



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DEL PLÁSMIDO
pUM505 SENSIBLES A CIPROFLOXACINA”

TESIS

Para obtener el grado de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

p.Q.F.B. Nallely Serrato Gamiño

Asesor: D. C. Carlos Cervantes Vega.

Doctor en Ciencias Genómicas

Co-asesor: M. C. Víctor Manuel Chávez Jacobo.

Maestro en Biología Experimental

Morelia, Michoacán, Febrero 2016.

A. RESUMEN

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*, posee un tamaño de 123 kilobases y cuenta con 138 marcos de lectura abiertos (ORF). Un análisis *in silico* reveló que el plásmido no posee genes de resistencia a antibióticos reportados hasta la fecha; sin embargo, al ser transferido a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 se encontró que pUM505 confiere resistencia a ciprofloxacina (Cp), un antibiótico de la familia de las quinolonas. Para identificar los determinantes responsables de la resistencia a Cp se generó un banco de mutantes por transposición al azar en la cepa *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505) y se seleccionaron mutantes sensibles a ciprofloxacina (Cp^S). De un total de 12,000 mutantes analizadas, se obtuvieron 12 mutantes Cp^S y mediante secuenciación se determinó que en 4 de las mutantes se encuentra interrumpido un probable operón formado por los *orf57*, *orf58* y *orf59*, mientras que en otras 2 mutantes está interrumpido el *orf87*. La complementación de la mutante afectada en el *orf57* con el gen silvestre condujo a la recuperación del fenotipo de resistencia a Cp y confirmó la relación del gen con el fenotipo de pUM505. Debido a que se cuenta con 6 mutantes Cp^S de las cuales se desconocen los genes relacionados con el fenotipo de susceptibilidad a Cp, el objetivo del presente trabajo consiste en identificar y caracterizar los genes interrumpidos en el grupo restante de mutantes. Mediante la secuenciación y el análisis de las secuencias se determinó que la inserción del transposón ocurrió en diferentes regiones del plásmido pUM505; en la mutante 1, *orf45*, *virD4*, *orf47*, *orf48* y *orf49*; en la mutante 2, *hop*, *orf43* y *orf44*, en la mutante 3, *orf65*, *orf66*, *bin*, *merE*, *merD* y *merA*; en la mutante 4, *orf85*, *orf86* y *orf87*; en la mutante 5, *orf96* y *orf97* y en la mutante 6, *araC* y *orf85*. Se realizó la clonación individual del gen *hop*, que codifica un efector del sistema de secreción tipo III, y del *orf43*, que codifica una Aconitasa B, que se ha relacionado su actividad como regulador transcripcional bajo condiciones de estrés oxidativo, y se transfirieron a *Escherichia coli* J53-2. Se determinó que ambos genes confieren distintos niveles de resistencia a Cp y aunque se desconoce el mecanismo que podría poseer *hop*, se sugiere que el *orf43* regula la expresión de genes responsables del fenotipo de resistencia, como podrían ser genes del metabolismo del DNA, división o permeabilidad celular. Con base en lo realizado en este trabajo se concluye que el plásmido pUM505 posee diversos genes que participan en la resistencia a Cp.

Palabras clave: Plásmido, resistencia a quinolonas, regulador transcripcional, transposición al azar y análisis de secuencias.

B. ABSTRACT

The pUM505 plasmid was isolated from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*, it has a length of 123 kilobases and contains 138 open reading frames (ORF). DNA sequence analysis revealed that pUM505 lacks antibiotic resistance genes reported to date; however, when the plasmid was transferred to the *P. aeruginosa* PAO1 strain conferred resistance to ciprofloxacin (Cp), an antibiotic of the quinolone family. To identify the genes responsible for Cp resistance a bank of mutants was generated by random transposition in *P. aeruginosa* strain PAO1SR (pUM505). From a total of 12,000 mutants analyzed, 12 ciprofloxacin sensitive mutants (Cp^S) were obtained and by sequencing was determined that 4 of the mutants were probably interrupted at the operon formed by the *orf57*, *orf58* and *orf59* genes, while another two mutants were interrupted at the *orf87*. Complementation of the mutant affected at *orf57* with the wild gene *orf57* led to recovery of the Cp resistance phenotype and confirmed the relationship with pUM505 phenotype. The aim of this study consists in identifying and characterize the interrupted mutant genes in the remaining mutant group. By sequencing and sequence analysis it was determined that transposon insertion occurred in different regions of the pUM505 plasmid; in mutant 1: *orf45*, *virD4*, *orf47*, *orf48* and *orf49*; in mutant 2: *hop*, *orf43* and *orf44*; in mutant 3: *orf65*, *orf66*, *bin*, *merE*, *merD* and *merA*; in mutant 4: *orf85*, *orf86* and *orf87*; in mutant 5: *orf96* and *orf97* and in mutant 6: *araC* and *orf85*. We performed the individual cloning of *hop* gene which codes for an effector of the type III secretion system, and *orf43*, which codes for an aconitase B, which has been linked as transcriptional regulator activity under conditions of oxidative stress, and transferred them to *Escherichia coli* J53-2. It was determined that both genes give different levels of Cp resistance and although the mechanism of *hop* is unknown, it is suggested that the *orf43* regulates expression of genes responsible for the resistance phenotype, which may be DNA metabolism genes, cell division or permeability. Based on what has been done in this paper we conclude that the plasmid pUM505 possesses several genes involved in resistance to Cp.

Key words: Plasmid, quinolone resistance, transcriptional regulator, random transposition, sequence analysis.

B. ÍNDICE

A. RESUMEN.....	I
B. ABSTRACT.....	II
C. ÍNDICE.....	III
D. ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
E. ÍNDICE DE TABLAS.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Historia de las quinolonas.....	1
2. Estructura de las quinolonas.....	4
3. Clasificación de las quinolonas.....	5
3.1 Primera generación.....	6
3.2 Segunda generación.....	6
3.3 Tercera generación.....	6
3.4 Cuarta generación.....	9
4. Mecanismo de acción de las quinolonas.....	9
5. Sistemas de resistencia a quinolonas.....	13
5.1 Sistemas de resistencia codificados por genes cromosómicos.....	14
5.1.1 Modificaciones de los sitios blanco.....	14
5.1.2 Sistemas de expulsión.....	16
5.2 Sistemas de resistencia codificados por genes plasmídicos.....	17
5.2.1 Proteínas Qnr.....	17
5.2.2 Modificación enzimática.....	17
5.2.3 Sistemas de expulsión.....	18
II. ANTECEDENTES.....	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	28
IV. HIPÓTESIS.....	28
V. OBJETIVOS.....	29
a) Objetivo general.....	29
b) Objetivos específicos.....	29
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Medios de cultivo.....	31
2. Cepas empleadas.....	31
3. Plásmidos empleados.....	33
4. Oligonucleótidos empleados.....	33
5. Purificación de DNA total.....	33
6. Secuenciación de DNA.....	37

7. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias.....	37
8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
9. Electroforesis en geles de agarosa.....	38
10. Purificación de DNA en geles de agarosa.....	39
11. Tratamientos enzimáticos.....	39
11.1 Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt.....	39
11.2 Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20.....	40
11.3 Restricción con endonucleasas.....	40
12. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	40
13. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> JM101.....	41
14. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> J53-2.....	41
15. Transformación por el método de electroporación.....	42
16. Pruebas de susceptibilidad en medio líquido	42
VIII. RESULTADOS.....	43
1. Identificación de los genes interrumpidos por el transposón <i>Himar1::Gm^R</i> en las mutantes Cp ^S	43
2. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas codificadas por los genes identificados en las mutantes Cp ^S	43
3. Clonación de los genes <i>hop</i> y <i>orf43</i>	46
4. Subclonación de los genes seleccionados en el vector pUCP20.....	46
5. Pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina de las transformantes con los genes <i>hop</i> y <i>orf43</i>	49
IX. DISCUSIÓN.....	53
X. CONCLUSIÓN.....	60
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	61

C. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis de la primera quinolona.....	2
Figura 2. Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente.....	3
Figura 3. Primera y segunda generación de quinolonas.....	7
Figura 4. Tercera y cuarta generación de quinolonas.....	8
Figura 5. Acción de las topoisomerasas tipo IIA en el DNA.....	10
Figura 6. Representación esquemática de la acción de las quinolonas.....	12
Figura 7. Resistencia bacteriana a quinolonas.....	15
Figura 8. Mapa genético del plásmido pUM505.....	22
Figura 9. Resistencia a ciprofloxacina conferida por el plásmido pUM505.....	24
Figura 10. Susceptibilidad a ciprofloxacina de las mutantes Cp ^S	25

Figura 11. Susceptibilidad a ciprofloxacina de la mutante Cp ^S xerC ⁻ complementada con el gen <i>xerC</i> de pUM505.....	26
Figura 12. Mapa del vector pJET 1.2/Blunt.....	34
Figura 13. Mapa del vector de expresión binaria pUCP20.....	35
Figura 14. Localización de los genes identificados en el mapa genético del plásmido pUM505.....	44
Figura 15. Clonación de <i>hop</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	47
Figura 16. Clonación del <i>orf43</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	48
Figura 17. Subclonación de <i>hop</i> en el vector pUCP20.....	50
Figura 18. Subclonación del <i>orf43</i> en el vector pUCP20.....	51
Figura 19. Susceptibilidad a ciprofloxacina de las transformantes de <i>E. coli</i> J53-2.....	52

D. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutantes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1SR Cp ^S	32
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados.....	36
Tabla 3. Funciones predichas para los productos de los genes identificados en las mutantes Cp ^S	45

I. INTRODUCCIÓN

1. Historia de las quinolonas

Las quinolonas son un grupo de agentes antibacterianos sintéticos de amplio espectro de acción que incluye naftiridinas, quinazolininas e isotiazoloquinolonas (Drlica y col., 2009). La historia de las quinolonas inició cuando Lesher y colaboradores descubrieron de forma accidental el ácido nalidíxico (1,8-naftiridina) como un subproducto de la síntesis de la cloroquina (**Figura 1**), compuesto utilizado en el tratamiento de la malaria (Lesher y col., 1962). Posteriormente, en 1967 la introducción del ácido nalidíxico para uso clínico en el tratamiento de infecciones urinarias causadas por bacterias Gram negativas marcó el inicio de cinco décadas de desarrollo y uso de las quinolonas (Emmerson y Jones, 2003). No obstante, las quinolonas permanecieron como un grupo de antibióticos de poca relevancia clínica hasta la aparición de las fluoroquinolonas en los 70's, las cuales surgieron al añadir un flúor a la posición 6 de la molécula base (**Figura 2**) (Andersson y MacGowan, 2003). La modificación mejoró su efectividad frente a bacterias Gram-negativas y enterobacterias resistentes al ácido nalidíxico, además de proveer actividad frente a bacterias Gram-positivas (Emmerson y Jones, 2003). La primera fluoroquinolona que ofreció una mejora significativa con respecto del ácido nalidíxico fue la flumequina (Emmerson y Jones, 2003).

Hoy en día, ciprofloxacina, patentada en 1981, es la fluoroquinolona más empleada en el tratamiento contra bacterias Gram-negativas; es activa contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp, sin embargo, a pesar de los excelentes resultados en muchas infecciones respiratorias, se reportó el fallo en el tratamiento de infecciones neumocócicas, limitando su uso en esta área (Redgrave y col., 2014).

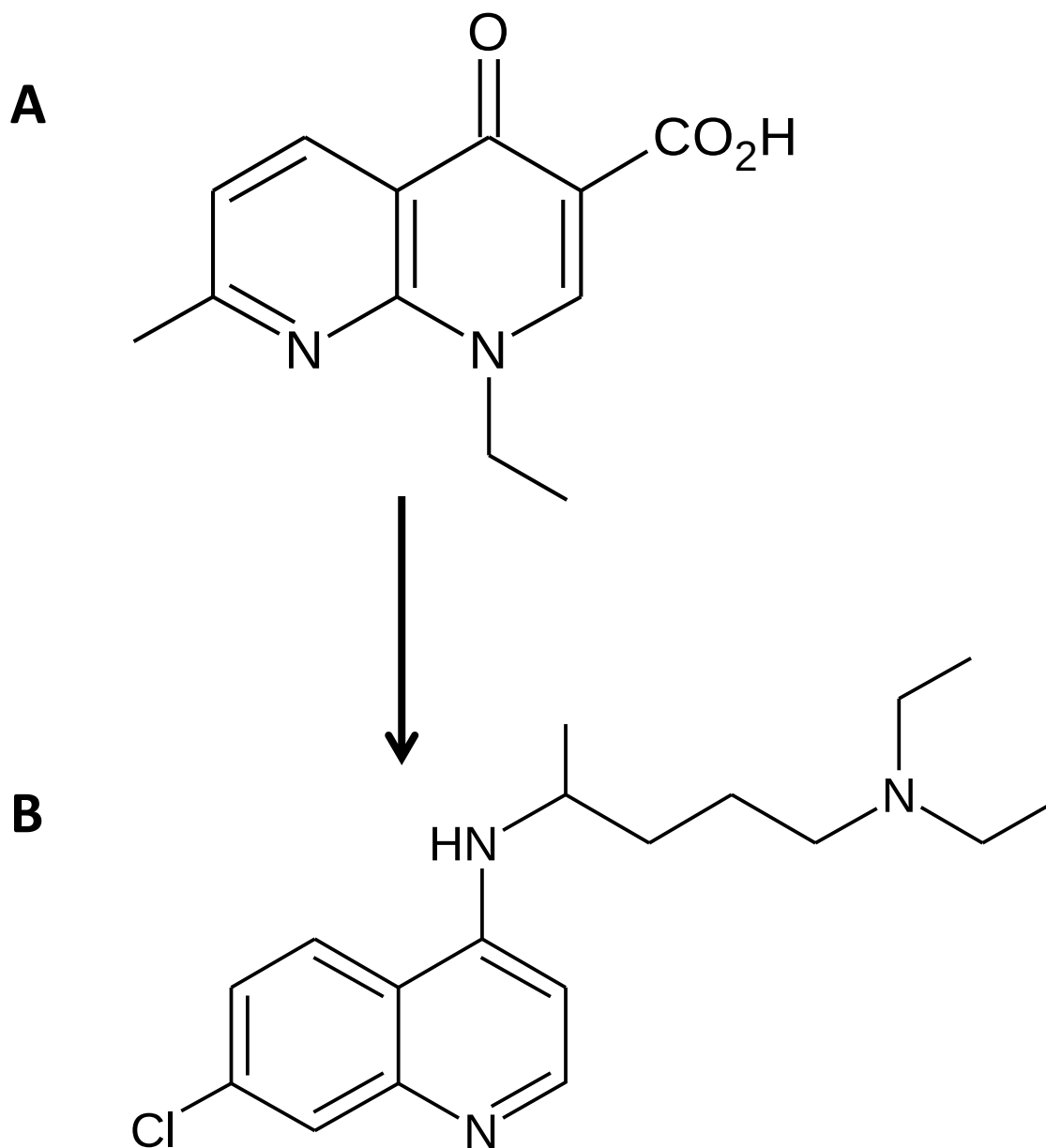


Figura 1. Síntesis de la primera quinolona. Se muestra la molécula de ácido nalidíxico (A) un subproducto de la síntesis de la cloroquina (B).

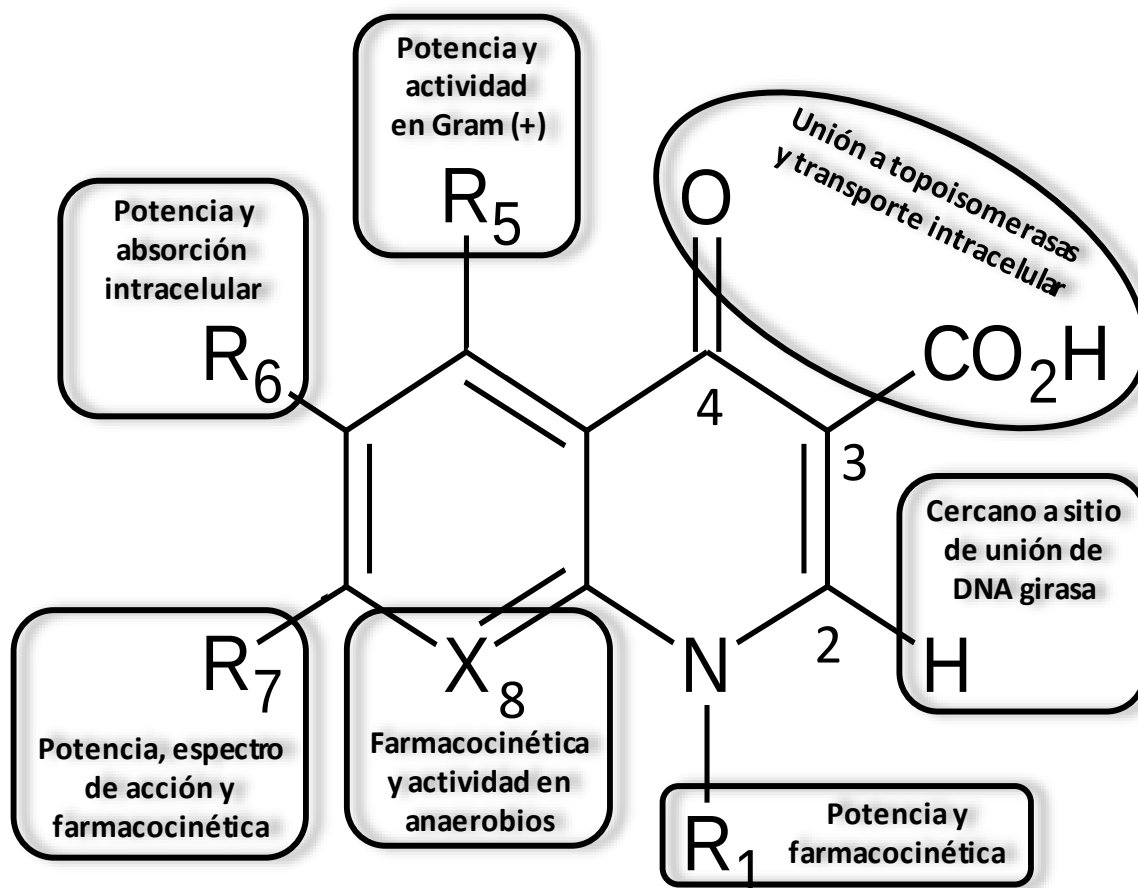


Figura 2. Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente. Se marcan con grupos R las posiciones más comúnmente sustituidas. X puede ser un átomo de carbono en el caso de quinolonas o un átomo de nitrógeno en el caso de naftiridinas. Se indican los principales procesos en los que participan las modificaciones en cada posición (modificado de Andersson y MacGowan, 2003).

Al introducir nuevas modificaciones, se ha logrado obtener una serie de nuevas quinolonas, algunas de las cuales fueron consideradas como superquinolonas, como trovafloxacin. Sin embargo, ante la aparición de severos efectos adversos, algunas de ellas han sido retiradas del mercado, como la temofloxacin por su toxicidad renal y hematológica, la trovafloxacin, que presenta hepatotoxicidad y la grepafloxacin que genera toxicidad cardíaca (Trucco, 2000). La actividad contra *Streptococcus pneumoniae* ha sido un gran logro en el grupo de nuevas quinolonas, reemplazando la escasa o moderada actividad contra dicho patógeno de sus predecesores. Además, muestran buena actividad *in vitro* sobre patógenos respiratorios como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* (Trucco, 2000).

En la actualidad, la demanda por quinolonas con mayor actividad y menor resistencia microbiana ha impulsado el desarrollo de nuevos compuestos, como en el caso de nemonoxacin, una quinolona no fluorada que actualmente se encuentra en la fase clínica III, penúltima fase del desarrollo farmacéutico, y que ha mostrado mayor actividad *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* que otros compuestos fluorados como ciprofloxacina y moxifloxacina (Qin y Huang, 2014).

2. Estructura de las quinolonas

La clave en la evolución de las quinolonas fue la modificación de su estructura base (**Figura 2**) a través de la adición de diferentes sustituyentes en las posiciones 1, 6 y 7 (Andriole, 2000). Dichas modificaciones afectan la actividad antibacteriana y las propiedades farmacocinéticas de las quinolonas. Algunas de las sustituciones clave son:

- La adición de un grupo ciclopropil en la posición 1 (**Figura 2**), incrementa la

actividad antibacteriana (Andriole, 1999).

- La adición de un átomo de flúor en la posición 6 (**Figura 2**) incrementó más de 10 veces su potencia y se cree que estabiliza la unión con su sitio blanco al influir en la distribución de cargas de la molécula (Laponogov y col., 2009).
- La adición de un grupo de piperazina en la posición 7 (**Figura 2**) provee una mayor actividad frente a bacterias Gram-negativas aerobias y aumenta la actividad frente a *Staphylococcus* y *Pseudomonas*; además se sugiere que juega un papel importante en la inhibición de los sistemas de expulsión, mejorando así la potencia del antibiótico (Andriole, 1999).
- La alquilación de la posición 7 (**Figura 2**) incrementa la actividad frente a bacterias Gram-positivas aerobias y aumenta la vida media (Andriole, 1999).
- La adición de un grupo metilo al nitrógeno del anillo de piperazina en la posición 7 (**Figura 2**) incrementa la vida media y la biodisponibilidad (Andriole, 1999).

A pesar de que ciertos sustituyentes, como los mencionados anteriormente, pueden producir importantes cambios en la actividad biológica de las quinolonas, las características finales de la molécula derivan de la interacción entre cada uno de los radicales (Peterson, 2001).

3. Clasificación de las quinolonas

Existen diversas maneras de clasificar a las quinolonas, por ejemplo: por su estructura química y su fecha de síntesis, sin embargo, se eligió para este trabajo la clasificación en generaciones, que se basa en la actividad antibacteriana que se ha incrementado dramáticamente conforme el desarrollo de las distintas generaciones, y su potencia contra organismos anaerobios y neumococos (Andriole, 2000).

3.1. Primera generación

Las quinolonas de la primera generación presentan actividad contra bacterias aerobias y Gram-negativas. En esta generación se encuentran el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico (**Figura 3A**), ambas son utilizadas en el tratamiento de infecciones de vías urinarias producidas por microorganismos Gram-negativos, incluyendo especies de *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia coli* (Brighty y Gootz, 2000).

3.2. Segunda generación

La segunda generación de quinolonas fue introducida en la década de los 80's. Las principales características de esta generación fue la actividad contra bacterias aerobias Gram-positivas y el incremento en la actividad contra las Gram-negativas, generando un enorme avance en el tratamiento de importantes infecciones clínicas, como pielonefritis, prostatitis y osteomielitis (Ball y col., 1998). Entre ellas se encuentran norfloxacin y ciprofloxacina (**Figura 3B**); la primera es utilizada principalmente en el tratamiento de infecciones urinarias y la segunda se emplea en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, osteomielitis causada por enterobacterias, infecciones de oído, infecciones gonocócicas y prostatitis crónica bacteriana, siendo así una de las quinolonas más utilizadas (Schacht y col., 1988).

3.3. Tercera generación

Las quinolonas pertenecientes a la tercera generación incluyen a gatifloxacina (**Figura 4A**), utilizada en el tratamiento de gonorrea, infecciones pulmonares, infecciones de piel y del tracto urinario, y levofloxacina (**Figura 4A**), la cual se indica para el tratamiento de neumonía, bronquitis crónica, infecciones urinarias, infecciones renales y de la próstata.

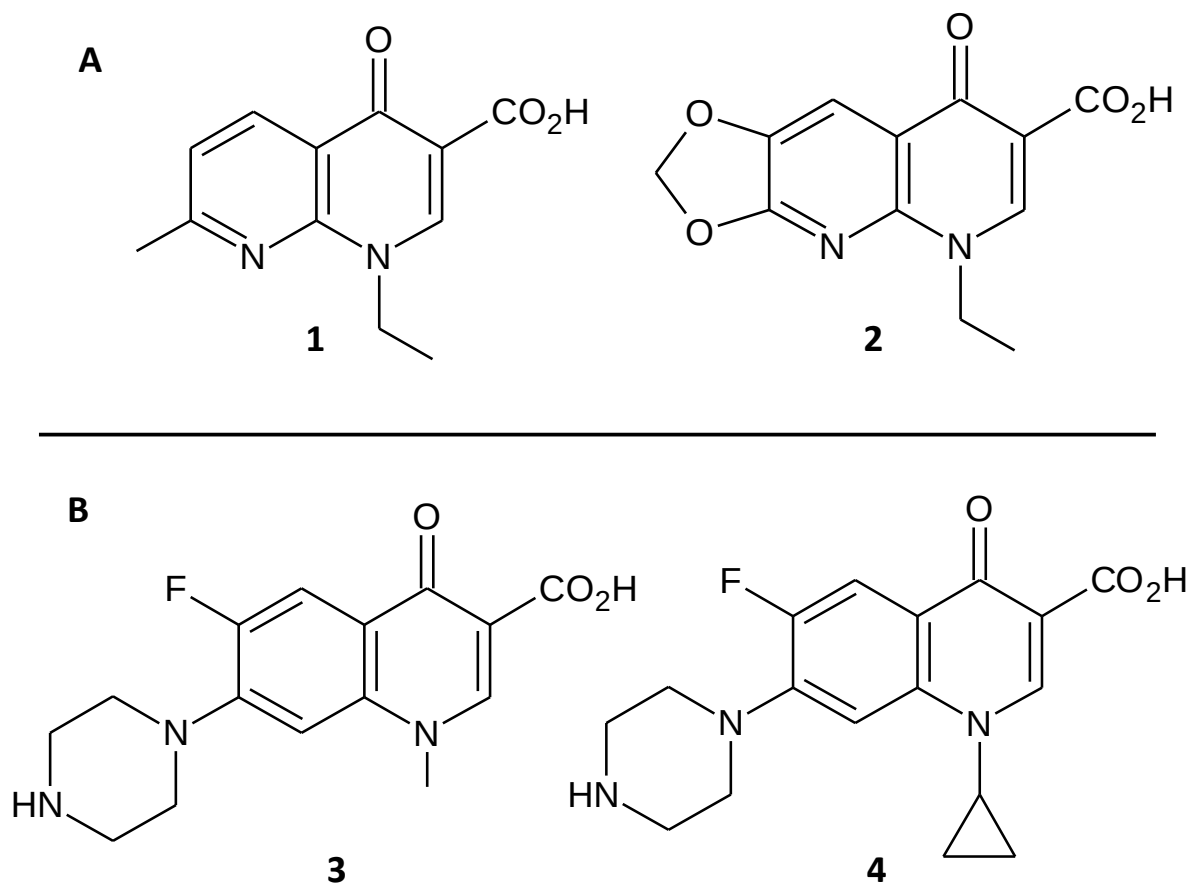


Figura 3. Primera y segunda generación de quinolonas. (A) Se muestran moléculas de la primera generación: (1) ácido nalidíxico y (2) ácido oxolínico; y (B) de la segunda generación: (3) norfloxacin y (4) ciprofloxacin.

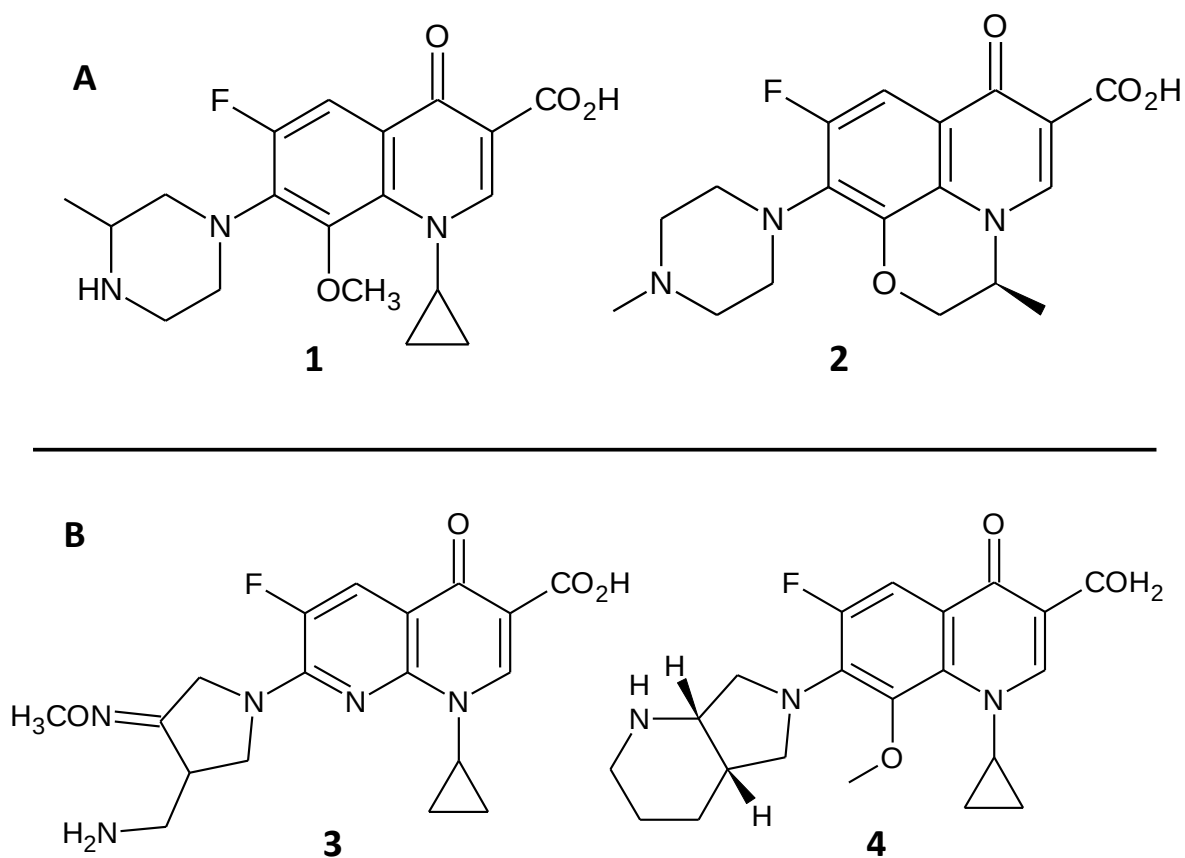


Figura 4. Tercera y cuarta generación de quinolonas. (A) Se muestran moléculas de la tercera generación: (1) gatifloxacin y (2) levofloxacin; y (B) de la cuarta generación: (3) gemifloxacin y (4) moxifloxacin.

Las moléculas de esta generación presentan una mayor actividad contra bacterias Gram-positivas, particularmente contra neumococos; además, son capaces de actuar contra bacterias anaerobias (Andriole, 2000).

3.4. Cuarta generación

Las quinolonas de cuarta generación presentan actividad contra bacterias anaerobias y un incremento de actividad contra neumococos, entre ellas se encuentran moxifloxacina y gemifloxacina (**Figura 4B**), que son utilizadas en el tratamiento de neumonía, bronquitis e infecciones de los senos paranasales (Brighty y Gootz, 2000).

4. Mecanismos de acción de las quinolonas

Las quinolonas son antibióticos con una gran capacidad para eliminar diversos tipos de bacterias de forma rápida (Hooper, 2001), por lo cual era importante determinar su mecanismo de acción. Fue en 1976 cuando se observó que el ácido nalidíxico causaba una acumulación anormal de precursores de DNA monocatenario cuando los dominios cromosómicos se presentaban superenrollados; además, la concentración de DNA monocatenario disminuía por la acción de una enzima que era específicamente inhibida por la quinolona (Crumplin y Smith, 1976). Estas primeras observaciones ayudaron a explicar el mecanismo de acción de las quinolonas que se describirá a continuación.

Los blancos de las quinolonas son dos enzimas esenciales en los procesos celulares de replicación, transcripción y reparación del DNA; la DNA girasa y la topoisomerasa IV (**Figura 5**). Dichas enzimas están encargadas del superenrollamiento del DNA que le permite mantenerse de forma compacta dentro de la célula, (Hooper, 2001). Ambas enzimas pertenecen a la familia de las topoisomerasas tipo IIA y están compuestas de dos

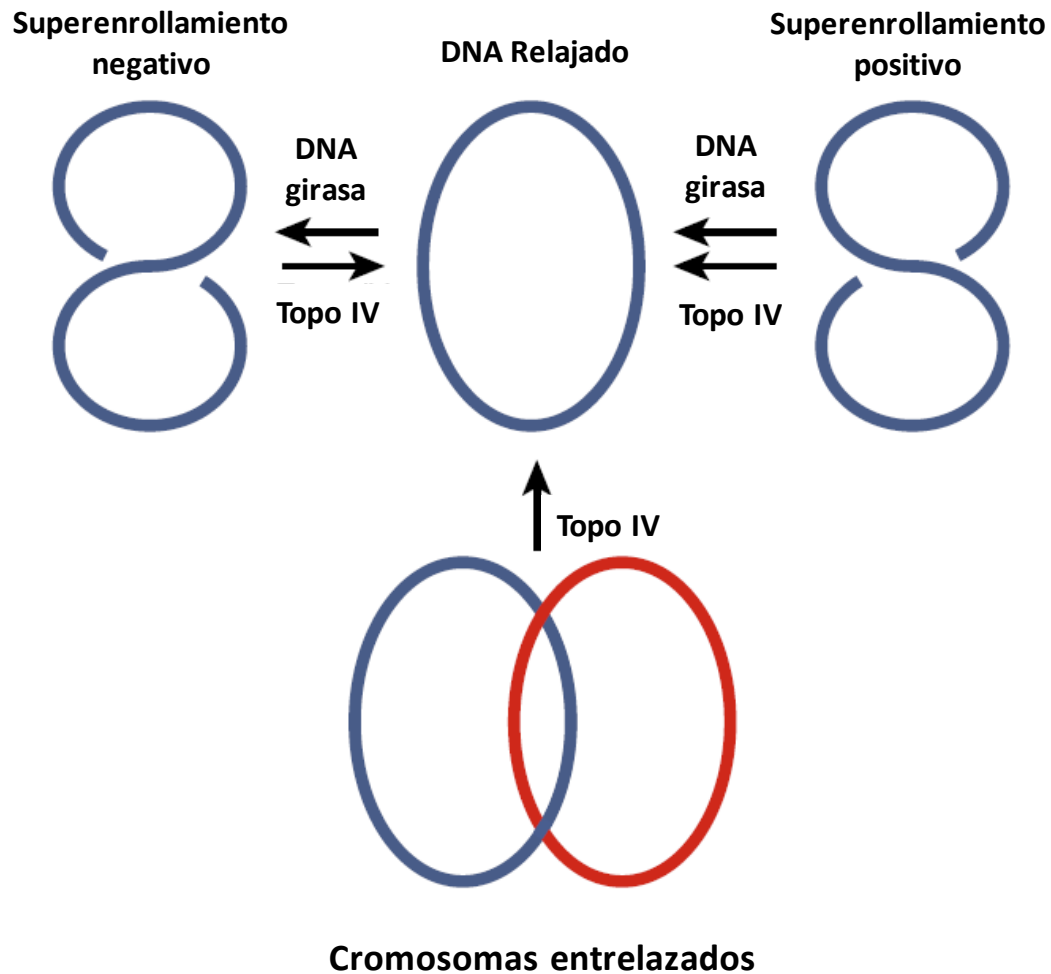


Figura 5. Acción de las topoisomerasas tipo IIA en el DNA. Se muestra de manera esquemática la acción de las topoisomerasas tipo IIA en el superenrollamiento del DNA en las bacterias (Modificado de Redgrave y col., 2014).

subunidades; GyrA de 97 kilodaltones (kDa) y GyrB de 90 kDa correspondientes a la DNA girasa y ParC de 75 kDa y ParE de 70 kDa correspondientes a la topoisomerasa IV (Champoux, 2001).

Las topoisomerasas presentan una acción homóloga con pequeñas diferencias; ambas enzimas actúan reduciendo la tensión molecular causada por el superenrollamiento realizando cortes a la doble cadena de DNA. La DNA girasa remueve superenrollamientos positivos y avanza delante de la horquilla de replicación, mientras que la topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación, además de ser responsable de la segregación de los cromosomas al final de la replicación (**Figura 5**).

Durante su mecanismo de acción, las topoisomerasas tipo IIA introducen un par de cortes en la cadena sencilla de DNA y se unen de forma covalente al extremo 5' formando un complejo DNA-topoisomerasa, relajando el superenrollamiento del DNA (Mizuuchi y col., 1980). Las quinolonas se unen rápidamente al complejo, probablemente antes de que la ruptura del DNA ocurra, mediante la región GyrA de la DNA girasa y la región ParC de la topoisomerasa IV, generando el complejo terciario DNA-Topoisomerasa-Quinolona que bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, inhibiendo así el crecimiento bacteriano (**Figura 6**). Sin embargo, se ha observado que los efectos son reversibles si se remueve la quinolona, ya sea por la adición del agente quelante EDTA o por un tratamiento térmico (Leo y col., 2005). En los sistemas *in vitro*, cuando la DNA girasa es el blanco, la inhibición ocurre en minutos mientras que si el blanco es la topoisomerasa IV la inhibición ocurre más lentamente (Khodursky y col., 1995). Al ser la formación del complejo terciario un proceso reversible es el punto crucial en el mecanismo

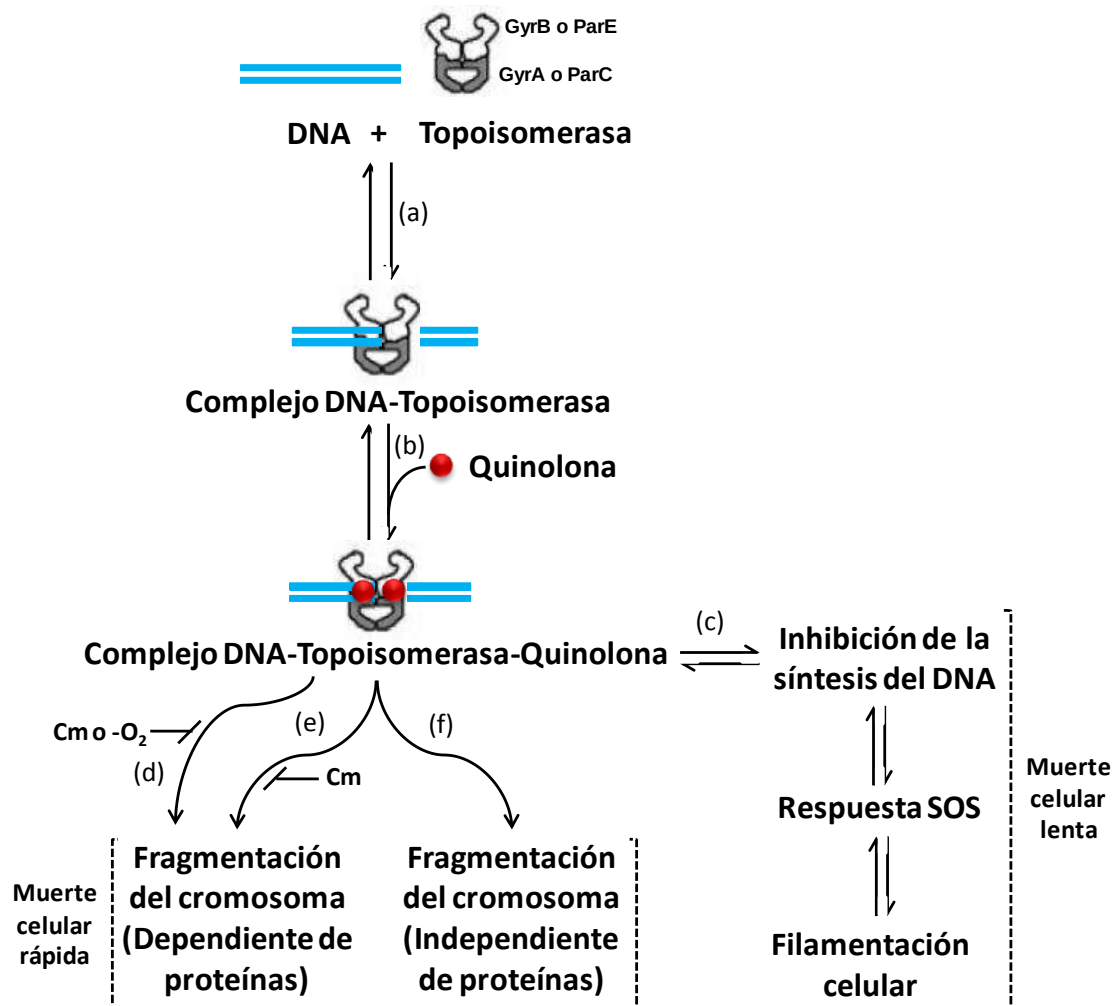


Figura 6. Representación esquemática de la acción de las quinolonas. (a) Unión de la topoisomerasa con el DNA y formación del complejo DNA-Topoisomerasa; (b) unión de la quinolona y formación del complejo DNA-Topoisomerasa-Quinolona; (c) inhibición de la replicación que conduce a la inducción del sistema SOS y a la filamentación celular; (d); fragmentación letal del cromosoma que requiere síntesis de proteínas, que puede inhibirse con cloranfenicol (Cm) y condiciones aeróbicas; (e) fragmentación letal del cromosoma que requiere síntesis de proteínas pero no condiciones aeróbicas; (f) fragmentación letal del cromosoma que no requiere síntesis de proteínas o condiciones aeróbicas (modificado de Drlica y col., 2009).

de acción de las quinolonas. Puede tomar dos cursos irreversibles que concluyen en la muerte celular; la ruta dependiente de la síntesis de proteínas en condiciones aeróbicas y la ruta independiente de la síntesis de proteína, la cual se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis, característica de la primera generación de quinolonas; sin embargo, ambas rutas tienen como objetivo la fragmentación cromosómica y finalmente la muerte celular **(Figura 6)**. Adicional a estas rutas, la reversibilidad del bloqueo de la replicación del DNA activa la respuesta del sistema SOS, que inhibe la división celular y propicia la formación de estructuras celulares filamentosas contribuyendo a una muerte celular lenta que no ha sido estudiada a profundidad (Piddock y col., 1990).

5. Sistemas de resistencia a quinolonas

En pocas décadas las quinolonas pasaron de ser un grupo pequeño de antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones urinarias a formar parte del grupo de antibióticos más prescritos para el tratamiento de una gran variedad de infecciones; desafortunadamente su uso excesivo ha provocado la generación de bacterias resistentes (Aldred y col., 2014). La resistencia bacteriana es hoy en día uno de los principales problemas clínicos al limitar la capacidad de tratamiento de un gran número de infecciones bacterianas (Aldred y col., 2014).

Debido a que las quinolonas son antibióticos completamente sintéticos, se propuso que los únicos sistemas de resistencia que las bacterias podían adquirir de manera inmediata serían las mutaciones en los genes que codifican las proteínas blanco, las topoisomerasas tipo IIA, y la expulsión de quinolonas mediada por los transportadores de membrana (Martínez, 2009). En cuanto a la adquisición de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes, aquella que ocurre cuando una bacteria que ya posee los genes de resistencia los

transfiere a otra que no es su descendiente, para el caso de las quinolonas se pensó que esto no sería posible, ya que el origen de los genes de resistencia a antibiótico de origen biológico son los propios organismos productores (Hernández y col., 2011). Actualmente, podemos clasificar los sistemas de resistencia en dos grupos (**Figura 7**): A) Sistemas codificados por genes cromosómicos, como lo son las modificaciones de los sitios blanco y los sistemas de expulsión, y B) Sistemas codificados por genes plasmídicos, tales como proteínas Qnr, sistemas de expulsión y la enzima aminoglucósido acetil transferasa modificada [aac(6')-Ib-cr] (Aldred y col., 2014).

5.1 Sistemas de resistencia codificados por genes cromosómicos

5.1.1 Modificaciones de los sitios blanco

El mecanismo de resistencia más común está dado por la mutación en los genes que codifican a las topoisomerasas IIA (*gyrA* y *gyrB* de la DNA girasa y, *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV), sitios blanco de las quinolonas (**Figura 7**). Las regiones donde se presentan dichas mutaciones son pequeñas secuencias de DNA denominadas “regiones determinantes de resistencia a quinolonas”, mejor conocidas como QRDR, por sus siglas en inglés (Yoshida y col., 1990).

Las mutaciones dan como resultado la sustitución de aminoácidos, las cuales generan alteraciones en la estructura de la enzima, principalmente la región de unión con la molécula de DNA, afectando la formación del complejo DNA-topoisomerasa y como consecuencia su unión a la quinolona, favoreciendo así la resistencia al antibiótico (Friedman y col., 2001).

La mutación más frecuente es la sustitución de la serina 83 por un triptófano (Redgrave y

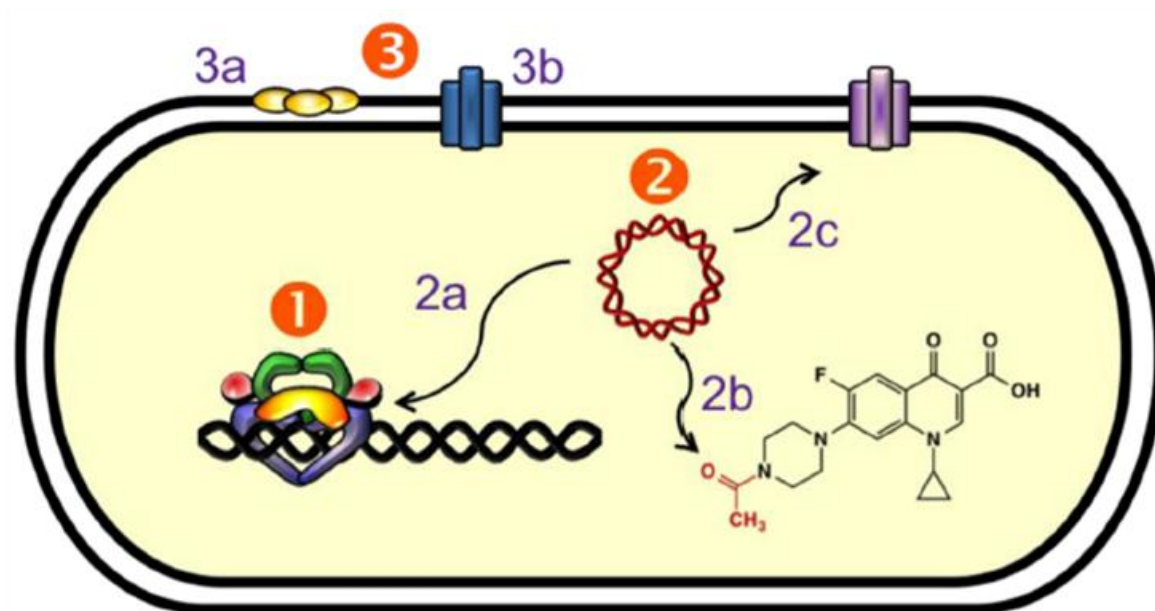


Figura 7. Resistencia bacteriana a quinolonas. Se representa una célula bacteriana mostrando los sistemas de resistencia a quinolonas. Los detalles de cada sistema se describen en el texto. (1) Resistencia mediada por mutaciones en los genes que codifican a las proteínas blanco (DNA girasa y topoisomerasa IV). (2) Resistencia mediada por genes plasmídicos. (2a) Proteínas Qnr (en amarillo) que disminuyen la unión del complejo DNA-topoisomerasa. (2b) Aac(6')-Ib-cr es una enzima que acetila algunas quinolonas, disminuyendo su efectividad. (2c) Sistemas de expulsión que disminuyen la concentración intracelular de las quinolonas. (3) Resistencia mediada por genes cromosómicos. (3a) Disminución de la expresión de porinas. (3b) Sistemas de expulsión (Tomada de Aldred y col., 2014).

col., 2014), región cercana al sitio activo, además de estar cerca de la tirosina 122, residuo donde se forma el enlace de fosfotirosina entre la enzima y el DNA (Shen y Pernet, 1985).

Aislados clínicos de cepas resistentes a quinolonas han mostrado mutaciones en la región C-terminal de la subunidad GyrB, sustituciones del ácido aspártico 426 por asparagina, generan resistencia a quinolonas ácidas y anfóteras y la sustitución de lisina 442 por ácido glutámico, ha mostrado conferir resistencia a drogas ácidas (Yamagishi y col., 1986).

5.1.2 Sistemas de expulsión

La inespecificidad de los sistemas de expulsión los hace capaces de eliminar activamente diversos tipos de compuestos, como lo son antibióticos, antisépticos, detergentes e incluso salicilatos de sodio siendo estas sales de gran tamaño (Aleksun y Levy, 1999). Por lo tanto, al ser capaces de reducir la concentración intracelular de las quinolonas confieren resistencia (**Figura 7**) (Redgrave y col., 2014).

Los sistemas de transporte se agrupan en superfamilias que incluyen facilitadores mayores (MFS), sistemas que unen ATP (ABC), sistemas de resistencia, división celular y nodulación (RND), proteínas pequeñas de resistencia a multidrogas (SMR) y sistemas de expulsión de multidrogas y compuestos tóxicos (MATE) (Martínez y col., 2009). Estos sistemas son los responsables de la resistencia intrínseca de algunas bacterias como *P. aeruginosa* a las fluoroquinolonas y a otros tipos de drogas (Piddock, 2006).

En otras bacterias como *S. aureus*, la resistencia a quinolonas está asociada con el gen *norA*, que codifica un transportador de amplio espectro. Además, en *E. coli* la bomba de expulsión AcrAB-TolC tiene el papel principal en la resistencia a quinolonas (Wang y col., 2001).

5.2 Sistemas de resistencia codificados por genes plasmídicos

5.2.1. Proteínas Qnr

Las proteínas Qnr se identificaron por primera vez en 1998 en el plásmido multirresistente pMG252, aislado de un cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a ciprofloxacina (Martínez y col., 1998).

Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos (PRP, por sus siglas en inglés), llamadas así porque sus miembros contienen un motivo recurrente de cinco aminoácidos en tándem [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly] (Vetting y col., 2006); hasta la fecha se han descrito cinco familias de proteínas Qnr; QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD (Vetting y col., 2006).

Estas proteínas han mostrado tener participación en la resistencia a ciprofloxacina al unirse al complejo DNA-Topoisomerasa, impidiendo la unión de las quinolonas, aunque no se conoce con detalle su mecanismo de acción (**Figura 7**) (Tran y col., 2005). Por sí mismas dichas proteínas proveen una baja resistencia a ciprofloxacina en cepas de *E. coli*, sin embargo, adquieren importancia clínica cuando se asocian con otros mecanismos de resistencia al antibiótico (Tran y Jacoby, 2002).

5.2.2. Modificación enzimática

Debido al origen sintético de las quinolonas no se esperaba que, de una forma tan rápida, las bacterias desarrollaran la capacidad de modificar el fármaco; la degradación de quinolonas se había descrito únicamente en hongos (Wetzstein y col., 1997). Sin embargo, en 2006 se identificó en cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina el plásmido pSH10-2, que posee el gen *qnrA*, el cual al ser transferido a la cepa Rec⁻ *E. coli* DH10B, una cepa

que presenta sensibilidad a ciprofloxacina si se compara con las cepas *E. coli* Rec⁺, confería cuatro veces mayor resistencia al antibiótico que lo reportado anteriormente para los genes *qnr* (Robicsek y col., 2006). Mediante mutagénesis por transposición, se identificó al gen *aac(6′)-Ib* presente en el plásmido pHSH10-2, el cual codifica una enzima aminoglucósido acetiltransferasa que confiere resistencia a algunos antibióticos del grupo de los aminoglucósidos: kanamicina, amikacina y tobramicina (Robicsek y col., 2006). El análisis *in silico* del gen *aac(6′)-Ib* reveló que se encuentra modificado en los codones 102 (Trp → Arg) y 179 (Asp → Tyr) y se demostró que en ausencia de dichas mutaciones, el gen no se asociaría con la resistencia a quinolonas (Robicsek y col., 2006). El mecanismo de acción de la enzima *aac(6′)-Ib-cr* (llamada así por que confiere resistencia a ciprofloxacina), se determinó mediante ensayos de acetilación, utilizando kanamicina y ciprofloxacina como sustratos. Se demostró que la enzima puede introducir un grupo acetilo en el nitrógeno del grupo piperazil que poseen ciprofloxacina y norfloxacina en la posición 7, reduciendo la afinidad del antibiótico por las topoisomerasas (**Figura 7**) (Robicsek y col., 2006).

5.2.3. Sistemas de expulsión

Los sistemas de expulsión confieren resistencia a quinolonas al disminuir la concentración intracelular del fármaco, y hasta la fecha se han identificado dos sistemas de expulsión codificados en plásmidos provenientes de cepas de *E. coli* (Poirel y col., 2012).

El plásmido pHPA, aislado de la cepa clínica de *E. coli* C316, contiene el gen *qepA* el cual codifica la proteína de membrana interna QepA, con 14 segmentos transmembranales, que se agrupa en la superfamilia de transportadores facilitadores mayores (MFS, por sus siglas

en inglés). La proteína confiere resistencia mediante la expulsión del citoplasma de quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina y norfloxacina (Yamane y col., 2007).

Por otra parte, el plásmido pOLA52 proveniente de una cepa de *E. coli* aislada de estiércol de cerdo, contiene el gen *oqx*A que codifica una proteína de membrana interna de 391 aminoácidos (aa), perteneciente a la familia RND, y el gen *oqx*B que codifica una proteína de periplasma de 1,050 aa; además, se encontró que ambos forman parte de un operón (Hansen y col., 2004). Las proteínas OqxAB confieren resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina; además son capaces de expulsar bromuro de etidio, lo que sugiere que la resistencia a quinolonas también está dada por su expulsión del citoplasma (**Figura 7**) (Hansen y col., 2004). Además, se determinó que OqxA y OqxB necesitan de una proteína de membrana externa para cumplir su función, como TolC de *E. coli*, funcionando como un complejo tripartita de expulsión similar a los codificados por genes cromosómicos de bacterias Gram-negativas (Hansen y col., 2004).

II. ANTECEDENTES

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo agua y suelo, así como en asociación con diversos organismos (Battle y col., 2008). Esta bacteria es la mayor causa de infecciones hospitalarias y es el patógeno más comúnmente asociado con la mortalidad de pacientes con fibrosis quística. Infecciones causadas por este microorganismo son muy difíciles de tratar debido a la resistencia intrínseca que posee a diversos antibióticos como quinolonas, β -lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos (Breidenstein y col., 2008). No obstante, el antibiótico ciprofloxacina, de la familia de las quinolonas, es el fármaco de primera elección en el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* en la mayoría de los países en desarrollo (Hoiby, 2011). Actualmente, el uso masivo de quinolonas ha incrementado el número de bacterias resistentes a su acción (Hernández y col., 2011) y las terapias antimicrobianas se vuelven cada vez más costosas y poco efectivas (Levy y Marshall, 2004).

Como ya se mencionó (**Figura 7**), hoy en día, los sistemas de resistencia a ciprofloxacina se encuentran ampliamente distribuidos y podemos dividirlo en dos grupos.

- I) Sistemas de resistencia codificados en genes cromosómicos: que incluye mutaciones en los genes que codifican a sus proteínas blanco, la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Hernández y col., 2011) y los sistemas de expulsión como MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Martínez y col., 2009).
- II) Sistemas codificados por genes presentes en plásmidos: que incluyen a las proteínas Qnr, que impiden la unión de las quinolonas al sitio blanco, los sistemas de expulsión (QepA y OqxAB) y la enzima aminoglucósido-acetil

transferasa modificada, AAC(6')-Ib-cr, que ejerce resistencia como consecuencia de la acetilación del antibiótico (Aldred y col., 2014).

Los sistemas plasmídicos han sido reportados en las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *K. pneumoniae*, sin embargo, hasta el momento no se han reportado sistemas de resistencia a quinolonas codificados por genes plasmídicos en *P. aeruginosa* (Wong y Kassen, 2011).

El plásmido conjugativo pUM505, aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1986; Cervantes y Ohtake., 1988), confiere resistencia a quinolonas (Ramírez-Díaz y col., 2011). El plásmido se secuenció y se realizó el análisis *in silico* donde se identificaron 138 regiones codificantes (**Figura 8**). pUM505 se dividió en dos regiones correspondientes a islas genómicas: Una región que presenta homología con una isla de patogenicidad de cepas de *Pseudomonas*, donde se encuentran genes probablemente relacionados con la replicación, la transferencia del plásmido y factores de virulencia; y la segunda región que corresponde a una isla de resistencia a metales pesados, donde se identificaron genes relacionados con la resistencia a mercurio inorgánico y al ion cromato (**Figura 8**). Sin embargo, no se identificaron genes relacionados con resistencia a antibióticos (Ramírez Díaz y col., 2011). Adicionalmente, se identificaron 64 regiones que codifican proteínas hipotéticas distribuidas en diferentes regiones del plásmido, las cuales podrían conferir resistencia a quinolonas mediante un mecanismo aún no descrito.

El plásmido pUM505 se transfirió a *P. aeruginosa* PAO1, una cepa estándar de laboratorio, y mediante pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina se observó un mayor crecimiento en la cepa que contiene el plásmido en comparación con el control (**Figura 9**).

Se concluyó que genes del plásmido pUM505 confieren resistencia mediante un

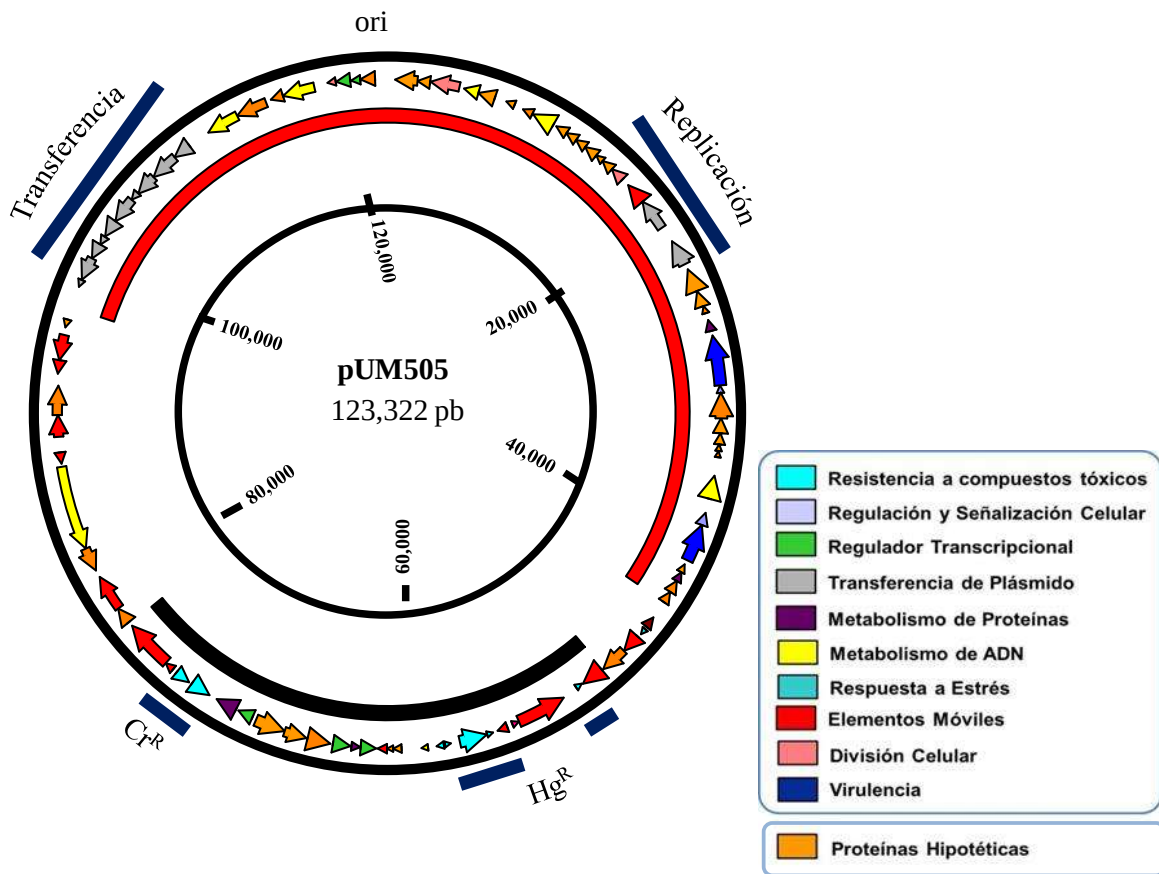


Figura 8. Mapa genético del plásmido pUM505. Las regiones codificantes se muestran con flechas o puntas de flecha, indicando la dirección de la transcripción. Las posibles funciones asignadas de las proteínas codificantes se agrupan de acuerdo a los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha, indicando también las proteínas hipotéticas. La isla de patogenicidad se muestra con una barra roja y la isla de resistencia a metales pesados con una barra negra. Se indica el origen de replicación (ori) y con barras azules las regiones relacionadas con la transferencia, replicación, resistencia a mercurio (Hg^R) y resistencia a cromato (Cr^R) (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

mecanismo aún no descrito.

Para identificar los genes responsables de la resistencia a quinolonas, se generó un banco de mutantes por transposición al azar en la cepa *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505) con el transposón *HimarI::Gm^R*. Las mutantes se seleccionaron por su sensibilidad a ciprofloxacina y por su capacidad de crecer en medio de cultivo suplementado con Gentamicina y Estreptomicina (marcadores de la presencia del transposón) y cloruro de mercurio. Finalmente, de un total de 12,000 mutantes analizadas, se seleccionaron 12 mutantes sensibles a ciprofloxacina (Cp^S) a las cuales se les realizaron pruebas de susceptibilidad en medio líquido (**Figura 10**). Las mutantes se clasificaron como sensibles e hipersensibles con base a la susceptibilidad que presentaron (Chávez-Jacobo, 2015). Se analizó la secuencia de DNA de seis de las mutantes y se identificaron los genes *orf57* (*xerC*), *orf58*, *orf59* (*xerC*) y el *orf87*, como genes interrumpidos por el transposón. Se logró complementar a la mutante interrumpida en el *orf57* con el gen *xerC* silvestre y se realizaron pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina. Se observó que la mutante complementada tiene un mayor crecimiento que la cepa que posee el gen interrumpido (**Figura 11**), por lo que se concluyó que el *orf57* del plásmido pUM505 está relacionado con el fenotipo de resistencia a ciprofloxacina. Se realizó el análisis *in silico* del *orf57* y se encontró que codifica una recombinasa sitio específica, por lo que se sugirió que podría participar en la separación de los cromosomas al final de la replicación del DNA, función que normalmente realiza la topoisomerasa (Yang, 2010).

Debido a que se desconocen los genes interrumpidos en el resto de las mutantes, es de nuestro interés continuar con el análisis de las mutantes sensibles a ciprofloxacina, con la finalidad de determinar qué otros genes del plásmido pUM505 están implicados en la

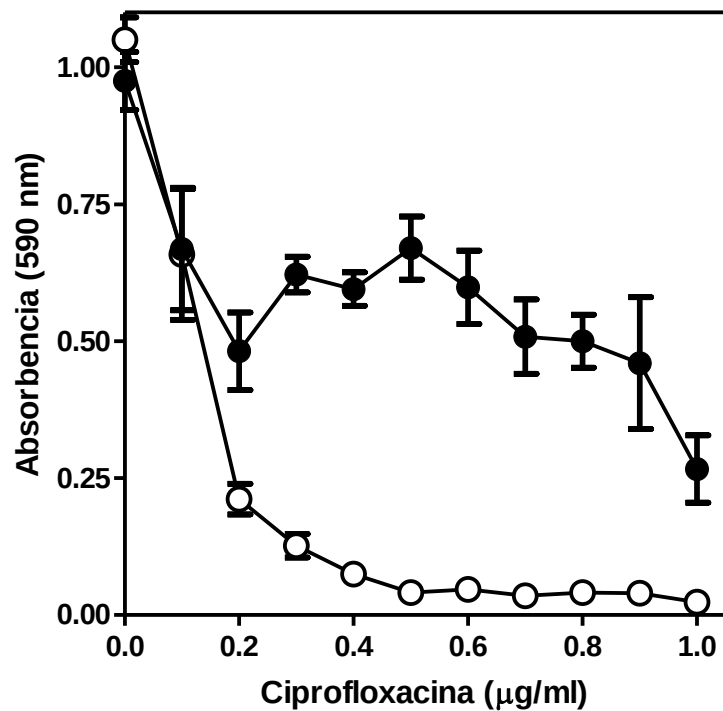


Figura 9. Resistencia a ciprofloxacin conferida por el plásmido pUM505. Los cultivos se crecieron en CN con las concentraciones de ciprofloxacin indicadas por 18 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente se midió la absorbencia a 590 nm. *P. aeruginosa* PAO1 (○) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (●). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6. (Rojas-Rojas, 2012).

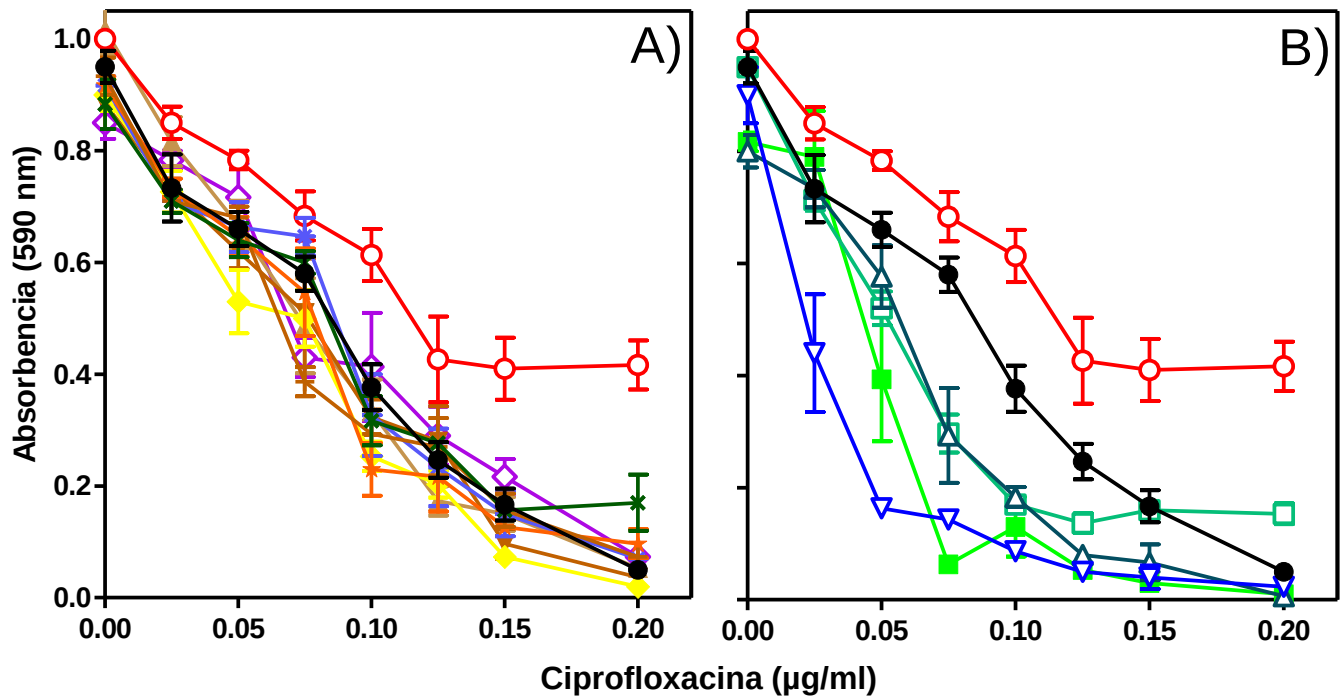


Figura 10. Susceptibilidad a ciprofloxacina de las mutantes Cp^S . Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante a las concentraciones de ciprofloxacina indicadas y se midió la absorbencia a 590 nm. PAO1SR (●), PAO1SR (pUM505) (○). (A) Mutantes sensibles: Cp^S : 4-55 (▲), 13-23 (▼), 14-26 (◆), 79-30 (◇), 95-02 (*), 97-44 (★), 97-47 (+) y 105-67 (×). (B): Mutantes hipersensibles Cp^S : 35-78 (■), 56-93 (□), 62-25 (△) y 65-45 (▽). Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3. (Chávez-Jacobo, 2015).

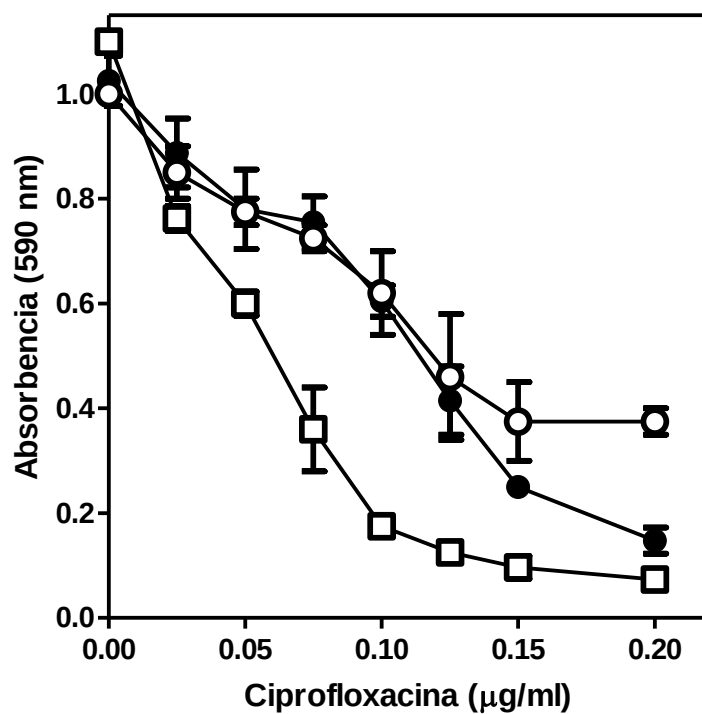


Figura 11. Susceptibilidad a ciprofloxacin de la mutante Cp^S xerC⁻ complementada con el gen *xerC* de pUM505. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante a las concentraciones de ciprofloxacin indicadas y se midió la absorbencia a 590 nm. PAO1SR (pUM505) (○), Cp^S xerC⁻ (pUCP20) (□) y Cp^S xerC⁻ (pUC_xerC) (●) Se muestran las barras de error estándar de la media, n=4. (Chávez-Jacobo, 2015).

resistencia a ciprofloxacina, lo que permitirá esclarecer el o los mecanismos empleados por las bacterias que poseen el plásmido para tolerar dicho antibiótico.

III. JUSTIFICACIÓN

El plásmido pUM505 confiere resistencia a ciprofloxacina cuando se transfiere a la cepa estándar *P. aeruginosa* PAO1. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de la secuencia del plásmido no se identificaron genes relacionados con la resistencia a antibióticos. Se generó y analizó un banco de 12,000 mutantes por transposición al azar, de las cuales 12 presentaron un fenotipo de sensibilidad a ciprofloxacina. Se realizó el análisis de 6 mutantes, sin embargo, solo se complementó una de ellas (*xerC*) y se concluyó que el gen interrumpido podría suplir la función de la topoisomerasa IV. Por lo tanto, es de nuestro interés realizar el análisis de las seis mutantes sensibles a ciprofloxacina restantes, para completar el análisis e identificación en su totalidad a los genes que podrían estar relacionados con el fenotipo de resistencia a quinolonas conferido por el plásmido pUM505.

IV. HIPÓTESIS

Los genes del plásmido pUM505 interrumpidos en las mutantes sensibles a ciprofloxacina confieren resistencia al antibiótico mediante un mecanismo aún no reportado.

V. OBJETIVOS

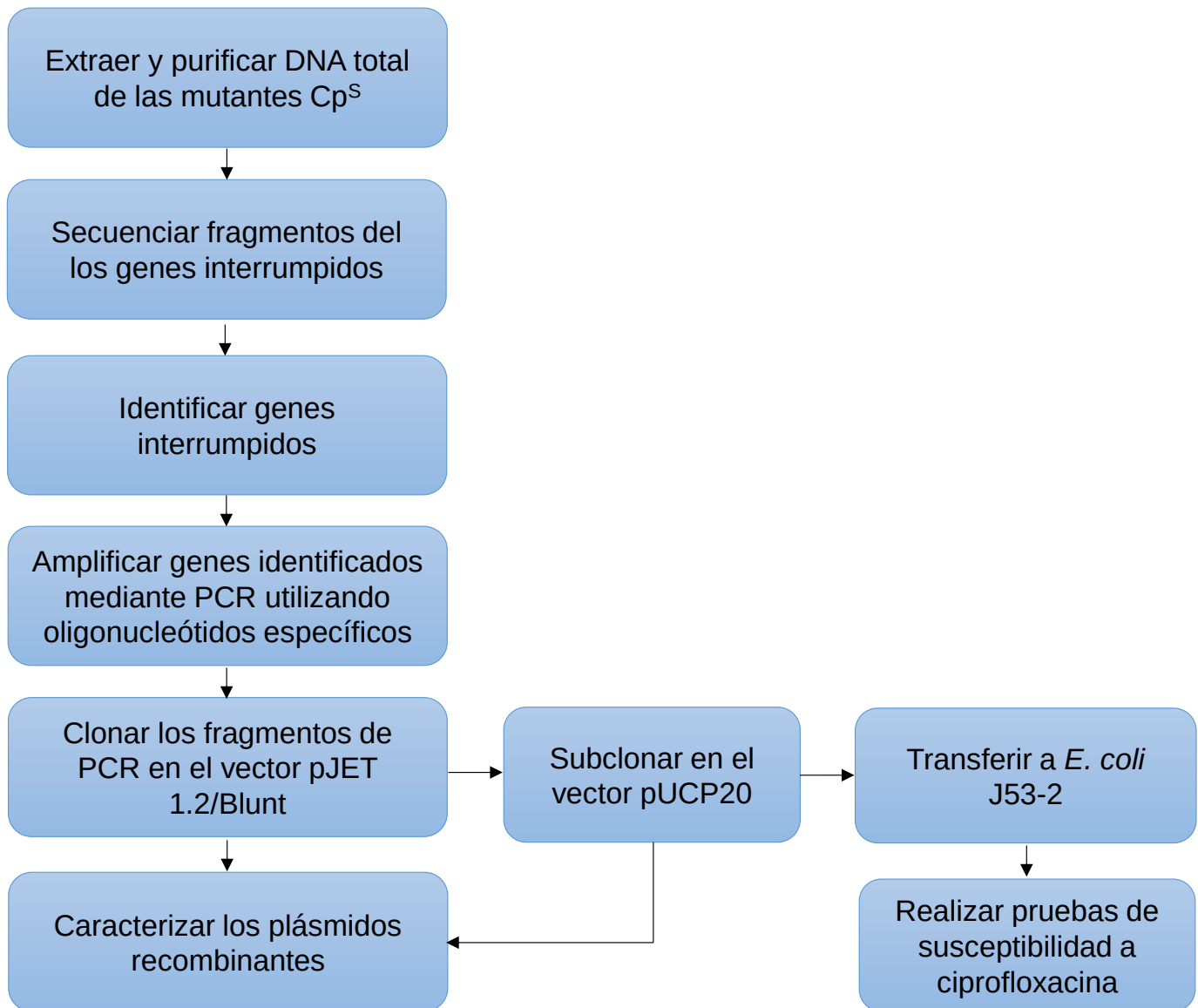
a) Objetivo General

Caracterizar los genes interrumpidos en un grupo de mutantes del plásmido pUM505 sensibles a ciprofloxacina.

b) Objetivos Específicos

- 1.- Identificar los genes interrumpidos en las mutantes de pUM505 Cp^S.
- 2.- Determinar la participación de los genes identificados en el fenotipo de resistencia a ciprofloxacina.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

- Caldo Luria Bertani (CL). Se preparó utilizando los siguientes componentes; NaCl (J. T. Baker) 1%, peptona de caseína (Bioxon) 1% y extracto de levadura (Becton Dickinson) 0.5%.
- Agar Luria Bertani (AL). Se preparó adicionando 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon) al CL.
- Medio mínimo M9 (M9): Sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM (Bioxon), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM (Sigma) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM (Merck) (Sambrook y col., 1989). Adicionalmente, se complementó con peptona de caseína (Bioxon) 0.1%.

2. Cepas empleadas

Las cepas empleadas fueron las siguientes:

- 1) *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505) (Chávez-Jacobo, 2015). Cr^R , Hg^R , Cp^R , Sm^R .
Cepa que se empleó para obtener el DNA molde utilizado en la amplificación por PCR de los genes de interés.
- 2) *P. aeruginosa* PAO1SR Cp^S mutantes 1 a 6 (**Tabla 1**). Cr^R , Hg^R , Cp^S , Sm^R , Gm^R .
Cepas mutantes seleccionadas por su fenotipo de susceptibilidad a ciprofloxacina. Contienen el transposón *HimarI::Gm^R*.
- 3) *E. coli* JM101 [F^- , traD36, proAB, lacIqDM15], thi, D (lac-proAB) (Yanisch-Perron y col., 1985). Cepa receptora de los plásmidos recombinantes derivados de los

Tabla 1. Mutantes *P. aeruginosa* PAO1SR Cp^S empleadas

Mutante Cp ^S	Clave numérica	Fenotipo Cp
1	56-93	Hipersensible
2	62-25	Hipersensible
3	95-02	Sensible
4	97-47	Sensible
5	97-44	Sensible
6	105-67	Sensible

(Chávez-Jacobo, 2015)

vectores pJET1.2/Blunt y pUCP20.

- 4) *E. coli* J53-2 [F^- , met^- , pro^- , Nal^R , Rif^R] (Coetzee y col., 1972). Cepa empleada como receptora de los plásmidos recombinantes y en pruebas de susceptibilidad.

3. Plásmidos empleados

Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

- pUM505. Plásmido conjugativo, confiere resistencia a Cr^R , Hg^R y Cp^R (**Figura 8**).
- pJET 1.2/Blunt. Vector que se utilizó para la recuperación de productos de PCR, confiere resistencia a Ap^R (**Figura 12**).
- pUCP20. Vector de expresión binaria que se utilizó para la expresión de los genes de interés, confiere resistencia a Ap^R y Cb^R (**Figura 13**).

4. Oligonucleótidos empleados

Para la secuenciación de fragmentos de los genes interrumpidos se utilizó el oligonucleótido MarOUT (Wong y Mekalanos, 2000). Además, se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los siguientes genes: *hop* y *orf43*. Las secuencias de los oligonucleótidos y sus características se enlistan en la **Tabla 2**.

5. Purificación de DNA total

Se recuperó la pastilla celular de un cultivo bacteriano de 4 ml crecido durante toda la noche, centrifugando 3 min y desechando el sobrenadante; la pastilla se lavó con 1 ml de solución TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM). Se resuspendió la pastilla en 450 μ l de solución TE, se agregó 20 μ l de lisozima (20 mg/ml), se mezcló y se incubó 30 min a 37°C. Se adicionaron 25 μ l de pronasa (pronasa E o proteinasa K, 20 mg/ml), se mezcló e incubó 15 min a 37°C. Se agregaron 50 μ l de SDS 10%, se mezcló e incubó 15 min a 37°C. Se

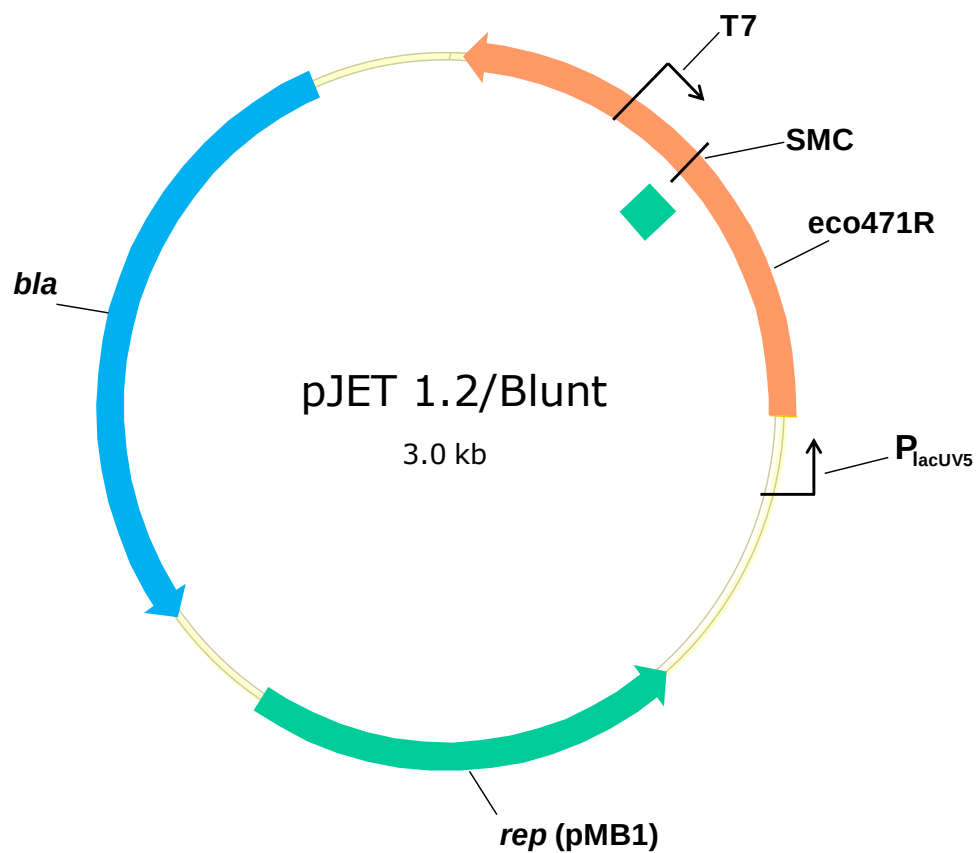


Figura 12. Mapa del vector pJET 1.2/Blunt. El vector contiene el gen *bla* de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para *E. coli* rep (pMB1), el gen letal *eco471R* que permite la selección positiva de las transformantes con el inserto en el vector, el promotor T7 para la transcripción *in vitro* del inserto y el promotor PlacUV5 para la expresión del gen *eco471R* a un nivel suficiente para permitir la selección positiva y un sitio múltiple de clonación (SMC) (Fermentas).

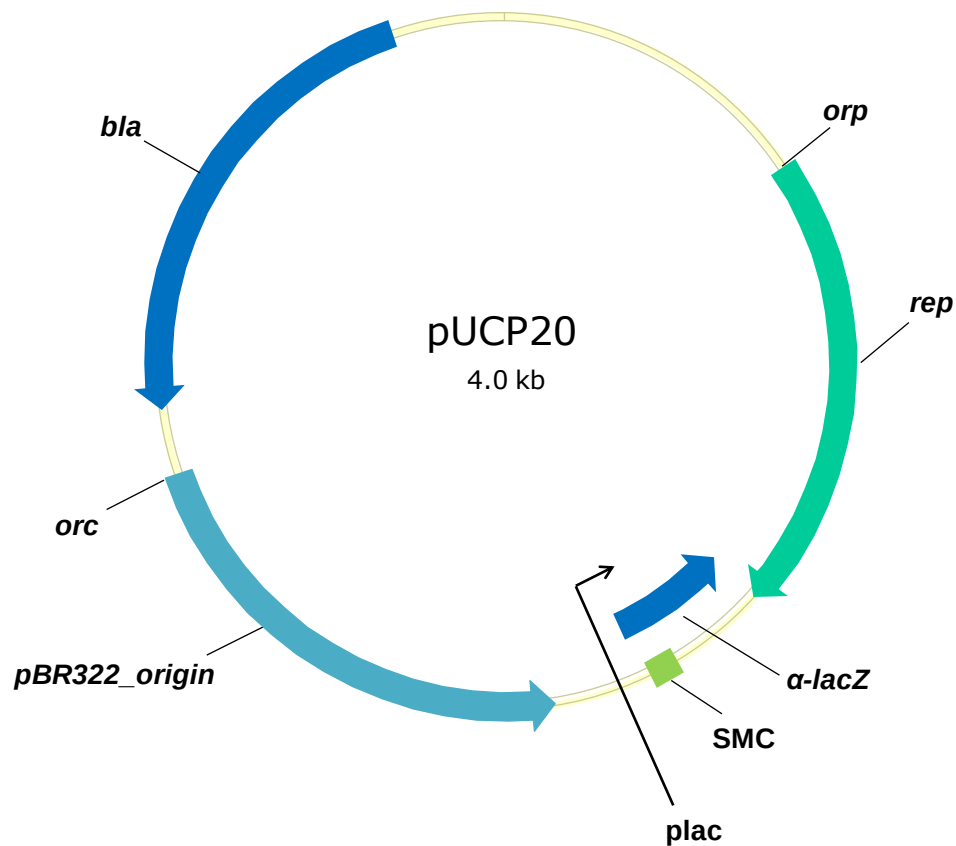


Figura 13. Mapa del vector de expresión binaria pUCP20. El vector contiene el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina y carbenicilina; orígenes de replicación para *E. coli* (*orc*) proveniente del plásmido pBR322 (*pBR322_origin*) y *P. aeruginosa* (*orp*); el gen *rep*, que codifica una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; α -*lacZ*, parte del gen que codifica la región amino terminal de la β -galactosidasa; el promotor *plac* y un sitio múltiple de clonación (SMC) (West y col., 1994).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Enzima
* Dir-hop	AGG <u>AAG CTT</u> ACG ATC CGT ATC GCG G	<i>HindIII</i>
* Rev-hop	ACG ACC ACG <u>AAT TCC</u> TCA ACC CTC T	<i>EcoRI</i>
Dir-orf43	ATC GCC CTG ATT <u>CTA GAC</u> CGC A	<i>XbaI</i>
Rev-orf43	CCG AAC <u>CGA ATT</u> CGG AGC ACA C	<i>EcoRI</i>
# MarOUT	CCG GGG ACT TAT CAG CCA ACC	-

Se indica la secuencia y el sentido de los oligonucleótidos empleados: Dir (directo) y Rev (reverso). Se encuentra subrayado el sitio de corte de la enzima de restricción que se muestra en la columna de la derecha.

*(Rodríguez Andrade, 2015)

#(Wong y Mekalanos, 2000)

calentó la solución de CTAB/NaCl (bromuro de cetiltrimetilamonio 10%/cloruro de sodio 0.7 M) a 65°C. Se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M, se mezcló y se incubó a 65°C por 5 min. Se agregaron 80 µl de solución CTAB/NaCl, se mezcló y se incubó 10 min a 65°C. Se adicionaron 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló hasta homogenizar y se centrifugó 5 min a 10 000 rpm. Se transfirió la fase acuosa y se agregó 500 µl de fenol saturado/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1), se mezcló y centrifugó 5 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó 1 ml de etanol absoluto. Se mantuvo 20 min a -80 °C. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min. Se lavó la pastilla 3 veces con etanol 70%. Se secó la pastilla y se resuspendió en 45 µl de buffer TE, se agregaron 5 µl de RNasa (100 mg/ml) y se incubó a 37°C por 15 min. Se inactivó la RNasa a 65°C durante 15 min. Se corrió de 2-5 µl del DNA purificado en un gel de agarosa.

6. Secuenciación de DNA

El DNA purificado se diluyó a 100 ng/µl y se envió para su secuenciación, utilizando el oligonucleótido MarOUT (**Tabla 2**) a una concentración de 3 µM, a Elim Biopharmaceuticals, Inc. USA.

7. Análisis *in silico* de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de la secuenciación se compararon con la secuencia del plásmido pUM505 empleando el software Vector NTI 11.5 (Life Technologies).

8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El procedimiento de amplificación de los genes de interés, mediante la reacción en cadena

de la polimerasa, se llevó a cabo empleando un termociclador de gradiente MultiGene (Labnet International, Inc.).

Para las reacciones de PCR se utilizó DNA a una concentración aproximada de 200 ng/ml, 10 picomoles de los oligonucleótidos específicos, 5 µl de la mezcla de reacción Master Mix (Promega) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl₂ y dNTPs a concentraciones optimizadas en un volumen final de 10 µl. Para la amplificación de los diferentes genes se siguieron las siguientes especificaciones:

Para el gen *hop*, se utilizaron los oligonucleótidos Dir-hop y Rev-hop (**Tabla 2**), la mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 55.3°C por 30 seg y polimerización a 72°C por 1 min, y finalmente un ciclo de polimerización a 72°C por 5 min.

Para el gen *orf43* se utilizaron los oligonucleótidos directo y reverso correspondientes (**Tabla 2**), la mezcla se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 59°C por 30 seg y polimerización a 72°C por 1.30 min, y finalmente un ciclo de polimerización a 72°C por 5 min.

9. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de los productos de PCR y del DNA plasmídico se realizó en geles de agarosa (Sigma) a una concentración de 1% (p/v); se empleó GelRedTM (Biotium) como colorante en amortiguador TAE [Tris-acetato 0.04 M (pH 7.5) y EDTA (Ácido etilendiamino tetracético) 0.5 M (pH 8.0)]. Los geles se depositaron en una cámara de electroforesis horizontal, conteniendo TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con

solución amortiguadora [azul de bromofenol 0.05%, EDTA 0.1 M (pH 8.0), SDS (dodecil sulfato de sodio) 5% y sacarosa 40%] y se colocaron en los orificios del gel. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje constante de 125 voltios por un periodo de 30-40 min. Posteriormente las bandas teñidas se observaron en un transluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products Inc). Los marcadores de tamaño molecular que se utilizaron fueron el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII* y el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

10. Purificación de DNA en geles de agarosa

Para purificar el DNA que se utilizó en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. La presencia y concentración del DNA recuperado se verificó en un gel de agarosa al 1% (p/v) comparando con el marcador de tamaño molecular.

11. Tratamientos enzimáticos

Para realizar las técnicas de ligación del DNA y posterior clonación en un vector, el DNA tuvo que ser sometido a diferentes tratamientos enzimáticos, los cuales se describen a continuación:

11. 1 Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt

Los productos de PCR se ligaron en el vector pJET 1.2/Blunt manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) empleando el kit comercial CloneJETTM PCR Cloning kit (Fermentas) siguiendo las indicaciones del proveedor.

11.2 Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20

Los fragmentos de DNA purificados se ligaron con el vector pUCP20 manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) utilizando una unidad de la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega). La reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche.

11.3 Restricción con endonucleasas

El DNA purificado se digirió utilizando una unidad de la endonucleasa de restricción (Promega) por cada µg de DNA, se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en geles de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

12. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina

Para el aislamiento de plásmidos se utilizó el método de lisis (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo:

Un cultivo bacteriano crecido en 4 ml de CL durante 18-20 h a 37°C con agitación constante se centrifugó durante 2 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM), y se le adicionó 20 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregó 300 µl de la solución lítica recién preparada (NaOH 0.2 N y SDS 1%), se mezcló suavemente y se mantuvo durante 10 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se le adicionó 300 µl de la solución de acetato de potasio 3 M pH 4.8, se mezcló ligeramente y se mantuvo 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se

adicionaron 500 µl de la mezcla fenol:cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 10 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa superior, se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se mantuvo durante 20 min a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 min a 13 000 rpm a temperatura ambiente. El sedimento se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugando durante 5 min a 12 000 rpm entre cada lavado, se recuperó el sedimento y se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla de DNA obtenida en 50 µl de agua desionizada y estéril. Se adicionó 5 µl de RNasa (100 mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la RNasa incubando 15 min a 65°C. Las muestras se almacenaron a -20°C y se sometieron a corrimientos electroforéticos en geles de agarosa para determinar la presencia del plásmido.

13. Preparación de células competentes de *E. coli* JM101

Para la preparación de células competentes de *E. coli* JM 101 se creció la cepa en 4 ml de CL a 37°C con agitación constante durante 18-24 h. Posteriormente se inoculó 250 ml de CL con los 4 ml del preinóculo y se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 590 nm. Posteriormente el cultivo se colocó en hielo por 20 min y a partir de este punto se mantuvieron siempre a una temperatura cercana a 4°C. Se centrifugó el cultivo por 10 min a 6 000 rpm a 4°C. La pastilla celular se lavó dos veces con 40 ml de agua desionizada, estéril y fría, centrifugando 10 min a 6,000 rpm a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% estéril y frío y se almacenaron en alícuotas de 200 µl a -80°C.

14. Preparación de células competentes de *E. coli* J53-2

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se siguió el método adaptado de Enderle y Farwell, (1988), el cual se describe a continuación:

Se crecieron los cultivos en placas de AL durante 18-24 h a 37°C y posteriormente se transfirió una asada de células con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en 500 µl de agua desionizada estéril y fría. Las células se resuspendieron en vórtex hasta que se formó una mezcla homogénea. Se centrifugó a 12 000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con 500 µl de agua desionizada estéril y fría. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500 µl de glicerol al 10% estéril y frío.

15. Transformación por el método de electroporación

A 100 µl de células competentes se les adicionó 1 µl de DNA a una concentración aproximada de 40 ng/µl; la mezcla se colocó en una celda para electroporación 215 (Eppendorf); la mezcla se sometió a un pulso eléctrico de 1.8 kilovoltios y se transfirió inmediatamente a un tubo con 2 ml de CL incubándose por 1 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl del cultivo en placas de AL selectivo (100 µg/ml de ampicilina para *E. coli* y 400 µg/ml de carbenicilina para *P. aeruginosa*) incubándose a 37°C durante toda la noche.

16. Pruebas de susceptibilidad en medio líquido

De un cultivo de 4 ml de caldo M9 crecido durante la noche se tomaron 40 µl para inocular tubos con 4 ml del medio con concentraciones crecientes de ciprofloxacina (Cp). Los tubos se incubaron 24 h a 37°C con agitación constante y la susceptibilidad se determinó en función de la turbidez de los cultivos al medir la absorbencia a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

VIII. RESULTADOS

1. Identificación de los genes interrumpidos por el transposón *Himar1::Gm^R* en las mutantes Cp^S

Para identificar los genes interrumpidos, se secuenciaron los nucleótidos aledaños al sitio de inserción del transposón *Himar1::Gm^R*, como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Se utilizó el oligonucleótido MarOUT y el DNA extraído y purificado de las 6 mutantes Cp^S disponibles.

Se obtuvieron dos secuencias por cada mutante, correspondiente a la región flaqueada por el transposón. Las secuencias se alinearon con la secuencia del plásmido pUM505 para identificar los genes responsables del fenotipo de susceptibilidad a ciprofloxacina. Se encontró que la inserción del transposón en las seis mutantes Cp^S ocurrió en diferentes regiones del plásmido. Las regiones del plásmido pUM505 donde fue localizado dicho transposón fueron: en la mutante 1, *orf45*, *virD4*, *orf47*, *orf48* y *orf49*; en la mutante 2, *hop*, *orf43* y *orf44*, en la mutante 3, *orf65*, *orf66*, *bin*, *merE*, *merD* y *merA*; en la mutante 4, *orf85*, *orf86* y *orf87*; en la mutante 5, *orf96* y *orf97* y en la mutante 6, *araC* y *orf85* (Figura 14).

2. Análisis *in silico* de las proteínas codificadas por los genes identificados en las mutantes Cp^S

Para determinar si las proteínas codificadas por los genes interrumpidos en las mutantes Cp^S tienen similitud con proteínas ya reportadas se realizó una búsqueda tipo BLAST.

Los resultados del análisis se resumen en la **Tabla 3**, donde se muestra el nombre del gen, el tamaño de la proteína que codifica, la descripción de la posible función de la proteína, el

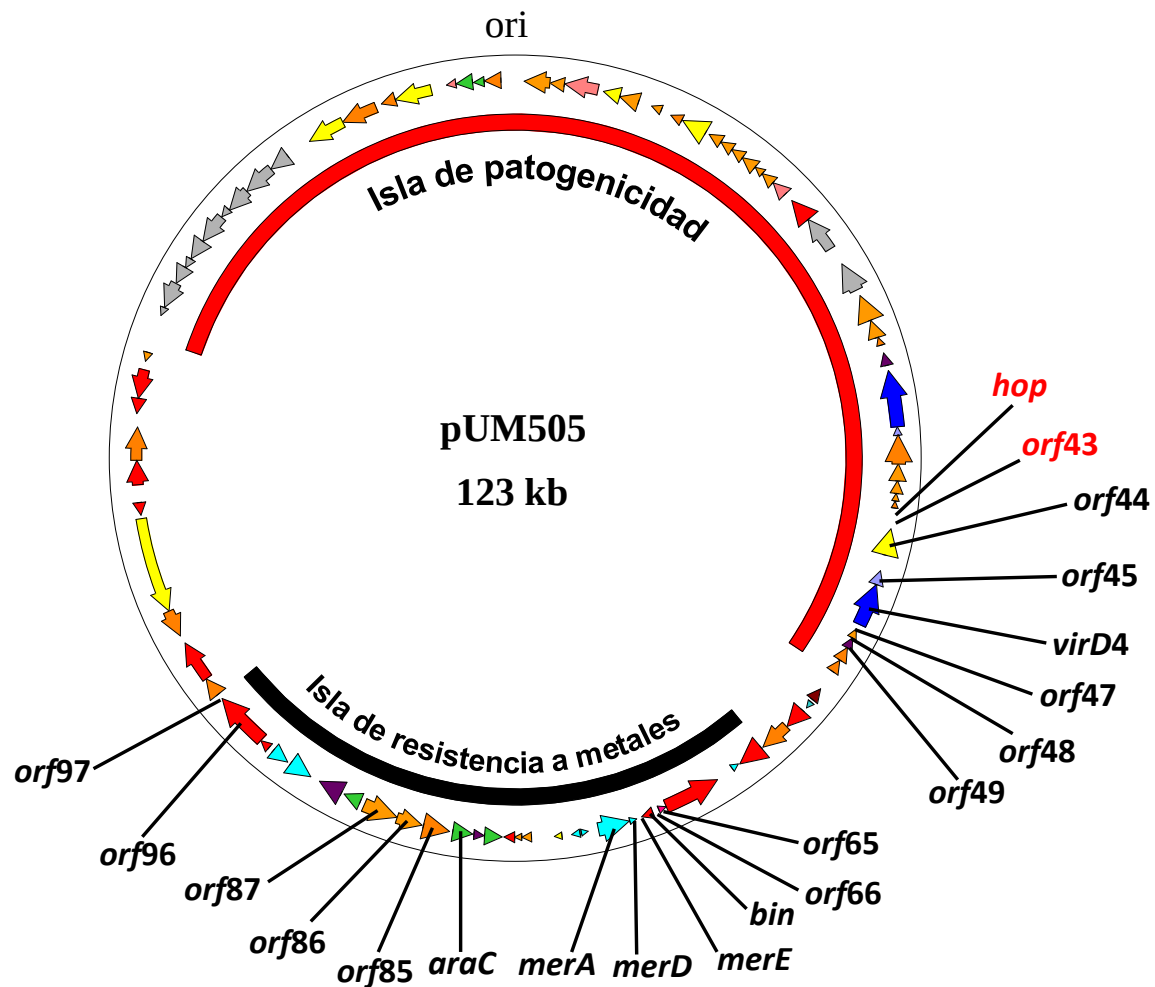


Figura 14. Localización en el mapa genético del plásmido pUM505 de los genes identificados en las mutantes Cp^S . Esquema del mapa genético del plásmido pUM505 donde se indican los genes identificados en las mutantes Cp^S (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011). Se marcan con rojo los genes seleccionados para análisis posteriores.

Tabla 3. Funciones predichas para los productos de los genes identificados en las mutantes Cp^S

Gen/orf	Tamaño (aa)	Descripción	Identidad (%)
<i>hop</i>	112	Efector tipo III (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>orf43</i>	101	Aconitasa B (<i>P. aeruginosa</i>)	80
<i>orf44</i>	493	Helicasa (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>orf45</i>	245	Proteína de membrana (<i>P. aeruginosa</i>)	99
<i>virD4</i>	743	Proteína del sistema de secreción tipo IV (<i>P. aeruginosa</i>)	98
<i>orf47</i>	89	TDP-glucosa oxidoreductasa (<i>P. aeruginosa</i>)	99
<i>orf48</i>	166	Proteína hipotética (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>orf49</i>	193	Transglicosilasa lítica (<i>P. aeruginosa</i>)	99
<i>orf65</i>	136	Proteína de motilidad (<i>Pseudomonas</i>)	100
<i>orf66</i>	79	Proteína hipotética (<i>Pseudomonas</i>)	100
<i>bin</i>	204	Transposasa (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>merE</i>	78	Proteína de resistencia a mercurio (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>merD</i>	121	Regulador transcripcional (<i>Pseudomonas</i>)	100
<i>merA</i>	548	Reductasa mercúrica (<i>Proteobacteria</i>)	100
<i>araC</i>	348	Regulador transcripcional (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>orf85</i>	463	Proteína de membrana (<i>Cupriavidus metallidurans</i>)	43
<i>orf86</i>	448	Proteína hipotética (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>orf87</i>	606	Lipoproteína (<i>P. aeruginosa</i> PA7)	38
<i>orf96</i>	720	Integrasa (<i>P. aeruginosa</i>)	100
<i>orf97</i>	41	Proteína hipotética (<i>P. aeruginosa</i>)	100

Base de datos consultada en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

organismo donde se encontró y el porcentaje de identidad que presenta.

3. Clonación de los genes *hop* y *orf43*

Para continuar con el análisis, se seleccionaron los genes *hop* (mutante 2) y el *orf43* (mutante 5), que fueron identificados en las mutantes Cp^S. Para comprobar si los genes están relacionados con el fenotipo de susceptibilidad del plásmido pUM505, los genes se amplificaron por PCR, se clonaron en el vector pJET 1.2/blunt y se transfirieron a la cepa *E. coli* J53-2. A las transformantes se les realizaron pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina.

Con la finalidad de verificar la correcta ligación de los genes en el vector pJET 1.2/blunt se realizó la digestión con las enzimas de restricción correspondientes de cada gen (**Tabla 2**).

- pJET_*hop* (**Figura 15A**), se obtuvieron fragmentos esperados de aproximadamente 2.7, 0.81 y 0.25 kb (**Figura 15C**).
- pJET_*orf43* (**Figura 16A**), se obtuvieron los fragmentos de aproximadamente 2.9 y 0.3 kb (**Figura 16C**).

4. Subclonación de los genes seleccionados en el vector pUCP20

Con la finalidad de realizar pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina en *E. coli* J53-2 se realizó la subclonación de los genes en el vector de expresión binaria pUCP20. Para ello se realizó la digestión de los plásmidos con las enzimas correspondientes (**Tabla 2**), liberando los insertos y de esta manera poder dirigir la ligación de los genes en el vector pUCP20 de acuerdo al método descrito en Materiales y Métodos. Se obtuvieron los plásmidos recombinantes pUC_ *hop* (**Figura 17A**) y pUC_ *orf43* (**Figura 18A**), que originaron los fragmentos de restricción del tamaño esperado (**Figuras 17B y 18B**), los cuales se

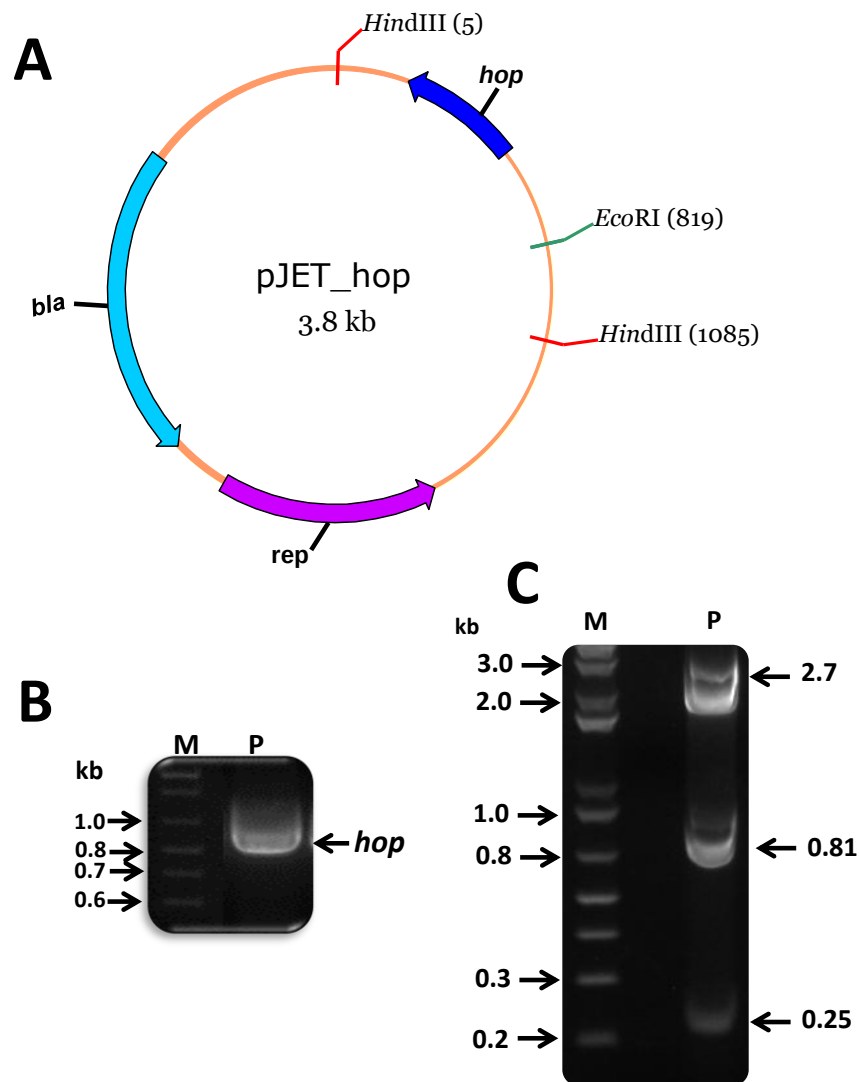


Figura 15. Clonación de *hop* en el vector pJET 1.2/Blunt. **A.** Mapa genético del plásmido pJET_hop. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y su posición entre paréntesis. **B.** Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR de *hop*. **C.** Digestión enzimática del plásmido pJET_hop. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de digestión enzimática con las enzimas *EcoRI/HindIII*; en el lado derecho se muestran las bandas del tamaño esperado de aproximadamente 2.7, 0.81 y 0.25 kb.

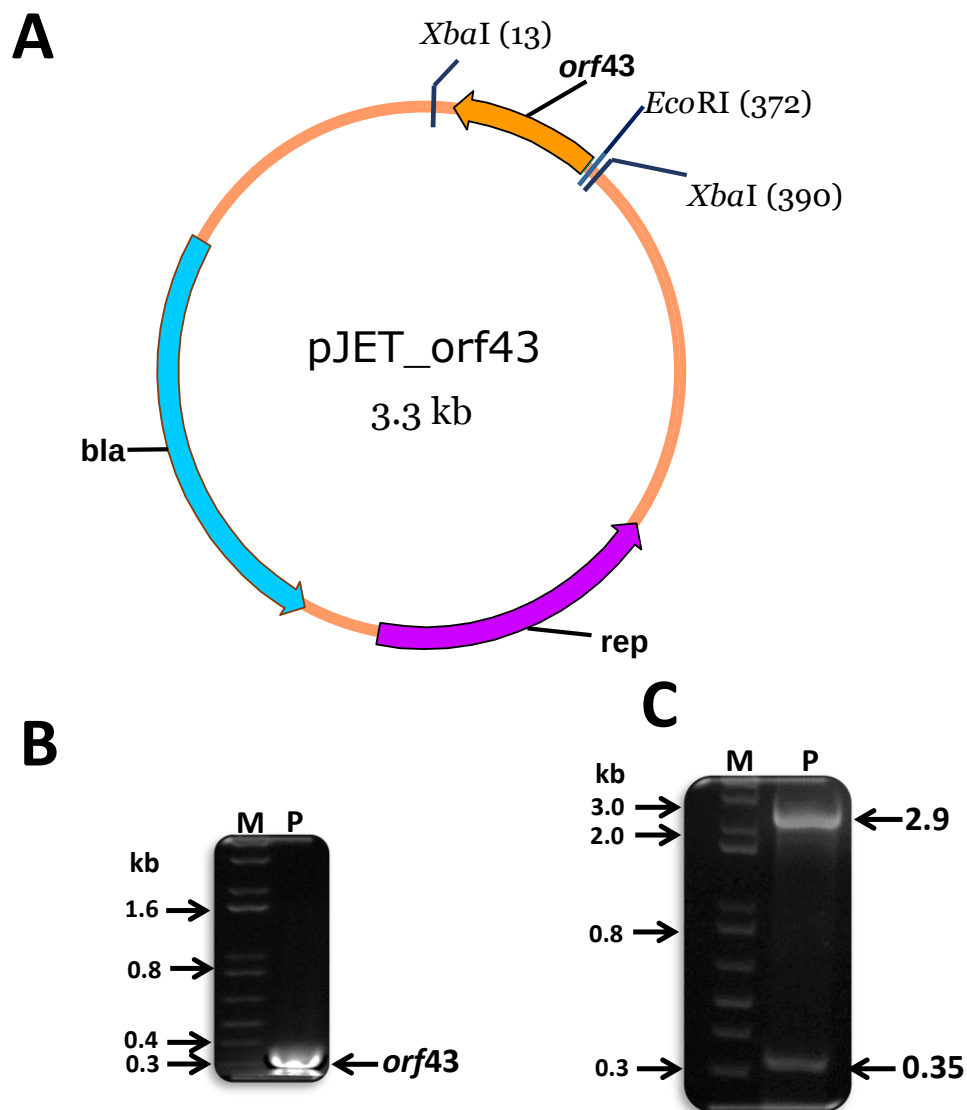


Figura 16. Clonación del *orf43* en el vector pJET 1.2/Blunt. **A.** Mapa genético del plásmido pJET_orf43. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xba*I, y su posición entre paréntesis. **B.** Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR de *orf43*. **C.** Digestión enzimática del plásmido pJET_orf43. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de digestión enzimática con las enzimas *Eco*RI/*Xba*I; en el lado derecho se muestran las bandas del tamaño esperado de aproximadamente 2.9 y 0.35 kb.

utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* JM101. La verificación de la subclonación de los genes en el vector se llevó a cabo mediante amplificación por PCR.

5. Pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina de las transformantes con los genes *hop* y *orf43*

Para comprobar si *hop* y el *orf43* están relacionados con el fenotipo de susceptibilidad a ciprofloxacina, se realizaron los ensayos de susceptibilidad al antibiótico en medio líquido. Los plásmidos recombinantes fueron transferidos a la cepa *E. coli* J53-2 y se utilizó como control sensible la cepa *E. coli* J53-2 (pUCP20).

En las pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina, se observó lo siguiente:

- La transformante *E. coli* J53-2 (pUC_*hop*) presentó un crecimiento ligeramente mayor comparado con control sensible (**Figura 19 A**).
- La transformante *E. coli* J53-2 (pUC_*orf43*) presentó un crecimiento claramente mayor en comparación con el control sensible (**Figura 19B**).

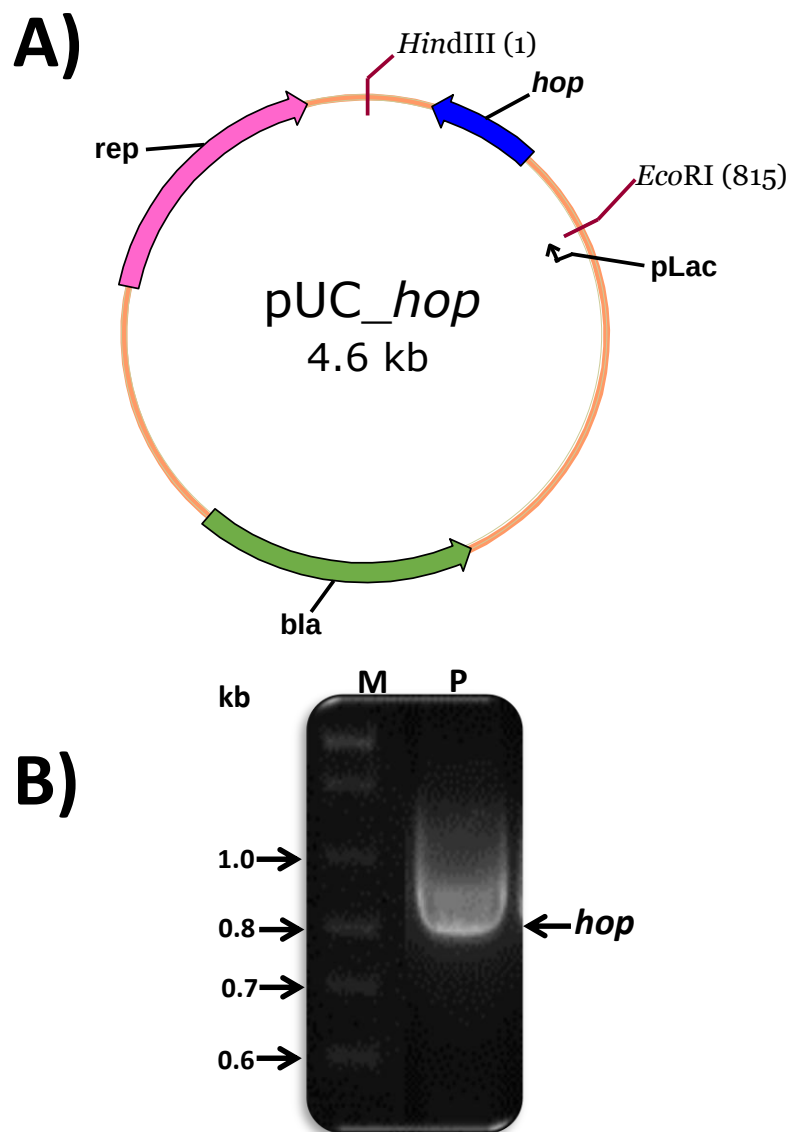


Figura 17. Subclonación de *hop* en el vector pUCP20. A. Mapa genético del plásmido pUC_hop. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y su posición entre paréntesis. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de la restricción enzimática. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de restricción enzimática con las enzimas *EcoRI/HindIII* verificado mediante PCR; en el lado derecho se muestra la banda del tamaño esperado de aproximadamente 0.81 kb.

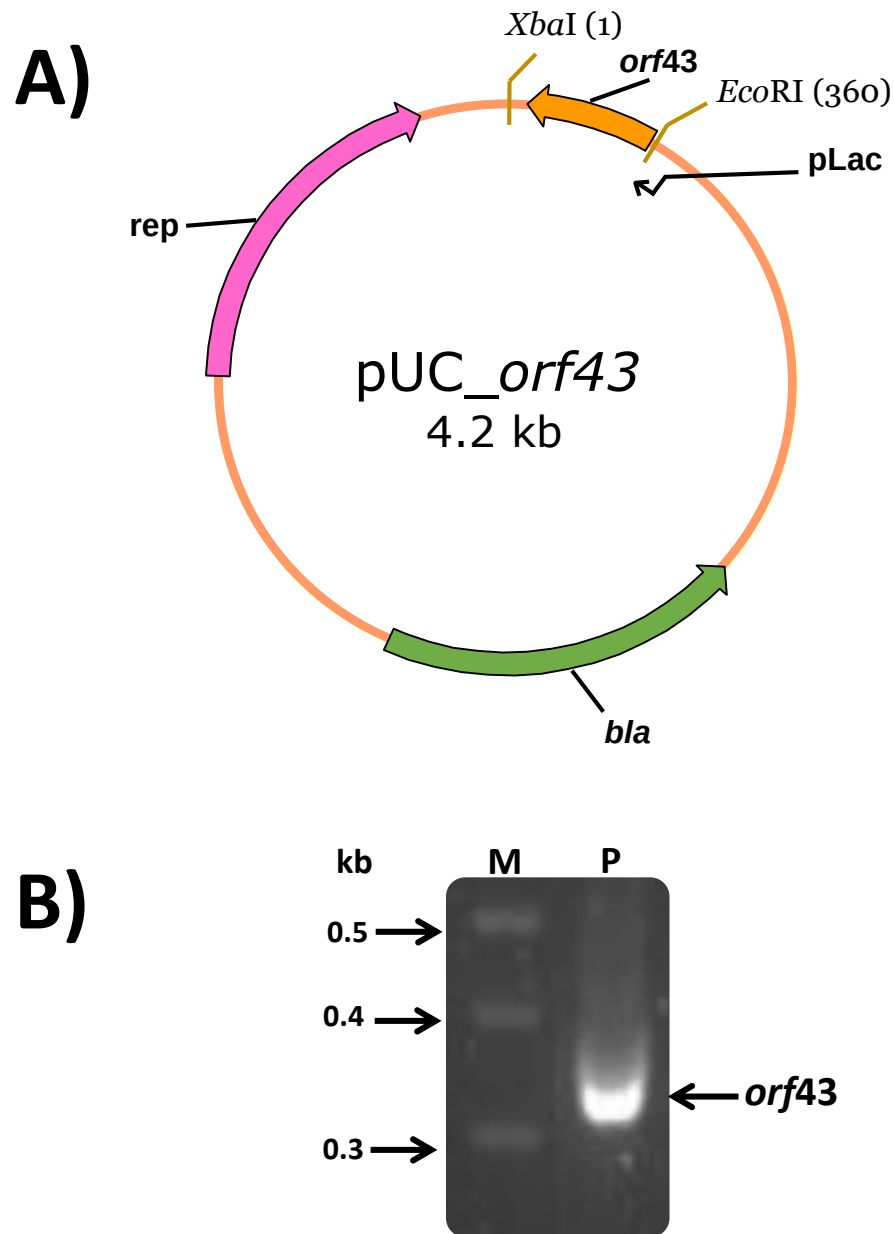


Figura 18. Subclonación del *orf43* en el vector pUCP20. **A.** Mapa genético del plásmido pUC_*orf43*. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, y su posición entre paréntesis. **B.** Gel de agarosa donde se muestra el producto de la restricción enzimática. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de restricción enzimática con las enzimas *EcoRI/HindIII* verificado mediante PCR; en el lado derecho se muestra la banda del tamaño esperado de aproximadamente 0.35 kb.

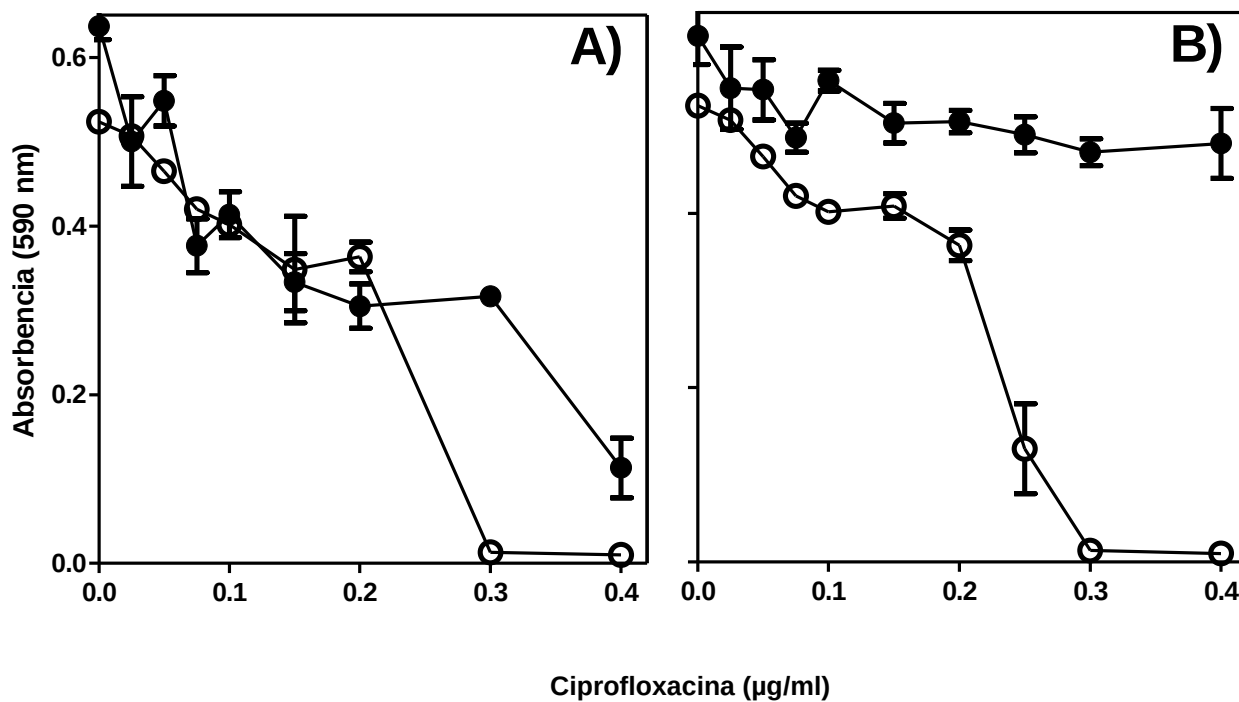


Figura 19. Susceptibilidad a ciprofloxacin de las transformantes de *E. coli* J53-2. Los cultivos se crecieron en medio M9 por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adiciono ciprofloxacin a las concentraciones indicadas. (A) *E. coli* J53-2 (pUCP20) (○) y *E. coli* J53-2 (pUC_hop) (●). (B) *E. coli* J53-2 (pUCP20) (○) y *E. coli* J53-2 (pUC_orf43) (●). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=6.

IX. DISCUSIÓN

Actualmente las quinolonas forman parte de los antibióticos más comúnmente prescritos para el tratamiento de infecciones causadas por Enterobacterias (Aldred y col., 2014). Una de las quinolonas más empleadas es ciprofloxacina (**Figura 3B**), que además presenta actividad contra las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp (Redgrave y col., 2014). El extenso uso de este compuesto ha generado la aparición de bacterias capaces de resistir su acción (Hernández y col., 2011). Actualmente, los sistemas de resistencia a esta familia de antibióticos se encuentran ampliamente distribuidos y podemos dividirlos en dos grupos (Aldred y col., 2014) (**Figura 7**):

Los sistemas plasmídicos han sido reportados en las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *K. pneumoniae*; sin embargo, hasta el momento no se han reportado sistemas de resistencia a quinolonas codificados por genes plasmídicos en *P. aeruginosa* (Wong y Kassen, 2011).

En nuestro grupo de trabajo se aisló el plásmido pUM505 de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1986; Cervantes y Ohtake, 1988) y se determinó que cuando es transferido a la cepa estándar de laboratorio *P. aeruginosa* PAO1 confiere resistencia a ciprofloxacina (**Figura 9**); sin embargo, al analizar la secuencia del plásmido (**Figura 8**), no se identificaron genes de resistencia a quinolonas reportados hasta el momento (Ramírez-Díaz y col., 2011).

La caracterización de mutantes sensibles a ciprofloxacina generadas por transposición al azar de la cepa *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505) permitió la identificación de los genes *orf57* (*xerC*), *orf58*, *orf59* (*xerC*) y el *orf87*, como los responsables del fenotipo de susceptibilidad a ciprofloxacina. La mutante interrumpida en el *orf57* fue transformada con el gen *orf57* (*xerC*) silvestre y se realizaron pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina. Se

observó que el fenotipo de la mutante fue restablecido por la presencia del gen, la transformante mostró mayor crecimiento que la cepa mutante (**Figura 11**), por lo que se concluyó que el gen *xerC* del plásmido pUM505 está relacionado con el fenotipo de resistencia a ciprofloxacina (Chávez-Jacobo, 2015). El análisis de la secuencia del producto codificado por el *orf57* indicó que éste codifica a una recombinasa sitio específica, sugiriendo que dicha proteína participa en la separación de los cromosomas al finalizar la replicación del DNA cuando la topoisomerasa IV es inhibida por la ciprofloxacina (Chávez-Jacobo, 2015).

Con el propósito de determinar qué otros genes de pUM505 participan en la resistencia a ciprofloxacina, en este trabajo se llevó a cabo la identificación y la caracterización de los genes interrumpidos en un grupo de mutantes sensibles a ciprofloxacina (Cp^S) derivadas de *P. aeruginosa* PAO1SR (pUM505).

El análisis de la secuencia de DNA de las mutantes Cp^S caracterizadas indicó que la inserción del transposón ocurrió como se muestra en la **Figura 14**. La identificación de varios genes relacionados con el fenotipo de sensibilidad en las mutantes Cp^S analizadas, confirma la idea de que el plásmido pUM505 posee múltiples sistemas de resistencia al antibiótico (Chávez-Jacobo, 2015).

El análisis BLAST de las proteínas codificadas por los genes identificados en las mutantes Cp^S mostró que las proteínas codificadas por los *orfs* 48, 66, 86 y 97 poseen identidad con proteínas hipotéticas, mientras que el resto de las proteínas identificadas presentan identidad con proteínas con función predicha. Cabe mencionar que a excepción de los productos de los *orfs* 85 y 87 el resto de las proteínas mostró valores de identidad superior a 98% con proteínas predichas (**Tabla 3**), identificadas en *P. aeruginosa*; sin embargo, este

resultado no es de sorprender, debido a que el plásmido pUM505 se aisló de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1986).

El análisis de las secuencias aledañas al sitio de inserción del transposón en las mutantes permitió la identificación de genes probablemente responsables del fenotipo de sensibilidad a ciprofloxacina. Los genes identificados en la mutante 1 codifican en su mayoría a proteínas previamente relacionadas con sistemas de virulencia. El gen *virD4* (*orf46*) codifica a la proteína VirD4. La proteína VirD4 de *P. aeruginosa* PA14 forma parte del sistema de secreción tipo IV; es una ATPasa que se encarga de energizar el sistema de secreción (Fink, 1993). El *orf49* se predice que codifica a una Transglicosilasa lítica, proteínas que forman parte del sistema de secreción tipo III, el cual lleva a cabo la remodelación de la pared celular que permite el ensamblaje del sistema de secreción (Greenberg y Vinatzer, 2003). Por otra parte, el *orf47* codifica a una proteína con identidad a proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa, mientras que el *orf48* codifica a una proteína hipotética; ambas proteínas probablemente no están relacionadas con la resistencia a ciprofloxacina. Finalmente, el *orf45* codifica una proteína de membrana, lo que sugiere que podría llevar a cabo la expulsión de ciprofloxacina y de esta manera conferir resistencia. Está ampliamente descrito que los sistemas membranales de expulsión MexAB-OprM de *P. aeruginosa* participan en la resistencia a ciprofloxacina a través de la expulsión del antibiótico al exterior de la célula (Martínez y col., 2009).

Entre los genes identificados en la mutante 2 se encuentra *hop* (*orf42*), que probablemente codifica a una proteína efectora del sistema de secreción tipo III. En *Pseudomonas syringae*, la proteína Hop es transferida a células vegetales por el sistema de secreción tipo III produciendo daño celular (Greenberg y Vinatzer, 2003). Sin embargo, esta proteína

efectora no ha sido relacionada con resistencia a antibióticos. El *orf43* codifica una aconitasa B, enzima que se encarga de la isomerización del citrato a isocitrato a través de cis-aconitato en el ciclo de Krebs; sin embargo, también se ha descrito su papel como regulador transcripcional bajo condiciones de estrés oxidativo (Pechter y col., 2013), como el producido por la acción de ciprofloxacina. El *orf44* codifica una Helicasa, este tipo de proteínas están relacionadas con el metabolismo del DNA al llevar a cabo la separación de la doble hélice; sin embargo, no se han relacionado con el mecanismo de resistencia a ciprofloxacina.

El grupo de genes *merE*, *merD* y *merA* identificados en la región de inserción del transposón de la mutante 3 se relacionan con el sistema de resistencia a mercurio que contiene el plásmido pUM505 (**Figura 8**). Además, se identificó en esta región al *orf65* que codifica a una proteína que se relaciona con la motilidad; el *orf66* codifica una proteína hipotética y el gen *bin* (*orf67*) codifica una probable transposasa. Si bien esta mutante presenta un fenotipo de sensibilidad a ciprofloxacina, ninguno de los genes identificados ha sido previamente relacionado con la resistencia a ciprofloxacina.

En la mutante 4 se identificaron los genes *orf85*, *orf86* y *orf87*, que ya se habían identificado anteriormente en otras mutantes sensibles a ciprofloxacina (Chávez-Jacobo, 2015). Estos genes podrían codificar proteínas de membrana y debido a que estos sistemas se relacionan con la expulsión de diferentes fármacos, se sugiere que los productos de los genes identificados en esta mutante podrían conferir resistencia a ciprofloxacina mediante la expulsión de dicho fármaco.

Los genes identificados en la mutante 5 corresponden a una integrasa codificada en el *orf96* y a una proteína hipotética codificada en el *orf97*. El *orf96* fue previamente relacionado con

la resistencia a ciprofloxacina (Chávez-Jacobo, 2015). La topoisomerasa IV y las integrasas pertenecen a la familia de las topoisomerasas; estas enzimas pueden romper y unir moléculas de DNA (Yang, 2010). Por lo tanto, se sugiere que la integrasa codificada por el *orf96* podría suplir la función de las topoisomerasas inhibidas por la acción de las quinolonas.

Finalmente, en la mutante 6 se identificó nuevamente el *orf85*, previamente descrito. Además, en esta mutante se identificó al gen *araC* que codifica a una proteína con identidad al regulador transcripcional del operón de arabinosa AraC, y esto sugiere que el gen *orf85* es el que está relacionado con el fenotipo de sensibilidad en esta mutante.

Con el propósito de determinar la participación de manera individual de los genes identificados en la resistencia a ciprofloxacina se determinó analizar la participación de *hop* y del *orf43*. El *orf43* al regular la expresión de genes (Pechter y col., 2013); además se decidió probar el gen *hop* debido a que en el grupo de trabajo se contaba ya con los oligonucleótidos necesarios para su amplificación mediante PCR (Rodríguez-Andrade, 2015). *hop* y el *orf43*, fueron amplificados por PCR, clonados en el vector pUCP20 y transferidos a *E. coli* J53-2, donde se realizaron pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina.

La razón por la que se empleó la cepa de *E. coli* J53-2 se debe a que ésta posee una mutación en el gen que codifica la subunidad GyrA de la DNA girasa, lo cual le confiere resistencia a quinolonas, y ha sido reportado que los sistemas de resistencia a quinolonas no son mutuamente excluyentes, es decir, una cepa puede acumular estos sistemas para exhibir un alto nivel de resistencia (Aldred y col., 2014). De esta manera, si el sistema que transferimos confiere un nivel de resistencia bajo, al estar acompañado de otro sistema,

como el que ya posee la cepa J53-2, sería más fácil de detectar en una prueba de susceptibilidad en medio líquido.

En el caso de la prueba de susceptibilidad a ciprofloxacina realizada para la transformante *E. coli* J53-2 (pUC_hop) (**Figura 19A**), se observó un crecimiento ligeramente mayor en comparación al control sensible, al menos en las dos concentraciones mayores, por lo que se concluye que el gen *hop* confiere resistencia a ciprofloxacina cuando se transfiere a *E. coli*. Sin embargo, debido a que el gen *hop* codifica un efector del sistema de secreción tipo III que está relacionado con la virulencia de *P. aeruginosa* (Rodríguez-Andrade, 2015), no es posible establecer una relación entre el fenotipo conferido por este gen y su función.

Por otro lado, la transformante *E. coli* J53-2 (pUC_orf43) (**Figura 19B**) presentó un crecimiento claramente mayor en comparación con el control sensible en la curva de susceptibilidad a ciprofloxacina, lo cual nos indica que el *orf43*, que codifica una aconitasa B, confiere resistencia a ciprofloxacina cuando se transfiere a *E. coli*. Se ha reportado la actividad de la aconitasa B como regulador transcripcional cuando la célula se encuentra bajo condiciones de estrés oxidativo, como el que se induce por la presencia de ciprofloxacina (Pechter y col., 2013). Por lo tanto, se sugiere que la aconitasa B codificada por el *orf43* del plásmido pUM505 confiere resistencia a quinolonas al regular la síntesis de ciertas proteínas.

Se ha reportado que la capacidad de *P. aeruginosa*, fuente original del plásmido pUM505, para adaptarse tanto al estrés del medio ambiente como al ejercido por la terapia con antibióticos, se relaciona con el tamaño de su genoma (6.3 megapares de bases) y el gran número de genes que codifican reguladores transcripcionales (Cirz y col., 2006). La

regulación de genes relacionados con la replicación o reparación de DNA, podrían ser los genes que estarían bajo la regulación del producto codificado por el *orf43* del plásmido pUM505 y, de manera indirecta, conferir la resistencia a ciprofloxacina observada en las pruebas de susceptibilidad (**Figura 19B**).

Con base a lo realizado en este trabajo se ha determinado que el plásmido pUM505 posee diversos genes que participan en la resistencia a ciprofloxacina.

X. CONCLUSIÓN

El plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* posee genes que codifican diversos mecanismos de resistencia a ciprofloxacina, brindando una ventaja adaptativa a las bacterias que contienen dicho plásmido.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Aldred, K. J., Kerns R. J. y Osherooff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53: 1565-1574.
- Alekshun, M. N. y Levy, S. B. (1999). Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *J Bacteriol* 181: 4669-4672.
- Andersson, M. I. y MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 Suppl 1: 1-11.
- Andriole, V. T. (1999). The future of the quinolones. *Drugs* 45 (Suppl 3):1-7.
- Andriole, V. T. (2005). The quinolones: past, present and future. *Clin. Infect. Dis.* 41 Suppl 2: 113-119.
- Ball, P., Fernald, A. y Tillotson, G. (1998). Therapeutic advances of new fluoroquinolones. *Expert Opin. Investig. Drugs* 7: 761-783.
- Battle, S. E., Meyer, F., Rello, J., Kung, V. L. y Hauser, R. (2008). Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J. Bacteriol.* 190: 7130-7140.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Breidenstein, E. B. M., Khaira, B. K., Wiegand, I., Overhage J. y Hancock, E. W. (2008). Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 4486-4491.
- Brighty, K. E. y Gootz, T. D. (2000). Chapter 2: Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. En Andriole V., T., ed. The quinolones 3rd ed. San Diego: Academic Press.
- Cambau, E., Perani, E., Dib, C., Petinon, C., Trias, J. y Jarlier, V. (1995). Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to Imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2248-2252.
- Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173-176.
- Cervantes-Vega, C., Chávez, J., Córdova, NA., De la Mora, P. y Velasco, J. A. (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48: 159-163.

Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 369-413.

Chávez-Jacobo, V. M. (2015). Identificación de genes del plásmido pUM505 implicados en la resistencia a quinolonas. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.

Cirz, R. J., O'Neill, B. J., Hammond, J. A., Head, S. R. y Romesberg, F. E. (2006). Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol* 188: 7101-7110.

Coetzee, J. N., Datta, N. y Hedges, R. W. (1972). R factor from *Proteus rettgeri*. *J. Gen. Microbiol.* 72: 543-552.

Crumplin, G. C. y Smith, J. T. (1976). Nalidixic acid and bacterial chromosome replication. *Nature* 260: 643-645.

Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A. y Zhao X. (2009). Quinolones: actions and resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem.* 9: 981-998.

Emmerson, A. M. y Jones, A. M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 13-20.

Enderle, P. J. y Farwell, M. A. (1988). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25: 955-958.

Fink, R. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* the opportunist: pathogenesis and disease, 2nd ed. University of Iowa, College of Medicine, Iowa city, Iowa.

Friedman, S. M., Lu, T. y Drlica, K. (2001). Mutation in the DNA gyrase a gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2378-2380.

Greenberg, J. T. y Vinatzer, B. A. (2003). Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plants cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 20-28.

Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A. H. y Sorensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3332-3337.

Hernández, A., Sánchez, M. B. y Martínez J. L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front. Microbiol.* 2: 1-6.

Hoiby, N. (2011). Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Medicine* 9: 1-7.

Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect.* 32: S9-S15.

- Ish-Horowics, D. y Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.
- Khodursky, A. B., Zechiedrich, E. I. y Cozzarelli, N. R. (1995). Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 92: 11801-11805.
- Khodursky, A. B. y Cozzarelli N. R. (1998). The mechanism of inhibition of Topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* 273: 27668-27677.
- Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X., Sawhney, R., Thompson, A. W., McAuley, K. E., Fisher, L. M. y Sanderson, M. R. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 667-669.
- Leo, E., Gould, K., Pan, S., Capranico, G., Sanderson, M., Palumbo, M. y Fisher, L. M. (2005). Novel symmetric and asymmetric DNA scission determinants for *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV and gyrase are clustered at the DNA breakage site. *J. Biol. Chem.* 280: 14252-14263.
- Leshner, G. Y., Froelich, E. J. Gruett, M. D., Bailey, J. H. y Brundage R. P. (1962). 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* 5: 1063-1068.
- Levy, S. B. y Marshall, B. (2014). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10 Suppl 12: 122-129.
- Martínez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276: 2521-2530.
- Martínez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernández, A., Garmendia, L., Fajardo, A. y Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 430-449.
- Martínez, M. L., Pascual, A. y Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351: 797-799
- Mizuuchi, K., Fisher, L. M., O'Dea, M. y Gellert, M. (1980). DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1847-1851.
- Pechter, K. B., Meyer, F. M., Serio, A. W., Stulke, J. y Sonenshein, A. L. (2013). Two roles of aconitase in the regulation of tricarboxylic acid branch gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 195: 1525-1537.
- Peterson, L. R. (2001). Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin. Infect. Dis.* 33 Suppl 3: 180- 186.

Piddock, L. J., Walters, R. N. y Diver, J. M. (1990). Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2331-2336.

Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 629-636.

Poirel, L., Cattoir, V. y Nordmann, P. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance: interactions between human, animal, and environment ecologies. *Front. Microbiol.* 3: 1-7.

Qin, X. y Huang, H. (2014). Review of nemonoxacin with special focus on clinical development. *Drug Des. Devel. Ther.* 8: 765-774.

Ramírez-Díaz, M. I., Diaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C. y Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid* 66: 7-18.

Redgrave, S. L., Sutton, B. S., Webber, A. M. y Piddock, J. L. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 22: 438-445.

Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K. y Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside-acetyltransferase. *Nat. Med.* 12: 83-88.

Rodríguez-Andrade, E. (2015). Identificación de los genes del plásmido pUM505 que participan en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.

Rojas-Rojas, F. U. (2012). Identificación de genes del plásmido pUM505 involucrados en la resistencia a quinolonas. Tesis de licenciatura. QFB-UMSNH.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Schacht, P., Arcieri, G., Branolte, J., Bruck, H., Chysky, V., Griffith, E., Gruenwaldt, G., Hullmann, R., Konopka, C. A. y O'Brien, B. (1988). Worldwide clinical data on efficacy and safety of ciprofloxacin. *Infection* 16 Suppl. 1: 29-43.

Shen, L. L. y Pernet, A. G. (1985). Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: the target of the drugs is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:307-311.

Tran, J. H., Jacoby, G. H. y Hooper D. C. (2005). Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicro. Agents Chemother.* 49:118-125.

- Tran, J. H. y Jacoby, G. H. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5638-5642.
- Trucco, A. (2000). Aspectos microbiológicos de las nuevas quinolonas: Levofloxacin, Sparfloxacin, Trovafloxacin y Grepafloxacin. *Rev. Chil. Infect.* 17: 67-72.
- Vetting, M. W., Hegde, S. S., Fajardo, J. E., Fiser, A., Roderick, S. L., Takiff, H. E. y Blanchard, J. S. (2006). The pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 45: 1-10.
- Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M. y Levy, S. B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1515-1521.
- West, S. E., Schweizer, H. P., Hricová, K., Uvízl, R., Neiser, J., Blahut, L. y Urbánek, K. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148: 81-86.
- Wetzstein, H. G., Schmeer, N. y Karl, W. (1997). Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gleophyllum striatum*: identification of metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4272-4281.
- Wong, A. y Kassen, R. (2011). Parallel evolution and local differentiation in quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 157: 937-944.
- Wong, S. M. y Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 10191-10196.
- Xiong, X., Bromley, E. H. C., Oelschlaeger, P., Woolfson D. N. y Spencer, J. (2011). Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res.* 39: 3917-3927.
- Yamagishi, J., Yoshida, H., Yamyoshi, M. y Nakamura, S. (1986). Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 367-373.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T. y Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolones efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 3354-3360.
- Yang, W. (2010). Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45: 520-534.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

Yoshida, H. y col., (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1271-1272.