



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

Análisis genético y molecular del papel de un pequeño RNA antisentido, una estructura tallo-asa y un oligopéptido en la regulación de la traducción de la proteína de inicio de la replicación de un plásmido *repABC*.

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

AMERICA PAULINA RIVERA URBALEJO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

CUERNAVACA MOR. JUNIO 2015



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.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos en el Departamento de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas

Durante la realización de este trabajo de Doctorado se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CVU/Becario: 217813/207106

El trabajo que aquí presento contó con los apoyos económicos del CONACYT (100099) y PAPIIT (IN205414)

*Dedicada A Mis Padres,
Que Con Su
Motivación Y Apoyo
Me Enseñaron
A Ser Entusiasta Y
Perseverante*

AGRADECIMIENTOS

A mi mentor el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos (CCG-UNAM)

A mi comité tutorial:

Dr. Dávila Ramos José Guillermo

Dr. Morett Sánchez Juan Enrique

A los miembros del jurado:

Dra. Yolanda López Vidal. (Fac. Med.-UNAM)

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos (CCG-UNAM)

Dra. Susana Brom Klanner (CCG-UNAM)

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López (IBT-UNAM)

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos (IBT-UNAM)

A mis amigos:

Ofelia, Ángeles, Gabriel, Paco, Soledad, Olga, José Luis, Eugenio, Lupita, Joe, Miguel, Orlando, Gama, Irma, Lozano, Gladys, Paty, Rosy, Verónica, Alma, Karla, Nanci, Alejandro, Sanx.

INDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract.....	2
INTRODUCCIÓN	3
I. CARACTERÍSTICAS DE LOS RNA´s BACTERIANOS.....	4
✓ RNAs CRISPR	4
✓ RNAs Riboswitches.....	8
✓ RNA Termosensores	10
✓ RNAs pequeños (antisentido).....	11
RNAs que actúan <i>in cis</i> :.....	13
RNAs que actúan <i>in trans</i> :.....	14
✓ RNAs con función dual.....	15
✓ RNAs que modulan la actividad de una proteína.....	15
II. RNAs PEQUEÑOS QUE CONTROLAN LA REPLICACIÓN EN PLASMIDOS.....	15
✓ Plásmidos	16
✓ ¿Qué mecanismos usan los RNAs pequeños para controlar la replicación en plásmidos?	18
III. FAMILIA DE PLASMIDOS <i>repABC</i>.....	20
✓ El sistema de partición en los plásmidos <i>repABC</i>	22
✓ El origen de replicación y <i>repC</i>	22
✓ Elementos que controlan el número de copias en los plásmidos <i>repABC</i>	23
IV. ANTECEDENTES	24
✓ Análisis genético del operón <i>repABC</i> del plásmido simbiótico p42d de <i>R. etli</i>	24
V. JUSTIFICACIÓN.....	28
VI. OBJETIVO	28
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	28
VIII. RESULTADOS	29
IX. RESULTADOS ADICIONALES	29
X. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	33
ANEXO	49

Resumen

Los RNAs reguladores pueden actuar a nivel de la transcripción, la traducción, la estabilidad del RNAm y en interacción directa con el DNA. Precisamente los primeros RNA pequeños descubiertos fueron RNA I y CopA encargados de controlar la replicación de los plásmidos ColEI y RI respectivamente. Con los años se han descubierto muchos otros RNAs pequeños codificados en plásmidos que nos han permitido entender sus diversos mecanismos de acción.

Los plásmidos son elementos extracromosomales comunes en el genoma de las bacterias, pueden ser circulares aunque también existen plásmidos lineales.

El mantenimiento de los plásmido grandes en una amplia variedad de alfa-proteobacterias depende de la unidad de replicación / segregación *repABC*. La región intergénica *repB-repC* de estos plásmidos codifica un ARN antisentido (ctRNA) que modula la tasa de transcripción / traducción de la proteína iniciadora RepC. El ctRNA actúa como un fuerte factor de incompatibilidad cuando se expresa en *trans*. Nosotros hemos seguido un enfoque de mutagénesis sitio dirigida para mapear las secuencias en el ctRNA que se requieren para la incompatibilidad y el control de la replicación del plásmido. Se encontró que los tres primeros nucleótidos del extremo 5' del ctRNA son esenciales para la interacción con su ARN blanco. También se encontró que grupos de 4-5 nucleótidos de no complementariedad dentro de los primeros 10 nucleótidos del brazo izquierdo del ctRNA y el ARN blanco son suficientes para evitar la incompatibilidad del plásmido. Adicionalmente, los miniplásmidos derivados que expresan el ctRNA con mutaciones en el extremo 5' o pequeñas deleciones en el ctRNA son capaces de controlar su propia replicación y coexistir con el plásmido parental. Sugerimos que un mecanismo que podría tener un papel crucial en el proceso de especiación de los plásmidos *repABC* es la acumulación de suficientes cambios en esta pequeña región del gen ctRNA para interrumpir la formación de heterodúplex entre el ARN blanco de un plásmido y el ctRNA del otro. Los plásmidos que llevan estos cambios no tendrán defectos en su mantenimiento.

Abstract

Regulatory RNAs can act at the level of transcription, translation, mRNA stability and in direct interaction with DNA. Precisely the first small RNA were discovered RNA I and CopA responsible for controlling the replication of plasmids ColEI and RI respectively. Over the years, many others have discovered small RNAs encoded in plasmids which have allowed us to understand their different mechanisms of action.

Plasmids are extrachromosomal elements common in the genome of the bacteria, may be circular although there are linear plasmids.

The maintenance of large plasmid in a wide variety of alpha-proteobacteria depends on the *repABC* replication/segregation unit. The intergenic *repB-repC* region of these plasmids encodes a countertranscribed RNA (ctRNA) that modulates the transcription/translation rate of RepC, the initiator protein. The ctRNA acts as a strong incompatibility factor when expressed *in trans*. We followed a site directed mutagenesis approach to map those sequences of the ctRNA that are required for plasmid incompatibility and for plasmid replication control. We found that the first three nucleotides of the 5'-end of the ctRNA are essential for interactions with its target RNA. We also found that stretches of 4-5 nucleotides of non-complementarity within the first 10 nucleotides of the left arm of the ctRNA and the target RNA are sufficient to avoid plasmid incompatibility. Additionally, miniplasmid derivatives expressing ctRNA with mutations in the 5'-end or small deletions in the ctRNA are capable of controlling their own replication and coexisting with the parental plasmid. We suggest that a mechanism that could have a crucial role in the speciation process of *repABC* plasmids is to accumulate enough changes in this small region of the ctRNA gene to disrupt heteroduplex formation between the target RNA of one plasmid and the ctRNA of the other. Plasmids carrying these changes will not have defects in their maintenance.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias durante el crecimiento celular pueden estar expuestas a señales internas o externas que las obligue a generar respuestas inmediatas para contender con su medio ambiente (Msadek 2000; Babitzke and Romeo 2007). Estas respuestas implican la regulación de genes específicos a través de proteínas y/o moléculas de RNA que les permiten a la bacteria mantener su crecimiento celular y sobrevivir a las nuevas condiciones del ambiente. A las moléculas de RNA capaces de modular la expresión de los genes, se les conocen como RNAs reguladores (Repoila and Darfeuille 2009; Richards and Vanderpool 2011; Sesto, Wurtzel et al. 2013).

De acuerdo a las funciones celulares que regulan estos RNAs, se les han nombrado, RNAs CRISPR, RNA Riboswitches y RNAs pequeños (RNA antisentido) (Sesto, Wurtzel et al. 2013).

Los RNAs CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) confieren a la bacteria resistencia contra la infección de bacteriófagos o también pueden interferir con la conjugación de plásmidos (van der Oost, Jore et al. 2009; Barrangou and Horvath 2012). Los Riboswitches, regulan la expresión de genes en respuesta a cambios de temperaturas o se unen a metabolitos y coenzimas específicos (Tucker and Breaker 2005). Por último los RNAs pequeños (RNA antisentido), los más estudiados hasta el momento, participan en la regulación de un amplio abanico de procesos fisiológicos como lo son la homeostasis de iones, la percepción del quórum, la virulencia, la formación de biopelículas y la replicación de plásmidos entre otras (Chabelskaya, Gaillot et al. 2010; Gong, Vu et al. 2011).

Este tipo de RNAs se producen rápidamente en la célula y no requieren ser traducidos, por lo cual representan una ventaja sobre la regulación con proteínas; además son de tamaño pequeño en un rango 50-500 nucleótidos, lo cual, permite una rápida respuesta para la regulación de genes específicos.

Los RNAs reguladores pueden actuar a nivel de la transcripción, la traducción o la estabilidad del RNAm. Ellos logran estos diversos resultados a través de una variedad

de mecanismos que incluyen cambios conformacionales en el RNA, unión con proteínas, apareamiento de bases con otros RNAs e incluso interacciones con DNA (Masse and Gottesman 2002; Mandal and Breaker 2004; Rios 2006; Marraffini and Sontheimer 2008; Mellin, Tiensuu et al. 2013).

Gracias al desarrollo de nuevas técnicas y a la disponibilidad de genomas secuenciados, se han ido descubriendo muchos RNAs reguladores en gran diversidad de bacterias. A su vez, el conocimiento adquirido durante todos los años de estudio sobre los mecanismos regulatorios ha permitido entender mejor el control de la expresión génica (Chabelskaya, Gaillot et al. 2010; Carroll 2013; Qi, Larson et al. 2013; St-Pierre, McCluskey et al. 2014; Walsh, Gardner et al. 2014).

Esta tesis se enfoca principalmente sobre el mecanismo regulatorio de un RNA antisentido que modula la expresión del gen que codifica la proteína de inicio de la replicación del plásmido simbiótico p42d de *Rhizobium etli* CFNX42.

I. CARACTERÍSTICAS DE LOS RNA´s BACTERIANOS

✓ RNAs CRISPR

Los RNAs CRISPR, son los RNAs reguladores no codificantes más recientemente descubiertos y su importancia radica en que confieren a la bacteria resistencia contra la infección por bacteriófagos o de resistencia contra la conjugación de plásmidos. Esta resistencia se adquiere a través de la incorporación de secuencias cortas de los elementos genéticos móviles (fagos o plásmidos) dentro de una región de la secuencia del RNA CRISPR, es por esta razón que los CRISPR también se consideran como un sistema de inmunidad de la bacteria (Diez-Villasenor, Almendros et al. 2010; Garneau, Dupuis et al. 2010).

La secuencia de los RNAs CRISPR está organizada en regiones de DNA altamente variables las cuales consisten de: una secuencia líder, unidades repetidas directas, unidades espaciadoras y genes *cas* (Godde and Bickerton 2006; Marraffini and Sontheimer 2008; Szczepankowska 2012) (Fig 1a).

La secuencia líder se localiza en la región 5' del RNA CRISPR, es rica en A-T y tiene un tamaño aproximado de 550 pares de bases. Esta región sirve como promotor para su transcripción y le sigue una serie de unidades repetidas directas no continuas que están separadas por otras unidades llamadas secuencias espaciadoras (Richter, Chang et al. 2012; Szczepankowska 2012).

Las unidades repetidas directas varían en tamaño entre 24 a 47 pares de bases, el número de estas secuencias a lo largo del RNA CRISPR puede variar, sin embargo son secuencias altamente conservadas y son específicas de cada especie. Hasta el momento se han caracterizado 12 grupos distintos de unidades repetidas y todas ellas contienen dos motivos parcialmente conservados en los extremos 5' y 3' GTTTg/c y GAAAC respectivamente. Esta secuencia forma una estructura secundaria de RNA muy estable implicada en el procesamiento del transcrito del RNA CRISPR (crRNA) (Jansen, Embden et al. 2002; Richter, Chang et al. 2012; Szczepankowska 2012).

En cuanto a las secuencias espaciadoras a diferencia de las unidades repetidas directas, no están conservadas y su tamaño oscila entre 26 a 72 pares de bases, estas unidades espaciadoras son segmentos que guardan similitud con los plásmidos y fagos a los que la célula estuvo expuesta (Sorek, Kunin et al. 2008; Bhaya, Davison et al. 2011).

Adyacente al DNA CRISPR, se encuentran varios genes asociados que codifican a las proteínas CAS. Estas proteínas contienen dominios característicos de helicasas, nucleasas y de unión al RNA. El orden, la orientación, el agrupamiento y el número de genes *cas* asociados a un mismo CRISPR pueden variar. Debido a esta gran variedad las proteínas Cas se han clasificado en dos subsistemas, el primero consiste de un módulo de procesamiento de información el cual requiere que estén presentes un *core* de proteínas universales como las proteínas Cas1 y Cas2, las cuales están involucradas en la adquisición de nuevas unidades espaciadoras.

El segundo subsistema involucra a las proteínas Cas que se requieren para el procesamiento del transcrito primario CRISPR (crRNA) como lo son el reconocimiento y la degradación del ácido nucleico invasor. Para este subsistema el RNA CRISPR puede contar con multisubunidades que conforman la llamada CASCADA o bien puede

conformarse por una sola proteína multifuncional (Horvath, Coute-Monvoisin et al. 2009; Bhaya, Davison et al. 2011; Szczepankowska 2012).

Además, hay otras proteínas llamadas RAMP, por su acrónimo en inglés: Repetitive Associated Mysterious Protein, que se asocian con las unidades repetidas, estas proteínas presentan un motivo de unión a RNA y también se ha mostrado que están involucradas en el procesamiento del transcrito crRNA (Deveau, Garneau et al. 2010; Szczepankowska 2012).

En base a esta clasificación que integra la secuencia, la filogenia, la organización del contenido de proteínas del *locus* Cas, el sistema RNA CRISPR-Cas se divide en tres tipos (Touchon and Rocha 2010) (Fig 1b).

El sistema CRISPR-Cas Tipo I, el cual además de tener a las proteínas *core* Cas1 y Cas2, contiene a otro grupo de genes como el gen *cas3* que genera una proteína con actividad de helicasa/ nucleasa. Esta proteína junto con múltiples proteínas Cas conforman el complejo de CASCADA. También se encuentran tres proteínas de la familia RAMP (Cas5, Cas6 y Cas7). De los tres grupos, el sistema I es el más diverso y se divide en seis subtipos del IA hasta el IF.

El más sencillo de los tres sistemas es el CRISPR-Cas tipo II, contiene a la proteína Cas9, la cual tiene dos dominios con actividad de nucleasas y se considera una proteína multifuncional con la habilidad de generar el crRNA y la degradación del DNA de plásmidos y fagos. El sistema tipo II al igual que el tipo I también se divide en dos subtipos, tipo IIA y IIB.

Por último, el sistema CRISPR-Cas tipo III, tiene unas características muy peculiares, ya que contiene la proteína Cas10 que forma parte de las proteínas RAMP. Cas10 está involucrada en el procesamiento del crRNA y posiblemente en la degradación del DNA invasor, también está presente la endoribonucleasa Cas6 involucrada en el procesamiento del crRNA. Además están presentes otras proteínas RAMP. Este sistema se subdivide en dos subtipos: tipo III A, en donde el blanco del sistema es el DNA y tipo III B, cuyo blanco es el RNA (Bhaya, Davison et al. 2011; Garside, Schellenberg et al. 2012; Szczepankowska 2012).

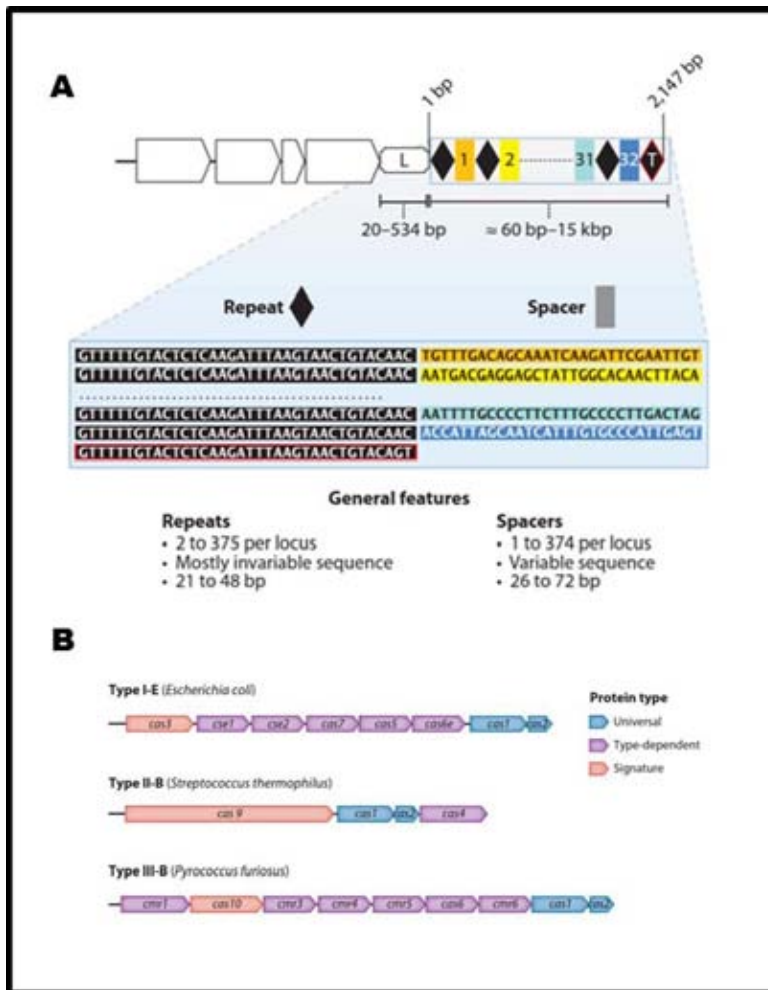


Fig 1. Sistema RNAs CRISPR. A) Organización del RNA CRISPR. Rombos representan las unidades repetidas directas, los rectángulos representan las unidades espaciadoras, los números indican el número de bases que forman a las unidades espaciadoras y las unidades repetidas, B) subtipos de RNA CRISPR. Imagen modificada de los artículos: (Deveau, Garneau et al. 2010; Bhaya, Davison et al. 2011)

Se ha reportado que los CRISPR se transcriben constitutivamente a bajos niveles y que su expresión puede aumentar en condiciones de estrés o por la expresión de genes virales.

El sistema CRISPR inicialmente se transcribe en un RNA largo llamado pre-crRNA que cubre la totalidad de unidades repetidas-espaciadoras. Posteriormente el pre-crRNA se

procesa de diferente manera dependiendo del sistema CRISPR-Cas (Brouns, Jore et al. 2008; Richter, Chang et al. 2012).

En los sistemas tipo I y tipo III, el complejo CASCADA o la proteína Cas 6, seccionan el transcrito pre-crRNA en crRNA's cortos que se componen de una unidad repetida-espaciadora. Estos crRNAs mantienen su estructura secundaria en forma de tallo-asa.

Alternativamente el procesamiento del pre-crRNA en el sistema tipo II involucra a la proteína Cas 9 y a un RNA pequeño codificado en trans llamado tracrRNA, ambos interactúan directamente con el pre-crRNA formando un complejo que finalmente procesa al pre-crRNA en crRNAs cortos. (Repoila 2009; Bhaya, Davison et al. 2011)

✓ RNAs Riboswitches

Los Riboswitches, son RNA reguladores no codificantes que se localizan generalmente en el extremo 5' de algunos RNA mensajeros. Estos reguladores tienen la habilidad de interactuar directamente con pequeñas moléculas como metabolitos y coenzimas. En ambos casos los riboswitches generan un cambio en la expresión del gen al que pertenecen, estos genes suelen estar involucrados en el consumo y uso de metabolitos (Mandal, Boese et al. 2003; Winkler, Nahvi et al. 2004; Haller, Rieder et al. 2011; Walsh, Gardner et al. 2014).

Los riboswitches se componen de dos dominios funcionales: un dominio aptámero y un dominio llamado plataforma de expresión. El dominio aptámero es una unidad muy selectiva encargada de reconocer e interactuar directamente con el metabolito de interés con gran afinidad, mientras que el dominio llamado plataforma de expresión es la región en la cual una vez que se ha reconocido la molécula de interés, genera estructuras alternativas que permiten regular la expresión del gen blanco (Xayaphoummine, Viasnoff et al. 2007; Mellin, Tiensuu et al. 2013; Peselis and Serganov 2014) (Fig 2).

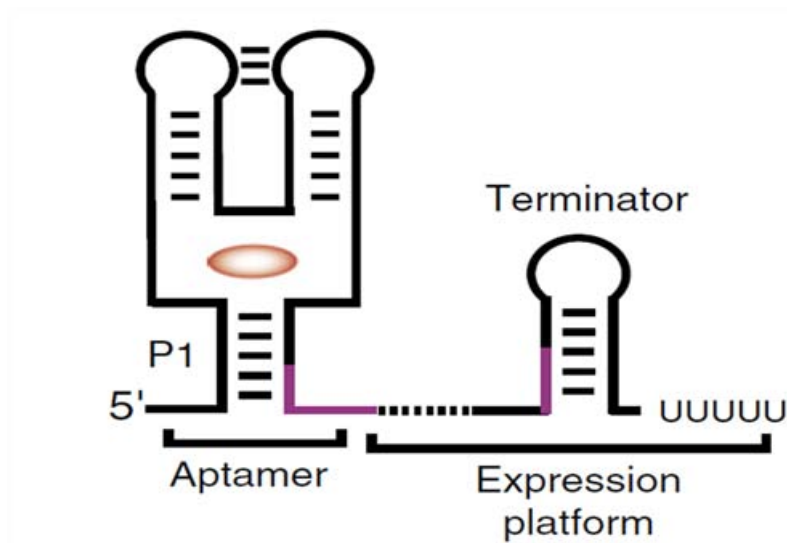


Fig 2. Organización de un RNA Riboswitch. Imagen modificada del artículo (Peselis and Serganov 2014)

Hasta el momento se conocen varios tipos de Riboswitches que responden a una molécula específica, por ejemplo:

Riboswitch que responde a Cobalamina, el cual se une a la coenzima adenosilcobalamina para regular la biosíntesis y el transporte de cobalamina y metabolitos similares (Nudler and Mironov 2004; Mellin, Tiensuu et al. 2013).

Riboswitch GMP di-cíclico, se une a la molécula de señalización GMP di-cíclico para regular una variedad de genes controlados por este segundo mensajero, se conocen dos tipos de riboswitches: riboswitches GMP di-cíclico-I y Riboswitches GMP di-cíclico-II (Ferre-D'Amare and Winkler 2011).

Riboswitch Flavina, se une al mononucleótido de Flavina para regular la biosíntesis y el transporte de Flavina (Nudler and Mironov 2004; Deigan and Ferre-D'Amare 2011).

Riboswitch GLM es una rибоenzima que se corta por si sólo cuando hay en la célula una concentración suficiente de glucosamina-6-fosfato (Mandal and Breaker 2004).

Riboswitch de Glutamina, se une a glutamina para regular a los genes implicados en el metabolismo de la glutamina, el nitrógeno y algunos péptidos cortos de función desconocida. Se conocen dos clases de riboswitches de glutamina: el motivo de RNA glnA y el motivo downstream-peptido (Ames and Breaker 2011).

Riboswitch de Glicina, se une a glicina para regular los genes encargados del metabolismo de glicina.(Ruff and Strobel 2014).

Riboswitch de Lisina, se une a la lisina para regular la biosíntesis de éste aminoácido, su catabolismo y su transporte (Abreu-Goodger, Ontiveros-Palacios et al. 2004).

El Riboswitch de PreQ1, se une a pre-queusina para regular a genes implicados en la síntesis o el transporte del precursor queuosina. Se conocen dos clases de Riboswitches: PreQ1-I, cuyo dominio de unión es más pequeño que el de los riboswitch naturales y el PreQ1-II el cual solo se encuentra en ciertas especies de los géneros de *Streptococcus* y *Lactococcus* y tienen una estructura completamente diferente y son más grandes (Ferre-D'Amare and Winkler 2011).

Los Riboswitchs de Purina, se unen a las purinas para regular el metabolismo y transporte de este compuesto (Mandal, Boese et al. 2003; Deigan and Ferre-D'Amare 2011).

Los Riboswitchs SAM, se unen a S-adenosilmetionina para regular la síntesis de metionina y el transporte de SAM (Batey 2011; Deigan and Ferre-D'Amare 2011; St-Pierre, McCluskey et al. 2014).

El Riboswitch TPP, se une a pirofosfato tiamina para regular el transporte y biosíntesis de tiamina y de metabolitos similares (Winkler and Breaker 2005; Deigan and Ferre-D'Amare 2011).

✓ RNA Termosensores

Los Termosensores son segmentos regulatorios que se localizan en el extremo 5´de algunos RNA mensajeros.

Estos segmentos regulan la expresión del gen localizado río abajo a través de cambios en su estructura secundaria en respuesta a fluctuaciones en la temperatura como los son el calor o el frío. Sin embargo; también se ha reportado que participan en la regulación de proteínas involucradas en la patogénesis bacteriana y en el desarrollo de la lisogenia provocada por el bacteriófago (Morita, Tanaka et al. 1999; Johansson, Mandin et al. 2002; Narberhaus, Waldminghaus et al. 2006; Waldminghaus, Heidrich et al. 2007; Giuliadori, Di Pietro et al. 2010).

✓ RNAs pequeños (antisentido)

Los RNAs pequeños hasta el momento son las moléculas cuyos mecanismos de acción mejor se conocen.(Novick, Ross et al. 1993; Gerdes, Gulyaev et al. 1997; Boisset, Geissmann et al. 2007; Giangrossi, Prosseda et al. 2010; Brantl 2014).

Estos transcritos suelen tener un tamaño que fluctúa entre los 50 y los 500 nucleótidos y poseen estructuras secundarias complejas conformadas por uno o varios motivos tallo- asa y regiones monocatenarias (Geisinger, Adhikari et al. 2006; Thomason and Storz 2010; Gottesman and Storz 2011) (Fig 3).

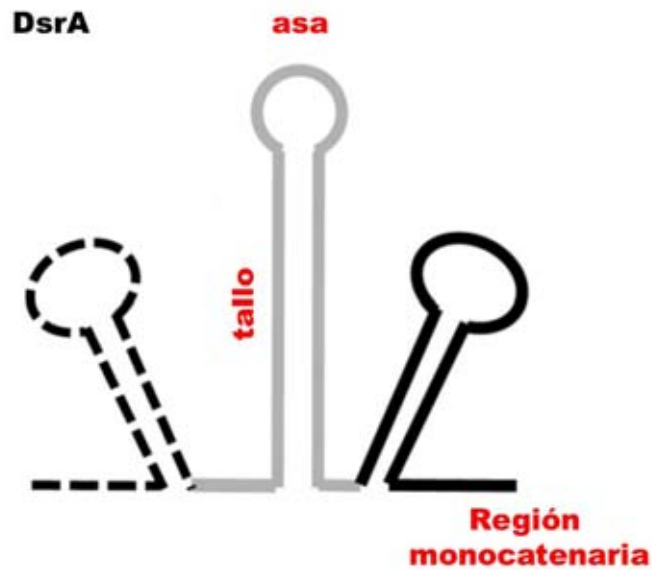


Fig 3. Estructura secundaria de un RNA small típico. Líneas punteadas, línea gris y línea negra, representan los tres tallos-asas que se forman en la estructura secundaria del RNA small DsrA. Imagen modificada del artículo (Cayrol, Geinguenaud et al. 2009).

Estos pequeños transcritos regulan la expresión génica apareándose con el RNA blanco usando regiones de complementariedad entre ambas moléculas. El contacto inicial puede ocurrir de dos maneras: a través de interacciones asa-asa o utilizando regiones de RNA monocatenario y una asa. Esta primera interacción genera un heteroduplex que se propaga generalmente a regiones más amplias entre las moléculas participantes (Gottesman 2005; Brantl 2007; Storz, Vogel et al. 2011) (Fig 4).

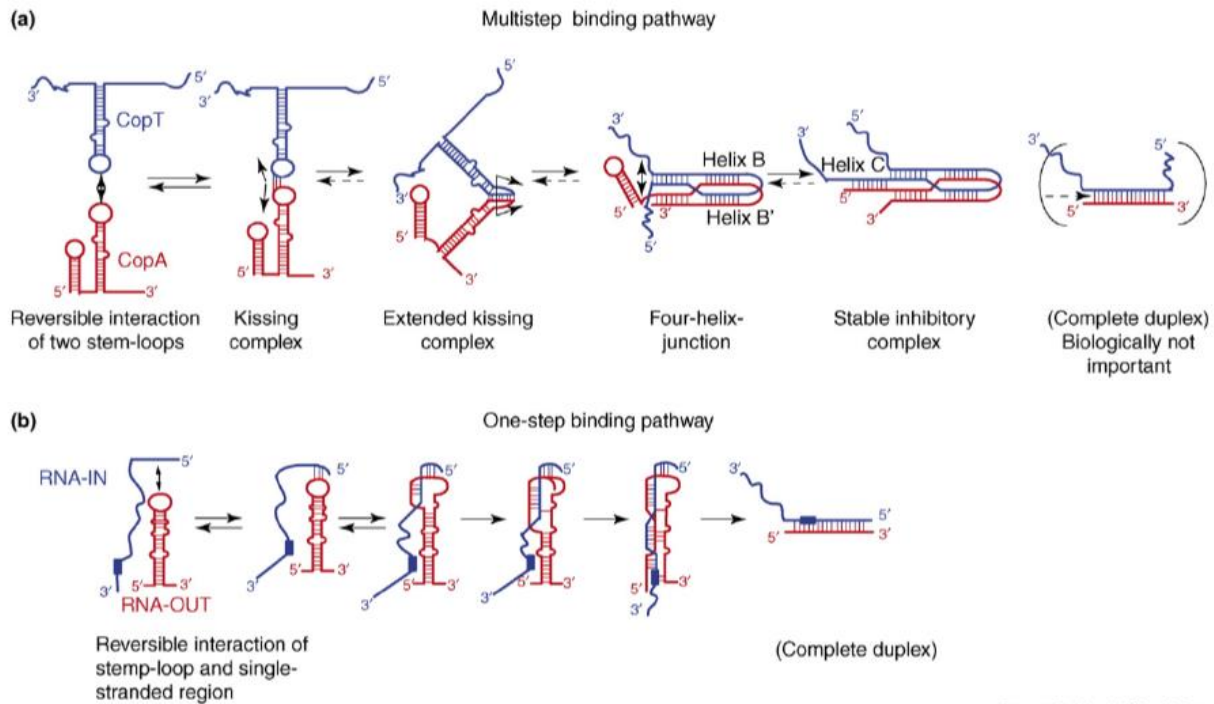


Figura 4. Ruta de interacción entre el RNA small y el RNA mensajero del gen blanco. A) ruta multipasos, la interacción comienza entre asas y progresa hasta forma una cadena de dos RNAs. B) Ruta de un solo paso, la interacción comienza entre un asa y una región de RNA monocatenario hasta formar la doble cadena de RNA. (azúl) RNA mensajeros blanco y (rojo) RNA small. Imagen tomada del artículo (Brantl 2007).

Este tipo de reguladores se clasifican en dos grupos: Los RNAs que actúan *in cis* y aquellos que actúan *in trans*.

RNAs que actúan *in cis*:

Los RNAs que actúan *in cis* generalmente se localizan en la misma región de DNA, pero en la cadena opuesta al gen blanco, y por tal motivo son totalmente complementarios con el RNAm que regulan (Thomason and Storz 2010; Richards and Vanderpool 2011).

Aunque este tipo de reguladores se pueden encontrar en el cromosoma, la mayoría de ellos se han localizado en plásmidos, en bacteriófagos y en transposones y controlan la expresión de algunos genes involucrados en procesos fundamentales como el inicio de la replicación, la eficiencia en la conjugación, la transposición, la degradación del RNAm y el inicio de la traducción (Brantl 2007).

Los RNAs que actúan *in cis* se expresan de manera constitutiva, sin embargo se ha reportado que aquellos que se localizan en el cromosoma solo se expresan bajo ciertas condiciones (i.e. fase estacionaria o estrés) (Storz, Altuvia et al. 2005; Brantl 2007).

En general el tiempo de vida de los RNAs pequeños codificados en plásmidos es corta (aproximadamente 1 min) y por esta razón se les considera inestables, los RNAs pequeños que tienen mayor estabilidad se codifican en transposones y en fagos. En cuanto a los RNAs pequeños codificados en el cromosoma su vida puede variar en un rango de 2 a más de 30 min (Storz, Altuvia et al. 2005; Brantl 2007; Brantl 2014).

RNAs que actúan *in trans*:

Los RNAs que actúan *in trans* pueden reconocer a más de un gen y se localizan en regiones de DNA distintas a la de los genes que regulan. Las regiones de complementariedad entre estos RNAs regulatorios y sus blancos es limitada y discontinua (Vogel and Wagner 2007; Frohlich and Vogel 2009; Thomason and Storz 2010).

Para que la regulación se lleve a cabo, necesitan de una proteína chaperona llamada Hfq, cuya función es facilitar la interacción entre el RNA regulatorio y su RNA blanco. La chaperona Hfq forma un anillo homohexamérico que estabiliza la unión entre el RNAm y el RNA regulador, además de ayudar a reclutar la maquinaria de degradación (Massé, Majdalani et al. 2003; Storz, Opdyke et al. 2004; Papenfort and Vogel 2009; Faner and Feig 2013; Wagner 2013).

Los RNAs codificados *in trans* solo se expresan bajo ciertas condiciones.

✓ RNAs con función dual

Los RNAs con funciones duales son una variación de los RNAs pequeños y se definen como RNAs que además de regular el RNAm por apareamiento de bases, también pueden codificar un péptido (Bohn, Rigoulay et al. 2007; Vanderpool, Balasubramanian et al. 2011).

Con base a los pocos ejemplos conocidos, sabemos que los péptidos codificados pueden reforzar la regulación ejercida por el RNA regulador o pueden actuar bajo distintas condiciones ambientales (Boisset, Geissmann et al. 2007; Wadler and Vanderpool 2007)

La identificación de más RNAs con funcionales duales podría proporcionar en un futuro información útil que nos permita entender mejor su papel en la célula.

✓ RNAs que modulan la actividad de una proteína

Los RNAs también interaccionan con proteínas, en algunos casos la unión RNAs-proteína es para promover funciones esenciales como lo es la transcripción (i.e. 6S) (Wassarman 2007), en otros la unión de estos RNAs es para modular la actividad de la proteína en cuestión (i.e. *CsrB*) (Babitzke and Romeo 2007).

II. RNAs PEQUEÑOS QUE CONTROLAN LA REPLICACIÓN EN PLASMIDOS.

Precisamente los primeros RNA pequeños descubiertos fueron RNA I y CopA encargados de controlar la replicación de los plásmidos ColEI y RI respectivamente. Con los años se han descubierto muchos otros RNAs pequeños codificados en plásmidos que nos han permitido entender sus diversos mecanismos de acción, pero ¿Qué son los plásmidos? (Nordstrom, Molin et al. 1984; Kues and Stahl 1989)

✓ Plásmidos

Los plásmidos son elementos extracromosomales comunes en el genoma de las bacterias, pueden ser circulares aunque también existen plásmidos lineales y se replican independientemente del cromosoma.

Codifican genes que no son esenciales para la sobrevivencia de la célula hospedera (de la Cueva-Mendez and Pimentel 2007). Aunque en algunas Rhizobias se han encontrado genes indispensables localizados en plásmidos (Landeta, Davalos et al. 2011; Villasenor, Brom et al. 2011). Sin embargo, los plásmidos codifican diversas proteínas que participan en la resistencia a antibióticos y a metales pesados; en la degradación de fuentes poco comunes de carbono; la generación de tumores en plantas o la fijación de nitrógeno, entre otras, confiriéndole propiedades a las bacterias que las vuelven competitivas en ciertos ambientes (Schrammeijer, Hemelaar et al. 1998; Wang, Yuan et al. 2004; Guglielmetti, Mora et al. 2007).

Los plásmidos se clasifican en grupos de incompatibilidad. La incompatibilidad es un proceso que impide que dos plásmidos coexistan establemente en la misma línea celular debido a que comparten los sistemas de replicación, los de segregación o los de regulación de alguno de estos procesos (Ebersbach, Sherratt et al. 2005).

Una de las características principales de los plásmidos es que son capaces de replicar de manera independiente al cromosoma bacteriano y lo hacen de manera coordinada con el crecimiento y el ciclo celular de la bacteria hospedera (del Solar and Espinosa 2000).

Las funciones para la replicación de los plásmidos y su control se concentran en un fragmento pequeño llamado replicón básico, el cual es la región más pequeña del plásmido capaz de replicar con el mismo número de copias que el plásmido completo (Kollek, Oertel et al. 1978).

El replicón básico consta de:

a) Un origen de replicación ($oriV$), ésta es la región que contiene los sitios de pegado para la proteína de inicio de la replicación.

b) El gen que codifica la proteína de inicio de la replicación (usualmente llamada Rep), la cual al unirse a los sitios específicos en el $oriV$, genera la apertura de las dos cadenas y el reclutamiento del complejo enzimático encargado de llevar a cabo la síntesis de las nuevas copias del plásmido (el replisoma).

c) Elementos que controlan el número de copias del plásmido, estos elementos se encargan de controlar la replicación del plásmido y pueden ser proteínas o RNAs pequeños, aunque también se ha reportado que existe otra manera de controlar la replicación de plásmidos y es a través de pequeñas secuencias repetidas de ADN localizadas en el origen de replicación, llamadas iterones, estas secuencias se encargan de titular la cantidad de proteína iniciadora disponible, además de que promueven que las moléculas recién replicadas permanezcan juntas evitando nuevas rondas de replicación hasta el comienzo de un nuevo ciclo de división celular (del Solar and Espinosa 2000).

d) El sistema de partición, el cual es la manera que tienen los plásmidos para asegurar la transmisión estable de la progenie. Existen dos tipos de partición, la partición activa y la partición pasiva, en ambos casos influye el número de copias del plásmido (Hayes and Barilla 2006).

El sistema de partición pasiva lo usan los plásmidos que son de alto número de copias, (>20 copias) ya que al momento de la división celular bacteriana existen suficientes copias del plásmido lo que permite que se lleve a cabo la difusión libre (Summers 1998).

Sin embargo los plásmidos de bajo número de copias usan el mecanismo de partición activa para asegurar que la progenie sea heredada correctamente, en este sistema las moléculas recién duplicadas se separan activamente hacia los extremos de la célula en división a través de una maquinaria celular nucleoprotéica para asegurar que por lo menos haya una copia del plásmido en cada una de las células hijas (Barilla 2010).

✓ **¿Qué mecanismos usan los RNAs pequeños para controlar la replicación en plásmidos?**

La diversidad de mecanismos empleados por los RNAs pequeños para controlar la replicación en plásmidos es muy amplia, ya que pueden controlar la replicación a niveles distintos: al inicio de la misma replicación del plásmido, durante la transcripción o durante la traducción de la proteína encargada del inicio de la replicación (Rep) (Brantl 2002; Brantl 2007; Brantl 2014).

Tanto los RNAs pequeños que actúan *in cis* como los que actúan *in trans* pueden inhibir la traducción de cuatro distintas maneras (Fig 5):

- I. **Inhibición de la unión del ribosoma:** en el cual la interacción del RNA pequeño con su RNA blanco, induce en este último, la formación de una estructura secundaria que bloquea directamente el sitio de unión al ribosoma (RBS), este tipo de mecanismo se ha observado en el plásmido pMV158 de *Streptococcus pneumoniae* y en el plásmido *pE194* de *Staphylococcus aureus* (del Solar and Espinosa 1992; Kwak and Weisblum 1994).
- II. **Inhibición de la formación de pseudonudo:** la unión del RNA pequeño con su RNA blanco, induce la formación de un pseudonudo que bloquea directamente el RBS y por tanto inhibe la traducción de la proteína, el mecanismo se ha observado en los plásmidos IncB, Inc1 α y CollbP9 de *Escherichia coli* (Asano, Moriwaki et al. 1991; Praszkie, Wilson et al. 1992; Brantl 2014).
- III. **Atenuación traduccional:** la unión del RNA pequeño con su RNA blanco, promueve la formación de una estructura tallo-asa que funciona como un terminador intrínseco de la transcripción, el mecanismo se ha descrito en el plasmido pSK41 de *S. aureus* (Kwong, Skurray et al. 2004; Brantl 2014).
- IV. **Inhibición de la traducción del péptido líder:** aquí el RNA pequeño al interaccionar con el RNA blanco se une a un péptido líder localizado en el mensajero del gen a regular y cuya traducción está acoplada a la del gen blanco, el mecanismo se identificó en el plásmido R1 de *E. coli*. (Fig 7 B,D,F, C) (Nordstrom, Molin et al. 1984).

También se ha definido dos mecanismos de acción que sólo se han observado en los RNA's que actúan *in cis* y son: la atenuación transcripcional y la inhibición de la maduración del primero.

En la atenuación transcripcional, el RNA pequeño se une al RNAm naciente e induce la formación de una estructura tallo-asa que evita que la transcripción continúe, este es el mecanismo usado por los plásmidos pAM β 1 de *Enterococcus faecalis*, pT181 de los estafilococos y por el plásmido pIP501 de *Streptococcus* (Novick, Iordanescu et al. 1989; Brantl, Birch-Hirschfeld et al. 1993; Le Chatelier, Ehrlich et al. 1996).

En cuanto a la inhibición de la maduración del primero, es un mecanismo que hasta el momento solo se ha reportado en el plásmido ColE1 de *E. coli*, este plásmido a diferencia del resto no codifica una proteína de inicio de la replicación ya que utiliza un RNA como primero del inicio de la replicación. En este caso el RNA pequeño (RNAI) se une al pre-primero (RNAIII), e inhibe que pueda utilizarse en el inicio de la replicación. Este es el mecanismo por el cual este tipo de plásmidos regula su número de copias (Fig 7 A y E) (Kues and Stahl 1989; Richards and Vanderpool 2011).

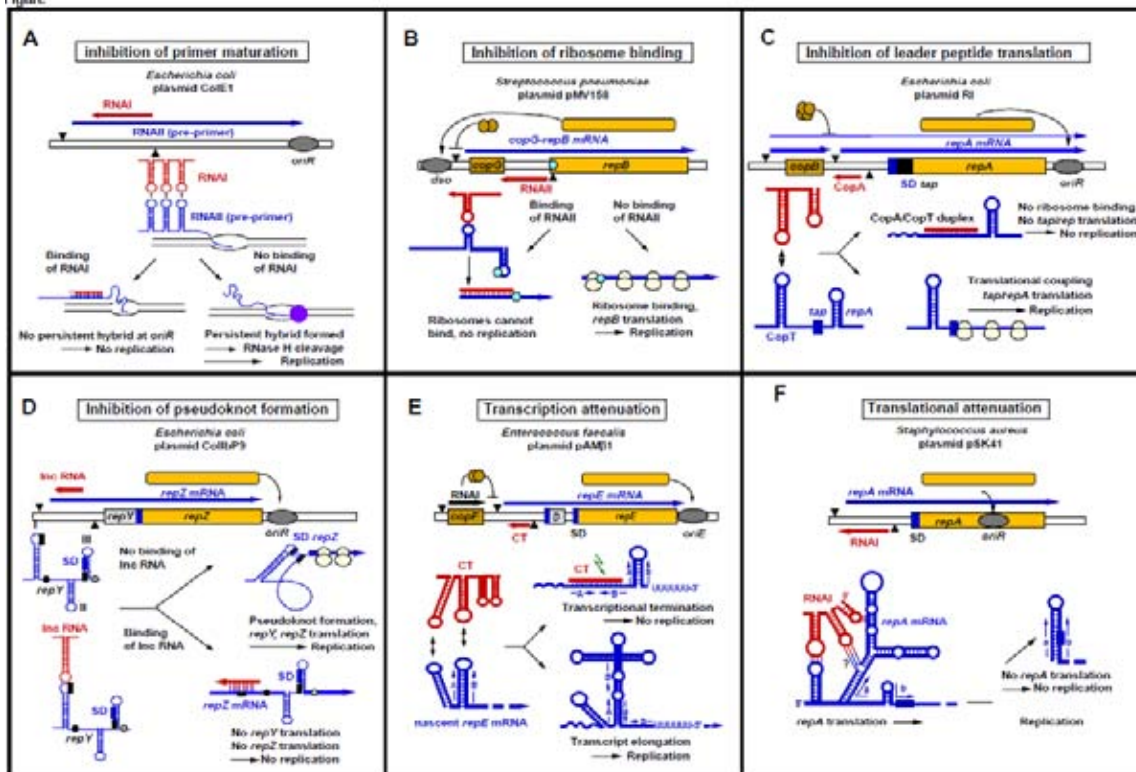


Fig 5. Mecanismos de acción empleados por los RNA pequeños (Brantl 2014).

III. FAMILIA DE PLASMIDOS *repABC*

La familia de los plásmidos *repABC* habita en las α -proteobacterias como *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Ruegueria*, *Paracoccus*, *Brucella* y *Gluconobacter* entre otros. En algunos de estos géneros los plásmidos proveen la capacidad de formar interacciones bacteria-planta para formar nódulos fijadores de nitrógeno y en otros como en *Agrobacterium* tienen la capacidad de inducir tumores en plantas (Bartosik, Baj et al. 1998; Zhong, Caspi et al. 2002).

Los plásmidos *repABC* se caracterizan por la presencia de un operón *repABC*, el cual consiste en una sola unidad transcripcional que contiene todos los elementos necesarios

para la replicación y mantenimiento estable de los replicones que lo poseen (Ramirez-Romero, Bustos et al. 1997; Pappas and Winans 2003).

Los operones *repABC* están formados por tres genes que codifican para proteínas y que siempre se encuentran organizados en el mismo orden: *repA*, *repB* y *repC*, un gen que codifica para un RNA antisentido (ctRNA) y al menos una secuencia centromérica llamada *parS*. Sin embargo pueden presentar diferencias en cuanto al número de promotores, el número y posición de los sitios *parS* y la presencia de minigenes que codifican péptidos (Cevallos, Cervantes-Rivera et al. 2008)(Fig 6).

En cuanto a la incompatibilidad, dado que más de un plásmido tipo *repABC* puede coexistir en la misma bacteria, esta familia de plásmidos incluye muchos grupos de incompatibilidad (Ramirez-Romero, Soberon et al. 2000; Cevallos, Porta et al. 2002; Soberon, Venkova-Canova et al. 2004)

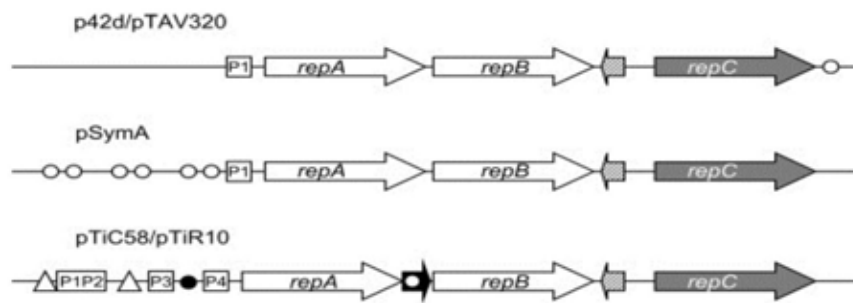


Fig 6. Diversidad de la organización genética de las regiones de replicación/ partición de los replicones *repABC*. Las flechas blancas representan los genes *repA* y *repB*, son las proteínas implicadas en la partición y en la regulación negativa de la transcripción del operón. Los círculos blancos indican la posición de los sitios *parS*. Los círculos negros indican cajas *vir* involucradas en la regulación. Flechas sombreadas indican la posición del gen de RNA antisentido. Flechas grises indican las posiciones de los genes *repC*, que codifican las proteínas limitantes para la replicación. La flecha negra representa el gen *repD*. Las cajas cuadradas indican las posiciones de los promotores y los triángulos la posición de las cajas *tra*, involucradas en la regulación del operón (Cevallos, Cervantes-Rivera et al. 2008).

✓ **El sistema de partición en los plásmidos *repABC***

Se ha demostrado que el producto de los primeros dos genes *repA* y *repB* junto con el sitio *parS* componen la maquinaria de partición en el plásmido pTiB6S3 de *Agrobacterium tumefaciens*, en el plásmido pTAV320 de *Paracoccus versutus*, en el plásmido p42d de *Rhizobium etli* y en el plásmido pSymA de *Sinorhizobium meliloti*. Los análisis genéticos y moleculares de estos plásmidos muestran que inserciones, deleciones o mutaciones tipo frame-shift en *repA* o *repB* disminuyen la estabilidad de los plásmidos (Gallie, Hagiya et al. 1985; Tabata, Hooykaas et al. 1989; Bartosik, Baj et al. 1998; Ramirez-Romero, Tellez-Sosa et al. 2001).

En los plásmidos p42d y pTiR10 de *R. etli* y *A. tumefaciens* respectivamente, las proteínas RepA (represor), junto con RepB (co-represor) llevan a cabo la autoregulación del operón, uniéndose a la región operadora localizada cerca del inicio de transcripción del gen *repA* (Ramirez-Romero, Tellez-Sosa et al. 2001; Pappas and Winans 2003).

En cuanto al sitio *parS*, es un sitio muy divergente entre los operones *repABC* y puede existir más de un sitio en un mismo plásmido. Sin embargo se ha demostrado que en los plásmidos pTAV320, pSymA, pTiR10, pTiC58 y p42d, esta región es esencial para la estabilidad de cada plásmido, es un factor de incompatibilidad cuando se coloca en *trans* con respecto al plásmido parental del que proviene y además es un sitio de unión para la proteína RepB (Bartosik, Szymanik et al. 2001; Soberon, Venkova-Canova et al. 2004; MacLellan, Smallbone et al. 2005; Cevallos, Cervantes-Rivera et al. 2008).

✓ **El origen de replicación y *repC***

Las proteínas tipo RepC solo se encuentran en las alfa protobacterias y pueden estar bajo diferentes contextos, frecuentemente el gen *repC* se encuentra asociado con un gen RNA antisentido (ctRNA), aunque también se ha encontrado asociado con el gen *repA* o como parte del operón típico de la familia de los plásmidos *repABC*.

En todos los casos el gen *repC* codifica la proteína iniciadora de la replicación y su función es unirse al origen de replicación (*oriV*) localizado dentro de la secuencia del gen

repC, convirtiéndolo en la mínima región que es esencial y suficiente para sostener la replicación de los plásmidos (Tabata, Hooykaas et al. 1989; Izquierdo, Venkova-Canova et al. 2005; Cevallos, Cervantes-Rivera et al. 2008).

✓ Elementos que controlan el número de copias en los plásmidos *repABC*

La regulación de algunos operones *repABC* está ligada a otro operón llamado *tral-trb*, el cual está relacionado con la percepción del quórum, este tipo de regulación es muy sofisticado por que el número de copias de los plásmidos puede ser influenciado tanto positiva como negativamente por factores externos, tal es el caso del plásmido pTiR10 en donde la actividad de sus promotores P1-P3 está influenciada positivamente por la proteína efectora TraR que se encuentra unida a una octanoil homoserin lactona, codificada por el gen *tral*, cuya transcripción aumenta en cuanto aumenta la densidad celular. Este complejo se une a las cajas *tra* localizadas entre los promotores P1 y P3 y como consecuencia se induce la transcripción de operón *repABC* y se incrementa el número de copias del plásmido (Pappas and Winans 2003).

Aunado a esto, otra proteína llamada VirG, la cual pertenece a un sistema de dos componentes, también participa en la regulación del plásmido pTiR10 tanto positiva como negativamente al unirse a las cajas *vir* localizadas entre los promotores P3 y P4 del operón (Zhu, Oger et al. 2000).

Una característica universal de la familia de plásmidos *repABC* es la presencia de una región intergénica altamente conservada localizada entre los genes *repB-repC*.

Esta región intergénica se ha analizado en los plásmidos pSymA, pSymB, p42d y pTiR10. Dichos análisis demostraron la presencia de un gen RNA antisentido (ctRNA) codificado en la cadena complementaria a la que codifica para *repB* y *repC* con una longitud de 55 a 59 nucleótidos que se transcribe bajo un promotor cuya secuencia muestra alta similitud con la secuencia consenso del σ^{70} de *E. coli* (Venkova-Canova, Soberon et al. 2004; Chai and Winans 2005; MacLellan, Smallbone et al. 2005).

La estructura secundaria predicha para el ctRNA es la de un tallo-asa, con dos regiones desapareadas, una de estas regiones es rica en uracilos, característica de los terminadores de la transcripción intrínsecos (Venkova-Canova, Soberon et al. 2004; Chai and Winans 2005; MacLellan, Smallbone et al. 2005; Brantl 2007).

El ctRNA está localizado río arriba del gen *repC* el cual codifica la proteína iniciadora de la replicación y por si solo es un factor de incompatibilidad en *trans*, de esta manera el ctRNA puede controlar los niveles de expresión de *repC* y por ende controlar el número de copias del plásmido portador.

IV. ANTECEDENTES

- ✓ **Análisis genético del operón *repABC* del plásmido simbiótico p42d de *R. etli*.**

Rhizobium etli CFN42, es una alfa-proteobacteria que habita en el suelo y tiene la capacidad de nodular y fijar nitrógeno en las raíces de los frijoles. Esta cepa contiene seis grandes plásmidos y en uno de ellos, el plásmido simbiótico (pSym) o p42d, se encuentran muchos de los genes involucrados en la nodulación y la fijación de nitrógeno (Cevallos, Porta et al. 2002; Gonzalez, Santamaria et al. 2006).

El plásmido p42d es una molécula circular que mide aproximadamente 371kb y codifica 354 genes. La mínima región del plásmido capaz de replicar con la misma estabilidad que el plásmido simbiótico original es de 5kb y se le denomina replicón básico y contiene básicamente al operón *repABC* (Ramirez-Romero, Bustos et al. 1997) (Fig 7).

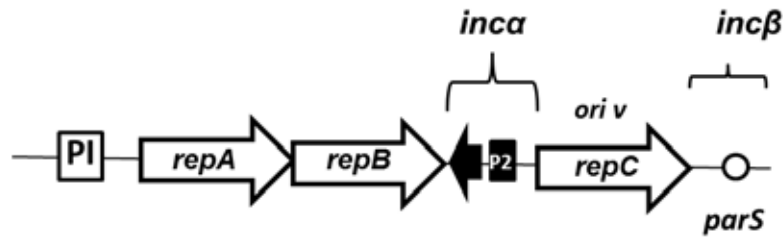


Fig 7. Organización del operón *repABC* (Rivera-Urbalejo, Perez-Oseguera et al. 2015).

Este operón igual que en otros operones *repABC* anteriormente mencionados, está conformado por tres genes que codifican las proteínas –RepA, RepB y RepC– un gen que codifica un RNA antisentido que se localiza en la región intergénica (*inca*) ubicada entre los genes *repB-repC* y un sitio *parS* (*incβ*) (Ramirez-Romero, Bustos et al. 1997; Cevallos, Cervantes-Rivera et al. 2008).

Las proteínas RepA, RepB y el sitio *parS* (*incβ*) están involucradas tanto en la segregación del plásmido, como en la regulación negativa de la transcripción. También se demostró que son un factor de incompatibilidad. RepC es la proteína iniciadora de la replicación, ya que los derivados del replicón básico que portan mutaciones o que carecen del gen, son incapaces de replicar. Además, el gen *repC*, con un Shine-Delgarno (SD) consenso y bajo un promotor *Plac* constitutivo replica con alto número de copias, lo que significa, por un lado, que el origen de replicación se localiza dentro de la secuencia del gen *repC* y por el otro, que este gen es el factor mínimo suficiente para replicar. En cuanto al ctRNA, este gen se expresa de manera constitutiva bajo un segundo promotor llamado P2, tiene una longitud de 59 pares de bases y regula los niveles de expresión de *repC* además de ser un factor de incompatibilidad (Ramirez-Romero, Soberon et al. 2000; Venkova-Canova, Soberon et al. 2004; Cervantes-Rivera, Pedraza-Lopez et al. 2011; Perez-Oseguera and Cevallos 2013).

El análisis *in vitro* de la región *inca* determinó que el ctRNA presenta una estructura secundaria formada por un tallo-asa y dos regiones desapareadas: una de 14 nucleótidos y la otra de 9 nucleótidos rica en uracilos, mientras que el RNA mensajero

V. JUSTIFICACIÓN

En la región *inca* del plásmido simbiótico p42d de *R. etli*, se localiza un gen que codifica para un ctRNA, la unión de este ctRNA con su blanco genera una estructura secundaria llamada elemento S, aunado a esto también se identificó una secuencia que codifica para un posible péptido, la presencia de estos tres elementos nos sugiere que están involucrados en el control de la replicación del plásmido simbiótico.

Para confirmar lo anterior es necesario analizar por separado cada una de estas moléculas.

VI. OBJETIVO

El objetivo principal de este proyecto es identificar los mecanismos moleculares mediante los cuales el RNA pequeño (antisentido), el elemento S y el posible péptido regulan la replicación del plásmido p42d.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Debido a que el codón de término del péptido sobrepone con el SD de repC queremos determinar si existe un acoplamiento traduccional entre ellos, mediante mutaciones a lo largo de su secuencia y realizando ensayos de replicación en la cepa CFNX107 la cual carece del plásmido simbiótico.
2. Determinar in vivo cuáles son los nucleótidos importantes para la función del ctRNA bajo dos perspectivas: incompatibilidad y como elemento regulador negativo.
3. Realizar mutaciones a lo largo de la secuencia del elemento S con el fin de que la estructura secundaria no se pueda formar y observar el efecto en la replicación del plásmido.

VIII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo corresponden al segundo objetivo del proyecto, el cual se publicó y anexo en esta tesis bajo el nombre:

Mutation in an antisense RNA, involved in the replication control of a repABC plasmid, that disrupt plasmid incompatibility and mediate plasmid especiation. (2015)

América Paulina Rivera-Urbalejo, Ángeles Pérez-Oseguera, Ofelia E.Carreón-Rodriguez, Miguel Angel Cevallos.

Plasmid doi: 10.1016/j.plasmid.2015.01.004

IX. RESULTADOS ADICIONALES

✓ **Análisis del acoplamiento traduccional entre el péptido putativo y repC.**

El péptido putativo es de 10 aminoácidos y para analizar la existencia de un acoplamiento traduccional entre el péptido y la proteína de inicio de la replicación RepC del plásmido simbiótico de *R.etli.*, se utilizó el QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit para generar cuatro mutaciones a lo largo de la secuencia del péptido putativo (Fig 10).

Cada una de las construcciones se generó a partir de la muestra *inca-repC* pDOP que contiene la región *inca* y el gen completo de repC, clonados en el vector pDOP.

Secuencia del péptido

	<u>SD</u>	<u>I</u>									<u>T</u>	Replicación en CFNX107	
pDOPin α	UGGCG	GUG	AGC	GAA	UUU	CCU	UUG	CCU	GCU	GAA	AGG	UGA	R
pDOPF α STOP	UGGCG	GUG	AGC	GAA	UAA	CCU	UUG	CCU	GCU	GAA	AGG	UGA	R
pDOP S α C	UGGCG	GUG	TGC	GAA	UUU	CCU	UUG	CCU	GCU	GAA	AGG	UGA	R
pDOP I α STOP	UGGCG	TAG	AGC	GAA	UUU	CCU	UUG	CCU	GCU	GAA	AGG	UGA	R
pDOPSD α EcoRV	GATAT	CUG	AGC	GAA	UUU	CCU	UUG	CCU	GCU	GAA	AGG	UGA	R

Fig 10. Secuencia aminoacídica del péptido putativo. (SD) Shine Delgarno del péptido, (I) codón de inicio, (T) codón de termino. La columna de la derecha muestra la capacidad para replicar (R) de cada una de las mutantes generadas.

En la primera construcción se mutó el cuarto aminoácido del péptido, cambiando una fenilalanina por un codón de paro (UUUxUAA), la segunda construcción, lleva la mutación en el codón contiguo al codón de inicio del péptido, cambiando una serina por una cisteína (AGCxTCG), en la tercera construcción se generó una mutación que cambia el codón de inicio del péptido por un codón de paro (GUGxTAG) y en la cuarta construcción se mutó el SD del péptido por el sitio de restricción EcoRV (UGGCGxGATATC).

Cada una de las construcciones se transformaron en la cepa S17 de *E. coli*, para posteriormente poder conjugarlas con la cepa CFNX107 de *R. etli* y analizar su capacidad de replicación de cada una de las mutantes generadas a través de evaluar el perfil de plásmidos de las transconjugantes.

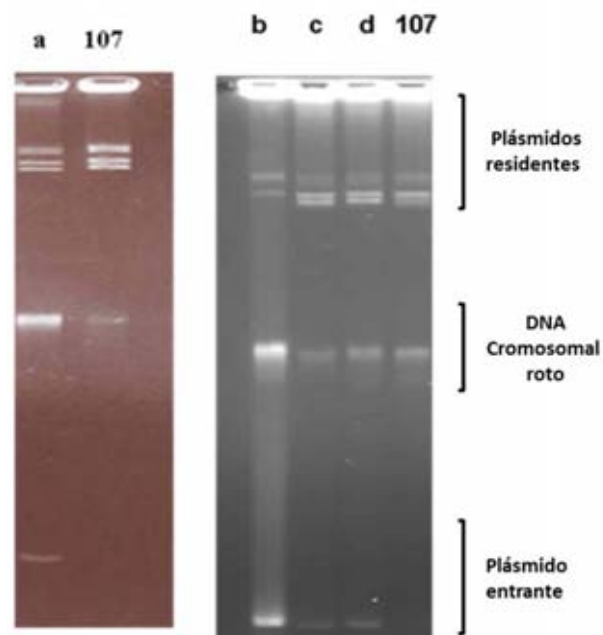


Fig 11. Perfil plasmídico de las transconjugantes con mutaciones en la secuencia del péptido, a) pDOPSDxEcoRV, b) pDOPFxBSTOP, c) pDOPIxBSTOP, d) pDOPSxC, los corchetes señalan los plásmidos residentes de *R. etli* CFNX107, el DNA cromosomal roto y el plásmido entrante.

Ninguno de los cambios que introducimos afectó la replicación del plásmido, por lo tanto, podemos decir que el péptido no existe, o no tiene ninguna implicación funcional y que no existe un acoplamiento traduccional como suponíamos.

✓ Análisis del elemento S

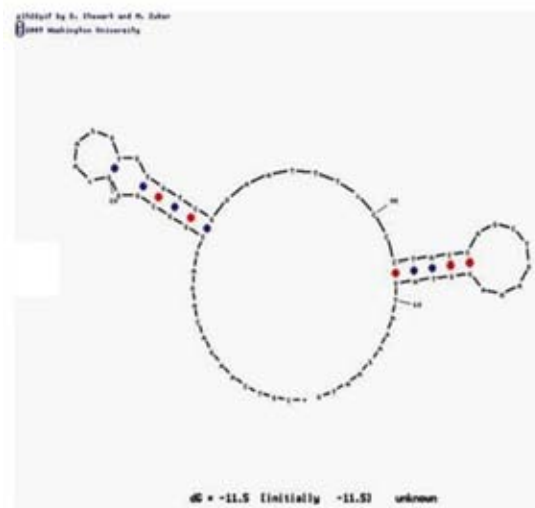


FIG 12. Estructura secundaria predicha por el programa MFOLD después de cambiar cada uno de los nucleótidos a lo largo del elemento S.

Para analizar el efecto del elemento S en la replicación del plásmido simbiótico de *R. etli*, realizamos mutaciones a lo largo de su secuencia con el fin de evitar que se formara la estructura secundaria de tallo-asa.

La secuencia se transformó en la cepa S17 de *E. coli* y se conjugó en CFNX107 para analizar su papel en la replicación.

Ninguna transconjugante se obtuvo de la conjugación en la cepa CFNX107, lo que nos sugiere que aunque esté presente el ctRNA, sin el elemento S, es posible que la proteína de inicio de la replicación se esté sobre expresando.

X. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Las moléculas de RNA cubren un amplio rango de funciones reguladoras en bacterias y modulan varios aspectos como la resistencia contra la infección de bacteriófagos, regulan la expresión de genes en respuesta a cambios de temperatura o a la unión de metabolitos y coenzimas específicos, también participan en otros procesos fisiológicos como el control de la replicación en plásmidos, homeostasis de iones y percepción del quórum entre otras.

Los RNA's que regulan el control de la replicación en plásmidos representan un fuerte factor de incompatibilidad.

Una característica general de los plásmidos *repABC* es que tienen un gen que codifican un pequeño RNA antisentido en la región intergénica *repB-repC*. Se ha demostrado que este ctRNA juega un papel importante en el control de la transcripción/traducción de la proteína iniciadora de la replicación y que esta molécula es un fuerte factor de incompatibilidad.

Nosotros realizamos de 4 a 5 mutaciones consecutivas a lo largo del brazo 5' del ctRNA localizado en el operón *repABC* del plásmido simbiótico p42d de *R. etli* y observamos que nuestras construcciones son incapaces de desplazar al plásmido parental.

Este análisis nos permite concluir que los primeros 10 nucleótidos del extremo 5' del ctRNA son los importantes para la interacción con el RNA mensajero blanco y también que son los responsables del fenotipo de incompatibilidad y los cambios en estos 10 nucleótidos son suficientes para producir la especiación del plásmido.

En contraste los plásmidos que llevan mutaciones en los últimos tres nucleótidos del brazo 5' del ctRNA o que expresan al ctRNA con cuatro mutaciones consecutivas en el asa, son capaces de ejercer incompatibilidad con el plásmido parental, sugiriéndonos que existe un apareamiento parcial entre el ctRNA-RNAm blanco.

El brazo desapareado 5' del ctRNA es complementario al asa apical del RNA mensajero del operón y esta complementariedad es importante para iniciar la interacción entre el ctRNA- RNAm blanco, nosotros mostramos que la mutación de los primeros tres

nucleótidos del ctRNA es suficiente para suprimir la capacidad de esta molécula para ejercer incompatibilidad y que este efecto se debe a que los primeros tres nucleótidos son importantes para el contacto inicial entre las moléculas ctRNA-RNAm blanco.

Para evaluar la capacidad del ctRNA para modular la transcripción de su RNA blanco se utilizó la fusión *arepC :: gusA*, la cual lleva el promotor P2 wild type o un promotor inactivo, las diferencias en las actividades del gen reportero fueron significativas; la fusión *gusA* con el promotor P2 mutante mostró mayor aumento en la actividad del gen reportero comparado con la actividad de la fusión *arepC :: gusA* el cual llevaba el promotor wild-type.

Cuando la cepa que lleva la fusión *arepC :: gusA* con el promotor P2 mutante era complementado con un plásmido que expresa el ctRNA bajo su propio promotor, se obtuvo una reducción del 50% en la actividad *gusA*. Estos resultados muestran que la actividad del ctRNA es más eficiente cuando el gen se expresa en su ubicación nativa (en la actividad *in situ*) que cuando se expresa desde otro replicón (actividad *ex situ*), lo que sugiere que este RNA antisentido inicia la formación de heterodúplex cuando el ctRNA y su RNAm blanco están siendo transcritos.

Sorprendentemente, las cepas que llevan la fusión *arepC :: gusA* (en el plásmido o en el cromosoma) con el promotor P2 wild-type y una segunda copia del gen ctRNA wild-type en otro vector, presentaron mayor actividad del gen reportero que la cepa con la fusión *arepC :: gusA* sola. Estos resultados indican que una segunda copia del gen ctRNA interfiere con la regulación de la primera copia, probablemente porque los ctRNAs de ambas fuentes pueden formar dúplex ctRNA-ctRNA. Sin embargo, es posible que el plásmido que codifica el gen ctRNA en este experimento esté presente en grandes cantidades debido al número de copias del vector.

En cuanto al péptido putativo y su posible acoplamiento traduccional con *repC*, al evaluar la capacidad de replicación de cada una de las cuatro contrucciones generadas, observamos que ninguna de las mutaciones afectaba la replicación de los plásmidos, por lo tanto podemos concluir que el péptido no existe o no tiene ninguna implicación funcional y por ende no existe un acoplamiento traduccional como suponíamos.

El elemento S, es una estructura tallo-asa que se forma al momento que se lleva a cabo la interacción entre el ctRNA y el RNAm del operón, nosotros realizamos mutaciones a lo largo de esta estructura que interrumpen su formación y evaluamos el papel del elemento S en el control de la replicación de la proteína de inicio. Fuimos incapaces de obtener transconjugantes en los ensayos de replicación, lo cual nos sugiere que aunque este presente el ctRNA, el elemento S, es importante para controlar la replicación del plásmido, lo cual hace que el sistema de regulación de la replicación del plásmido simbiótico de *R. etli* sea un sistema complejo.

Finalmente los resultados de este proyecto contribuyen al entendimiento de especiación en plásmidos como un proceso de pequeños cambios acumulativos, sin embargo aún nos preguntamos ¿cuáles son los cambios en el ctRNA que destruyen su actividad como regulador? pregunta que esperamos pronto responder.

BIBLIOGRAFÍA

Abreu-Goodger, C., N. Ontiveros-Palacios, et al. (2004). "Conserved regulatory motifs in bacteria: riboswitches and beyond." Trends Genet **20**(10): 475-479.

Ames, T. D. and R. R. Breaker (2011). "Bacterial aptamers that selectively bind glutamine." RNA Biol **8**(1): 82-89.

Asano, K., H. Moriwaki, et al. (1991). "An induced mRNA secondary structure enhances repZ translation in plasmid ColIb-P9." J Biol Chem **266**(36): 24549-24556.

Babitzke, P. and T. Romeo (2007). "CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins." Curr Opin Microbiol **10**(2): 156-163.

Barilla, D. (2010). "One-way ticket to the cell pole: plasmid transport by the prokaryotic tubulin homolog TubZ." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(27): 12061-12062.

Barrangou, R. and P. Horvath (2012). "CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification." Annu Rev Food Sci Technol **3**: 143-162.

Bartosik, D., J. Baj, et al. (1998). "Molecular and functional analysis of pTAV320, a repABC-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1." Microbiology **144**(Pt 11): 3149-3157.

Bartosik, D., M. Szymanik, et al. (2001). "Identification of the partitioning site within the repABC-type replicon of the composite *Paracoccus versutus* plasmid pTAV1." J Bacteriol **183**(21): 6234-6243.

Batey, R. T. (2011). "Recognition of S-adenosylmethionine by riboswitches." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(2): 299-311.

Bhaya, D., M. Davison, et al. (2011). "CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation." Annu Rev Genet **45**: 273-297.

Bohn, C., C. Rigoulay, et al. (2007). "No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*." BMC Microbiol **7**: 10.

Boisset, S., T. Geissmann, et al. (2007). "Staphylococcus aureus RNAlII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism." Genes Dev **21**(11): 1353-1366.

Brantl, S. (2002). "Antisense-RNA regulation and RNA interference." Biochim Biophys Acta **3**: 1-3.

Brantl, S. (2007). "Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs." Curr Opin Microbiol **10**(2): 102-109.

Brantl, S. (2014). "Antisense-RNA mediated control of plasmid replication - pIP501 revisited." Plasmid **7**(14): 00057-00052.

Brantl, S., E. Birch-Hirschfeld, et al. (1993). "RepR protein expression on plasmid pIP501 is controlled by an antisense RNA-mediated transcription attenuation mechanism." J Bacteriol **175**(13): 4052-4061.

Brouns, S. J., M. M. Jore, et al. (2008). "Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes." Science **321**(5891): 960-964.

Carroll, D. (2013). "Staying on target with CRISPR-Cas." Nat Biotechnol **31**(9): 807-809.

Cayrol, B., F. Geinguenaud, et al. (2009). "Auto-assembly of E. coli DsrA small noncoding RNA: Molecular characteristics and functional consequences." RNA Biol **6**(4): 434-445.

Cervantes-Rivera, R., F. Pedraza-Lopez, et al. (2011). "The replication origin of a repABC plasmid." BMC Microbiol **11**(158): 1471-2180.

Cervantes-Rivera, R., C. Romero-Lopez, et al. (2010). "Analysis of the mechanism of action of the antisense RNA that controls the replication of the repABC plasmid p42d." J Bacteriol **192**(13): 3268-3278.

Cevallos, M. A., R. Cervantes-Rivera, et al. (2008). "The repABC plasmid family." Plasmid **60**(1): 19-37.

Cevallos, M. A., H. Porta, et al. (2002). "Rhizobium etli CFN42 contains at least three plasmids of the repABC family: a structural and evolutionary analysis." Plasmid **48**(2): 104-116.

Chabelskaya, S., O. Gaillot, et al. (2010). "A *Staphylococcus aureus* Small RNA Is Required for Bacterial Virulence and Regulates the Expression of an Immune-Evasion Molecule." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000927.

Chai, Y. and S. C. Winans (2005). "A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid." *Mol Microbiol* **56**(6): 1574-1585.

de la Cueva-Mendez, G. and B. Pimentel (2007). "Gene and cell survival: lessons from prokaryotic plasmid R1." *EMBO Rep* **8**(5): 458-464.

Deigan, K. E. and A. R. Ferre-D'Amare (2011). "Riboswitches: discovery of drugs that target bacterial gene-regulatory RNAs." *Acc Chem Res* **44**(12): 1329-1338.

del Solar, G. and M. Espinosa (1992). "The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein, RepA." *Mol Microbiol* **6**(1): 83-94.

del Solar, G. and M. Espinosa (2000). "Plasmid copy number control: an ever-growing story." *Mol Microbiol* **37**(3): 492-500.

Deveau, H., J. E. Garneau, et al. (2010). "CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions." *Annu Rev Microbiol* **64**: 475-493.

Diez-Villasenor, C., C. Almendros, et al. (2010). "Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*." *Microbiology* **156**(Pt 5): 1351-1361.

Ebersbach, G., D. J. Sherratt, et al. (2005). "Partition-associated incompatibility caused by random assortment of pure plasmid clusters." *Mol Microbiol* **56**(6): 1430-1440.

Faner, M. A. and A. L. Feig (2013). "Identifying and characterizing Hfq-RNA interactions." Methods **63**(2): 144-159.

Ferre-D'Amare, A. R. and W. C. Winkler (2011). "The roles of metal ions in regulation by riboswitches." Met Ions Life Sci **9**: 141-173.

Frohlich, K. S. and J. Vogel (2009). "Activation of gene expression by small RNA." Curr Opin Microbiol **12**(6): 674-682.

Gallie, D. R., M. Hagiya, et al. (1985). "Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58 replication region with a novel high-copy-number derivative." J Bacteriol **161**(3): 1034-1041.

Garneau, J. E., M. E. Dupuis, et al. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature **468**(7320): 67-71.

Garside, E. L., M. J. Schellenberg, et al. (2012). "Cas5d processes pre-crRNA and is a member of a larger family of CRISPR RNA endonucleases." Rna **18**(11): 2020-2028.

Geisinger, E., R. P. Adhikari, et al. (2006). "Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function." Mol Microbiol **61**(4): 1038-1048.

Gerdes, K., A. P. Gulyaev, et al. (1997). "Antisense RNA-regulated programmed cell death." Annu Rev Genet **31**: 1-31.

Giangrossi, M., G. Prosseda, et al. (2010). "A novel antisense RNA regulates at transcriptional level the virulence gene icsA of *Shigella flexneri*." Nucleic Acids Res **38**(10): 3362-3375.

Giuliodori, A. M., F. Di Pietro, et al. (2010). "The cspA mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA." Mol Cell **37**(1): 21-33.

Godde, J. S. and A. Bickerton (2006). "The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes." J Mol Evol **62**(6): 718-729.

Gong, H., G. P. Vu, et al. (2011). "A Salmonella small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors." PLoS Pathog **7**(9): e1002120.

Gonzalez, V., R. I. Santamaria, et al. (2006). "The partitioned Rhizobium etli genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3834-3839.

Gottesman, S. (2005). "Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." Trends Genet **21**(7): 399-404.

Gottesman, S. and G. Storz (2011). "Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(12).

Guglielmetti, S., D. Mora, et al. (2007). "Small rolling circle plasmids in Bacillus subtilis and related species: organization, distribution, and their possible role in host physiology." Plasmid **57**(3): 245-264.

Haller, A., U. Rieder, et al. (2011). "Conformational capture of the SAM-II riboswitch." Nat Chem Biol **7**(6): 393-400.

Hayes, F. and D. Barilla (2006). "The bacterial segrosome: a dynamic nucleoprotein machine for DNA trafficking and segregation." Nat Rev Microbiol **4**(2): 133-143.

Horvath, P., A. C. Coute-Monvoisin, et al. (2009). "Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes." Int J Food Microbiol **131**(1): 62-70.

Izquierdo, J., T. Venkova-Canova, et al. (2005). "An antisense RNA plays a central role in the replication control of a repC plasmid." Plasmid **54**(3): 259-277.

Jansen, R., J. D. Embden, et al. (2002). "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes." Mol Microbiol **43**(6): 1565-1575.

Johansson, J., P. Mandin, et al. (2002). "An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*." Cell **110**(5): 551-561.

Kollek, R., W. Oertel, et al. (1978). "Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1." Mol Gen Genet **162**(1): 51-57.

Kues, U. and U. Stahl (1989). "Replication of plasmids in gram-negative bacteria." Microbiol Rev **53**(4): 491-516.

Kwak, J. H. and B. Weisblum (1994). "Regulation of plasmid pE194 replication: control of cop-repF operon transcription by Cop and of repF translation by countertranscript RNA." J Bacteriol **176**(16): 5044-5051.

Kwong, S. M., R. A. Skurray, et al. (2004). "Staphylococcus aureus multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation." Mol Microbiol **51**(2): 497-509.

Landeta, C., A. Davalos, et al. (2011). "Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia." J Bacteriol **193**(6): 1317-1326.

Le Chatelier, E., S. D. Ehrlich, et al. (1996). "Countertranscript-driven attenuation system of the pAM beta 1 repE gene." Mol Microbiol **20**(5): 1099-1112.

MacLellan, S. R., L. A. Smallbone, et al. (2005). "The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large repABC family of alpha-proteobacterial plasmids." Mol Microbiol **55**(2): 611-623.

Mandal, M., B. Boese, et al. (2003). "Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria." Cell **113**(5): 577-586.

Mandal, M. and R. R. Breaker (2004). "Gene regulation by riboswitches." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 451-463.

Marraffini, L. A. and E. J. Sontheimer (2008). "CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA." Science **322**(5909): 1843-1845.

Masse, E. and S. Gottesman (2002). "A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4620-4625.

Massé, E., N. Majdalani, et al. (2003). "Regulatory roles for small RNAs in bacteria." Curr Opin Microbiol **6**(3): 324.

Mellin, J. R., T. Tiensuu, et al. (2013). "A riboswitch-regulated antisense RNA in *Listeria monocytogenes*." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(32): 13132-13137.

Morita, M. T., Y. Tanaka, et al. (1999). "Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor." Genes Dev **13**(6): 655-665.

Msadek, I. (2000). "Stress and sensitivity." Trends Microbiol. **8(1)**: 10-12.

Narberhaus, F., T. Waldminghaus, et al. (2006). "RNA thermometers." FEMS Microbiol Rev **30(1)**: 3-16.

Nordstrom, K., S. Molin, et al. (1984). "Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system." Plasmid **12(2)**: 71-90.

Novick, R. P., S. Iordanescu, et al. (1989). "pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator." Cell **59(2)**: 395-404.

Novick, R. P., H. F. Ross, et al. (1993). "Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule." Embo J **12(10)**: 3967-3975.

Nudler, E. and A. S. Mironov (2004). "The riboswitch control of bacterial metabolism." Trends Biochem Sci **29(1)**: 11-17.

Papenfert, K. and J. Vogel (2009). "Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level." Res Microbiol **160(4)**: 278-287.

Pappas, K. M. and S. C. Winans (2003). "Plant transformation by coinoculation with a disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain and an *Escherichia coli* strain carrying mobilizable transgenes." Appl Environ Microbiol **69(11)**: 6731-6739.

Pappas, K. M. and S. C. Winans (2003). "The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid repABC operon." Mol Microbiol **49(2)**: 441-455.

Perez-Oseguera, A. and M. A. Cevallos (2013). "RepA and RepB exert plasmid incompatibility repressing the transcription of the repABC operon." Plasmid **70**(3): 362-376.

Peselis, A. and A. Serganov (2014). "Themes and variations in riboswitch structure and function." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **1839**(10): 908-918.

Praszkier, J., I. W. Wilson, et al. (1992). "Mutations affecting translational coupling between the rep genes of an IncB miniplasmid." J Bacteriol **174**(7): 2376-2383.

Qi, L. S., M. H. Larson, et al. (2013). "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression." Cell **152**(5): 1173-1183.

Ramirez-Romero, M. A., P. Bustos, et al. (1997). "Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*." Microbiology **143**(Pt 8): 2825-2831.

Ramirez-Romero, M. A., N. Soberon, et al. (2000). "Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid." J Bacteriol **182**(11): 3117-3124.

Ramirez-Romero, M. A., J. Tellez-Sosa, et al. (2001). "RepA negatively autoregulates the transcription of the repABC operon of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid basic replicon." Mol Microbiol **42**(1): 195-204.

Repoila, F. (2009). "Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects." Biol. Cell **101** (2): 117-131.

Repoila, F. and F. Darfeuille (2009). "Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects." Biology of the Cell **101**(2): 117-131.

Richards, G. R. and C. K. Vanderpool (2011). "Molecular call and response: The physiology of bacterial small RNAs." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **1809**(10): 525-531.

Richter, C., J. T. Chang, et al. (2012). "Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems." Viruses **4**(10): 2291-2311.

Rios, J. M. (2006). "[The big world of the small RNAs]." Rev Latinoam Microbiol **48**(2): 73-78.

Rivera-Urbalejo, A., A. Perez-Oseguera, et al. (2015). "Mutations in an antisense RNA, involved in the replication control of a repABC plasmid, that disrupt plasmid incompatibility and mediate plasmid speciation." Plasmid **30**(15): 00015-00013.

Ruff, K. M. and S. A. Strobel (2014). "Ligand binding by the tandem glycine riboswitch depends on aptamer dimerization but not double ligand occupancy." Rna **20**(11): 1775-1788.

Schrammeijer, B., J. Hemelaar, et al. (1998). "The presence and characterization of a virF gene on *Agrobacterium vitis* Ti plasmids." Mol Plant Microbe Interact **11**(5): 429-433.

Sesto, N., O. Wurtzel, et al. (2013). "The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation." Nat Rev Micro **11**(2): 75-82.

Soberon, N., T. Venkova-Canova, et al. (2004). "Incompatibility and the partitioning site of the repABC basic replicon of the symbiotic plasmid from *Rhizobium etli*." Plasmid **51**(3): 203-216.

Sorek, R., V. Kunin, et al. (2008). "CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea." Nat Rev Microbiol **6**(3): 181-186.

St-Pierre, P., K. McCluskey, et al. (2014). "Fluorescence tools to investigate riboswitch structural dynamics." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **1839**(10): 1005-1019.

Storz, G., S. Altuvia, et al. (2005). "An abundance of RNA regulators." Annu Rev Biochem **74**: 199-217.

Storz, G., J. A. Opdyke, et al. (2004). "Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs." Curr Opin Microbiol **7**(2): 140-144.

Storz, G., J. Vogel, et al. (2011). "Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers." Mol Cell **43**(6): 880-891.

Summers, D. (1998). "Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability." Mol Microbiol **29**(5): 1137-1145.

Szczepankowska, A. (2012). "Role of CRISPR/cas system in the development of bacteriophage resistance." Adv Virus Res **82**: 289-338.

Tabata, S., P. J. Hooykaas, et al. (1989). "Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3." J Bacteriol **171**(3): 1665-1672.

Thomason, M. K. and G. Storz (2010). "Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing?" Annu Rev Genet **44**: 167-188.

Touchon, M. and E. P. Rocha (2010). "The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of Escherichia and Salmonella." PLoS One **5**(6): e11126.

Tucker, B. J. and R. R. Breaker (2005). "Riboswitches as versatile gene control elements." Curr Opin Struct Biol **15**(3): 342-348.

van der Oost, J., M. M. Jore, et al. (2009). "CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes." Trends Biochem Sci **34**(8): 401-407.

Vanderpool, C. K., D. Balasubramanian, et al. (2011). "Dual-function RNA regulators in bacteria." Biochimie **93**(11): 1943-1949.

Venkova-Canova, T., N. E. Soberon, et al. (2004). "Two discrete elements are required for the replication of a repABC plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure." Mol Microbiol **54**(5): 1431-1444.

Villasenor, T., S. Brom, et al. (2011). "Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in *Rhizobium etli* and *Rhizobium leguminosarum*." BMC Microbiol **11**(66): 1471-2180.

Vogel, J. and E. G. Wagner (2007). "Target identification of small noncoding RNAs in bacteria." Curr Opin Microbiol **10**(3): 262-270.

Wadler, C. S. and C. K. Vanderpool (2007). "A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20454-20459.

Wagner, E. G. (2013). "Cycling of RNAs on Hfq." RNA Biol **10**(4): 619-626.

Waldminghaus, T., N. Heidrich, et al. (2007). "FourU: a novel type of RNA thermometer in *Salmonella*." Mol Microbiol **65**(2): 413-424.

Walsh, S., L. Gardner, et al. (2014). "Intracellular Light-Activation of Riboswitch Activity." ChemBioChem **15**(9): 1346-1351.

Wang, Z., Z. Yuan, et al. (2004). "Processing of plasmid DNA with ColE1-like replication origin." Plasmid **51**(3): 149-161.

Wassarman, K. M. (2007). "6S RNA: a small RNA regulator of transcription." Curr Opin Microbiol **10**(2): 164-168.

Winkler, W. C. and R. R. Breaker (2005). "Regulation of bacterial gene expression by riboswitches." Annu Rev Microbiol **59**: 487-517.

Winkler, W. C., A. Nahvi, et al. (2004). "Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme." Nature **428**(6980): 281-286.

Xayaphoummine, A., V. Viasnoff, et al. (2007). "Encoding folding paths of RNA switches." Nucleic Acids Res **35**(2): 614-622.

Zhong, Z., R. Caspi, et al. (2002). "A 50-kb plasmid rich in mobile gene sequences isolated from a marine micrococcus." Plasmid **47**(1): 1-9.

Zhu, J., P. M. Oger, et al. (2000). "The bases of crown gall tumorigenesis." J Bacteriol **182**(14): 3885-3895.

ANEXO

Mutation in an antisense RNA, involved in the replication control of a repABC plasmid, that disrupt plasmid incompatibility and mediate plasmid especiation. (2015)

América Paulina Rivera-Urbalejo, Ángeles Pérez-Oseguera, Ofelia E. Carreón-Rodríguez, Miguel Angel Cevallos.

Plasmid doi: 10.1016/j.plasmid.2015.01.004



Mutations in an antisense RNA, involved in the replication control of a *repABC* plasmid, that disrupt plasmid incompatibility and mediate plasmid speciation



América Rivera-Urbalejo, Ángeles Pérez-Oseguera, Ofelia E. Carreón-Rodríguez, Miguel A. Cevallos*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 30 January 2015
Communicated by Dr. B. Funnell

Keywords:

Alpha-proteobacteria
Rhizobium
Replication control
Plasmid evolution

ABSTRACT

The maintenance of large plasmid in a wide variety of alpha-proteobacteria depends on the *repABC* replication/segregation unit. The intergenic *repB-repC* region of these plasmids encodes a countertranscribed RNA (ctRNA) that modulates the transcription/translation rate of RepC, the initiator protein. The ctRNA acts as a strong incompatibility factor when expressed *in trans*. We followed a site directed mutagenesis approach to map those sequences of the ctRNA that are required for plasmid incompatibility and for plasmid replication control. We found that the first three nucleotides of the 5'-end of the ctRNA are essential for interactions with its target RNA. We also found that stretches of 4–5 nucleotides of non-complementarity within the first 10 nucleotides of the left arm of the ctRNA and the target RNA are sufficient to avoid plasmid incompatibility. Additionally, miniplasmid derivatives expressing ctRNAs with mutations in the 5' end or small deletions in the ctRNA are capable of controlling their own replication and coexisting with the parental plasmid. We suggest that a mechanism that could have a crucial role in the speciation process of *repABC* plasmids is to accumulate enough changes in this small region of the ctRNA gene to disrupt heteroduplex formation between the target RNA of one plasmid and the ctRNA of the other. Plasmids carrying these changes will not have defects in their maintenance.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Plasmids are extrachromosomal elements that have a fundamental role in bacterial evolution, primarily because they are efficient vectors of horizontal gene transfer. Analysis of barriers to horizontal gene transfer and the evolutionary mechanisms shaping the structure of mobile elements are complex and compelling long-term research topics (e.g., Harrison and Brockhurst, 2012; Popa and Dagan, 2011). Our

current understanding suggests that plasmid mobility between cells of the same or different species depends on several factors. Some factors are intrinsic to their gene content; plasmids should carry all the genes required for conjugation or at least the DNA sequences that allow them to use the conjugative machinery of other plasmids. Other factors limiting plasmid mobility are host encoded; for example, a plasmid's recipient needs to encode elements required to sustain the replication and maintenance of the incoming plasmid. Plasmid incompatibility is another factor that restricts plasmid mobility. Two plasmids are unable to coexist in the same cell if their replication and/or segregation machineries interfere with each other (Austin and Nordström, 1990; Novick et al., 1976). In this way, the host plasmid content limits the diversity of new replicons that can be accepted and maintained in the recipient cell.

* Corresponding author. Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. Fax: (+52) 7773 17 55 81.

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

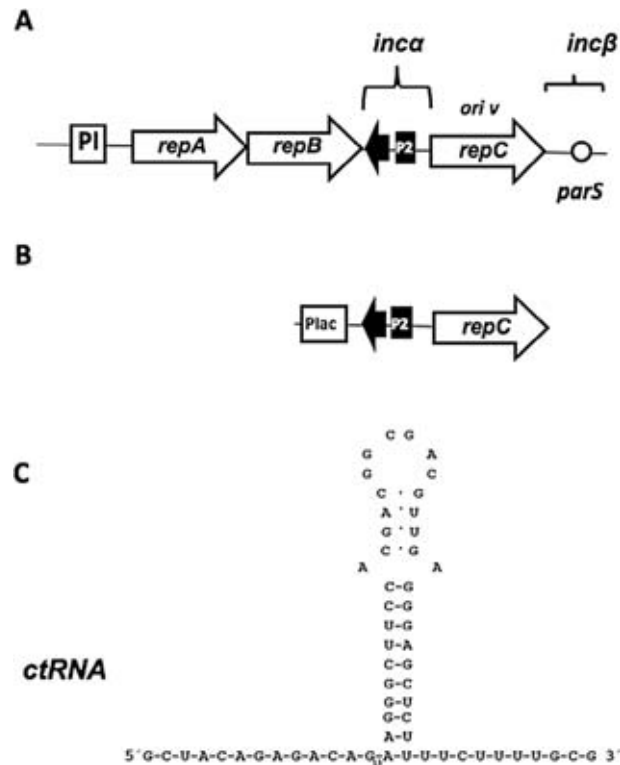


Fig. 1. (A) Genetic organization of a *repABC* replication/segregation unit. (B) Genetic structure of the replication unit of pDOP α C miniplasmid. White arrows represent genes encoding the partitioning and the initiator proteins. Circle represents the centromeric-like region *parS*. Black arrow represents the gene encoding the ctRNA that modulates *repC* expression. Boxed P1 and P2, indicate the position of the promoters found within the *repABC* replication/segregation unit; meanwhile boxed Plac indicates the position of promoter governing *repC* transcription in the miniplasmid. Brackets indicate regions involved in plasmid incompatibility. (C) Secondary structure model of the ctRNA of plasmid pRetCFN42d (p42d).

To cope with plasmid incompatibility, bacteria have developed a wide variety of plasmid replication systems to minimize potential interferences. A close examination of bacterial genomes shows that the plasmid replication systems of one strain are usually not closely related (unpublished results). An exception to this observation is alphaproteobacteria genomes. The genome architecture of this bacterial class, especially in the Rhizobiales, Rhodospirillales, and Rhodobacterales orders, commonly consists of one chromosome and several large plasmids of very low copy number that frequently belong to the same plasmid family. The most prevalent replication/segregation unit of these alphaproteobacteria plasmids is the *repABC* operon and, for this reason, they are classified as members of the *repABC* plasmid family (Cevallos et al., 2008; Pappas, 2008; Petersen et al., 2009; Pinto et al., 2011). This plasmid family includes several incompatibility groups, meaning that more than one *repABC* plasmid can coexist in the same strain (Castillo-Ramírez et al., 2009; Cevallos et al., 2002). It is extremely common within Rhizobiales that all plasmids from one strain are members of the *repABC* family. For example, the six large plasmids of *Rhizobium etli* CFN42 belong to the *repABC* plasmid family (Cevallos et al., 2008; Crossman et al., 2008; González et al., 2003).

A *repABC* operon contains all of the elements required for the replication and maintenance of a plasmid and must

be considered as a complete replication/segregation unit. This operon consists of three protein-encoding genes that are always in the same order, *repA*, *repB* and *repC*, and of a small antisense RNA regulatory gene located in the complementary DNA strand between the *repB* and *repC* genes. RepA and RepB have dual roles. They are involved, in conjunction with the centromere-like sequence (*parS*), in plasmid segregation and in the negative regulation of their own transcription (Pappas and Winans, 2003b; Pérez-Oseguera and Cevallos, 2013). RepC is the replication initiator protein and acts on the origin of replication located within the central region of its own coding sequence (Fig. 1A) (Cervantes-Rivera et al., 2011; Pinto et al., 2011). The position and number of partitioning-site sequences, *parS*, vary widely from plasmid to plasmid (Cevallos et al., 2008; Pappas and Cevallos, 2011). The antisense RNA plays a crucial role in modulating the *repC* transcription/translation rate (Cervantes-Rivera et al., 2010; Chai and Winans, 2005).

We have shown that plasmid pRetCFN42d, also known as p42d, of *R. etli* CFN42 possesses three regions that exert plasmid incompatibility when they are introduced *in trans*. The first region contains the *repA* and *repB* genes. Coexpression of these genes represses the *repABC* operon and induces parental plasmid loss. Expression of *repA* or *repB* does not interfere with the maintenance of the parental

	5' -end	Stem-Loop	3' -end
ctRNAwt	GCUACAGAGACAG	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAmut (1-4)	cg ggCAGAGACAG	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAmut (2-5)	Gaaug AGAGACAG	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAmut (4-8)	GCU g cg ccc GACAG	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAmut (6-10)	GCUAC g cccc CAG	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAmut (9-13)	GCUACAG accucc	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAmut (11-15)	GCUACAGAG aucc	cc GGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAR5	GCUACAGAGACAG	AAGGGCUUCCACG cg cg cu CGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAmu (2-5) R5	Gaaug AGAGACAG	AAGGGCUUCCACGAC cg cg cu CGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAΔ (1-3)	G C AGAGACAG	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG
ctRNAΔ (1-8)	GACAG	AAGGGCUUCCACGACGGCGACGUUGAGGGAGCUCUU	UUCUUUUUGCG

Fig. 2. Nucleotide sequences of ctRNA mutants. Mutations introduced in the ctRNAs are indicated with lower case letters and the names of the molecules carrying them names are listed in the left column.

plasmid. Nevertheless, RepA hyper-repressor mutants are strong incompatibility factors (Pérez-Oseguera and Cevallos, 2013). The second region is a 16-bp palindrome located downstream of the *repC* stop codon that constitutes the partitioning-site sequence *parS* (or *incβ*) and is also an effective incompatibility factor (Soberón et al., 2004). The last incompatibility region consists of the counter-transcribed RNA gene (*ctRNA*) encoded within the *repB-repC* intergenic region (*inca*). Expression of this molecule in *trans* rapidly induces the displacement of the parental plasmid, interfering with transcription/translation of the initiator protein (Venkova-Canova et al., 2004).

The gene encoding the *ctRNA* of plasmid p42d resides within the 155-bp intergenic *repB-repC* region and is constitutively expressed from a SigA promoter (Venkova-Canova et al., 2004). This ctRNA is 59 nt long with a very simple secondary structure: a single stem-loop flanked by two unpaired regions (arms). The left arm is 13 nt and the U-rich right arm is 9 nt (Fig. 1C). The left arm of the ctRNA is responsible for the initial interaction with the target RNA. The half-life of the ctRNA is approximately 5 minutes (Cervantes-Rivera et al., 2010). The region of the target mRNA that interacts with the ctRNA folds in a long stem-loop structure with two major paired regions interrupted by four unpaired regions. The apical loop sequence (5'-GUAGCA) is complementary to the first 5 nt of the ctRNA left arm. The last nucleotides at the 3'-end, which contain the Shine-Dalgarno (SD) sequence and the *repC* initiation codon, remain single stranded (Fig. 2) (Cervantes-Rivera et al., 2010). The mRNA/ctRNA hybrid induces the formation of a stem-loop structure in the target RNA, which acts as an intrinsic transcriptional termination signal (S-element). This structure also hides the SD sequence of *repC*, preventing the translation of the initiator protein (Cervantes-Rivera et al., 2010).

Based on the *repABC* replication/segregation unit of plasmid p42d, two miniplasmids have been constructed. One of the plasmids contains the complete *inca* region and *repC* under the control of a constitutive promoter (pDOP-αC) (Fig. 1B). A mobilizable suicide vector containing this insert is able to replicate as an autonomous entity in *Rhizobium* but only to a low copy number (2–3 copies per chromosome). The second miniplasmid consists of the *repC* ORF under the control of a constitutive promoter cloned in a mobilizable suicide vector. This construct replicates with a slightly higher copy number (6–7 copies per chromosome) in CFNX107 and was used to determine that the replication origin of p42d is located within the *repC* gene (Cervantes-Rivera et al., 2010).

The purpose of this paper was to map sequences of the ctRNA that are required for the induction of plasmid incompatibility and for plasmid replication control. We found that the first three nucleotides of the 5'-end of the ctRNA are essential for interactions with its target RNA. We also found that a gap of four or five nucleotides of non-complementarity between the ctRNA and the target RNA in the first 10 nucleotides of the 5'-end of the ctRNA is sufficient to avoid plasmid incompatibility. Additionally, miniplasmid derivatives of pDOPαC-expressing ctRNAs with mutations in the 5' end or small deletions in the ctRNA are capable of controlling their own replication and coexisting with the parental plasmid.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

In this work we used three *Rhizobium etli* strains, all derivatives of CE-3, a streptomycin resistant derivative of CFN42 (Noel et al., 1984). Strain CFNX101 is a *recA* derivative containing all plasmids present in CFN42. CFNX107 is also a *recA* strain but lacks plasmids pRetCFN42a and pRetCFN42d (Martínez-Salazar et al., 1991), and CFN2001 is a strain that also lacks plasmids pRetCFN42a and pRetCFN42d (Quinto et al., 1982). We used *Escherichia coli* DH5α as a plasmid recipient (Hanahan, 1983), but *E. coli* S17 was used in the biparental bacterial crosses to introduce our plasmid constructs into *R. etli* strains (Simon et al., 1983). *E. coli* strains were cultivated at 37 °C in Luria-Bertani medium. *Rhizobium* strains were grown at 30 °C in PY medium supplemented with 10 mM CaCl₂ (Noel et al., 1984). Antibiotics, when used, were added at the following concentrations (μg/ml): chloramphenicol, 30; kanamycin, 30; nalidixic acid, 20; gentamycin, 30; tetracycline, 10; and ampicillin, 100.

2.2. DNA manipulation

Plasmid DNA was purified using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) according to the manufacturer's instructions. Restriction and ligation reactions were performed using the conditions specified by the manufacturer of the enzymes (Thermo Scientific [Waltham, MA, USA], and New England Biolabs [Ipswich, MA, USA], respectively). Platinum High Fidelity *Taq* Polymerase (Invitrogen) was used in all PCR reactions. PCR products were cloned using the CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo

Table 1
Oligonucleotides used in this work.

Name	Sequence	Construction
M1.1up	5'GCC CTT CTG TCT CTG CCC GAA GAA CAG AAT CGC3'	Used to generate construction pDOP α mut(1–5)C
M1.1lw	5'GCG ATT CTG TTC TTC GGG CAG AGA CAG AAG GGC3'	
M1.2up	5'CGT GGA AGC CCT TCT GGG GGC GTA GCA AGA ACA GAA TC3'	Used to generate construction pDOP α mut(6–10)C
M1.2lw	5'GAT TCT GTT CTT GCT ACG CCC CCA GAA GGG CTT CCA CG 3'	
M1.3up	5'GTC GTG GAA GCC CGG GGA TCT CTG TAG CAA G3'	Used to generate construction pDOP α mut(11–15)C
M1.3lw	5'CTT GCT ACA GAG ATC CCC GGG CTT CCA CGA C3'	
M1.4up	5'GTC GTG GAA GCC CTT GGA GGT CTG TAG CAA GAA CAG3'	Used to generate construction pDOP α mut(9–13)C
M1.4lw	5'CTG TTC TTG CTA CAG ACC TCC AAG GGC TTC CAC GAC3'	
M1.5up	5'GGA AGC CCT TCT GTC GGC GCA GCA AGA ACA GAA TC3'	Used to generate construction pDOP α mut(4–8)C
M1.5lw	5'GAT TCT GTT CTT GCT GCG CCG ACA GAA GGG CTT CC3'	
CATTup	5'GAA GCC CTT CTG TCT CTC ATT CAA GAA CAG AAT CGC3'	Used to generate constructions: pDOP α mut(2–5)C and pDOP α mut(2–5)CR5
CATTlw	5'GCG ATT CTG TTC TTG AAT GAG AGA CAG AAG GGC TTC3'	
Q8up	5'CCG TCG TGG AAG CCC TTC TGT CAA GAA CAG AAT CGC ATT TCC TC3'	Used to generate construction pDOP α Δ (1–8)C
Q8lw	5'GAG GAA ATG CGA TTC TGT TCT TGA CAG AAG GGC TTC CAC GAC GG3'	
Q3up	5'GCC CTT CTG TCT CTG CAA GAA CAG AAT CGC3'	Used to generate construction pDOP α Δ (1–3)C
Q3lw	5'GCG ATT CTG TTC TTG CAG AGA CAG AAG GGC3'	
–35Mlup	5'CGC ATT TCC TCG AAT CCT ACG CGT GAG TCT TTG GCG CCG TTT TGG TG3'	Used to generate construction pDOP α Cmut
–35Mlulw	5'CAC CAA AAC GGC GCC AAA GAC TCA CGC GTA GGA TTC CAG GAA ATG CG3'	
Gusinc α	5'CAA CTA GTC CCG CAA AAG AAA AGA GCT CCC3'	Used to generate construction pRK7813inc α
Guscinc α	5'CTC GAG CAT ATG AGC GCC AGT TGG GCA TTC3'	
GrepSall	5'GTC GAC GCC CGA AGC GCC AGT TGG3'	Used to generate constructions: pHER α CgusA and pHER α CgusAmut
HincKpnllw	5'GGT ACC CCC GCA AAA GAA AAG AGC TC3'	
GincSallup	5'GTC GAC TCG CCG TCG TGG AAG CCC TTC3'	Used to generate constructions; pGusActrRNA and pGusActrRNAmut
GincKpnllw	5'GGT ACC CTC TGT AGC AAG AAC AGA ATC GC3'	
pDoup	5'GCT AGC CGC AGG AAA GAA CAT GTG AG3'	Used to generate constructions: pD0301 α CgusA and pD0301 α CgusAmut
pDolw	5'CAT ATG CTG AAT GGC GAA TGG GAC GC3'	
301up	5'ATG CAT CTT GCG GCC TTG ACG CCA AGG3'	
301lw	5'ATG CAT AGA GAT CCG AAC GAT GTG CTG ATC CC3'	
Bgluinc α -35up	5'CAT ATG GCA AAT ATT ATA CGC AAG GCG ACA AGG3'	
Bgluinc α -35lw	5'GCT AGC CTA GTG GAT CC ACTA GTA ACG GCC G3'	

Scientific) or the TA Cloning Kit (Invitrogen). The primers used in this work were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and IBT-UNAM and are listed in Table 1.

2.3. Bacterial matings

All constructs based in mobilizable vectors were introduced into *Rhizobium* using *E. coli* S17-1 as donor strain (Simon et al., 1983). Receptor and donor strains were grown in their proper antibiotic-free liquid medium to stationary phase, mixed in a 1:1 (vol) ratio on antibiotic-free PY plates and incubated at 30 °C overnight. Cells were resuspended in PY medium, and serial dilutions were plated on the appropriate selective PY medium.

2.4. Plasmid construction

Plasmid pDOP α C contains the complete *repB-repC* intergenic region (*inc α*) and the complete *repC* gene (Cervantes-Rivera et al., 2011). This plasmid was used as a PCR template in most of our constructs. Plasmid pDOP α Cmut is pDOP α C derivative carrying mutations in the –35 hexameric element (changed from TTGACG to ACGCGT) of the *ctRNA* promoter (P2) to destroy its function. These changes were introduced using the Quick Change II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) with primers 35Mlup and 35Mlulw using pDOP α C as the DNA template. To demonstrate that these sequence changes destroy promoter function, a *ctRNA* gene was transcriptionally fused with *gusA* as a reporter gene. To do this, a PCR

product was obtained using primers GincSalup and GincKpnllw and plasmid pDOP α Cmut as a PCR template. The PCR product was cloned into pJET using the CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific). The resulting plasmid was digested with the *KpnI* and *Sall* endonucleases, and the fragment containing the P2 promoter and the first 33 bp of the *ctRNA* gene was inserted into pBBMCS53 (Corvera et al., 1999) using its *KpnI* and *Sall* sites. The resulting plasmid was named pGusActrRNAmut. The control plasmid pGusActrRNAwt, which carries *gusA* fused to the *ctRNA* wild-type gene promoter, was generated similarly but using pDOP- α C as DNA template. Both plasmids and empty pBBMCS53 were introduced independently by conjugation into *R. etli* CFNX107. The activity of the reporter gene in the transconjugants was evaluated, and a comparison of the results showed that the *ctRNA::gusA* with a mutant P2 promoter has the same level of activity as the empty vector, while the reporter activity of the control *ctRNA::gusA* was easily detected (see Supplementary Fig. S1).

The plasmids pDOP- α Δ (1–3)C, pDOP- α Δ (1–8)C, pDOP- α mut(1–5)C, pDOP- α mut(2–5)C, pDOP- α mut(4–8)C, pDOP- α mut(6–10)C, pDOP- α mut(9–13)C, pDOP- α mut(11–15)C, pDOP- α R5C and pDOP- α mut(2–5)R5C carrying mutations in the *ctRNA* gene were also generated with the Quick Change II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) using pDOP- α C as the PCR template and the primers listed in Table 1.

Plasmid pBBR1MC-*ctRNA*wt, which was used to evaluate the incompatibility phenotype of wild-type *ctRNA*, was obtained by ligating the pBBR1MCS-2 vector (Kovach et al.,

1995) digested with *EcoRI* and *SacII* with an *EcoRI-SacII* restriction fragment of plasmid pDOP- α C containing the complete *repB-repC* intergenic region and the first 620 bp of the *repC* gene. Plasmids pBBR1MCS-ctRNA Δ (1–3), pBBR1MCS-ctRNA Δ (1–8), pBBR1MCS-ctRNAmut(1–4), pBBR1MCS-ctRNAmut(2–5), pBBR1MCS-ctRNAmut(4–8), pBBR1MCS-ctRNAmut(6–10), pBBR1MCS-ctRNAmut(9–13), pBBR1MCS-ctRNAmut(11–15), pBBR1MCS-ctRNAR5, and pBBR1MCS-ctRNAmut(2–5)R5, all expressing mutant ctRNAs, were obtained in a similar way but using restriction fragments of the pDOP- α C derivatives described above as donors. pDOP α plasmids sharing the same mut suffix as pBBR1MCS-ctRNA plasmids were restriction fragment donors for the latter.

To construct plasmid pRK7813inc α , a PCR product was first obtained using primers Gusinc α and GusCinc α and pDOP- α C as the DNA template. This product was the cloned into the pCR 2.1 plasmid using the instructions and reagents from the TA Cloning Kit (Invitrogen). The resulting plasmid was digested with *EcoRI*, and the restriction fragment containing the entire *repB-repC* intergenic region and the first 280 bp of *repC* were inserted into the *EcoRI* site of pRK7813 (Jones and Gutterson, 1987).

The first step to build the plasmid carrying the *repC::gusA* fusion (pHER α CgusA) was obtaining a PCR product made using primers HincKpn1LW and GrepSall and pDOP α C as the DNA template. The amplicon was cloned in pJET using the instructions and reagents from the CloneJET PCR cloning kit (Thermo). The resultant plasmid was digested with *KpnI-Sall*, and the restriction fragment containing the *repB-repC* intergenic sequence and 280 bp of *repC* was inserted in the *KpnI* and *Sall* sites of plasmid pHER (Venkova-Canova et al., 2004). Plasmid pHER α CgusAmut contains a *repC::gusA* fusion preceded by the complete *repB-repC* intergenic sequence but with the mutations in the –35 hexameric element of the ctRNA gene promoter, as described above. This plasmid was constructed in a similar way to pHER α CgusA with the exception that the PCR product was generated with the GrepSall and HincKpn1LW primers and pDOP- α Cmut as a PCR template.

Plasmid pDO301 α CgusA, an integrative vector, is a pDO derivative (Pérez-Segura et al., 2013) carrying the *repC::gusA* fusion and was constructed in the following way: first, the *lacZ* gene with the promoter of plasmid pDO was deleted, and *NdeI* and *NheI* sites were then added to the PCR product. This 2814-bp PCR product was obtained with primers pDOup and pDOlw using pDO as the DNA template. The amplification product was cloned into pJET with the CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific). Next, a DNA product containing the *repC::gusA* fusion, including its associated pLac promoter, was obtained by PCR using primers β gluinc α -35up and β gluinc α -35lw and pHER α CgusA as the DNA template. These primers added an *NdeI* restriction site to one end of the PCR product and a *NheI* restriction site to the other. Again, this product was cloned into pJET with the CloneJET PCR cloning kit (Thermo). The pJET derivatives carrying the *repC::gusA* fusion and the deleted pDO were digested with the *NheI* and *NdeI* endonucleases. Digestions were mixed, ligated, and transformed in *E. coli*, selecting recombinant plasmids resistant to chloramphenicol and carrying the *repC::gusA* fusion. This construct was named

pADO α CgusA. Finally, an internal segment (1020 bp) of the gene encoding the hypothetical protein with the locus_tag = “RHE_CH00301”, located in the *R. etli* CFN42 chromosome, was amplified with the primers 301up and 301lw using *R. etli* CFN2001, a CFN42 derivative lacking plasmids pRetCFN42a and pRetCFN42d (p42d), as the DNA template. The primers used in this PCR added *NsiI* restriction sites to both ends of the amplicon. The product was inserted within the *NsiI* restriction site of pADO- α CgusA. The resultant plasmid was named pDO301- α CgusA. To obtain plasmid pDO301- α CgusAmut, the *repC::gusA* fusion of pDO301- α CgusA was substituted with the *repC::gusA* fusion with the modified P2 promoter. To do this, PCR was performed with primers β gluinc α -35up and β gluinc α -35lw using pHER α CgusAmut as the DNA template.

2.5. β -glucuronidase activity measurements

Overnight cultures of the strain carrying the *gusA* fusions were grown with tetracycline and nalidixic acid. β -glucuronidase activities were assessed in bacterial cells grown to an OD₅₄₀ of 0.4 or 0.8 (as indicated in figure 5). Cells from 1-ml aliquots were collected by centrifugation, and the cell pellet was resuspended in a salt wash solution (0.4 mM MgSO₄/1.2 mM K₂PO₄) supplemented with chloramphenicol (100 μ g/ml). β -glucuronidase assays were performed using *p*-nitrophenyl glucuronide as a substrate, as described previously (Wilson et al., 1992). Data were normalized to the total cell protein concentration using the Lowry method (Sambrook et al., 1989).

2.6. Plasmid profiles

Rhizobium plasmid profiles were visualized on agarose gels according to the protocol described by Hynes and McGregor, 1990.

2.7. Plasmid incompatibility

The incompatibility phenotype of the constructs was determined by introducing them into *R. etli* *recA* derivative CFNX101 to avoid cointegrations mediated by homologous recombination between the incoming plasmid and the parental plasmid. The plasmid profiles of at least four transconjugants from each cross were analyzed. A recombinant plasmid was considered incompatible with the symbiotic plasmid if it was able to displace the symbiotic plasmid or able to induce its integration with another replicon of the receptor strain (Ramírez-Romero et al., 2000).

2.8. Plasmid replication

To determine the replication capabilities of the pDOP derivatives in *R. etli*, the constructs were introduced into CFNX107 by conjugation. The plasmid profiles of at least four transconjugants from each cross were analyzed. A recombinant plasmid was considered capable of replication in *R. etli* if the plasmid profiles of the transconjugants showed a new band of the expected size.

2.9. Bioinformatics

Sequence alignments were done using ClustalW2 at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (Larkin et al., 2007).

3. Results

3.1. The first 10 nucleotides on the left arm of the ctRNA are crucial for the induction of plasmid incompatibility

We knew that the introduction of a plasmid carrying the whole wt ctRNA gene of plasmid p42d was able to induce the displacement of the parental plasmid when introduced into CFNX101, a *R. etli* CFN42 *recA* derivative, carrying the parental plasmid (Ramírez-Romero et al., 2000; Venkova-Canova et al., 2004). As a control and to corroborate this observation, a region encompassing the whole intergenic *repB-repC* region and the first half of the *repC* gene was introduced into the pBBR1MCS-2 vector. The resultant construct, named pBBR1MCS-ctRNAwt, was then introduced into CFNX101, and the analysis of the transconjugants indicated that this recombinant plasmid induced incompatibility to the parental plasmid (Fig. 3A).

To identify the nucleotides of the ctRNA that are essential for incompatibility, we focused on the left arm of the ctRNA for the following two reasons: first, our *in vitro* experiments indicated that this arm is the only region that is

essential in the initial steps of the ctRNA-target mRNA interaction (Cervantes-Rivera et al., 2010), and second, gene deletions in the region that encodes the right arm of the ctRNA are incapable of terminating transcription originating from its own promoter. The absence of adequate transcription termination of this gene generates larger RNA molecules that are unable to exert their function, making this region difficult to analyze *in vivo* (Venkova-Canova et al., 2004).

To map which nucleotides in the ctRNA left arm have a crucial role in plasmid incompatibility, we made two sets of pBBR1MCS-ctRNAwt derivatives that express mutant ctRNAs. The first set consisted of plasmids lacking the first three or eight nucleotides of the left arm of the ctRNA [pBBR1MCS-ctRNA Δ (1–3) and pBBR1MCS-ctRNA Δ (1–8)]. The second set consisted of eight plasmid derivatives, each one carrying four or five consecutive mutations in the ctRNA left arm. In combination, these mutations span the 13 nucleotides that form this arm (see Fig. 2). The two mutant plasmid sets were introduced into *R. etli* CFNX101, and the plasmid profiles of the transconjugants were evaluated to determine if the incoming plasmids were able to displace the parental plasmid. All incoming plasmids but one were able to coexist with p42d (Fig. 3B). The exception was plasmids pBBR1MCS-ctRNAmut(11–15) which exerted incompatibility to p42d (see Fig. 3B, lane 4). This plasmid carries changes from position 11 to 15 of the ctRNA; these nucleotides encompass the last three nucleotides of the left

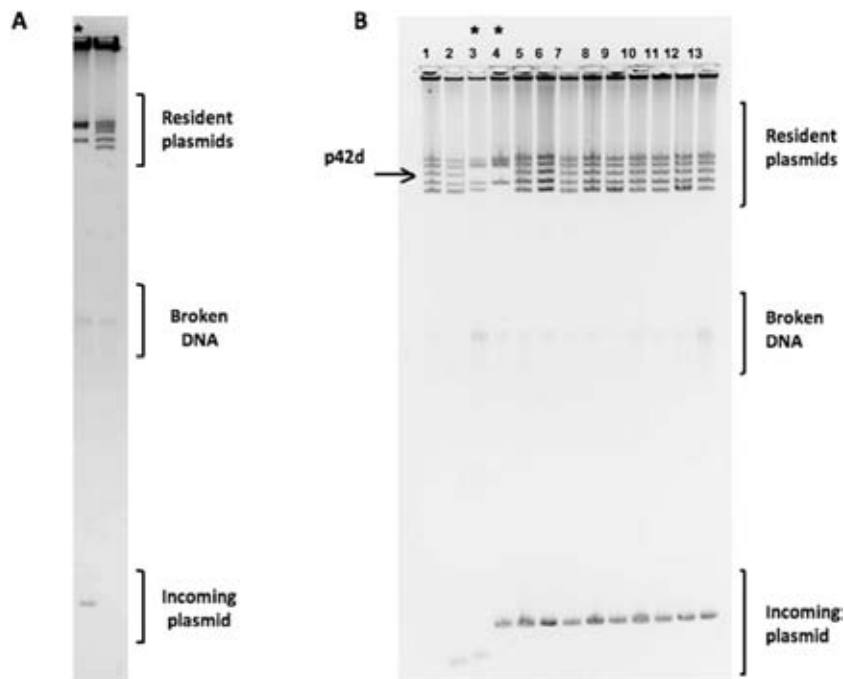


Fig. 3. Incompatibility phenotypes of mutant ctRNAs. (A) Plasmid profiles of *R. etli* CFNX101 transconjugant carrying plasmid pBBR1MCS-ctRNAwt (lane at left) and of strain CFNX101 (at right). (B) Plasmid profiles of *R. etli* CFNX101 transconjugants carrying the following incoming plasmids: (1) CFNX101; (2) pBBR1MCS-2; (3) pBBR1MCS-ctRNAR5; (4) pBBR1MCS-ctRNAmut(11–15); (5) pBBR1MCS-ctRNAmut(6–10); (6) pBBR1MCS-ctRNAmut(1–5); (7) pBBR1MCS-ctRNAmut(9–13); (8) pBBR1MCS-ctRNAmut(4–8); (9) pBBR1MCS-ctRNAmut(2–5); (10) pBBR1MCS-ctRNA(2–5)R5; (11) pBBR1MCS-ctRNA Δ (1–3); (12) pBBR1MCS-ctRNA Δ (1–8); (13) pBBR1MCS-ctRNA Δ (1–8)R5. Brackets at right show the positions of the resident plasmids, broken DNA, and incoming plasmid. Arrow shows the location of plasmid p42d in *R. etli* CFNX101 and asterisks show transconjugants strains in which p42d were displaced by the introduction of the incoming plasmid.

arm and the first two of the stem-loop structure (Fig. 2). Plasmid pBBR1MCS-ctRNAR5 was constructed with an insert similar to those already described but expressing a ctRNA with four consecutive changes in the loop of the stem-loop structure (Fig. 2). This plasmid, when introduced into CFNX101, was incompatible with p42d (Fig. 3B, lane 3). Moreover, plasmid pBBR1MCS-ctRNAmut(2–5)R5, a plasmid carrying changes in positions 2–5 and changes in the loop, was still compatible when introduced to strain CFNX101 (Fig. 3B, lane 10). These results show that a gap of four or five non-complementarity nucleotides between the ctRNA and the target RNA along the first 10 nucleotides of the 5' end of the ctRNA are enough to avoid plasmid incompatibility and also demonstrated that the loop does not play a central role in the incompatibility phenomenon.

3.2. Mutations in the ctRNA that mediate plasmid speciation

The ability of ctRNA to exert its function depends not only on its structure but also on the structure of its target RNA. A few mutations within the RNA sequence may have a large impact on its secondary structure. Given that mutations in the ctRNA gene necessitate a complementary change in its target RNA, we wanted to ask if these ctRNA variants, in the context of a miniplasmid, are able to maintain their capacity to replicate or produce a nonfunctional plasmid. To answer this question, all mutations described in the previous section were introduced into pDOP- α C, a miniplasmid

capable of replicating in *R. etli*. This miniplasmid contains a DNA fragment containing the entire *repC* gene of p42d and the *repABC* operon preceded by its cognate *repB-repC* intergenic region (Fig. 1B) cloned into pDOP, which is a *Rhizobium* suicide vector. Transcription of the *repC* of this construct was under the control of the Plac promoter located in the vector, and the replication capabilities of this miniplasmid depended completely on the activity of RepC. Constructs carrying all ctRNA gene variants were conjugated into two different *R. etli* *recA* strains, one containing p42d, the parental plasmid (CFNX101), and the other lacking it (CFNX107). The plasmid profiles of the transconjugants were analyzed.

Miniplasmid pDOP- α C replicated in CFNX107 as an independent replicon but was unable to replicate in the strain carrying the parental plasmid (CFNX101), indicating that p42d inhibits the establishment of the incoming plasmid. Mutant derivatives that express ctRNA variants that do not induce incompatibility against the parental plasmid have contrasting behaviors. Plasmids pDOP- α mut(1–5)C, pDOP- α mut(4–8)C, pDOP- α mut(2–5)C, pDOP- α mut(6–10), and pDOP- α Δ (1–8)C replicated in both *R. etli* strains, indicating that these constructs are completely functional and possess a different incompatibility group than that of the parental plasmid and now belong to a new plasmid class (Fig. 4A and B). Plasmid pDOP- α Δ (1–3)C was able to replicate in strain CFNX107 but it fails to replicate in CFNX101. For the other plasmids, we failed in all our attempts to obtain

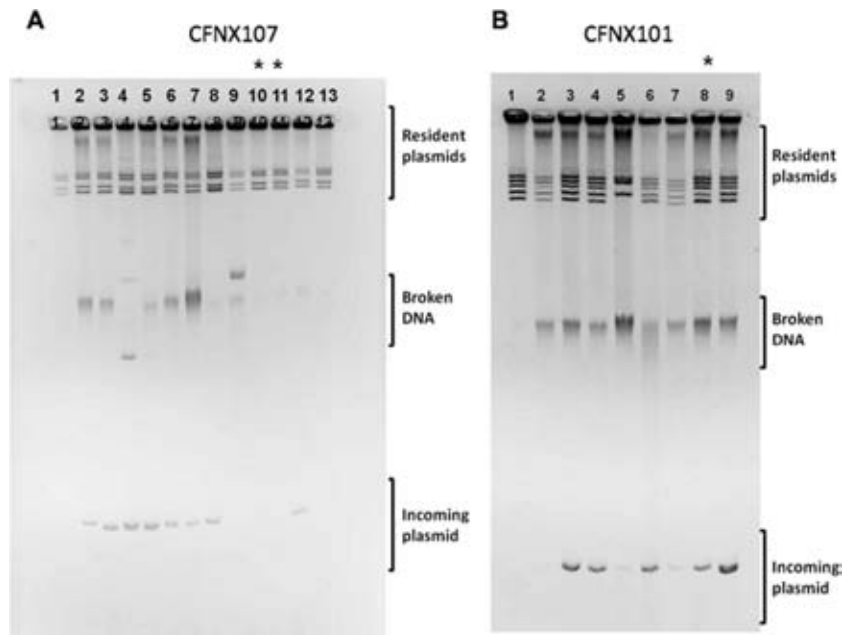


Fig. 4. Replication phenotypes of miniplasmid pDOP α C derivatives encoding mutant ctRNAs in *R. etli* CFNX107 and CFNX101. (A) Plasmid profiles of *R. etli* CFNX107 transconjugants carrying the following incoming miniplasmids: (1) CFNX 107; (2) pDOP- α C; (3) pDOP α R5C; (4) pDOP- α mut(1–5)C; (5) pDOP- α mut(6–10)C; (6) pDOP- α mut(11–15)C; (7) pDOP- α mut(4–8)C; (8) pDOP- α Δ (1–3)C; (9) pDOP- α mut(2–5)C; (10) pDOP- α mut(2–5)R5C; (11) pDOP- α Δ (1–8)R5C; (12) pDOP α Δ (1–8). Lanes 1 and 13 show plasmid profile of *R. etli* CFNX107. (B) Plasmid profiles of *R. etli* CFNX101 transconjugants carrying the following incoming miniplasmids: (2) pDOP α -R5C; (3) pDOP- α mut(1–5)C; (4) pDOP- α mut(6–10)C; (5) pDOP- α mut(11–15)C; (6) pDOP- α mut(4–8)C; (7) pDOP- α mut(2–4); (8) pDOP- α mut(2–4)R5C; (9) pDOP- α Δ (1–8). Lane 1 shows *R. etli* CFNX107 plasmid profile. Brackets show the positions of the resident plasmids; broken DNA; incoming plasmid and asterisks show the transconjugants in which the introduced miniplasmid formed a co-integrate elsewhere in the genome and for this reason considered unable to replicate in that genetic background.

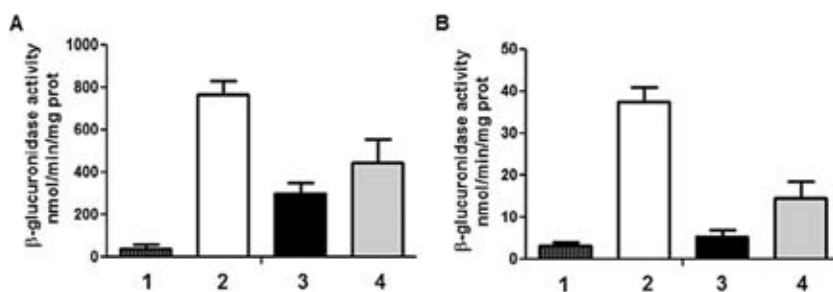


Fig. 5. Evaluation of the *in situ* and *ex situ* activities of the ctRNA in the transcription. (A) β -glucuronidase activities of CFNX107 derivatives with $\alpha C::gusA$ fusions located in a plasmid: (1) CFNX107 carrying pHER α CgusA (with the wild type P2 promoter). (2) CFNX107 carrying a pHER α CgusAmut (with a non-functional P2 promoter). (3) CFNX107/pHER α CgusA complemented with a plasmid expressing the wild type ctRNA (pRK7813inc α). (4) CFNX107/pHER α CgusAmut complemented with a plasmid expressing the wild type ctRNA (pRK7813inc α). These measurements were done at OD₅₄₀ 0.4. (B) β -glucuronidase activities of CFNX107 derivatives with $\alpha C::gusA$ fusions integrated in the chromosome: (1) CFNX107/pDO301 α CgusA (with the wild type P2 promoter). (2) CFNX107/pDO301 α CgusAmut (with a non-functional P2 promoter). (3) CFNX107/pDO301 α CgusA complemented with a plasmid expressing the wild type ctRNA (pRK7813inc α). (4) CFNX107/pDO301 α CgusAmut complemented with a plasmid pRK7813inc α . These measurements were done at OD₅₄₀ 0.8.

transconjugants when CFNX101 or CFNX107 were used as receptors of plasmid pDOP- α mut(9–13)C. This result indicates that this plasmid cannot be maintained in those genetic backgrounds.

Additionally, plasmids pDOP α mut(11–15)C and pDOP α R5C, which express mutant ctRNAs that, in our incompatibility assays, induced the displacement of p42d, were able to replicate in the *R. etli* strain lacking the parental plasmid (CFNX107), indicating that they are functional. However, when we used CFNX101 as receptor strain for these plasmids, clear differences were obtained: plasmid pDOP α R5C behaved similarly to pDOP α C carrying the wild-type ctRNA, and both failed to replicate in this genetic background. However, we succeeded in introducing the plasmid pDOP α mut(11–15)C into CFNX101. An analysis of the plasmid profiles of the transconjugants showed that pDOP- α mut(11–15)C replicated at a lower copy number or with less stability in the CFNX101 genetic background than in CFNX107. Notably, plasmid pDOP- α mut(2–5)R5C encodes a mutant ctRNA that, in our incompatibility assays, is incompatible and does not replicate in CFNX107 (Fig. 4A, lane 10) but is able to replicate in CFNX101 (Fig. 4B, lane 8). This result suggests that this plasmid encodes a ctRNA that is nonfunctional *in cis* and requires the action of the ctRNA expressed by the parental plasmid.

3.3. The ctRNA expressed *in cis* is more efficient at attenuating the transcription/translation of its target RNA than when expressed *in trans*

The ctRNA is a *cis*-encoded RNA whose main activity is to negatively regulate the transcription/translation of the *repC* on the plasmid that carries its own gene (*in situ* activity). However, this molecule can also interfere with the replication of a second plasmid carrying the same replication/segregation unit and can confer plasmid incompatibility (*ex situ* activity). To evaluate the relative contribution of the *in situ* and *ex situ* activities of the ctRNA in the transcription/translation of *repC*, we made two *repC::gusA* transcriptional fusions using pHER as an expression vector capable of replicating in *Rhizobium*. The first

construct consisted of the complete *repB-repC* intergenic region and the first nucleotides of *repC* followed by the reporter gene (pHER α CgusA). The transcription of this fusion depended on the pLac promoter of the vector. The second *repC::gusA* fusion is almost identical, but the sequence of the –35 hexameric element of the P2 promoter was mutated to destroy its function (pHER α CgusAmut; see Section 2). Both constructs were introduced into *R. etli* CFNX107 by conjugation, and the β -glucuronidase activities of the transconjugants were determined. The strain containing the *repC::gusA* fusion with the mutant P2 had 14.6-fold more activity than the strain with the wild-type *gusA* fusion. This result shows that the *in situ* ctRNA activity is very efficient at negatively modulating *repC* expression. To evaluate the *ex situ* ctRNA activity, a plasmid (pRK7813inc α) that expresses the wild-type ctRNA under its own promoter was introduced into CFNX107/pHER α CgusAmut and CFNX107/pHER α CgusA. Again, the activities of the reporter gene of transconjugant strains were determined. The measurements shown in Fig. 5A, indicated that the expression of the ctRNA *in trans* reduced the expression of pHER α CgusAmut by almost 50% (Fig. 5A–4). One factor that may have contributed to this result is that the plasmid pHER α CgusAmut has a higher copy number than pRK7813inc α . Unexpectedly, the activity of CFNX107/pHER α Cgus/pRK7813inc α was seven-fold higher than the observed activity of CFNX107/pHER α Cgus, indicating that the action of the ctRNA expressed *in trans* interferes with the function of the ctRNA expressed *in cis* (Fig. 5A–3 and –1, respectively).

To further evaluate the ctRNA *ex situ* activity on *repC* expression, the Plac-*repC::gusA* fusion present in plasmids pHER α CgusA and pHER α CgusAmut was introduced into a *R. etli* vector (pDO301) designed to integrate via homologous recombination into a chromosomal gene encoding a hypothetical protein (locus_tag = “RHE_CH00301”). The resulting constructs pDO301- α CgusA and pDO301 α CgusAmut were conjugated into strain CFN2001, a *R. etli* CFN42 *recA*-derivative lacking p42d. One transconjugant of each cross was used as a recipient of plasmids pRK7813 or pRK7813inc α . The β -glucuronidase activities of strains of the transconjugants were obtained and compared. As

shown in Fig. 5B, the reporter gene activities of these transconjugants were, in all cases, lower than those detected when the fusions were located in plasmids. The strain carrying the *repC::gusA* fusion with the mutated ctRNA promoter (pDO301- α CgusAmut) showed 6.8-fold more activity than the strain with the P2 wild-type promoter (pDO301- α CgusA). The introduction of plasmid pRK7813inc α to the strain carrying the *repC::gusA* fusion with the mutated ctRNA promoter reduced the activity of the reporter gene by 1.54-fold. Meanwhile, the strain harboring the *repC::gusA* fusion with the wild-type ctRNA promoter and pRK7813inc α exhibited almost twofold more activity than the *repC::gusA* fusion with the wild-type P2 promoter, indicating that an excess of ctRNA may be counter-productive.

4. Discussion

The genomic architecture of alphaproteobacteria belonging to the Rhizobiales, Rhodospirillales, and Rhodobacterales orders frequently contain several large plasmids whose replication relies on the *repABC* replication/segregation unit (Cevallos et al., 2008; Mazur et al., 2011; Pinto et al., 2012). Understanding how this genome architecture emerged is essential for explaining how new plasmid incompatibility groups arise from one ancestral replication/segregation unit. This process can be viewed as a mechanism of plasmid speciation as stated by Sýkora (1992), and two hypotheses have been postulated. The first hypothesis posits that the formation of a bireplicon can be generated by the following events: (A) the duplication of the region containing the replication and segregation genes, (B) the co-integration between an incoming plasmid and a resident plasmid of the same incompatibility group, or (C) a deficiency in the dimer resolution process. Then, the bireplicon can accumulate mutations without threatening plasmid maintenance. These mutations could lead to new variants of replication genes with new incompatibility properties; a new plasmid species originates when the bireplicon resolves into two plasmids (modified from Sýkora, 1992). The second hypothesis does not require the formation of a bireplicon but involves two strains with the same plasmid evolving independently to permit the divergent evolution of genes involved in replication and segregation. Over time, this will lead to the generation of different incompatibility groups. If a plasmid of one of these strains is mobilized to another strain already containing a plasmid with the same common ancestor, both plasmids can then coexist without interference due to the divergent evolution (Cevallos et al., 2002).

In this work, we show that a third hypothesis is possible: the acquisition of mutations allows the generation of new plasmid species in the same strain without disruption of the replication/segregation properties of the participating plasmids.

Phylogenetic analyses of alphaproteobacterial *repABC* proteins supported the second hypothesis, but also show that three forces are shaping the evolution of *repABC* replication/segregation units: horizontal transfer, gene duplication and divergence, and intra-operon recombination (Castillo-Ramírez et al., 2009; Cevallos et al., 2002). Notwithstanding, here we will show evidence suggesting that

our third hypothesis can explain some aspects about the origin of new incompatibility groups in *repABC* plasmids.

An integral vision about the evolution of *repABC* replication/segregation units takes into consideration that these units contain three different incompatibility determinants. In the simpler scheme these incompatibility determinants co-evolve, meaning that each determinant exerts incompatibility against the same plasmids. However, as stated above, intra-operon recombination has a role in the evolution of these replication/segregation units, and for this reason it is conceivable that some *repABC* plasmids will exert incompatibility against plasmids of more than one incompatibility group. In this work we focused on only one incompatibility determinant of the p42d *repABC* replication/segregation unit: the ctRNA.

A general characteristic of *repABC* plasmids is that they have a gene encoding a small antisense RNA (ctRNA) within their *repB-RepC* intergenic region. It has been shown that these ctRNAs play a central role controlling the transcription/translation of the initiator protein and that these molecules are strong incompatibility factors. Three different research groups have attempted to map the crucial nucleotides involved in plasmid incompatibility in several ctRNAs, belonging to *repABC* operons of plasmids: pRleVF39d, pRleVF39e, pRleVF39f (*R. leguminosarum* VF39; Yip et al., 2014); pSymA (*Sinorhizobium meliloti* 1021; MacLellan et al., 2005), pTiC58 (*Agrobacterium tumefaciens* C58; MacLellan et al., 2005) and pTiR10 (*A. tumefaciens* R10; Chai and Winans, 2005). These experiments were performed using an error-prone PCR or an *E. coli* mutator strain calibrated to obtain one or very few mutations per molecule. These experiments always yielded the same results: mutant ctRNAs that lose their incompatibility phenotype against their cognate parental plasmids were those in which the ctRNA promoter was affected, destroying or diminishing its activity. Most of the time, the -35 and -10 hexameric elements were altered, but the initiation transcription site was also disrupted in a few examples (Chai and Winans, 2005; MacLellan et al., 2005; Yip et al., 2014). Remarkably, in the experiments performed, no single-point mutations in the ctRNA impairing plasmid incompatibility were isolated. These results suggest that a single-nucleotide mismatch is not sufficient to disrupt the essential process of ctRNA-target RNA heteroduplex formation, and hence, the capacity of ctRNA to exert incompatibility persists unmodified. Based on these observations, we constructed ctRNAs derived from plasmid p42d in which 4–5 consecutive mutations were introduced along the 5' end of the ctRNA. Changes in the first 10 nucleotides of this region destroy the capacity of the ctRNA to displace the parental plasmid, suggesting that these 10 nucleotides need to be paired with the target RNA to ensure its functionality. In contrast, a plasmid expressing a ctRNA with mutations affecting the last three nucleotides of the left arm of the ctRNA and the first two of the stem-loop structure or a plasmid expressing a ctRNA with four consecutive mutations in the loop are still able to exert incompatibility, suggesting that a partially paired ctRNA-target RNA, with the exception of the first 10 nucleotides, are functional. The functionality of partial pairing has been described in other plasmid systems (Brantl and Wagner, 2000; Heidrich and Brantl, 2007; Malmgren et al., 1997).

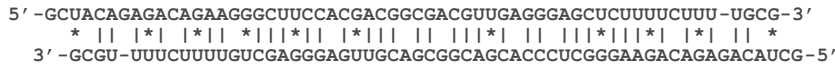


Fig. 6. Scheme of a ctRNA-ctRNA hybrid. Watson-Crick pairs are indicated with lines and not Watson-Crick pairs with asterisks.

However, the minimum consecutive changes needed to destroy ctRNA activity remains to be investigated.

The unpaired 5' end of the p42d ctRNA is complementary to the apical loop of its target RNA, and this complementarity is central to initiating the ctRNA-target-RNA interaction (Cervantes-Rivera et al., 2011). As we showed here, the lack of the first three nucleotides of the 5' end of the ctRNA is enough to suppress the capacity of this molecule to exert incompatibility, most likely because these nucleotides are critical in the first step of ctRNA-target-RNA pairing.

The activity of the ctRNA promoters vary widely, but in general, the promoter driving ctRNA transcription is strong; this characteristic, as noted recently by Yip et al. (2014), is a prerequisite to exerting incompatibility (Chai and Winans, 2005; MacLellan et al., 2005). The activity of the p42d ctRNA promoter (P2) is twice the activity measured from the pLac promoter that drives *repC* transcription in our construct. Taking in account that in wild-type cells, the promoter governing the transcription of the *repABC* promoter (P1) is negatively regulated by RepA and RepB, it is possible that a high P2/P1 transcription ratio is required for adequate plasmid maintenance.

When the capacity of the ctRNA to modulate the transcription of its target RNA was evaluated using *arepC::gusA* fusions carrying the wild-type P2 promoter or its inactive derivative, the differences in reporter activities were significant; the *gusA* fusion with the mutant P2 promoter showed a several-fold increase in activity when compared with the activity of the *arepC::gusA* fusion with the wild-type P2 promoter (the increase was different depending on if the fusion was in the chromosome or in a medium-copy-number plasmid). However, when the strain carrying the *arepC::gusA* fusion with the mutant P2 promoter was complemented with a plasmid expressing the ctRNA from its own promoter, a 50% reduction in *gusA* activity was obtained. These results show that ctRNA activity is more efficient when the gene is expressed in its native location (*in situ* activity) than when expressed from another replicon (*ex situ* activity), suggesting that this antisense RNA initiates heteroduplex formation when both the ctRNA and its target RNA are being transcribed.

Unexpectedly, strains carrying a *arepC::gusA* (in plasmid or in chromosome) with wild-type P2 and a second copy

of the wild-type *ctRNA* gene in a plasmid vector exhibited more reporter activity than the strain carrying a *arepC::gusA* alone. These results indicate that a second copy of the *ctRNA* gene interferes with the regulation of the first copy, likely because the ctRNAs from both sources make ctRNA-ctRNA duplexes, as illustrated in Fig. 6. However, it is important to keep in mind that the plasmid encoded ctRNA in this experiment is likely present in huge excess due to the copy number.

The majority of the miniplasmids expressing ctRNAs with consecutive mutations in the unpaired 5' end that were unable to displace the parental plasmids in our incompatibility assays could be maintained as independent replicons even in the presence of p42d. These observations indicate that stretches of 4–5 nucleotides of non-complementarity within the first 10 nucleotides of the unpaired 5' region of ctRNA and the target RNA are sufficient to produce plasmid speciation. We suggest that the key to this speciation process is to accumulate enough changes in this small region of the ctRNA gene to disrupt heteroduplex formation between the target RNA of one plasmid and the ctRNA of the other. An analysis of the ctRNAs present in *Rhizobium* genomes showed at least one example that suggests that this mechanism of evolution is operating in nature: the ctRNAs of the *repABC* replication/transcription units of plasmids pRL9 and pRL12 of *Rhizobium leguminosarum* 3841 are identical except in their 5'-ends. Differences are located in tight clusters (Fig. 7).

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [Grant number 100099] and the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica [Grant number IN205414]. A. R-U and O. E. C-R were supported during the Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-Universidad Nacional Autónoma de México) by scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.plasmid.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.004).

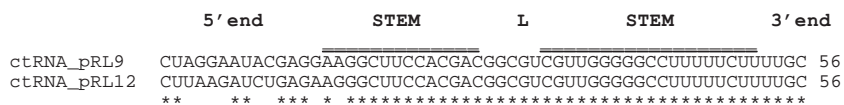


Fig. 7. Sequence alignment of the ctRNAs located on the *repABC* replication/segregation units of plasmids pRL9 and pRL12 (*R. leguminosarum* 3841). Asterisks indicate identical nucleotide residues. Bars show regions involved in the formation of the stem of the stem-loop structures of these ctRNAs; meanwhile L indicates nucleotides residues present in the loops of stem-loop structures.

References

- Austin, S., Nordström, K., 1990. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* 60, 351–354.
- Brantl, S., Wagner, E.G.H., 2000. Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation: an in vitro study of plasmid pT181. *Mol. Microbiol.* 35, 1469–1482.
- Castillo-Ramírez, S., Vázquez-Castellanos, J.F., González, V., Cevallos, M.A., 2009. Horizontal gene transfer and diverse functional constraints within a common replication-partitioning system in Alphaproteobacteria: the *repABC* operon. *BMC Genomics* 10, 536. doi:10.1186/1471-2164-10-536.
- Cervantes-Rivera, R., Romero-López, C., Berzal-Herranz, A., Cevallos, M.A., 2010. Analysis of the mechanism of action of the antisense RNA that controls the replication of the *repABC* plasmid p42d. *J. Bacteriol.* 192, 3268–3278.
- Cervantes-Rivera, R., Pedraza-López, F., Pérez-Segura, G., Cevallos, M.A., 2011. The replication origin of a *repABC* plasmid. *BMC Microbiol.* 11, 158.
- Cevallos, M.A., Porta, H., Izquierdo, J., Tun-Garrido, C., García-de-los-Santos, A., Dávila, G., et al., 2002. *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. *Plasmid* 48, 104–116.
- Cevallos, M.A., Cervantes-Rivera, R., Gutiérrez-Ríos, R.M., 2008. The *repABC* plasmid family. *Plasmid* 60, 19–37.
- Chai, Y., 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.
- Corvera, A., Promé, D., Promé, J.C., Martínez-Romero, E., Romero, D., 1999. The *nolI* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 236–246.
- Crossman, L.C., Castillo-Ramírez, S., McAnnula, C., Lozano, L., Vernikos, G.S., Acosta, J.L., et al., 2008. A common genomic framework for a diverse assembly of plasmids in the symbiotic nitrogen fixing bacteria. *PLoS ONE* 3 (7), e2567. doi:10.1371/journal.pone.0002567.
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., et al., 2003. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol.* 4, R36.
- Hanahan, D., 1983. Studies of transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–560.
- Harrison, E., Brockhurst, M.A., 2012. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol.* 20, 262–267.
- Heidrich, N., Brantl, S., 2007. Antisense-RNA mediated transcriptional attenuation in plasmid pIP501: The simultaneous interaction between two complementary loop pairs is required for efficient inhibition by the antisense RNA. *Microbiology* 153, 420–427.
- Hynes, M.F., McGregor, N.F., 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4, 567–574.
- Jones, D.G., Gutterson, N., 1987. An efficient mobilizable cosmid vector, pRK7813, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens* strain HV37a. *Gene* 6, 299–306.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, et al., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., et al., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- MacLellan, S.R., Smallbone, L.A., Sibley, C.D., Finan, T.M., 2005. The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large *repABC* family of alpha-proteobacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 55, 611–623.
- Malmgren, C., Wagner, E.G.H., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Romby, P., 1997. Antisense RNA control of plasmid R1 replication: the dominant product of the antisense RNA-mRNA binding is not a full RNA duplex. *J. Biol. Chem.* 272, 12508–12512.
- Martínez-Salazar, J., Romero, D., Girard, M.L., Dávila, G., 1991. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. *J. Bacteriol.* 173, 3035–3040.
- Mazur, A., Majewska, B., Stasiak, G., Wielbo, J., Skorupska, A., 2011. *repABC*-based replication systems of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii TA1 plasmids: incompatibility and evolutionary analyses. *Plasmid* 66, 53–66.
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., Cevallos, M.A., 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158, 148–155.
- Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss, R., 3rd, Falkow, N., Datta, S., 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40, 168–189.
- Pappas, K.M., 2008. Cell-cell signaling and the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid copy number fluctuations. *Plasmid* 60, 89–107.
- Pappas, K.M., Cevallos, M.A., 2011. Plasmids of the Rhizobiaceae and their role in interbacterial and transkingdom interactions. In: Witzany, G. (Ed.), *Biocommunication in Soil Microorganisms*, vol. 23. Series: Soil Biology. Springer, 474 p. ISBN: 978-3-642-14511-7, (Chapter 12).
- Pappas, K.M., Winans, S.C., 2003b. The RepA and RepB autorepressors and TraR play opposing roles in the regulation of a Ti plasmid *repABC* operon. *Mol. Microbiol.* 49, 441–455.
- Pérez-Oseguera, A., Cevallos, M.A., 2013. RepA and RepB exert plasmid incompatibility repressing the transcription of the *repABC* operon. *Plasmid* 70, 362–376.
- Pérez-Segura, G., Pérez-Oseguera, A., Cevallos, M.A., 2013. The *repAC* replication system of the *Rhizobium leguminosarum* pRL7 plasmid is functional: implications regarding the origin and evolution of *repABC* plasmids. *Plasmid* 69, 49–57.
- Petersen, J., Brinkmann, H., Pradella, S., 2009. Diversity and evolution of *repABC* type plasmids in Rhodobacterales. *Environ. Microbiol.* 10, 2627–2638.
- Pinto, U.M., Flores-Mireles, A.L., Costa, E.D., Winans, S.C., 2011. RepC protein of the octopine-type Ti plasmid binds to the probable origin of replication within *repC* and functions only in *cis*. *Mol. Microbiol.* 81, 1593–1606.
- Pinto, U.M., Pappas, K.M., Winans, S.C., 2012. The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 755–765.
- Popa, O., Dagan, T., 2011. Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 615–623.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G.G., et al., 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* 299, 724–728.
- Ramírez-Romero, M.A., Soberón, N., Pérez-Oseguera, A., Téllez-Sosa, J., Cevallos, M.A., 2000. Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.* 182, 3117–3124.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engineering transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1, 784–791.
- Soberón, N., Venkova-Canova, T., Ramírez-Romero, M.A., Téllez-Sosa, J., Cevallos, M.A., 2004. Incompatibility and the partitioning site of the *repABC* basic replicon of the symbiotic plasmid from *Rhizobium etli*. *Plasmid* 51, 203–216.
- Sýkora, P., 1992. Macroevolution of plasmids: a model for plasmid speciation. *J. Theor. Biol.* 159, 53–65.
- Venkova-Canova, T., Soberón, N.E., Ramírez-Romero, M.A., Cevallos, M.A., 2004. Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure. *Mol. Microbiol.* 54, 1431–1444.
- Wilson, K.J., Huges, S.G., Jefferson, R.A., 1992. The *Escherichia coli* *gus* operon, induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In: Gallagher, S.R. (Ed.), *GUS Protocols, Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 7–23.
- Yip, C.B., Ding, H., Hynes, M.F., 2014. Counter-transcribed RNAs of *Rhizobium leguminosarum repABC* plasmids exert incompatibility effects only when highly expressed. *Plasmid*. 2014 Dec 18. pii: S0147-619X(14)00093-6. doi: 10.1016/j.plasmid.2014.12.003.