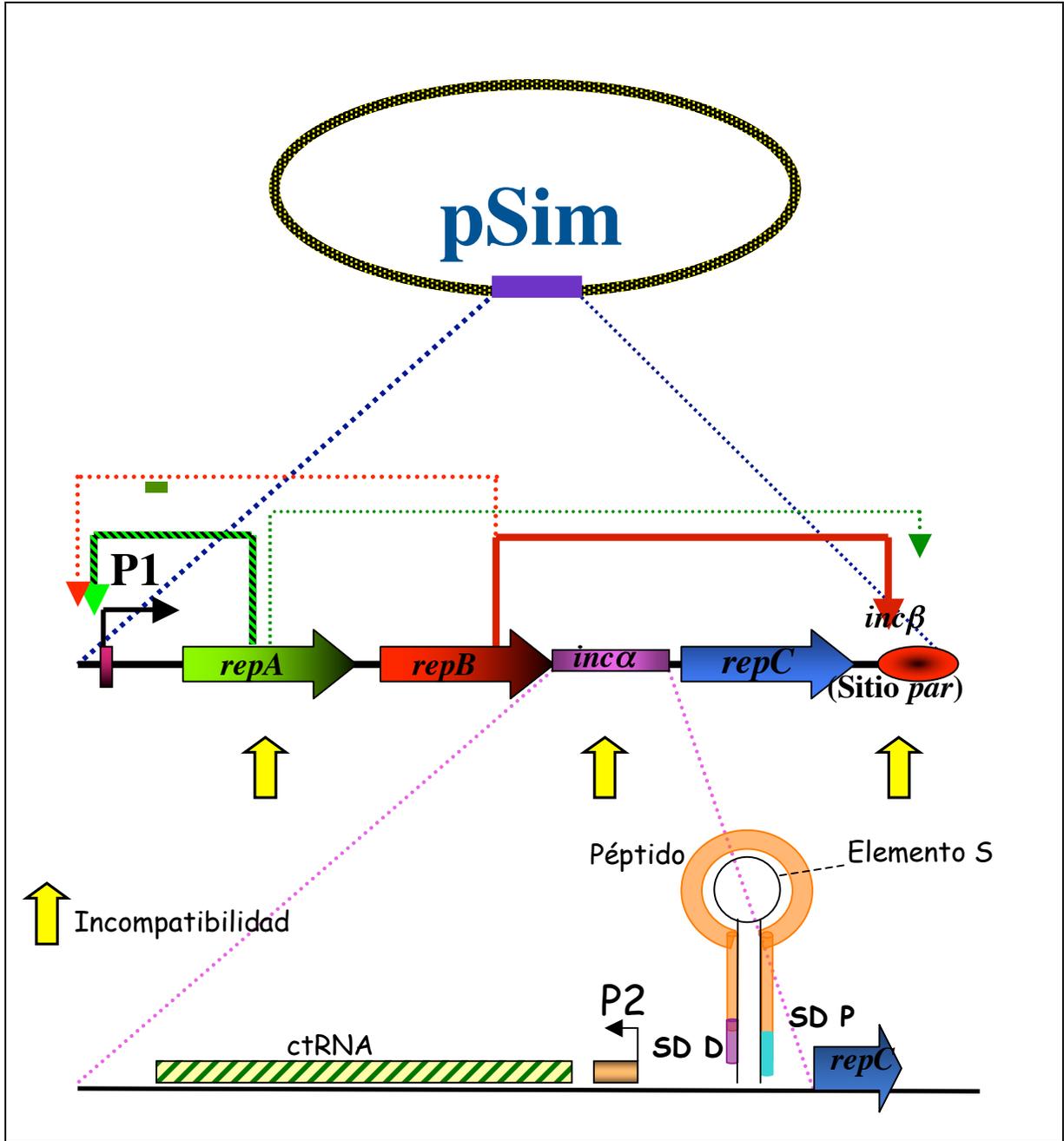


Figura 5. Regulación del replicón *repABC*. El plásmido simbiótico o p42d de *R. etli* CFN42 contiene un replicón formado por 3 genes *repA*, *repB* y *repC* (flechas verde, roja y azul, respectivamente). También contiene una región intergénica *repB-repC*, llamada *incα* (rectángulo morado). Dentro de *incα* se encuentra un gen que codifica para un RNA antisentido (ctRNA rectángulo amarillo con líneas verdes), una estructura talloasa que se forma en el RNAm-*repC*. y un pequeño péptido (color naranja) dentro de esta estructura. Las flechas amarillas corresponden a factores que confieren incompatibilidad contra el plásmido simbiótico.

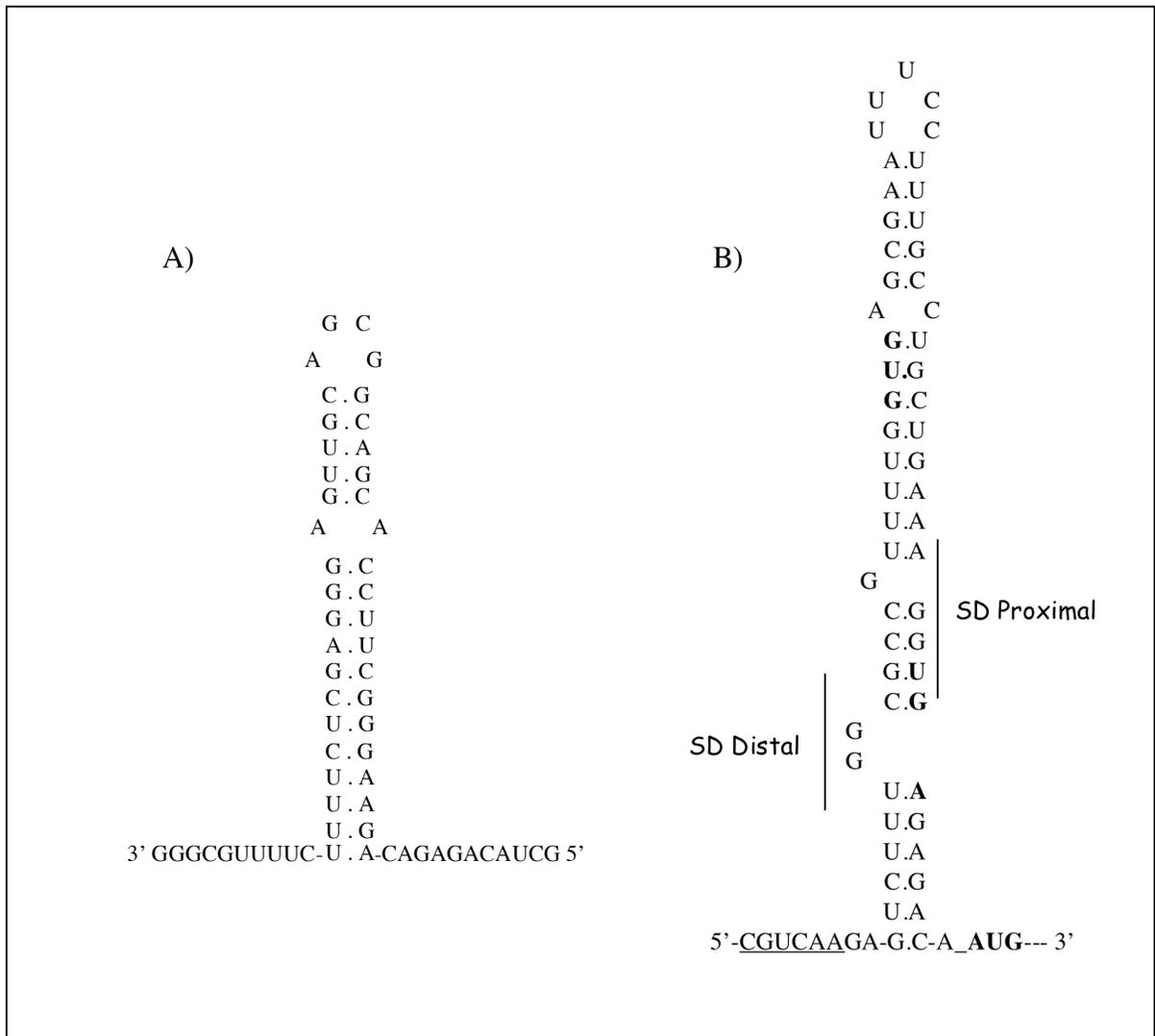


Figura 6 A)Estructura del RNA antisentido encontrado en la región *inca* del plásmido simbiótico (p42d) de *Rhizobium etli*. Esta estructura tallo y asa está formada por 18 nucleótidos ricos en GC formando el tallo, el cual está interrumpido por un par de bases no apareadas, además presenta una secuencia de U's, típica de los terminadores independientes de *rho* (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

B)Estructura del Elemento S. Predicción de la estructura secundaria del plegamiento del *RNA_m-repC*, dentro del los 65 nt corriente arriba del codón de inicio AUG de *repC*, que consiste en una estructura tallo y asa que ocluye su secuencia SD. La secuencia complementaria a la caja -35 del promotor P2 del ctRNA se muestra subrayada. El codón de inicio AUG de *repC*, se encuentra en letras oscuras, así como el codón de inicio GUG y el codón de término UGA del pequeño péptido (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

III. Hipótesis

Si la unión del ctRNA al RNAm-*repC* ocurre entre las secuencias de cadena sencilla de ambos RNA's, las mutaciones o eliminaciones en dichas regiones en el ctRNA afectarán su interacción con el RNAm-*repC*, por lo tanto, ya no tendrá la capacidad de generar incompatibilidad e inhibir la replicación.

IV. Objetivo General:

Elucidar el mecanismo de acción mediante el cual el ctRNA regula la replicación del plásmido p42d de *Rhizobium etli* CFN42.

IV.1. Objetivo particular:

Identificar los elementos del RNA antisentido que son importantes para la incompatibilidad y la regulación de la replicación del plásmido p42d de *R. etli*.

Estrategia:

Se generó una serie de mutantes en el gen que codifica para el ctRNA, construidas de manera sitio específica, que afectaron la secuencia del asa, tallo y regiones de cadena sencilla. Probamos si son capaces de producir incompatibilidad contra el plásmido simbiótico, así como su efecto en la replicación.

Con esto pretendemos identificar los sitios de interacción primaria entre el ctRNA y el RNAm-*repC*.

V. Materiales y Métodos

Cepas y plásmidos

En la tabla siguiente se enlistan las cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados.

Cepa	Características	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa hospedera de plásmidos	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> S17-1	Cepa donadora de plásmidos	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>R. etli</i> CFNX101	recA:: Ω Sp ^r Sm ^r ; p42a ⁻ p24d ⁻ ; derivado de CE3	Martínez-Salazar <i>et al.</i> , 1991
<i>R. etli</i> CFNX107	recA:: Ω Sp ^r Sm ^r ; derivado de CE3	Ramírez-Romero <i>et al.</i> , 2000
Plásmidos	Características	Referencia
pDOP	Derivado de pDO, 4.3 kb contiene <i>parDE</i>	R. Cervantes (datos no publicados)
pBBR1MCS-5	Gm ^r Vector de clonación replicable en <i>Rhizobium</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pDRinco42d	Contiene la secuencia del ctRNA del plásmido p42d de <i>R. etli</i> silvestre en el pBBR1MCS-5	Este estudio
pDR1	Contiene una mutación puntual en el asa del RNA (A-U) en pBBR1MCS-5	Este estudio
pDR2	Contiene una mutación puntual en el asa del RNA (G-C) en pBBR1MCS-5	Este estudio
pDR3	Contiene una mutación puntual en el asa del RNA (C-G) en pBBR1MCS-5	Este estudio
pDR4	Contiene una mutación puntual en el asa del RNA (G-C) en pBBR1MCS-5	Este estudio
pDR5	Contiene una mutación donde cambian las cuatro bases en el asa del RNA (AGCG-UCGC) en pBBR1MCS-5	Este estudio

pDR7	Contiene una mutación para cerrar la burbuja del tallo del ctRNA en pBBR1MCS-5 (A-T)	Este estudio
pDR12	Contiene una eliminación de la primera parte del extremo 5' del ctRNA (AAGAAG) en pBBR1MCS-5	Este estudio
pDR13	Contiene una eliminación de la segunda parte del extremo 5' del ctRNA (AGAAUG) en pBBR1MCS-5	Este estudio
pDR14	Contiene una sustitución de la primera parte del extremo 5' del ctRNA de <i>R. etli</i> por <i>S. meliloti</i> (AAGACAGA-GAGGAGUCUA en pBBR1MCS-5	Este estudio
pDOPD α C-42d	Derivado de pDOP. Contiene la región <i>inca</i> y <i>repC</i> del plásmido p42d de <i>R. etli</i>	Este estudio
pDOPR1	Contiene una mutación puntual en asa del ctRNA (A-U) en pDOP, incluyendo <i>repC</i>	Este estudio
pDOPR2	Contiene una mutación puntual en asa del ctRNA (G-C) en pDOP, incluyendo <i>repC</i>	Este estudio
pDOPR3	Contiene una mutación puntual en asa del ctRNA (C-G) en pDOP, incluyendo <i>repC</i>	Este estudio
pDOPR4	Contiene una mutación puntual en asa del ctRNA (G-C) en pDOP, incluyendo <i>repC</i>	Este estudio
pDOPR5	Contiene una mutación donde cambian las cuatro bases en asa del ctRNA (AGCG-UCGC) en pDOP, incluyendo <i>repC</i>	Este estudio
pDOPR7	Contiene una mutación para cerrar la burbuja del tallo del ctRNA en pDOP (A-T) e incluye <i>repC</i>	Este estudio
pDOPR12	Contiene una eliminación de la primera parte del extremo 5' del ctRNA (AAGAAG) en pDOP e incluye <i>repC</i>	Este estudio
pDOPR13	Contiene una eliminación de la segunda parte del extremo 5' del ctRNA (AGAAUG) en pDOP e incluye <i>repC</i>	Este estudio

PDOPR14	Contiene una mutación en la primera parte del extremo 5' del ctRNA (AAGACAGA-GAGGAGUCUA) en PDOP e incluye <i>repC</i>	Este estudio
---------	--	--------------

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación y mutagénesis de la región *inca-repC* en este estudio se enlistan en la siguiente tabla.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Sitios de restricción	Origen
SK-C-U	TCT AGA CCG CGG CCC GCA AAA GAA AAG AGC	<i>XbaI, SacII</i>	Este estudio
SK-C-L	GGT ACC TTA CCC AGC CCT CAA ACC GCC GCC	<i>KpnI</i>	Este estudio
SK-C-UE	CCG CGG CCC GCA AAA GAA AAG AGC TCC CTC AAC	<i>SacII</i>	Este estudio
SPH-C-L	GTC GAC GCA TGC GC CGA AGC GCC AGT TG	<i>SalI, SphI</i>	Este estudio
RNAL1	CCC TCA ACG ACG CCG TCG TGG	Ninguno	Este estudio
RNAL2	CCC TCA ACG TGG CCG TCG TGG	Ninguno	Este estudio
RNAL3	CCC TCA ACG TCC CCG TCG TGG	Ninguno	Este estudio
RNAL4	CCC TCA ACG TCG GCG TCG TGG	Ninguno	Este estudio
RNAL5	CCC TCA ACG AGC GCG TCG TGG	Ninguno	Este estudio
CTRNAB	CCC TCA ACG TCG CCG TCG AGG AAG CCC	Ninguno	Este estudio

DELTA5-1	CCC TCA ACG TCG CCG TCG TGG AAG CCC TCT GTA GCA AGA AC	Ninguno	Este estudio
DELTA5-2	CCC TCA ACG TCG CCG TCG TGG AAG CCC TTC TGT CCA AGA ACA GAA TCG C	Ninguno	Este estudio
QAD4L	CCG CGG CCC GCA AAA GAA AAG AGC TCC CTC AAC GTC GCC GTC GTG GAA GCC TCC TCA GAT TTG TAG CCA AG	<i>SacII</i>	Este estudio

Condiciones de crecimiento de las cepas de *E. coli* y *R. etli*

Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37°C en medio de cultivo Luria-Bertani (LB), suplementado, según fuera el caso, con ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), Cloranfenicol (30 µg/ml). Las cepas de *R. etli* se incubaron a 30°C en medio PY suplementado con CaCl₂ 1M y Ác, nalidíxico (20 µg/ml), Gm (30 µg/ml).

Construcción de los plásmidos control

Plásmido pDOPD α C-42d

Se amplificó por PCR el fragmento *inca-repC* del plásmido p42d, utilizando los oligos SK-C-U y SK-C-L. El producto de PCR se clonó en el vector PCR 2.1 TOPO de Invitrogen. Posteriormente, se clonó este fragmento en el plásmido pDOP en los sitios *SacII* y *KpnI* para determinar la capacidad de replicación.

Plásmido pDR*inca*-42d

Se utilizó como molde el plásmido pDOPD α C-42d y se hizo un PCR con los oligos SKCU y SPH-C-L. El producto final de PCR fue clonado en el vector PCR 2.1 TOPO y,

posteriormente, se clonó este fragmento en el plásmido pBBR1MCS-5 en el sitio *EcoRI* para determinar incompatibilidad contra el plásmido simbiótico.

Plásmido pDOPD α C-SymA

Se amplificó por PCR el fragmento *inca-repC* del plásmido pSymA, utilizando los oligos S-SymA-U y K-SymA-L. El producto de PCR se clonó en el vector PCR 2.1 TOPO de Invitrogen. Posteriormente, se clonó este fragmento en el plásmido pDOP en los sitios *SacII* y *KpnI*, para determinar capacidad de replicación.

Plásmido pDR*inca*-SymA

Se utilizó como molde el plásmido pDOPD α C-SymA y se hizo un PCR con los oligos S-SymA-U y N-iSymA-L. El producto final de PCR fue clonado en el vector PCR 2.1 TOPO y, posteriormente, se clonó este fragmento en el plásmido pBBR1MCS-5 en el sitio *EcoRI* para determinar incompatibilidad contra el plásmido simbiótico.

Construcción de los plásmidos con las mutaciones en el RNA antisentido

Mutaciones en el asa del RNA antisentido

Se utilizó como molde el plásmido pDOPD α C-42d y se hizo un PCR con los oligos RNAL1 y SPH-C-L, introduciendo así la mutación en el asa del RNA antisentido. Después se hizo un segundo PCR con los oligos SK-C-UE y SPH-C-L, para reamplificar desde el inicio de *inca*. Del mismo modo se hicieron las demás mutantes, utilizando los oligos RNAL2, RNAL3, RNAL4 y RNAL5. Los productos finales de PCR fueron clonados en el vector PCR 2.1 TOPO y posteriormente se clonó este fragmento en el plásmido pBBR1MCS-5 para determinar incompatibilidad (pDR1, pDR2, pDR3, pDR4 y pDR5). Los plásmidos pDOPR1, pDOPR2, pDOPR3, pDOPR4 y pDOPR5 se contruyeron para determinar el

efecto de las mutaciones en el asa del RNA antisentido en la replicación. Se amplificó la región *inca-repC* con los oligos mutagénicos RNAL1, RNAL2, RNAL3, RNAL4 RNAL5 y SK-C-L. Posteriormente se hizo un segundo PCR con los oligos SK-CU-E y SK-C-L para amplificar la región completa *inca-repC*. De manera que dichos fragmentos contenían las mismas mutaciones en el asa del RNA antisentido incluyendo *repC*. Estos fragmentos se clonaron en el plásmido pDOP.

Mutaciones para cerrar la burbuja del RNA antisentido

Se amplificó por PCR la región *inca-repC* con los oligos SK-C-L y CTRNAB. Con ese producto se volvió a amplificar otro producto de PCR con los oligos SK-C-L y SK-CU-E. El producto final del PCR se clonó en el plásmido pDOP para determinar capacidad de replicación.

Posteriormente, se hizo un PCR a partir de la clona que se utilizó para determinar replicación, utilizando los oligos SPH-C-L y SK-CU-E. El producto de PCR se clonó en el pBBR1MCS-5 para determinar incompatibilidad contra el plásmido simbiótico.

Mutaciones que eliminan la primera parte del brazo 5' del RNA antisentido

Se amplificó por PCR la región *inca-repC* con los oligos SK-C-L y DELTA5-1. Con dicho producto se volvió a amplificar otro PCR con los oligos SK-C-L y SK-CU-E. El producto final del PCR se clonó en el plásmido pDOP para determinar capacidad de replicación.

Posteriormente, se hizo un PCR a partir de la clona que se utilizó para determinar replicación, utilizando los oligos SPH-C-L y SK-CU-E. El producto de PCR se clonó en el pBBR1MCS-5 para determinar incompatibilidad contra el plásmido simbiótico.

Mutaciones que eliminan la segunda parte del brazo 5' del RNA antisentido

Se amplificó por PCR la región *inca-repC* con los oligos SK-C-L y DELTA5-2. Con dicho producto se volvió a amplificar otro PCR con los oligos SK-C-L y SK-CU-E. El producto final del PCR se clonó en el plásmido pDOP para determinar capacidad de replicación.

Posteriormente, se hizo un PCR a partir de la clona que se utilizó para determinar replicación, utilizando los oligos SPH-C-L y SK-CU-E. El producto de PCR se clonó en el pBBR1MCS-5 para determinar incompatibilidad contra el plásmido simbiótico.

Mutación que sustituye la primera parte del brazo 5' del RNA antisentido de R. etli por el de S. meliloti

Se amplificó por PCR la región *inca-repC* con los oligos QAD4 y SK-C-L. El producto final del PCR se clonó en el plásmido pDOP para determinar capacidad de replicación.

Para determinar incompatibilidad contra el plásmido simbiótico se utilizó el plásmido pBBR1MCS-5, donde se clonó el PCR amplificado con los oligos SPH-C-L y SK-CU-E.

Determinación de incompatibilidad contra el plásmido simbiótico.

Nosotros aprovechamos las propiedades de incompatibilidad de los plásmidos para determinar la interacción entre el RNA antisentido y el RNAm-*repC*.

Para poder realizar los ensayos de incompatibilidad, se utilizó la cepa CFNX101, la cual contiene el plásmido simbiótico. A esta cepa se le introdujo por conjugación una serie de construcciones basadas en un vector replicable en *Rhizobium* (pBBR1MCS-5) (Fig.7). En

este plásmido se clonó la región *inca* (portando las mutaciones) (Fig. 10). Posteriormente se hizo un perfil plasmídico de las cepas transconjugantes para determinar si eran compatibles o incompatibles. En caso de que la construcción fuera incompatible contra el plásmido simbiótico, sólo se observa el plásmido entrante y no el simbiótico. Si la construcción fuera compatible contra el plásmido simbiótico, ambos plásmidos pueden coexistir. Por lo tanto en la parte superior del gel se observarían los 6 megaplásmidos de *Rhizobium*, incluyendo el p42d y en la parte inferior del gel se observa la construcción (pBBR1MCS-5 + *inca*).

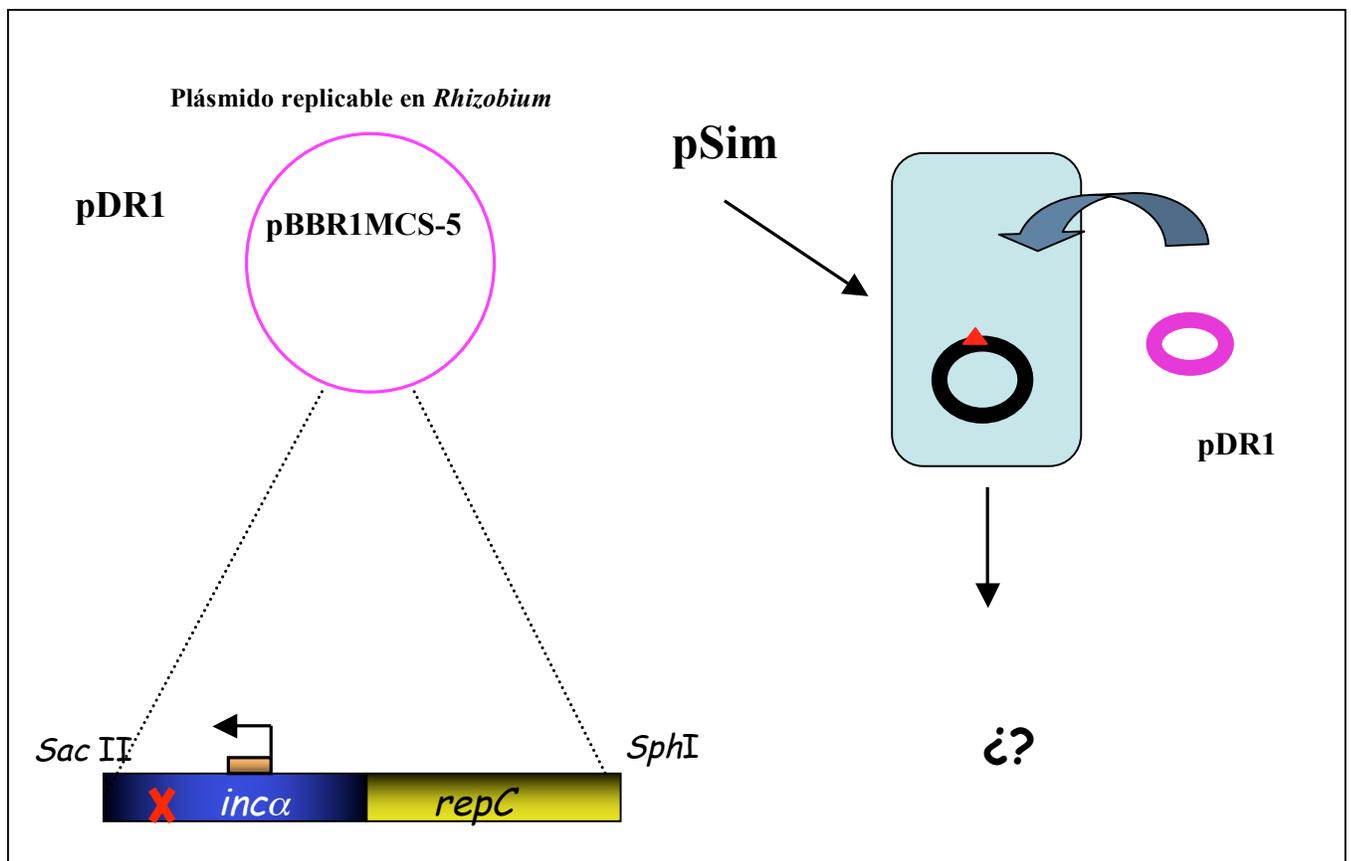


Figura 7. Ensayo de Incompatibilidad en la cepa CFNX101

Se utilizó la cepa CFNX101, la cual contiene el plásmido simbiótico p42d (círculo negro) y se le introdujo por conjugación un plásmido pBBR1MCS-5 (círculo rosa) capaz de replicar en *Rhizobium etli*, que contenía la región *inca* portando las mutaciones (región azul) y parte de *repC*, (región amarilla). Las transconjugantes obtenidas se seleccionaron por resistencia al antibiótico codificado por el plásmido pBBR1MCS-5 (Gm). Posteriormente se hizo un perfil plasmídico para determinar si son compatibles o incompatibles.

Determinación de la replicación

Las pruebas de replicación se realizaron para poder determinar si las mutaciones en el ctRNA, tienen un efecto en la estructuración apropiada del RNAm-*repC*, para poder llevar a cabo la replicación.

Para realizar los ensayos de replicación se utilizó la cepa CFNX107, la cual carece del plásmido simbiótico. A esta cepa se le introdujo por conjugación una serie de construcciones basadas en un vector (pDOP) que no se replica en *R. etli* a menos que se le introduzcan los elementos necesarios para hacerlo (*repC*) (Fig. 8). En este plásmido se clonó la región *inca* (portando las mutaciones) y *repC* (Fig. 10). Si el plásmido se replica, logra establecerse y si no se replica no se establece en la línea celular. Esto se determina con un perfil plasmídico.

El plásmido pDOPD α C42d, que contiene la región *inca* completa y *repC*, se replica cuando se introduce por conjugación en la cepa *R. etli* CFNX107. Esto comprueba que es un sistema funcional que puede utilizarse como base para las siguientes construcciones y se usa como control.

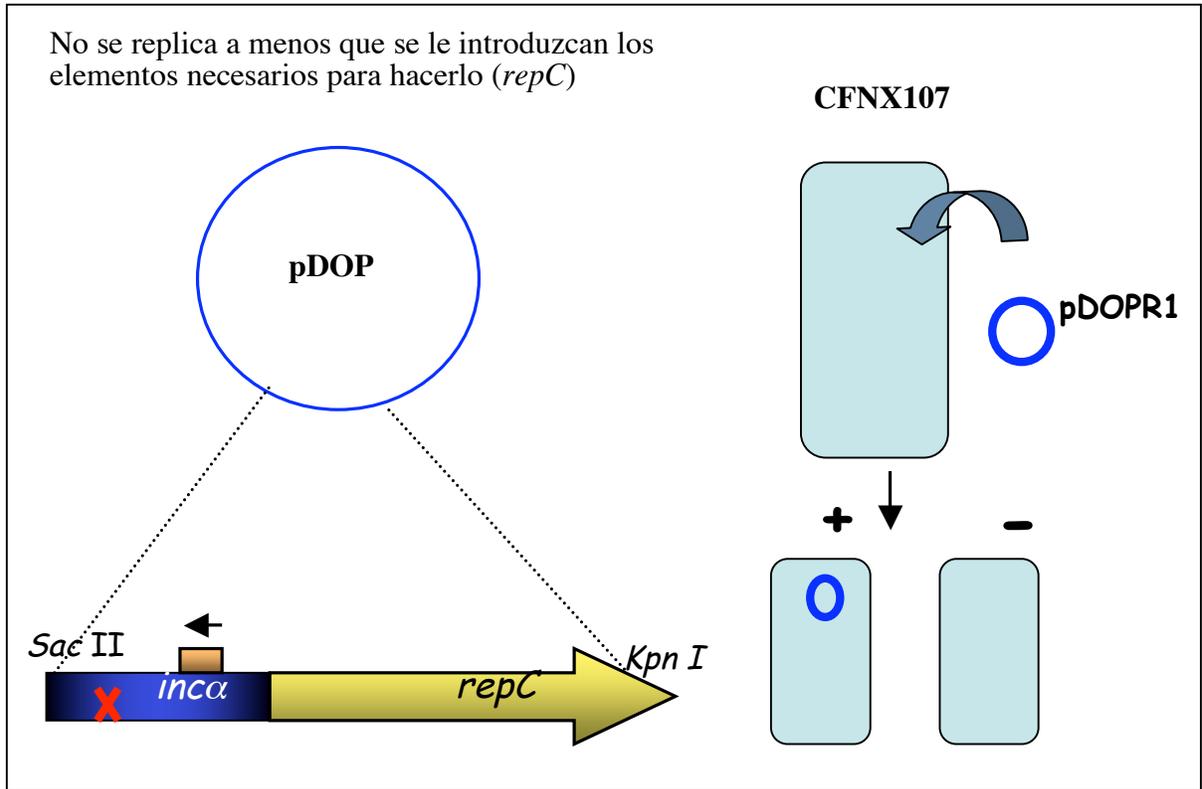


Figura 8. Ensayo de Replicación en la cepa CFNX107

Se utilizó la cepa CFNX107, la cual carece del plásmido simbiótico p42d. Se introdujo por conjugación un plásmido pDOP (círculo azul) que no replica en *Rhizobium etli* a menos que se le introduzcan los elementos necesarios, el cual contenía la región *inca* (región azul) y *repC* (flecha amarilla) a la cepa. Las transconjugantes obtenidas fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico codificado por pDOP (Cm). Posteriormente se hizo un perfil plasmídico para determinar si replica o no.

Conjugación bacteriana

La transferencia de material genético que se establece entre bacterias y que requiere del contacto entre las células donadora y receptora se denomina conjugación. El material que se transfiere por este proceso puede ser de origen plasmídico, cromosómico o consistir de un tipo de transposones que son conjugativos. Para que la conjugación se lleve a cabo se

requiere de genes que participan en el proceso, desde el acercamiento de las células hasta la transferencia del DNA, así como de una determinada secuencia nucleotídica a partir de la que se realiza la transferencia. Los genes que se requieren para la conjugación, muchas de las veces se localizan en el mismo plásmido que será transferido, pero también pueden residir en el cromosoma de la célula donadora. En los plásmidos movilizables por conjugación existe una secuencia nucleotídica que se conoce como el origen de transferencia (*oriT*). Esta región es reconocida por una enzima que corta a una de las dos cadenas complementarias de DNA. La cadena cortada es posteriormente acarreada hacia la célula receptora donde se sintetiza la cadena complementaria y se sella la ruptura. El plásmido transferido sólo puede ser conservado por las células hijas de la célula bacteriana que originalmente recibió al plásmido, si tiene una secuencia específica (*oriV*) que sea reconocida por los sistemas de replicación de plásmidos de la bacteria.

Como cepa receptora se utilizó la *Rhizobium etli* CFNX101 (Ác nal^R). Como donadora se utilizó la *E. coli* S17-1 que porta el plásmido pMMB206 de 9.3 kb (Cm^R). La cepa S17-1 tiene integrado en el cromosoma el plásmido conjugativo RP4, esta región proporciona los productos necesarios para la transferencia de otros plásmidos que utilizan el mismo sistema. La localización del RP4 en el cromosoma dificulta su transferencia a otras bacterias.

- 1.-Inocular por separado 5 ml de LB con la cepa donadora y PY con la cepa receptora e incubar a 30°C toda la noche.
- 2.-Platear en una caja de PY 100 µl de la cepa donadora y 200 µl de la cepa receptora e incubar a 30°C toda la noche.
- 3.-Colectar la población bacteriana, cruza y parentales con 3 ml de PY
- 4.-Hacer diluciones de la cruza 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} tomando 50 µl de la colecta.

5.-De cada dilución platear con triángulo de vidrio 100 µl por caja de LB o PY con los antibióticos adecuados. Incubar a 30° C por varios días.

TÉCNICA DE ECKHARDT O PERFIL PLASMÍDICO

Dado que la técnica de lisis alcalina para obtener plásmido y la electroforesis al 1% son ineficientes para plásmidos mayores de 90 kb, se tuvieron que crear nuevas técnicas para trabajar con plásmidos de este tamaño.

La técnica del Eckhardt permite detectar la presencia de plásmidos de gran tamaño en la bacteria en que se está trabajando mediante electroforesis en un gel, sin necesidad, sin necesidad de aislar previamente el plásmido. La eficacia de la técnica para observar los plásmidos radica en tres puntos importantes: 1) Trabajar con bacterias que no hayan llegado a la fase estacionaria de crecimiento, lo cual permitirá una lisis efectiva de ellas. 2) La lisis de las bacterias se realiza IN SITU, lo cual provoca que los plásmidos no sufran mayor alteración por tratamiento mecánico. 3) Usar un gel de agarosa al 0,7% en buffer boratos y una corriente eléctrica moderada mientras ingresa la muestra. El único defecto de la técnica es que requiere de mayor tiempo de corrida, aunque la definición con que se ven los plásmidos parece compensarlo.

1.-Inocular *Rhizobium etli* en un tubo con medio PY (3 ml) y dejar creciendo en agitación a 30°C hasta que alcance una densidad óptica de 0.2 leída a 620 nm. Con este crecimiento se garantiza que la lisis y lavados serán efectivos.

2.-Preparar un gel horizontal de agarosa al 0,7% en solución Tris-Boratos 1X.

3.-Preparar 2 series de tubos eppendorf., 1 par de tubos por cada muestra a trabajar.

4.-En una de las series de tubos añadir 1 ml de N-lauryl sarcosina 0,3% y ponerlos en hielo.

5.-Tomar una alícuota de 1 ml de cultivo a una DO de 0.2 y centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.

6.-Eliminar el sobrenadante con ayuda de una jeringa. Se debe dejar el pellet completamente seco.

7.-Añadir 500 μ l de agua estéril a los tubos que tienen las bacterias, resuspender con vórtex.

8.-Añadir suavemente los 500 μ l a los tubos que tienen el Sarcosyl. El sarcosyl es un detergente que elimina exo y lipopolisacáridos permitiendo que la lisis se efectue en el pozo del gel. Centrifugar a 14000 rpm 3 min, eliminar el sobrenadante con jeringa y dejar el pellet completamente seco.

9.-Añadir al tubo 40 μ l de ficoll 20% en TE 10/1 (Solución Tris-EDTA 10-1 mM respectivamente) y resuspender con pipeta. Dejar en hielo 15 minutos. La solución ficoll le da densidad a la muestra para que no flote a la hora de ponerla en el gel.

10.-Mientras las muestras están en hielo, a la cámara con el gel añadirle buffer TB1X sin cubrirlo y en cada pozo añadir 25 μ l de SDS 10%-Xilencianol en agua. El SDS ayudará a la lisis y precipitación de proteínas una vez que esto ocurra al poner la muestra. El xilencianol es un colorante que nos permite ver hasta donde han avanzado las muestras durante la corrida.

11.-Conectar la cámara a la fuente de poder al revés. Aplicar 100 volts durante 15 min. Este paso permite que el SDS ingrese al gel, y que posteriormente al aplicar la corriente en el sentido correcto, entre en contacto con la muestra poco a poco, lo que permite una lisis adecuada. La precorrida puede hacerse fuera del cuarto frío. Una vez que se ha hecho la precorrida , se añade más TB 1X para cubrir el gel.

12.-Agregar 40 μ l de lisozima en agua a la solución de lisis y añadir 10 ml de la mezcla a los tubos con bacterias y resuspender suavemente para homogenizar. La lisozima es la encargada de lisar a las bacterias.

13.-Tomar 25 μ l de muestra y poner en los pozos.

14.-Realizar corrida del gel, las primeras dos horas a 40 volts y las siguientes 16 hrs a 100 volts. La corrida es en el cuarto frío. La corriente de 40 volts permite el ingreso de los plásmidos por tamaño en el gel.

15.-Apagar la fuente de poder, teñir el gel con bromuro de etidio y observar en un transluminador con luz UV.

VI. RESULTADOS

Identificación de los elementos importantes del ctRNA que determinan incompatibilidad contra el plásmido simbiótico p42d.

El RNA antisentido de la región *inca* del plásmido p42d tiene la siguiente estructura: primero un tallo-asa rico en GC de 18 pb, que incluye una burbuja de un par de nucleótidos no apareados. Segundo, una cola rica en U de 10 nucleótidos de longitud y, tercero, un extremo 5' no apareado de 11 nucleótidos de longitud (Fig. 6A). Para identificar cuál o cuáles regiones del RNA antisentido están involucradas en el fenómeno de incompatibilidad y, por tanto, en la interacción con el mensajero, evaluamos por medio de mutagénesis sitio-dirigida cada una de las regiones del RNA antisentido.

Se ha reportado que la interacción de un RNA antisentido con un RNAm inicia por las regiones no apareadas de los RNA's, usualmente a través de interacciones entre las secuencias del asa, tanto del RNA antisentido como del RNAm (Gerhart *et al.*, 1998). A esta interacción inicial se le conoce como "kissing". La complementariedad de las secuencias entre el RNA antisentido y el RNAm puede termodinámicamente llevar a un apareamiento total, formando un complejo estable. Con dicho antecedente, es probable que la interacción entre el RNA antisentido y el RNAm-*repC* interaccionen inicialmente por el asa, siendo una región crítica en determinar la incompatibilidad. Sin embargo, no hay un asa complementaria en el RNAm de nuestro plásmido. Para identificar si el asa juega un papel en la interacción inicial de nuestro RNA antisentido se introdujeron una serie de mutaciones en el asa, cambiando una sola base a la vez y las 4 bases del asa al mismo tiempo. Los fragmentos con estas mutaciones se clonaron en un vector capaz de replicar en *Rhizobium*. Las construcciones resultantes se introdujeron por conjugación en la cepa *R. etli* CFNX101,

la cual contiene el plásmido parental p42d. Las propiedades de incompatibilidad de estas construcciones se determinaron por el análisis del perfil de plásmidos de las transconjugantes obtenidas. Todas las construcciones con mutaciones en el asa del ctRNA siguen ejerciendo incompatibilidad hacia el plásmido p42d, incluyendo la que cambia las 4 bases del asa, similar al plásmido con la región *inca* silvestre (Fig.12). El plásmido pDR1 contiene una mutación puntual en la posición 28 (A-U), pDR2 contiene el cambio en la posición 29 (G-C), pDR3 contiene la mutación en la posición 30 (C-G), pDR4 cambian en la posición 31 (G-C) y pDR5 cambia en las posiciones 28, 29, 30 y 31 (AGCG-UCGC) (Fig. 9). Esto sugiere que los cambios no alteraron la interacción con el RNAm-*repC*, por lo tanto, el mecanismo de interacción no inicia por el asa.

En algunos casos, se ha reportado que la burbuja que se encuentra en el tallo actúa como protección contra la degradación por la RNAsaH, por lo tanto se supone que mutaciones en esta burbuja eliminan la protección y el RNA antisentido es fácilmente degradado (Brantl, 2002). Para determinar si la burbuja encontrada en la posición 37 en el tallo del ctRNA del plásmido p42d tiene esta función, se realizó una mutación A-U con el fin de destruir esta burbuja (pDR7) (Fig. 9). El perfil plasmídico indicó que dicha construcción sigue ejerciendo el efecto de incompatibilidad contra el plásmido simbiótico (Fig. 14), lo que indica que este cambio no afectó la interacción con el RNAm-*repC*.

Otra región dentro del ctRNA que podría mediar la interacción con el RNAm es el extremo 5', ya que esta formado por una cadena sencilla de 11 nt no apareados. Por lo tanto se hicieron una serie de mutaciones que incluyeron eliminaciones de una primera y segunda parte de esta región. La primera parte incluye cuatro nt del tallo y los tres nt siguientes dentro del extremo 5' (AAGACAG) y la segunda parte incluye los últimos 8 nt, más

distantes al tallo (AGACAUCG). En el perfil plasmídico de la figura 14 se observa que las construcciones con eliminaciones dentro del extremo 5' se vuelven compatibles. La construcción pDR12 contiene una eliminación de la primera parte del extremo 5' desde la posición 47 a la 53 (AAGACAG) (Fig. 9). El plásmido pDR13 contiene una eliminación de la segunda parte del extremo 5' desde la posición 54 a la 61 (AGACAUCG) (Fig. 9). Como control se utilizó el plásmido pDR*inca*42d que contiene la región de *inca* silvestre, el cual es incompatible contra el plásmido simbiótico.

Estos resultados sugieren que el extremo 5' es importante para la interacción inicial con el RNAm-*repC*.

Identificación de las regiones del ctRNA involucradas en la replicación del plásmido p42d.

En el perfil plasmídico de la figura 12 se observa que las construcciones con mutaciones en el asa del ctRNA conservan su capacidad de replicación. El plásmido pDOPR1, contiene una mutación puntual en la posición 28 (A-U), pDOPR2 contiene el cambio en la posición 29 (G-C), pDOPR3 contiene la mutación en la posición 30 (C-G), pDOPR4 cambian en la posición 31 (G-C) y pDOPR5 cambia en las posiciones 28, 29, 30 y 31 (AGCG-UCGC) (Fig 9). Estos resultados indican que las mutaciones en la región del RNAm complementaria al asa del RNA antisentido, no alteran la estructura del RNAm de tal modo que altere la replicación del plásmido. Como se mencionó anteriormente, en algunos casos la burbuja encontrada en el tallo del ctRNA evita la degradación por RNAsaH (Brantl, 2002). Por lo tanto se realizó una mutación para cerrar la burbuja del tallo 37(A-U). Se esperaba que al ser el ctRNA un regulador negativo de la expresión de *repC*, y al introducir una mutación que

hiciera más sensible al ctRNA a la degradación, aumentara el número de copias del plásmido. En el perfil plasmídico de la figura 14 podemos observar que la construcción pDOPR7 que contiene la eliminación de la burbuja del tallo mantiene el mismo número de copias que la cepa control. Este resultado indica que dicha burbuja parece no estar involucrada en la estabilidad del ctRNA.

Como se mencionó en los antecedentes, las interacciones entre un RNA antisentido y su RNAm ocurren entre regiones de cadena sencilla (Gerhart *et al.*, 1998), por lo tanto una región de interés dentro del ctRNA es el extremo 5'. Para determinar si el extremo 5' está implicado en la regulación de la replicación, se hicieron eliminaciones de una primera y segunda parte de esta región. En el perfil plasmídico de la figura 14 se observa que la construcción que tiene la eliminación de la primera parte del extremo 5' pierde la capacidad para replicarse, en contraste con la construcción que tiene la eliminación en la segunda parte del extremo 5', que aún sigue replicándose. El plásmido pDOPR12 contiene una eliminación de la primera parte del extremo 5' desde la posición 47 a la 53 (AAGACAG) (Fig. 9). El plásmido pDOPR13 contiene una eliminación de la segunda parte del extremo 5' desde la posición 54 a la 61 (AGACAUCG) (Fig.9). Estos resultados sugieren que la eliminación de la primera parte del extremo 5' puede alterar la estructuración del RNAm-*repC*, de tal forma que se evita la replicación, y por lo tanto es una región importante para la regulación de la replicación. La eliminación de la segunda parte del extremo 5' del ctRNA del plásmido p42d parece no alterar la estructuración adecuada del RNAm, ya que continúa replicándose. Lo que indica que esta región no está involucrada en la regulación de la replicación.

Por otro lado, se ha probado que el plásmido pSymA de *S. meliloti* es compatible contra el plásmido p42d de *R. etli*. Al realizar un alineamiento entre las dos secuencias *inca* de *R. etli*

y *S. meliloti* se observan diferencias que le confieren al ctRNA la capacidad de ser compatible o incompatible contra el plásmido simbiótico (Fig. 15).

Con dicho antecedente y de acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, que sugieren que el extremo 5' es la región importante para la interacción, se realizó una construcción que contenía una sustitución de la primera parte del extremo 5' del ctRNA de *R. etli* por el de *S. meliloti*. De manera que la secuencia GAAGACAGAG es sustituido por AGGAGUCUAA. De igual modo se determinó su efecto en la replicación e incompatibilidad contra el plásmido simbiótico. El en perfil plasmídico de la figura 17 se observa que la construcción que contiene la sustitución en la primera parte del extremo 5' es compatible contra el plásmido simbiótico. En contraste con el plásmido que contiene al ctRNA de *R. etli* (pDRinca), el cual es incompatible contra el plásmido simbiótico. El plásmido pDR14 contiene una sustitución en la primera parte del extremo 5' del ctRNA desde la posición 46 a la 55 de *R. etli* por *S. meliloti* (GAAGACAGAG por AGGAGUCUAA) (Fig. 9). Este resultado indica que al introducir un cambio en la primera parte del extremo 5' ya no se lleva a cabo la interacción con el RNAm-*repC*, por lo tanto se vuelve compatible contra el plásmido simbiótico.

Lo que sugiere que precisamente esta región es importante para la interacción con el RNAm-*repC*.

En el perfil plasmídico de la figura 17 se puede observar que la construcción que contiene ésta misma sustitución, pero que fue utilizada para determinar el efecto en su replicación, conserva la capacidad para hacerlo. El plásmido pDOPR14 contiene una sustitución en la primera parte del extremo 5' del ctRNA desde la posición 46 a la 55 de *R. etli* por *S. meliloti* (GAAGACAGAG por AGGAGUCUAA) (Fig. 9). Este resultado sugiere que la

sustitución no afectó la estructuración del RNAm-*repC*, por lo tanto puede llevarse a cabo la replicación.

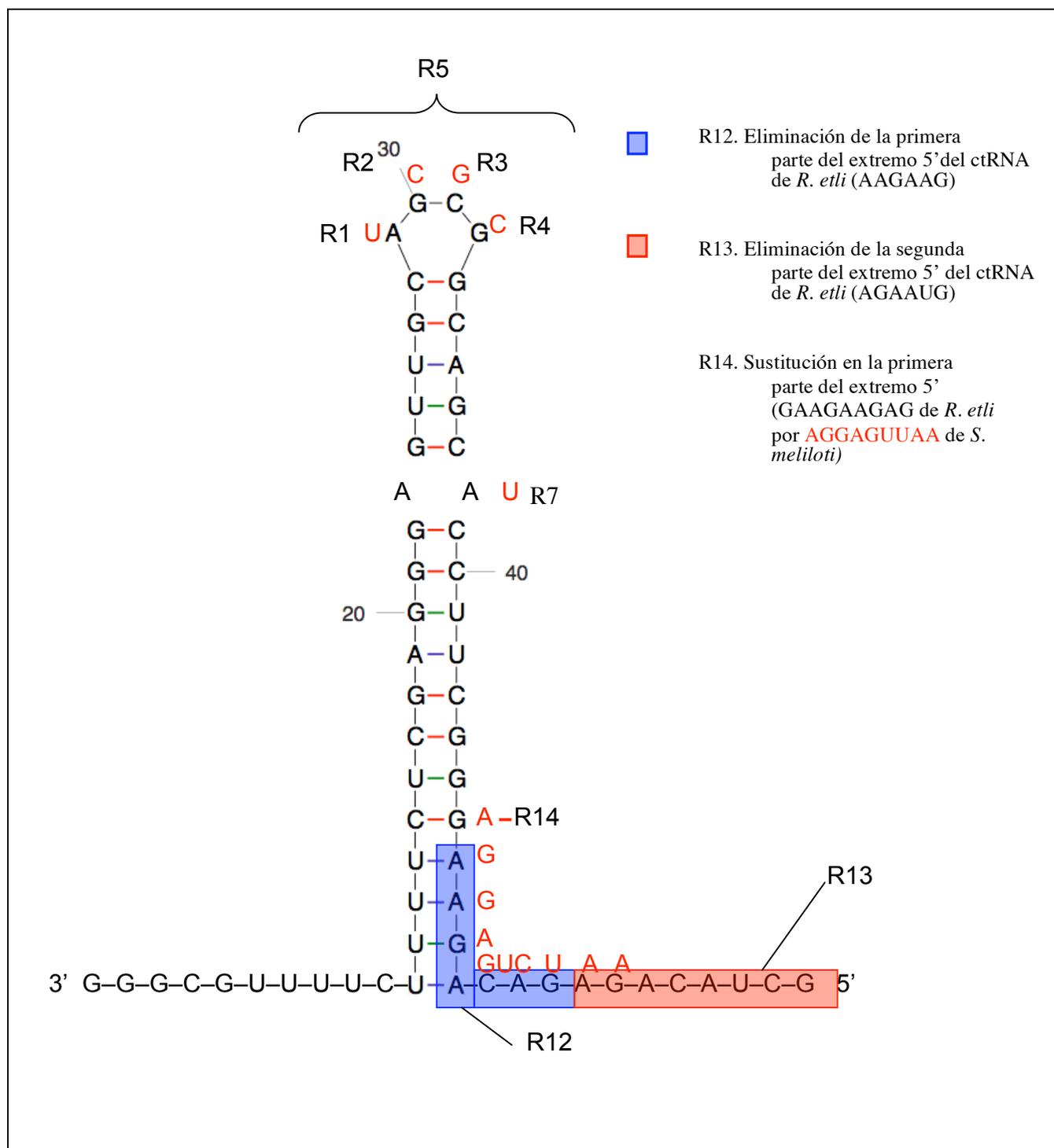


Figura 9. Esquema de mutaciones realizadas en el ctRNA del plásmido p42d de *R. etli*. La sustitución de una base por otra se señala en rojo. Las regiones azul y roja corresponden a las eliminaciones realizadas en el extremo 5' del ctRNA. Los nombres de las mutaciones se indican con una R y un número.

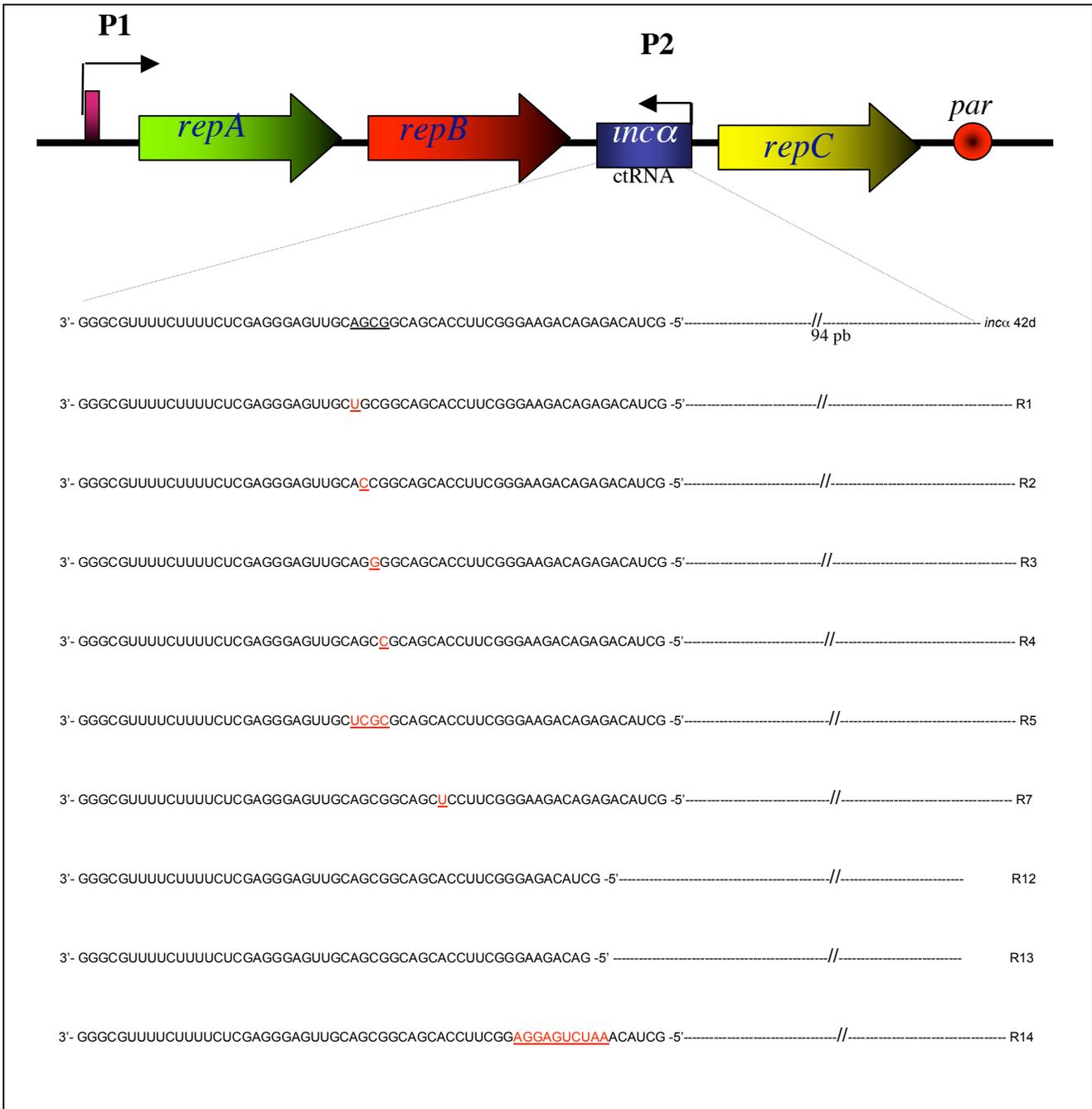


Figura 10. Representación esquemática de la localización de las mutantes en el ctRNA. En la parte superior de la figura se muestra el replicón básico del plásmido p42d. Los genes del operón están representados por flechas verde, roja y amarilla. La región intergénica entre *repB* y *repC* está indicada como *inco*. La secuencia *inco* codifica para el ctRNA. Las secuencias debajo del replicón, corresponden a las mutantes en el ctRNA. Los cambios se muestran en rojo. Las mutantes que tienen eliminaciones se observan más cortas.

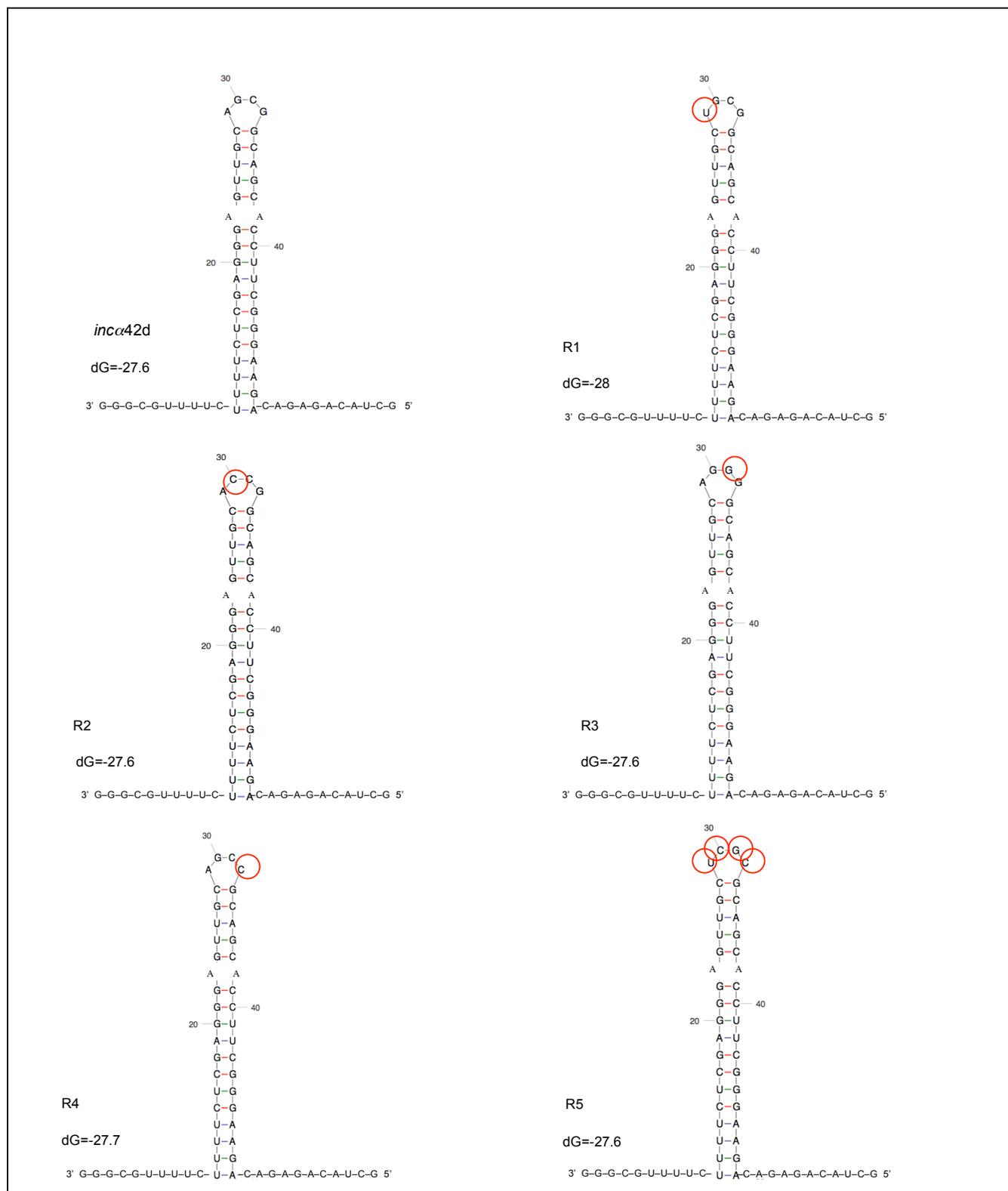


Figura 11. Predicción del plegamiento del ctRNA con las mutaciones en el asa. Las bases que cambiaron, están señaladas con un círculo rojo.

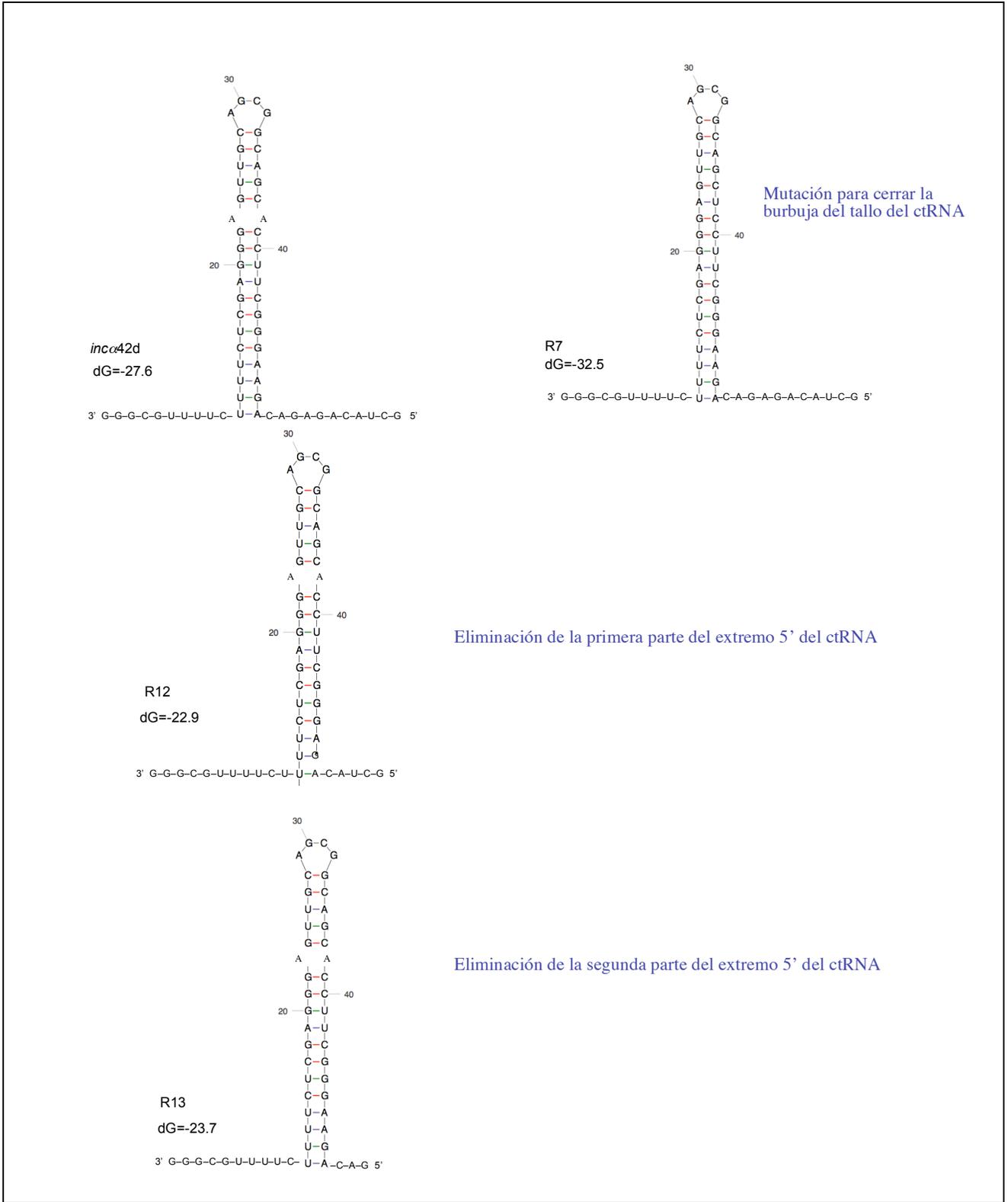


Figura 13. Predicción del plegamiento del ctRNA con mutaciones en el tallo y eliminaciones en el extremo 5'.

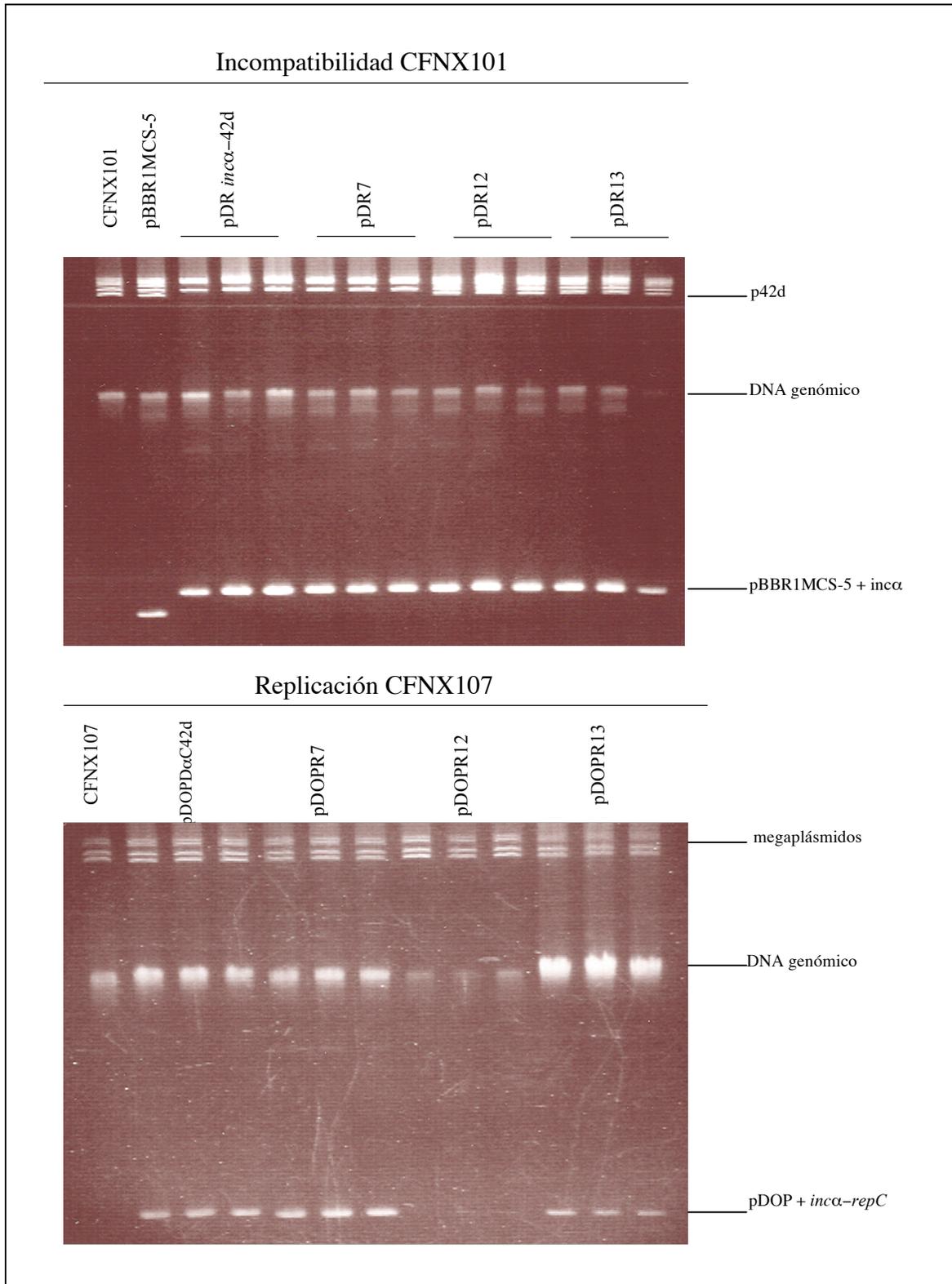
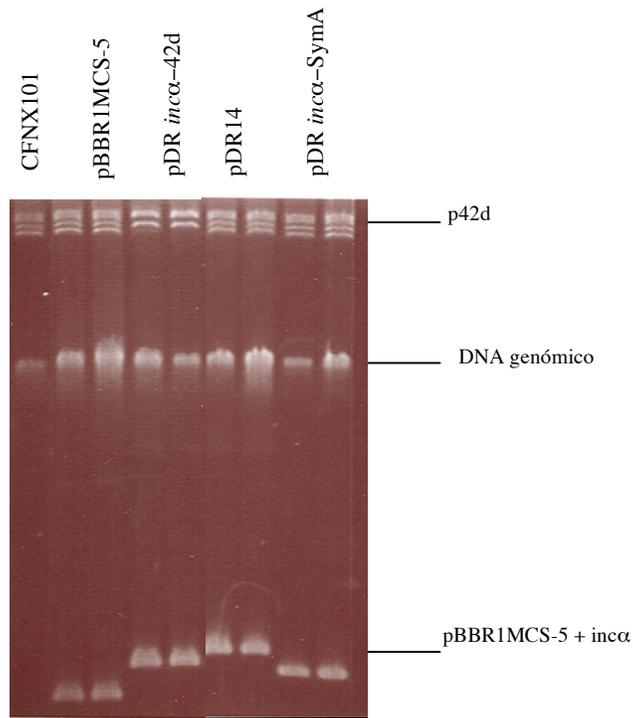


Figura 14. Perfil plasmídico de mutantes en el ctRNA, que cierran la burbuja del tallo, y tienen eliminación de la primera y segunda parte del extremo 5'

Incompatibilidad CFNX101



Replicación CFNX107

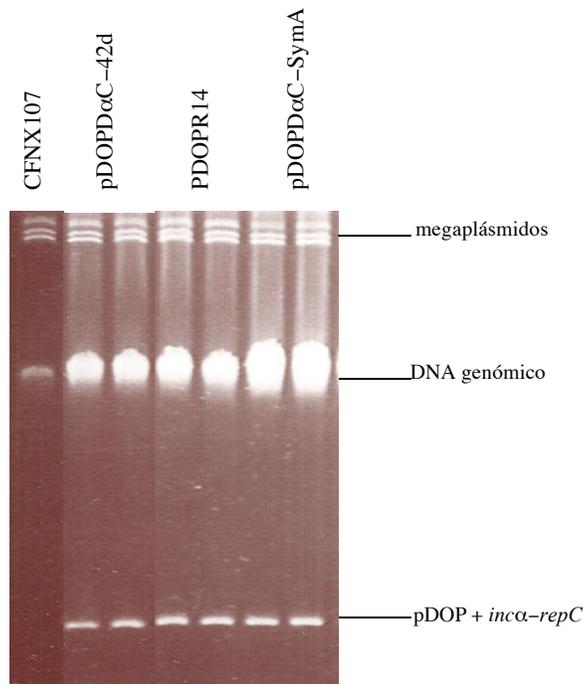


Figura 17. Perfil plasmídico de la mutante que tiene una sustitución en el extremo 5' del ctRNA de *R. etli* por el de *S. meliloti* (utilizando MFold).

Tabla 3. Resultados de Incompatibilidad en la cepa CFNX101 de las mutantes en el ctRNA de *R. etli*

MUTACIÓN	Nombre de la clona en pBBR1MCS-5	Incompatibilidad en CFNX101
Ninguna	pDRinc α -42d	Incompatible
Asa del ctRNA	pDR1	Incompatible
Asa del ctRNA	pDR2	Incompatible
Asa del ctRNA	pDR3	Incompatible
Asa del ctRNA	pDR4	Incompatible
Asa del ctRNA	pDR5	Incompatible
Cerrar burbuja del ctRNA	pDR7	Incompatible
Eliminación de la primera parte del extremo 5' del ctRNA	pDR12	Compatible
Eliminación de la segunda parte del extremo 5' del ctRNA	pDR13	Compatible
Sustitución de la primera parte del extremo 5' del ctRNA	pDR14	Compatible

Tabla 4. Resultados de Replicación en la cepa CFNX107 de las mutantes en el ctRNA de *R. etli*

MUTACIÓN	NOMBRE DE LA CLONA EN pDOP	Replicación en CFNX107
Ninguna	pDOPD α C42d	+
Asa del ctRNA	pDOPR1	+
Asa del ctRNA	pDOPR2	+
Asa del ctRNA	pDOPR3	+
Asa del ctRNA	pDOPR4	+
Asa del ctRNA	pDOPR5	+
Cerrar burbuja del ctRNA	pDOPR7	+
Eliminación de la primera parte del extremo 5' del ctRNA	pDOPR12	-
Eliminación de la segunda parte del extremo 5' del ctRNA	pDOPR13	+
Sustitución de la primera parte del extremo 5' del ctRNA	pDOPR14	+

VII. DISCUSIÓN

La familia de replicones *repABC* está ampliamente propagada entre alfa-Proteobacterias y su importancia radica en la organización inusual de los genes involucrados en la partición (*repA* y *repB*) y replicación del plásmido (*repC*), ya que están codificados en un mismo operón (Ramírez-Romero *et al.*, 2001; Pappas and Winans, 2003b). La expresión del operón se regula negativamente por las proteínas de partición, y por ello mismo los niveles de transcripción del iniciador de la replicación (Ramírez-Romero *et al.*, 2001; Pappas and Winans, 2003b). En algunos plásmidos *repABC* del tipo Ti de *Agrobacterium*, la expresión del operón se activa por TraR y su autoinductor y se reprime por RepA y RepB (Pappas and Winans, 2003). Esto regula la expresión del sistema de partición y de replicación simultáneamente.

A primera vista, la concentración de RepC, el factor limitante de la replicación, depende directamente de la velocidad transcripcional del operón *repABC*; sin embargo, Venkova-Canova y colaboradores (2004) demostraron que en el caso del plásmido p42d de *R. etli* existen elementos reguladores adicionales involucrados en la expresión de RepC y que están codificados dentro de la región intergénica *repB-repC*. Esto vuelve más complejo al mecanismo de regulación de replicación del plásmido.

Dichos elementos consisten en un gen que codifica para un pequeño RNA antisentido (ctRNA) y una estructura tallo-asa localizada 6 pb corriente arriba de *repC*. El gen del ctRNA está presente en casi todos los miembros de la familia *repABC*, a excepción del plásmido pTAV320 de *P. Versutus* (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

Las evidencias que permitieron demostrar la presencia de un gen que codifica para un RNA antisentido dentro de la región *inc α* del plásmido p42d de *R. etli* se mencionan a continuación. Primero, se encontró un promotor, P2, de tipo σ^{70} en dirección contraria al operón *repABC*, localizado 59 pb corriente arriba del codón inicial del gen *repC*

(Venkova-Canova *et al.*, 2004). Segundo, la presencia física del ctRNA se demostró identificando el sitio de inicio transcripcional por 5' RACE (Venkova-Canova *et al.*, 2004). Tercero, se encontró un terminador *rho*-independiente presente en el ctRNA de al menos 57 nt de longitud (Venkova-Canova *et al.*, 2004). Cuarto, el ctRNA se sintetizó *in vitro* utilizando RNAP de *E. coli* y su tamaño estimado fue de 59 nt de longitud (Venkova-Canova *et al.*, 2004). Quinto, la introducción de un fragmento de DNA expresando el gen del ctRNA ejerció incompatibilidad hacia el plásmido p42d, pero no una construcción equivalente con el promotor P2 mutado (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

Además, se mostró que el ctRNA regula negativamente la expresión de *repC* (Venkova-Canova *et al.*, 2004). Sorprendentemente, los plásmidos que contenían mutaciones para eliminar el promotor del ctRNA (P2) o que carecían del gen del ctRNA perdieron la capacidad para replicarse. Se esperaba que al mutar el ctRNA, aumentara el número de copias del plásmido, sin embargo no fue posible restaurar la replicación cuando se introdujo el ctRNA en *trans*, esto sugiere que la actividad del ctRNA en *cis* es requerida para la replicación.

Esto convierte al ctRNA en un regulador de la replicación del plásmido p42d de *R. etli*. El segundo elemento regulador encontrado es una estructura tallo-asa denominado elemento S. Este se forma en el RNAm-*repABC* y está localizada dentro de la región *inca*, corriente arriba de *repC*. El elemento S juega múltiples papeles en la regulación de *repC*: actúa como un regulador negativo de la transcripción de *repC*, y se requiere para la replicación y probablemente codifica para elementos positivos que incrementan la traducción de *repC* (Venkova-Canova *et al.*, 2004).

Chai y Winans (2005) proponen un modelo para el papel del RNA antisentido en la replicación del plásmido Ti. La unión del RNA antisentido (*repE*) al RNAm-*repABC*

altera la estructura secundaria en el RNAm corriente arriba de *repC*. Esto podría terminar la transcripción directamente, parecido a un terminador *Rho*-independiente. Alternativamente, la estructura secundaria debe actuar únicamente para bloquear el inicio de traducción del RNAm-*repC*. Además, sugieren que este fenómeno puede ocurrir entre la mayoría de plásmidos de esta familia.

El objetivo de este estudio fue elucidar el mecanismo de acción del ctRNA, en la regulación de los niveles de RepC. Para ello, se determinó el efecto de mutaciones en regiones importantes del ctRNA, en su capacidad para replicar y ejercer incompatibilidad contra el plásmido simbiótico. Se realizaron mutaciones en el asa del ctRNA, ya que se ha reportado, que la interacción entre un ctRNA y el RNAm se lleva a cabo inicialmente entre las regiones no apareadas entre ambos RNA's, frecuentemente entre las asas complementarias (Gerhart *et al.*, 1998). Los cambios realizados en el asa se eligieron para poder identificar exactamente en qué base se iniciaba la interacción con el RNAm, sin alterar su estructura secundaria. Se utilizó el programa MFOLD para predecir el plegamiento de los ctRNA's con las mutaciones (Zuker *et al.*, 1999). Al realizar la predicción del plegamiento de los ctRNA's con mutaciones en el asa se pudo observar que la estructura secundaria no se alteró (Fig. 11), comparada con la del ctRNA del plásmido p42d de *R. etli*. Sorprendentemente las mutaciones R1, R2, R3, R4 y R5 que contienen cambios en el asa, no tienen un efecto ni en su replicación, ni en su incompatibilidad. Lo que indica que la interacción del ctRNA con el RNAm-*repC* no inicia por el asa, como es frecuentemente en otros sistemas ya reportados. Además, éstas mutaciones no afectaron la estructuración adecuada del RNAm-*repC* para poder llevar a cabo la replicación. Se ha mencionado que algunos plásmidos contienen una burbuja en los tallos de algunos ctRNA's y que actúa como protección contra la degradación por RNAsa (Brantl, 2002). Por lo tanto, evaluamos si la burbuja que se

encuentra en el ctRNA del plásmido p42d, es importante para su estabilidad e interacción con el RNAm-*repC*. Para esto, se realizó una mutación puntual para cerrar la burbuja del tallo y hacerlo más propenso a la degradación por RNAsa. Al realizar la predicción del plegamiento del ctRNA con la mutación que cierra la burbuja, se observó que esta mutación no alteró el plegamiento del ctRNA (Fig. 13). La mutación R7 no tuvo efecto en su replicación en su incompatibilidad ni en su replicación. Estos resultados indican que la burbuja del tallo no actúa como una protección para su degradación. Sin embargo, es necesaria la realización de estudios que determinen directamente el efecto de estas mutaciones sobre la vida media del ctRNA. El eliminar la burbuja del tallo tampoco afectó el plegamiento del RNAm-*repC*, por lo tanto la burbuja no está involucrada en la regulación de la replicación.

Otra probable región que podría mediar la interacción del ctRNA con el RNAm-*repC* es el extremo 5' ya que está formado por una cadena sencilla de 11 nt no apareados. Para investigar esta posibilidad se hicieron eliminaciones de una primera y segunda parte del extremo 5' por separado. La primera parte incluye cuatro nt del tallo y los tres nt siguientes dentro del extremo 5' desde la posición 47 a la 53 (AAGACAG) y la segunda parte incluye los últimos 8 nt, más distantes al tallo desde la posición 54 a la 61 (AGACAUCG). Cuando se realizó la predicción de los ctRNA's con las eliminaciones en el extremo 5' se observó que el plegamiento no se alteró, sólo se acortó el extremo 5' que se encuentra sin aparear (Fig. 13). La eliminación de la primera parte del extremo 5' denominada R12 vuelve al plásmido incapaz para replicarse y lo vuelve compatible contra el plásmido simbiótico. La eliminación de la segunda parte del extremo 5' denominada R13 no afecta su capacidad de replicación ya que se replica igual que el plásmido p42d; sin embargo, lo vuelve compatible contra el plásmido simbiótico. Esto sugiere que la eliminación de la primera parte del extremo 5' está

alterando el plegamiento del RNAm, lo que evita su replicación. Por lo tanto la primera parte del extremo 5' del ctRNA está involucrada en la regulación de la replicación, y que todo el extremo 5' es importante para el fenómeno de incompatibilidad.

Es importante mencionar que en el extremo 5' del ctRNA silvestre se pueden encontrar dos secuencias directas repetidas (AGAC) que posiblemente estén involucradas en el fenómeno de incompatibilidad contra el plásmido p42d, y que al realizar las eliminaciones de la primera o segunda parte del extremo 5', sólo se mantiene una de ellas, y el plásmido se vuelve compatible. Lo que sugiere que probablemente se requiere de ambas secuencias directas repetidas para ejercer incompatibilidad, aunque, desde luego, se necesitan más experimentos para demostrarlo.

Con base en los resultados obtenidos y tomando como antecedente que la región *inca* del plásmido pSymA de *S. meliloti* es compatible contra el plásmido simbiótico p42d, se construyó un plásmido que contenía una mutación en la primera parte del extremo 5' que sustituye esta secuencia correspondiente a *R. etli* por la de *S. meliloti* (GAAGACAGAG por AGGAGUCUAA). Al realizar la predicción del plegamiento del ctRNA que contiene esta sustitución pudimos observar que el plegamiento no cambia, comparado con el ctRNA del plásmido p42d. Sin embargo, se observa una base sin aparear en la parte inferior del tallo (Fig. 16). Dicha sustitución R14 no tiene efecto en su replicación y es compatible contra el plásmido simbiótico. Esto comprueba que la primera parte del extremo 5' es la región importante para la interacción con el RNAm, ya que al cambiar esta parte de la secuencia el ctRNA pierde su capacidad para interactuar con el RNAm y por lo tanto no ejerce la incompatibilidad. Y que esta sustitución no alteró la estructuración del RNAm para poder llevar a cabo la replicación. Todos estos resultados indican que el extremo 5' del ctRNA es el que interactúa inicialmente con el RNAm-*repC*, y que sólo la primera parte del extremo 5' puede estar

involucrada en la regulación de la replicación. Sin embargo, aún no podemos concluir algo de manera concreta, ya que se requieren más experimentos para poder determinar si el RNA antisentido con las mutaciones, se está expresando correctamente o si no sufre alguna degradación. Por lo tanto no podemos proponer un mecanismo de acción del RNA antisentido, el elemento S y el posible péptido presentes en el replicón *repABC* del plásmido p42d.

VIII. CONCLUSIONES

Las mutaciones en el asa del ctRNA del plásmido p42d, no tienen efecto ni en su replicación, ni en su incompatibilidad. Lo que sugiere que RNAm no se ve afectado en su estructuración para poder llevar a cabo la replicación y que la interacción del ctRNA con el RNAm-*repC* no inicia por el asa.

La mutación para cerrar la burbuja en el tallo del ctRNA del plásmido p42d, no afectó la replicación ni la incompatibilidad. Esto indica que la burbuja no está involucrada en la estabilidad del ctRNA, ya que esperábamos que al hacer más sensible al ctRNA a la degradación por RNAsaH, aumentara el número de copias del plásmido. Además, esta burbuja no está involucrada en la regulación de la replicación.

La eliminación de la primera parte del extremo 5' del ctRNA del plásmido p42d que incluye desde la posición 47 a la 53, hace que el plásmido pierda su capacidad para replicar y lo vuelve compatible contra el plásmido simbiótico. Mientras que la eliminación de la segunda parte del extremo 5' del ctRNA, no tiene efecto en la replicación. Sin embargo, lo vuelve compatible contra el plásmido simbiótico. Esto sugiere que la primera parte del extremo 5' está involucrada en la regulación de la replicación y que el extremo 5' completo es importante para el fenómeno de incompatibilidad. Probablemente se requiere de 2 secuencias directas repetidas (AGAC) encontradas en el extremo 5' para ejercer incompatibilidad.

La sustitución de la primera parte del extremo 5' del ctRNA de *R. etli* por el de *S. meliloti* (GAAGACAGAG por AGGAGUCUAA) comprueba que la primera parte del extremo 5' es una región importante para la interacción con el RNAm, ya que al cambiar esta parte de la secuencia el ctRNA pierde su capacidad para interaccionar con

el RNAm y por lo tanto no ejerce la incompatibilidad. Sin embargo, esta sustitución no altera la estructuración del RNAm, por lo tanto sigue replicando.

IX. PERSPECTIVAS

- Introducir mutaciones en la estructura tallo-asa del ctRNA, evitando que se pliegue sobre sí mismo para determinar su efecto cuando se elimina esta estructura secundaria.
- Realizar mutaciones puntuales en el extremo 5' del ctRNA cambiando un triplete a la vez para analizar finamente la región de interacción con el RNAm-*repC*.
- Introducir una secuencia espaciadora en el extremo 5' del ctRNA, de 5 nt de longitud para determinar si el efecto es específico de la secuencia o de la distancia.
- Realizar una mutación en la región promotora sin tocar hexámeros, con el fin de evitar que el RNAm-*repC* se pliegue sobre sí mismo en ausencia del ctRNA.

X. BIBLIOGRAFÍA

Asano, K., Moriwaki, M. and Mizobuchi, K., 1991. An induced mRNA secondary structure enhances *repZ* translation in plasmid ColIb-P9. *J Biol Chem.* 266:24549-24556.

Asano, K. and Mizobuchi, K., 1998. An RNA Pseudoknot as the molecular switch for the translation of the *repZ* gene encoding the replication initiator of IncI α plasmid ColIb-P9. *J Biol Chem.* 273:11815-11825.

Bartosik, D., Baj, J., and Wlodarczyk, M. 1998. Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology* 144:3149-3157.

Bignell, C. and Thomas, C.M. 2001. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J Biotech.* 91:1-34.

Blomberg, P., Nordstrom, K., and Wagner, E. G. 1992. Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J.* 11:2675-2683.

Blomberg, P., Engdahl, H.M., Malmgren, C., Romby, P. and Wagner, E.G. 1994. Replication control of plasmid R1: disruption of an inhibitory RNA structure that sequesters the *repA* ribosome-binding site permits tap-independent RepA synthesis. *Mol Microbiol.* 12: 49-60.

Brantl S., 2002. Antisense RNAs in plasmid: control of replication and maintenance. *Plasmid.* 48:165-173.

Brantl S., 2004. Plasmid replication control by antisense RNAs. *Plasmid Biology.* ASM Press. Chapter 3.

Cevallos, M.A., Porta, H., Izquierdo, J., Tun-Garrido, C., Garcia-de-los-Santos, A., Davila, and G., Brom, S. 2002. *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. *Plasmid*. 48:104-16.

Chai, Yunrong and Winans, S.C. 2005. A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Mol Microbiol*. 56:1574-1585.

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

Gerdes, K., Moller-Jensen, J. and Bugge-Jensen, R. 2000. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol*. 37: 455-66.

Gerhart E., Wagner H. and Brantl S. 1998. Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication. *Trends Biochem Sci*. 23:451-4.

Ghosh, S.K., Hajra, S., Paek, A. and Jayaram, M. 2006. Mechanism for chromosome and plasmid segregation. *Annu Rev Biochem*. 75: 211-41.

Gottesman, S. 2004. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: Roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol*. 58:303-28.

Hama, C., Takizawa, T., Moriwaki, H. and Mizobuchi, K. 1990. Role of leader peptide synthesis in *repZ* gene expression of the ColIb-P9 plasmid. *J Biol Chem*. 265:10666-10673.

Pappas, K.M. and Winans, S.C., 2003. 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. and 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.

Praskier, J., Bird, P., Nikoletti, S. and Pittard, J. 1989. Role of counter transcript RNA in the copy number control system of an IncB miniplasmid. *J Bacteriol.* 171:5056-5064.

Praskier, J., Wilson, I. W. and Pittard, A. J. 1992. Mutations affecting translational coupling between the *rep* genes of an IncB miniplasmid. *J Bacteriol.* 174:2376-2383.

Praskier, J. and Pittard, A. J. 2002. Pseudoknot-dependent translational coupling in *repBA* genes of the IncB plasmid pMU720 involves reinitiation. *J Bacteriol.* 184:5772-5780.

Ramirez-Romero, M.A., Bustos, P., Girard, L., Rodríguez, O., Cevallos, M.A. and Davila, G. 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* 143: 2825-2831.

Ramirez-Romero, M.A., Soberon, N., Perez-Oseguera, A., Tellez-Sosa, J. and 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., Tellez-Sosa, J., Barrios, H., Perez-Oseguera, A., Rosas, V. and 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.

Schumacher, M.A. 2007. Structural biology of plasmid segregation proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 17:103-109.

Soberón, N., Venkova-Canova, T., Ramírez-Romero, M.A., Tellez-Sosa, J. and Cevallos, M.A. 2004. Incompatibility and the partitioning site of *repABC* basic replicon of the symbiotic plasmid from *Rhizobium etli*. *Plasmid* 51:203-16.

Summers, D.K. 1996. The biology of plasmids. Blackwell Science.

Storz, G., Altuvia, S. and Wassarman, K. 2005. An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem.* 74:199-217.

Venkova-Canova, T., Soberón, N., Ramírez-Romero, M.A. and 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.

Zhong, Z., Caspi, R., Mincer, T., Helinski, D., Knauf, V., Boardman, K., Wilkinson, J.E., Shea, T., DeLoughery, C., Toukdarian, A., 2002. A 50-kb plasmid rich in mobile gene sequences isolated from a marine *Micrococcus*. *Plasmid.* 47:1-9.

Zuker, M., Mathews, D.H., and Turner, D.H. 1999. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide in RNA biochemistry and biotechnology. In *NATO ASI Series*. Barciszewski, J., and Clark, B.F.C. (eds) Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.