



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS



**“Análisis funcional de los genes que codifican al
sistema toxina-antitoxina del plásmido pUM505”**

TESIS

Para Obtener el Título de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Karen Cecilia Hernández Ramírez

Asesora:

Doctora en Ciencias en Biología Experimental Martha Isela Ramírez Díaz

Co-asesor:

Doctor en Ciencias Bioquímicas Carlos Cervantes Vega

Morelia Mich., Noviembre del 2015.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I.- INTRODUCCIÓN	2
1.- Plásmidos.....	2
2.- Sistemas toxina-antitoxina (TA).....	4
2.1.- Mecanismos de acción de los sistemas TA.....	8
2.2.- Clasificación de los sistemas TA.....	10
2.3.- Aplicación de los sistemas TA.....	15
2.4.- Sistemas TA cromosómicos.....	17
II.- ANTECEDENTES	19
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2. Plásmido pUM505.....	20
2.1 Probable sistema Toxina-Antitoxina.....	22
III.- JUSTIFICACIÓN	24
IV.- HIPÓTESIS	24
V.- OBJETIVO GENERAL	25
VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
VII.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26

VIII.- MATERIALES Y METODOS.....	27
1.- Medios de cultivo.....	27
2.- Cepas empleadas.....	27
3.- Plásmidos y vectores empleados.....	28
4.- Oligonucleótidos empleados.....	32
5.- Análisis de secuencias.....	32
6.- Aislamiento de RNA	32
6.1.- Tratamiento enzimático con DNasa.....	34
6.2.- Transcripción reversa-PCR (RT-PCR).....	34
7.- Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	36
8.- PCR.....	37
9.- Electroforesis en gel de agarosa.....	37
10.- Purificación de DNA de 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.- Preparación de células competentes.....	40
13.- Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	41
14.- Transformación por el método de electroporación.....	41
15.- Pruebas de estabilidad plasmídica.....	42
16.- Cinéticas de crecimiento.....	42
17.- Obtención de extractos celulares.....	42

18.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	44
19.- Ensayos de virulencia.....	46
19.1.- Virulencia en el modelo de hojas de lechuga.....	46
19.2.- Virulencia en modelo de ratón.....	48
19.2.1.- Pruebas de sobrevivencia.....	48
19.2.2.- Pruebas de invasividad.....	48
IX.- RESULTADOS.....	50
1.- Análisis <i>in silico</i> de los <i>orfs</i> 123 y 124 de pUM505.....	50
2.- Análisis BLAST de los <i>orfs</i> 123 y 124.....	50
3.- Expresión de la región sobrepuesta de los <i>orfs</i> 123 y 124.....	53
4.- Clonación de los <i>orfs</i> 123 y 124 en el vector pJET 1.2/Blunt.....	53
5.- Determinación de la participación de los <i>orfs</i> 123 y 124 en la estabilidad plasmídica.....	57
6.- Determinación de la toxicidad producida por la proteína codificada por el <i>orf</i> 123 en <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	60
7.- Transferencia del plásmido recombinante pTrc_orf123 a <i>E. coli</i> BL21.....	64
8.- Determinación de la toxicidad producida por la proteína codificada por el <i>orf</i> 123 en <i>E. coli</i> BL21.....	64
9.- Subclonación de los <i>orfs</i> 123 y 124 en conjunto y por separado en el vector pUCP20.....	67
10.- Determinación de la participación del sistema TA en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	70
X.- DISCUSIÓN.....	75
XI.- CONCLUSIONES.....	84
XII.- BIBLIOGRAFÍA.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Contexto genético general de un loci TA.....	6
Figura 2. Funciones de los sistemas de TA codificados en plásmidos.....	9
Figura 3. Tipos de sistemas TA.....	11
Figura 4. Regulación de sistemas TA de tipo II.....	13
Figura 5. Mapa genético del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figura 6. Probable sistema TA en el plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i> ...	23
Figura 7. Vector pJET 1.2.....	29
Figura 8. Vector de clonación pUCP20.....	30
Figura 9. Vector de sobreexpresión pTrcHisC.....	31
Figura 10. Análisis de la secuencia de los <i>orfs</i> 123 y 124 de pUM505.....	51
Figura 11. Aislamiento del RNA total en fase exponencial y fase estacionaria.....	55
Figura 12. Expresión de la región sobrepuesta de los <i>orfs</i> 123 y 124.....	56
Figura 13. Clonación de los <i>orfs</i> 123 y 124 en el vector pJET 1.2/Blunt.....	58
Figura 14. Determinación de la estabilidad en <i>E. coli</i> con pJET.....	59
Figura 15. Determinación de la estabilidad en <i>E. coli</i> con pJET_orf123-4...	61
Figura 16. Determinación de la estabilidad de pJET en presencia o ausencia de los <i>orfs</i> 123-124.....	62
Figura 17. Cinéticas de crecimiento de la transformante <i>P. aeruginosa</i> (pUC_orf123).....	63
Figura 18. Subclonación del <i>orf</i> 123 en el vector de expresión pTrcHisC....	65

Figura 19. Separación de extractos celulares de la cepa <i>E. coli</i> BL21 con los plásmidos pTrcHisC y pTrc_orf123.....	66
Figura 20. Cinéticas de crecimiento de la transformante <i>P. aeruginosa</i> (pUC_orf123) en presencia y ausencia de IPTG.....	68
Figura 21. Subclonación de los orfs 123 y 124 en conjunto o por separado en el vector pUCP20.....	69
Figura 22. Virulencia causada por los orf 123 y 124 en <i>P. aeruginosa</i> PAO1 empleando el modelo de lechuga.	71
Figura 23. Supervivencia de ratones al inocularlos con <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en ausencia o presencia de los orfs 123 y 124.....	73
Figura 24. Invasividad de <i>P. aeruginosa</i> en presencia y ausencia de los orfs 123 y 124 en órganos de ratón.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Blancos celulares caracterizados de toxinas de sistemas TA.....	7
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para la amplificación por PCR.....	33
Tabla 3. Condiciones empleadas para la amplificación por RT-PCR.....	35
Tabla 4. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR.....	38
Tabla 5. Cepas utilizadas en las pruebas de estabilidad plasmídica.....	43
Tabla 6. Cepas utilizadas para determinar la toxicidad y virulencia de las proteínas codificadas por los <i>orfs</i> 123 y 124.....	47
Tabla 7. Proteínas homólogas al producto codificado por el <i>orf</i> 123.....	52
Tabla 8. Proteínas homólogas al producto codificado por el <i>orf</i> 124.....	54

RESUMEN

Los sistemas Toxina-Antitoxina (TA) son elementos genéticos pequeños compuestos de dos genes que codifican a una toxina y una antitoxina. Los sistemas TA se encuentran distribuidos en las bacterias y han sido encontrados en plásmidos y cromosomas. Se han relacionado con la estabilidad de plásmidos mediante exterminio post-segregacional, debido a que la toxina es más estable que la antitoxina, mientras que se ha demostrado la participación de los sistemas TA cromosómicos en la virulencia de las bacterias en las que han sido encontrados. El plásmido pUM505, aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*, posee una Isla de patogenicidad en la que se localizan los *orfs* 123 y 124 que codifican para un probable sistema TA. El *orf* 123 codifica a una proteína con un 55% identidad a la proteína RelE (componente tóxico) del sistema TA de *Klebsiella pneumoniae*. El *orf* 124 codifica a un probable regulador transcripcional con un 82% de identidad a la proteína antitoxina HTH de *Pseudomonas alcaligenes*. El objetivo de este trabajo fue determinar la función del probable sistema TA del plásmido pUM505. Primeramente se analizó la expresión de los *orfs* 123 y 124 mediante RT-PCR, utilizando oligos específicos de la región sobrepuesta y se comprobó que ambos *orfs* se expresan formando un operón. Mediante ensayos de estabilidad, se observó que cuando los *orfs* 123 y 124 fueron clonados en el vector pJET, el plásmido recombinante pJET_*orfs*123-4 se mantuvo bajo condiciones no selectivas en *Escherichia coli* después de seis días de subcultivos, mientras que pJET sin inserto se perdió, indicando que la presencia de los *orfs* 123 y 124 aumenta la estabilidad plasmídica. El *orf* 123 fue clonado en un vector de expresión bajo el control del promotor *lac* y transferido a *E. coli* BL21. Las transformantes de BL21 (pTrc_*orf*123) inducidas con IPTG mostraron la inhibición del crecimiento cuando se comparó con las células no inducidas, sugiriendo que la proteína codificada por el *orf* 123 actúa como una toxina en *E. coli*. La transformante de *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_*orf*123) mostró un crecimiento mayor en la virulencia en el modelo de lechuga cuando se comparó con el control PAO1 (pUCP20). Además incrementó la invasividad de PAO1 en órganos de ratón, mientras que las transformantes PAO1 (pUC_*orf*124) y PAO1 (pUC_*orf*123-4) mostraron virulencia e invasividad similar al control. Estos resultados indican que la toxina producida por el *orf* 123 aumenta la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 y sugiere que la antitoxina codificada por el *orf* 124 neutraliza la actividad de la toxina. Se concluyó que los *orfs* 123 y 124 del plásmido pUM505 codifican a un sistema TA, que aumenta la estabilidad plasmídica e incrementa la virulencia de *P. aeruginosa*.

Palabras clave: *P. aeruginosa*, operón, estabilidad plasmídica, virulencia, invasividad.

Abstract

Functional analysis of the genes encoding the toxin-antitoxin system plasmid pUM505

The toxin-antitoxin (TA) systems are small genetic elements consisting of two genes encoding a toxin and an antitoxin. TA systems are distributed among bacteria and have been found in plasmids and chromosomes. They have been related to the stability of plasmids by post-segregational killing, because the toxin is more stable than the antitoxin, while it has been demonstrated the involvement of chromosomal TA systems in the virulence of the bacteria that have been found. The pUM505 plasmid, isolated from a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*, has a pathogenicity island in which the *orfs* 123 and 124 encoding for a likely TA system are located. The *orf* 123 encodes a protein with 55% identity to the relE protein (toxic component) of TA system of *Klebsiella pneumoniae*. The *orf* 124 encodes a transcriptional regulator with an 82% identity to the Hth antitoxin protein of *Pseudomonas alcaligenes*. The objective of this work was to determine the role of the probable TA system of pUM505 plasmid. First, expression of *orfs* 123 and 124 was analyzed by RT-PCR using specific oligonucleotides of the overlapping region and found that both *orfs* are expressed forming an operon. By stability tests, it was observed that when the *orfs* 123 and 124 were cloned into the vector pJET, the recombinant plasmid pJET_Orfs123-4 was maintained under nonselective conditions in *Escherichia coli* after six days of subculture, and pJET plasmid containing no insert was lost, indicating that the presence of *orfs* 123 and 124 increases plasmid stability. The *orf* 123 was cloned into an expression vector under control of the *lac* promoter and transferred to *E. coli* BL21. The transformants BL21 (pTrc_Orf123) induced with IPTG showed growth inhibition when compared with non-induced cells, suggesting that the protein encoded by the *orf* 123 acts as a toxin in *E. coli*. The transformant *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_Orf123) showed higher growth in the virulence model of lettuce than the PAO1 (pUCP20) control. It also increased the invasiveness of PAO1 in mouse organs, while the transformants PAO1 (pUC_Orf124) and PAO1 (pUC_Orf123-4) showed similar virulence and invasiveness as control strain. These results indicate that the toxin produced by the *orf* 123 increases the virulence of *P. aeruginosa* PAO1 and it suggests that the antitoxin encoded by the *orf* 124 neutralizes toxin activity. It was concluded that the *orfs* 123 and 124 of pUM505 plasmid encode a TA system, which increases both plasmid stability and virulence of *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, operon, plasmid stability, virulence, invasiveness.

I.-INTRODUCCIÓN

1. PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico que se replican de forma autónoma y autorregulada, y que juegan un papel importante en la adaptación bacteriana a diferentes ambientes, ya que promueven la transferencia de genes entre estos microorganismos. Dependiendo de su tamaño, pueden codificar desde unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas (Khan, 1997). A pesar de que los plásmidos codifican los genes necesarios para la iniciación de su replicación, éstos dependen de factores codificados por la célula hospedadora (ligasas, DNA polimerasas, helicasas, etc.) para llevar a cabo el proceso completo (Dobrindt, 2001). En cambio, los productos de sus genes generalmente dan a las bacterias una ventaja selectiva sólo bajo ciertas condiciones. La resistencia a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y kanamicina; la nodulación de raíces de leguminosas y la producción de antibióticos como la bacteriocina, son algunas características fenotípicas codificadas por los plásmidos (Romero y Palacios, 1997).

La mayoría de los plásmidos naturales no son vectores de clonación o de expresión convenientes. Sin embargo, pueden ser modificados para su uso como tales. Algunos plásmidos se replican en pocas especies bacterianas y se dice que poseen un rango de hospederos reducido. Un segundo grupo de plásmidos se replica en un amplio rango de hospederos y se les denomina promiscuos (López-Meza, 2001).

Para poder existir independientemente del cromosoma, los plásmidos se replican de forma autónoma. A los plásmidos con esta capacidad, que son la mayoría, se les denomina replicones, esto es, estructuras de ácidos nucleicos con capacidad de autorreplicación, al igual que lo son los cromosomas y el DNA de los fagos. Los plásmidos que no poseen esta capacidad y que se integran de forma reversible en el cromosoma bacteriano para replicarse bajo su control, se les denomina episomas (Lewin, 2008).

Existen diversos factores que influyen en la capacidad de los plásmidos para colonizar diferentes hospederos; una replicación eficiente es el paso más crítico y es el resultado de una interacción adecuada entre el plásmido y el hospedero (Del Solar y col., 1996). La autorreplicación no es suficiente para asegurar la continuidad en la línea celular: los plásmidos deben heredarse de manera estable en la progenie de la célula hospedadora. El conjunto de mecanismos encargados de este proceso son habitualmente codificados por el propio plásmido (Actis, 1999):

- ❖ Sistemas de partición

La forma de evitar la pérdida del plásmido en la herencia vertical es responsabilidad de los sistemas de partición. Estos sistemas se aseguran de que al menos una copia vaya en cada célula hija por cada ciclo celular. Por el simple hecho de que una célula se divide en dos, no implica que se repartan equitativamente las copias que contenga de un plásmido determinado, sobre todo si se trata de plásmidos de bajo número de copias. Dejar al azar la repartición de copias no aseguraría la continuidad. Los sistemas de partición son sistemas

activos. Ejemplos de estos sistemas son el gen *parA* (ATPasa) y *parB* (proteína que se une al centrómero) (Gerdes y col., 2000; Bouet y col., 2007).

❖ Incompatibilidad plasmídica

La incompatibilidad plasmídica se define como el fracaso de dos plásmidos co-residentes para ser heredados de forma estable en ausencia de presión selectiva externa. Esto es, si la introducción de un segundo plásmido desestabiliza la herencia del primero estos dos son incompatibles. Este fenómeno es consecuencia de compartir elementos de herencia plasmídica, como son los mecanismos de replicación o partición (Novick, 1987; Actis, 1999). Sólo plásmidos de diferente grupo de incompatibilidad plasmídica pueden coexistir en la misma célula.

❖ Sistemas de adicción

Este tipo de sistemas está conformado por una toxina y una antitoxina. La toxina es estable y la antitoxina (que bloquea la acción de la toxina) es inestable. Por lo tanto, la bacteria sólo sobrevive mientras lleve el plásmido, ya que tendrá presente la antitoxina para neutralizar el efecto tóxico (Unterholzner y col., 2013).

2. SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA (TA)

Los sistemas TA son elementos genéticos pequeños compuestos de un gen que codifica a una toxina y un gen que codifica a una antitoxina. Los sistemas TA son codificados por genes que forman un operón, el espaciador rara vez se extiende más allá de 30 nucleótidos, y un pequeño solapamiento (1 a 20 nucleótidos en general) es la estructura más común. El orden de los dos genes también está bien conservado, con la antitoxina río arriba (**Figura 1**), aunque hay una excepción: en

el *loci higBA* el gen de la toxina está localizado río arriba del de la antitoxina (Tian y col., 1996).

Todos los genes TA analizados son pequeños. Según Pandey y col. (2005), las antitoxinas presentan de 41 a 206 aminoácidos (aa) de longitud y las toxinas de 31 a 204 aa; también en este caso hay una excepción: la toxina del sistema HipBA es de 440 aa. Las antitoxinas son generalmente más cortas que sus toxinas asociadas (Korch y Hill, 2006). El primer sistema TA, *ccdA / ccdB*, fue descrito hace 30 años como un módulo de mejora de la estabilidad del plásmido F de *Escherichia coli*. Los sistemas TA codificados por plásmidos también se llaman módulos de adicción (Yarmolinshky, 1995), ya que esta propiedad hace que la célula sea “adicta” a la producción de antitoxina y por lo tanto a los genes TA. La amplia difusión de los sistemas TA en los genomas de bacterias es una consecuencia de su capacidad de moverse por la transferencia horizontal de genes (Pandey y Gerdes, 2005; Koonin y Wolf, 2008). Los sistemas TA han sido descubiertos también en los cromosomas, especialmente en islas genómicas, donde a menudo se encuentran en varias copias.

Las dianas celulares de estas toxinas son muy diversos e incluyen la replicación del DNA, la estabilidad del RNAm, la síntesis de proteínas, la biosíntesis de la pared celular, y la síntesis de ATP (**Tabla 1**). Los sistemas TA pueden jugar un papel en la supervivencia celular bajo condiciones de estrés tales como falta de aminoácidos, el tratamiento con antibióticos, cambio de temperatura y el estrés oxidativo, a pesar de que los sistemas TA no son esenciales para el crecimiento celular normal (Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009; Yamaguchi y col., 2011).

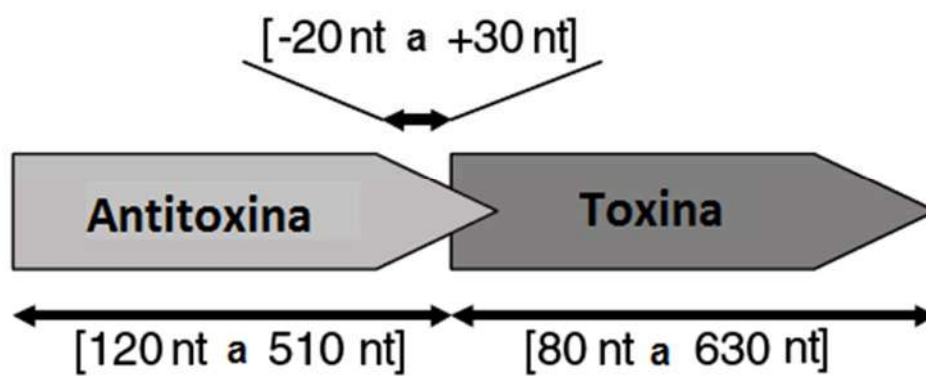


Figura 1. Contexto genético general de un loci TA. Se muestra la organización típica de loci TA con tamaños y perfiles de distancia (Adaptada de Sevin y Barloy-Hubler, 2007).

Tabla 1. Blancos celulares caracterizados de toxinas de sistemas TA.

Toxina/ Antitoxina	Actividad de la Toxina	Proceso celular ^a	Referencia
Hok/Sok	Se integra en la membrana interna de la célula	Síntesis de ATP	Gerdes y col., 1986
SymE/SymR	Corta el RNAm	Traducción	Kawano y col., 2007
TisB/IstR-1	Se integra en la membrana interna de la célula	Síntesis de ATP	Unoson y Wagner, 2008
CcdB/CcdA	Inhibe la DNA girasa	Replicación	Miki y col., 1992
ParE/ParD	Inhibe la DNA girasa	Replicación	Jiang y col., 2002
MazF/MazE	Corta el RNAm independiente de ribosoma y corta la RNAr 23S	Traducción	Zhang y col., 2003
RelE/RelB	Corta la unión del RNAm con el ribosoma	Traducción	Christensen y Gerdes, 2003
Kid/Kis	Corta el RNAm independiente de ribosoma	Traducción	Muñoz-Gómez y col., 2005
Doc/Phd	Se une a la subunidad 30S ribosomal	Traducción	Liu y col., 2008
HicA/HicB	Corta el RNAm independiente de ribosoma	Traducción	Jørgensen y col., 2009
HipA/HipB	Fosforila a EF-Tu	Traducción	Schumacher y col., 2009
VapC/VapB	Corta el RNAt	Traducción	Winther y Gerdes, 2011
RatA/RatB	Se une a la subunidad 50S ribosomal	Traducción	Zhang y Inouye, 2011
ζ/ε	Fosforila la UDP-N-Acetilglucosamina	Síntesis de peptidoglicano	Mutschler y col., 2011

^a Proceso celular en el que se encuentra el blanco celular que es afectado por la toxina de manera específica.

2.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS SISTEMAS TA

En los sistemas TA, las moléculas de toxina (proteínas) son considerados como moléculas dañinas para las células (Kunin y Ouzounis, 2003). Los tiempos de vida de las moléculas de toxina y antitoxina son muy diferentes en las células: las moléculas de toxina tienden a ser estables mientras que las moléculas de antitoxina tienden a ser inestables. Por lo tanto, para evitar los efectos tóxicos de moléculas de toxina, las moléculas de antitoxina tienden a ser producidas continuamente (Aizenman y col., 1996). Después de la división celular, las células hijas que no heredan una copia de un plásmido que expresa un módulo de la adicción ya no pueden producir la proteína antitoxina. Por lo tanto, después de una rápida degradación de la antitoxina residual, el exceso de la toxina restante es libre para unirse e inhibir la diana celular, proporcionando un mecanismo de selección para el mantenimiento del plásmido en la población (Jaffe y col., 1985; Gerdes y col., 1986) (**Figura 2A**). Este mecanismo es llamado muerte post-segregacional (Tsuchimoto y col., 1992; Van Melderen y col., 1994). Los modelos matemáticos demuestran que el fenómeno de exterminio post-segregacional permite la propagación de los sistemas de TA en las poblaciones de bacterias, independientemente de sus frecuencias originales (Monchizuki y col., 2006). Esto podría proporcionar una explicación racional para el éxito evolutivo de los sistemas TA. Cooper y Heinemann en el 2000, demostraron que los sistemas de TA también podrían funcionar en la competencia plásmido-plásmido. Ellos mostraron que los sistemas TA codificados por plásmidos permiten a un plásmido

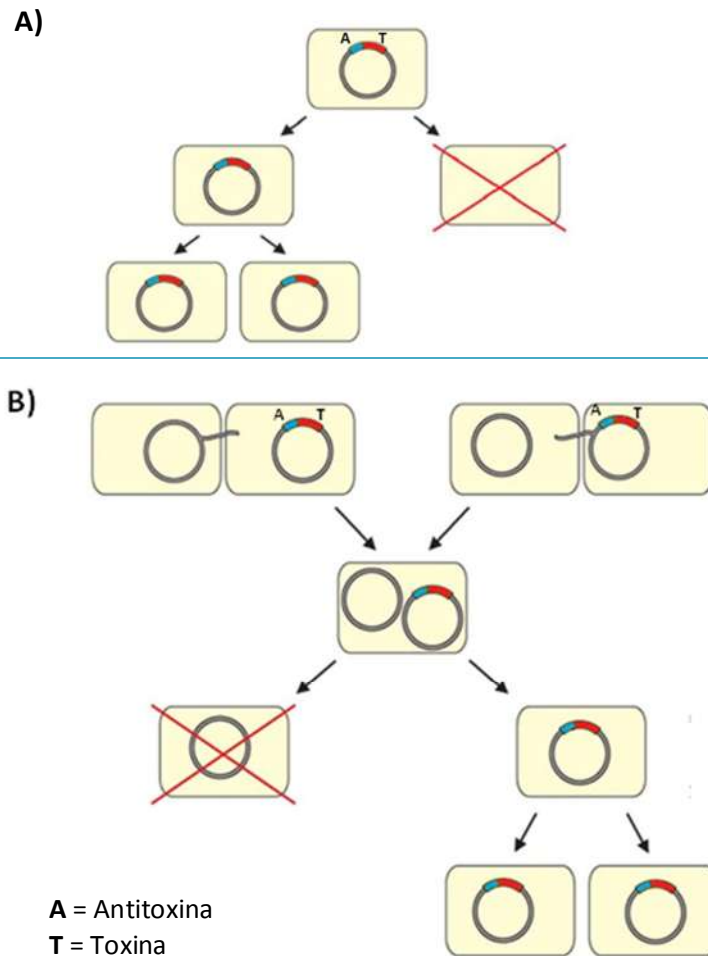


Figura 2. Funciones de los sistemas de TA codificados en plásmidos. A) Estabilización de plásmidos por exterminio post-segregacional. Si durante la división celular el plásmido se pierde, la toxina y antitoxina proteínas presentes en el citosol dejará de ser de nueva expresión, las antitoxinas inestables disminuyen rápidamente, dejando la toxina libre para actuar en su blanco celular, dando lugar a la muerte celular. En consecuencia, sólo las células con el plásmido con el sistema TA van a sobrevivir. B) Exclusión de plásmidos compatibles coexistentes. Si a una célula se le transfieren dos plásmidos conjugativos y uno de estos contiene un sistema TA, ambos plásmidos van a competir por su permanencia en la célula, produciendo la muerte de aquellas células hijas que no posean el plásmido con el sistema TA. (Modificado de Unterholzner y col. 2013).

conjugativo competir con un plásmido conjugativo perteneciente al mismo grupo de incompatibilidad, pero desprovisto del sistema de TA (Cooper y Heinemann, 2000) (**Figura 2B**).

2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS TA

Los sistemas TA son ampliamente prevalentes en bacterias, así como en arqueas, y por lo general se clasifican en tres tipos, de acuerdo con la naturaleza de la antitoxina y su modo de interacción con la toxina (**Figura 3**):

❖ Tipo I

Las antitoxinas del Tipo I son RNAs antisentido inestables. En la mayoría de los casos la expresión de la toxina está regulada por apareamiento de bases del RNA de la antitoxina con el RNAm estable de la toxina. Esta interacción ha demostrado prevenir la unión al ribosoma y de este modo detener la traducción del RNAm de la toxina.

❖ Tipo II

Los sistemas TA de tipo II son los más estudiados en la actualidad. Los genes están organizados en operones con la antitoxina situada río arriba del gen de la toxina, aunque se conocen algunos ejemplos de organización invertida de genes, por ejemplo, *higBA* (Tian y col., 1996), *hicAB* (Jørgensen y col., 2009), *mqsRA* de *E. coli* (Brown y col., 2009) y *bmTA* de *Brucella abortus* (Heaton y col.,

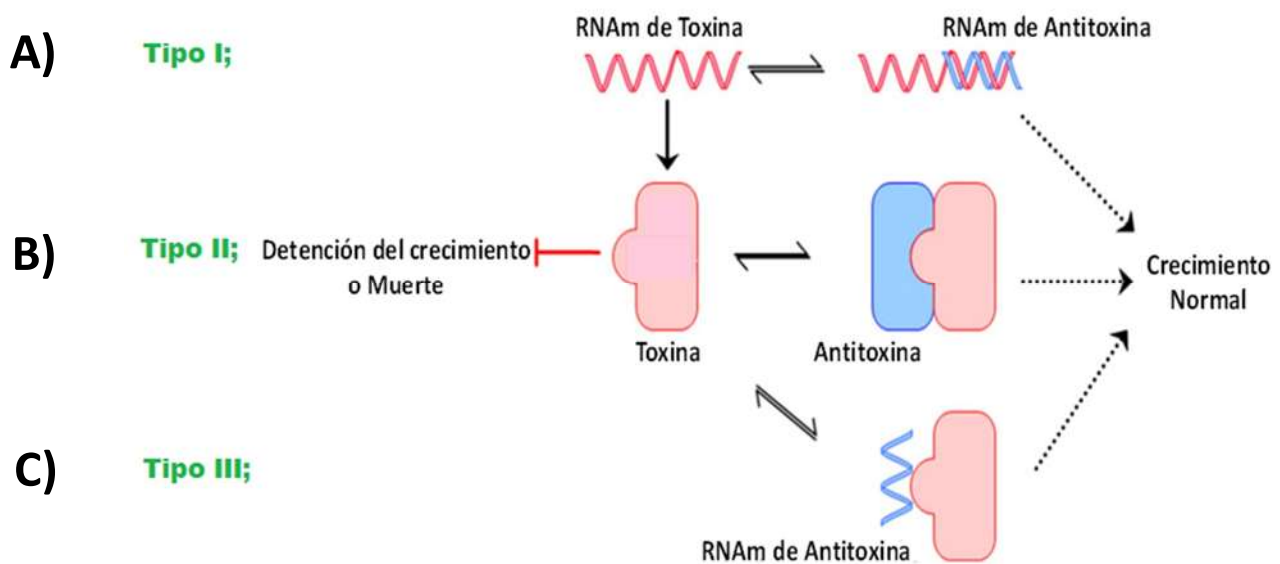


Figura 3. Tipos de Sistemas TA. A) Sistema de tipo I, el RNAm de antitoxina hace un complejo con el RNAm de la toxina, inhibiendo la traducción de la molécula de toxina. B) Sistema de tipo II, la antitoxina y la toxina son proteínas, las antitoxinas se unen a las toxinas y bloquean el sitio activo de las toxinas. C) Sistema de tipo III, un RNAm de antitoxina forma un complejo con una proteína toxina. Las toxinas libres en cada sistema de TA conducen a la detención del crecimiento bacteriano y la muerte celular (Park y col., 2013).

2012). Por lo general, la transcripción de genes TA es regulada sólo por la antitoxina o por el complejo formado por ambas proteínas; sin embargo, también se conocen sistemas de tres componentes, donde la tercera proteína juega un papel regulador específico (Smith y Rawlings, 1997; De la Hoz y col., 2000). La presencia de un exceso de la antitoxina respecto a la toxina asegura la formación de un complejo de estas dos proteínas y la inactividad de la toxina. En una situación en la que el nivel celular de la antitoxina disminuye, la toxina ya no puede ser neutralizada. En el caso de los sistemas TA de plásmidos, esto conduce a la detención del crecimiento o la muerte celular causada por la toxina que actúa libremente en una diana celular específica. Para evitar esto, es necesario que el huésped bacteriano mantenga de forma estable el plásmido que lleva el sistema TA (Brzozowska y Zielenkiewicz, 2013).

El papel de los sistemas TA cromosómicos aún está en discusión. Su probable función incluye su participación en la formación de células persistentes (son variantes latentes de células regulares que se forman en las poblaciones microbianas y son altamente tolerantes a los antibióticos), apoptosis bacteriana y la detención del ciclo celular; sin embargo, la hipótesis más difundida es que están involucrados en la respuesta general de estrés, como se sugiere en amplios estudios sobre los sistemas TA *mazEF* y *relBE* (Gerdes, 2000; Christensen y col., 2001, 2003; Engelberg-Kulka y col., 2006).

Una representación esquemática de la estructura y funcionamiento del mecanismo de los sistemas TA tipo II, así como su regulación, se muestra en la **Figura 4**.

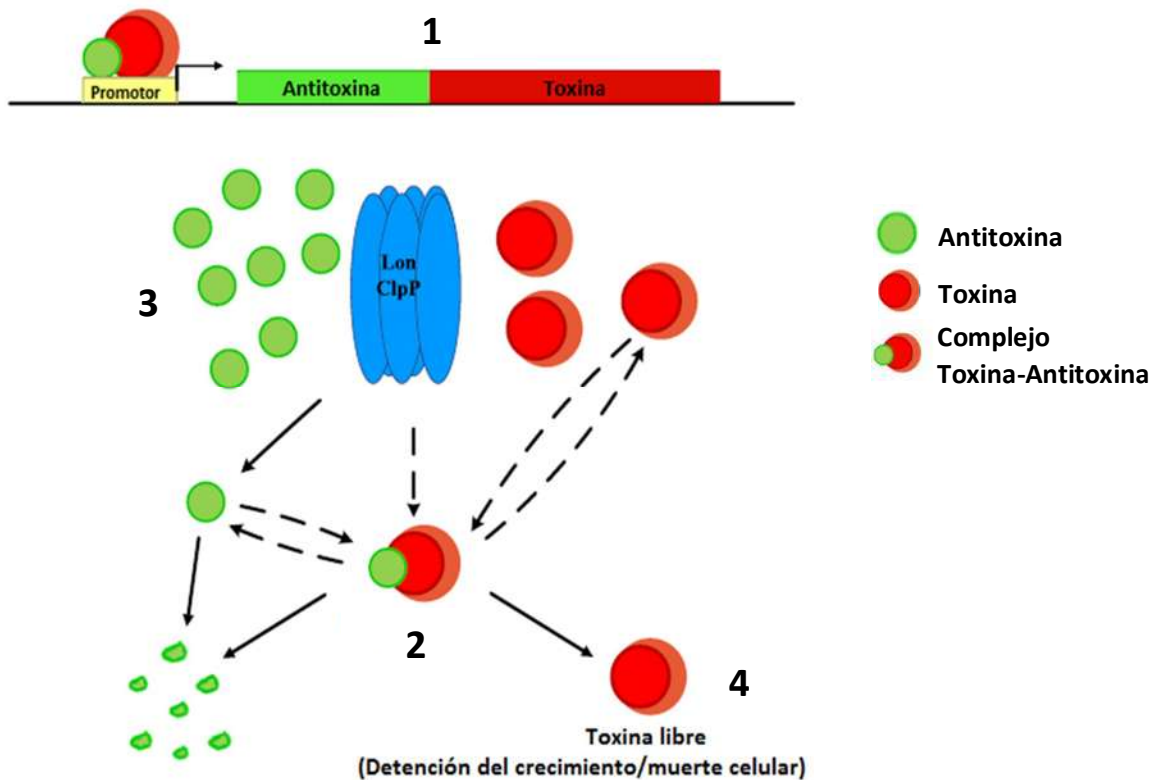


Figura 4. Regulación de sistemas TA de tipo II. 1) La toxina y la antitoxina se producen a partir del mismo operón, que se autorregula por el complejo TA o la antitoxina sola. 2) La antitoxina forma un complejo dinámico con la toxina neutralizando su efecto tóxico. 3) Las proteasas celulares, Lon o ClpP, degradan la proteína antitoxina susceptible, que en consecuencia conduce a la aparición de una forma libre de toxinas. 4) La toxina libre puede actuar sobre una diana celular específica que resulta en la detención del crecimiento celular o muerte celular bacteriana. El gen de la toxina y su proteína codificada se muestran en rojo; el gen de la antitoxina y su proteína codificada en verde. Las líneas discontinuas simbolizan la posible acción de la proteasa en la antitoxina unida con la toxina, así como el proceso de formación de complejo de toxina-antitoxina reversible, el modelo fue sugerido de sistemas TA estudiados en *E. coli* (Modificado de Brzowska y Zielenkiewicz, 2013).

En contraste con la toxina estable, la proteína antitoxina tiene una vida media más corta debido a su vulnerabilidad a la degradación por proteasas celulares (Jensen y Gerdes, 1995). En muchos casos, en ausencia de la toxina, el dominio C-terminal, o a veces la antitoxina entera, sigue siendo no estructurada por lo que es altamente susceptible a las proteasas celulares. Después de la unión a la toxina, la conformación del dominio C-terminal de la antitoxina adopta una conformación extendida. Esta transición desorden-orden se produce en muchos sistemas TA. Se cree que la baja estabilidad termodinámica y dominios intrínsecamente desplegados son características comunes de antitoxinas clase II (Yamaguchi y col., 2011). Además, las proteínas antitoxina son a menudo fuertemente ácidas, y junto con su estructura desorganizada, permiten cambios conformacionales necesarios para la unión con las toxinas cargadas positivamente. La inestabilidad fisiológica de las antitoxinas es el resultado de su sensibilidad a la degradación por proteasas específicas dependientes de ATP pertenecientes a familias LON y ClpP (Ning y col., 2011). La regulación proteolítica de los sistemas TA ha sido estudiada con gran detalle en *E. coli*. Entre cuatro sistemas proteolíticos que posee esta bacteria: Lon, ClpP, FtsH y HslVU (ClpQY), los dos primeros se ha demostrado que degradan a las antitoxinas.

Originalmente los sistemas TA tipo II se agruparon en familias basadas en la similitud de secuencia y estructura de los genes, y se supone que cada familia de toxinas se asocia con una familia antitoxina específica. Sin embargo, ahora se ha hecho evidente que existen muchos sistemas híbridos donde un locus TA contiene una toxina de una clase y una antitoxina de otra clase. Recientemente, se sugirió

clasificar las toxinas en diez familias: *ccdAB*, *mazEF*, *vapBC*, *phd/doc*, *parDE*, ϵ - ζ , *higBA*, *relBE*, *hipBA* y *hicAB*, las cuales pueden ser codificadas por plásmidos o cromosomas (Gerdes y col, 2005; Fivian-Hughes y Davis, 2010; Leplae y col., 2011). Por otro lado las antitoxinas se clasificaron en 20 familias; además, se identificaron cuatro familias de toxinas 'solitarias' que no están flanqueadas por antitoxinas y que mostraron inhibición del crecimiento si se sobreexpresan en *E. coli* (Leplae y col, 2011).

❖ TIPO III

Recientemente, un sistema TA de tipo III se reveló en un plásmido de *Erwinia carotovora* (Fineran y col., 2009). Al igual que en los sistemas de tipo I y II, la toxina ToxN es una proteína mientras que la antitoxina ToxI es una molécula de RNA. En su modo de acción, ToxI no inhibe la expresión de la toxina, sino más bien inhibe la actividad de la toxina, mediante el secuestro de la toxina por la formación de un complejo (Pecota y Wood, 1996; Blower y col., 2011). Curiosamente, el sistema de tipo III se descubrió como un sistema de protección de bacterias contra infecciones de bacteriófagos. Se detectó un pequeño número de homólogos de toxinas tipo III tanto en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Fineran y col., 2009; Hayes y Van Melderen, 2011).

2.3 APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS TA

El empleo de la toxicidad inherente de los sistemas TA ha sido propuesta como un nuevo blanco antibacteriano, como la activación de la toxina latente a través de la

interrupción directa del complejo TA o algún mecanismo alternativo que resultaría en la muerte celular bacteriana (Engelberg-Kulka y col., 2004; DeNap y Hergenrother, 2005; Alonso y col., 2007; Williams y Hergenrother, 2008).

Se conoce que los antibióticos bactericidas, como la kanamicina, pueden reprimir a los sistemas TA, MazE-MazF, RelB-RelE, MqsR-MqsA y HigB-HigA en *E. coli* (Kohanski y col., 2007). Cuando se examinó el nivel de expresión de todos los sistemas TA después de la adición de antibióticos (kanamicina y ampicilina) en *E. coli*, no sólo los cuatro sistemas TA descritos anteriormente, sino también otros sistemas TA, fueron reprimidos (Yamaguchi y col., 2011), lo que sugiere que la muerte celular mediada por los antibióticos bactericidas pueden estar asociada con muchos sistemas de TA en *E. coli*.

La toxina TisB está involucrada con el fenómeno de formación de células persistentes después del tratamiento con el antibiótico ciprofloxacina (Dörr y col., 2010). El mecanismo “persistir” causado por la expresión TisB no se entiende bien; sin embargo, la inhibición de la síntesis de ATP causada por TisB parece ser un factor importante. Curiosamente, varias toxinas en el sistema TA Tipo I (SymE, HokE, y TisB) son inducidas bajo respuesta SOS (Pedersen y Gerdes, 1999; Fernández de Henestrosa y col., 2000; Courcelle y col., 2001; Vogel y col., 2004; Kawano y col., 2007). Se predice que la inducción de la expresión de estas toxinas cromosómicas provoca la detención del crecimiento por la inhibición de la síntesis de ATP, pero no causa la muerte celular (Unoson y Wagner, 2008; Dörr y col., 2010).

2.4 SISTEMAS TA CROMOSÓMICOS

Los genes TA también se encuentran localizados en los cromosomas bacterianos, aunque su papel exacto en este entorno se debate (Keren y col., 2004; Buts y col., 2005; Gerdes y col., 2005; Engelberg-Kulka y col., 2006; Szekeres y col., 2007; Nariya y Inouye, 2008). Un análisis completo de los genomas de procariontes han puesto de relieve la diversidad en la distribución de los sistemas TA (Anantharaman y Aravind, 2003; Pandey y Gerdes, 2005; Sevin y Barloy-Hubler, 2007). Sin embargo se ha descrito que no existe correlación entre el número de sistemas TA, el estilo de vida, la pertenencia a un phylum, o la tasa de crecimiento.

Algunos genomas tales como los de *Nitrosomonas europaea*, *Sinorhizobium meliloti*, y *Mycobacterium bovis* contienen más de 50 sistemas TA putativos (Pandey y Gerdes, 2005). Algunos otros contienen ninguno o muy pocos (menos de tres) sistemas TA putativos, como *Rickettsia prowazeki*, *Campylobacter jejuni*, o *Bacillus subtilis*. La presencia de al menos 33 sistemas TA en *E. coli* y más de 60 sistemas TA en *Mycobacterium tuberculosis* sugiere que los sistemas TA están implicados no sólo en la fisiología bacteriana normal, sino también en la patogenicidad de las bacterias (Leplae y col., 2011). Mediante un análisis bioinformático se encontró que en el genoma de *Salmonella typhimurium* están presentes 11 sistemas TA de tipo II, de los cuales varios se conservan en otras cepas patógenas de la misma especie pero están ausentes en cepas no patógenas, lo que sugirió que ciertos sistemas TA podrían tener un papel en la patogenicidad de *Salmonella*. Adicionalmente, se demostró que la actividad del

sistema *sehAB* de *S. typhimurium*, juega un papel en la virulencia en ratones (De la Cruz y col., 2013).

En el 2011, Williams y col., mostraron que la presencia de genes homólogos del sistema TA *mazEF* de *Staphylococcus aureus* y los sistemas *relBE* y *higBA* de *Pseudomonas aeruginosa*, estaban presentes en 78 aislados clínicos de *S. aureus* y 42 aislados de *P. aeruginosa*, respectivamente.

II.-ANTECEDENTES

1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Pace, 1997). Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, pantanos y hábitats marinos costeros, así como de plantas y animales. Esta bacteria es capaz de crecer hasta 43 °C y puede utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón (Hardalo y Edberg, 1997). *P. aeruginosa* es considerada como patógena para plantas y mamíferos, y capaz de resistir a varios antibióticos y desinfectantes (Madigan y col., 2004). Es una de las causas más frecuentes de infecciones oportunistas en los seres humanos y es el patógeno más comúnmente asociado con la mortalidad de pacientes con fibrosis quística (Battle y col., 2008).

En el 2000, se concluyó la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, que fue aislada de un paciente con otitis media. Esta secuencia ya se encuentra disponible en el internet (www.pseudomonas.com) y su análisis fue publicado (Stover y col., 2000). El tamaño aproximado del único cromosoma circular (www.pseudomonas.com) que forma el genoma de esta bacteria es de cerca de 6.3 millones de pares de bases y un total de 5570 marcos de lectura

abiertos. PAO1 es una cepa estándar del laboratorio y es ampliamente usada en estudios de investigación (Holloway, 1955).

2. Plásmido pUM505

El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado, y se determinó que es capaz de conferir resistencia a cromato y mercurio (Cervantes y Ohtake, 1988). En el 2011, nuestro equipo de trabajo realizó la secuenciación y el análisis de la secuencia del plásmido; se encontró que es un replicón circular de 123,332 pares de bases (pb) y se identificaron 138 regiones codificantes (**Figura 5**). Se localizó un origen de replicación (oriV) que abarca alrededor de 800 pb, en una región de ~17 kilobases (kb) en donde además se localizan los genes probablemente implicados en la conjugación y la transferencia del plásmido (Ramírez-Díaz y col., 2011).

También se encontraron dos regiones bien definidas correspondientes a islas genómicas, que corresponden a 98 kb de plásmido total. La primera región es de ~67 kb que corresponde a una isla de patogenicidad (PAI) y la segunda región, de ~31 kb, corresponde a una isla genómica que contiene genes de resistencia a metales. Las PAIs son típicamente grandes regiones genómicas (10-200 kb) que están presentes en los genomas de las cepas patógenas. Los factores de virulencia de bacterias patógenas, como adhesinas, toxinas, y los sistemas de secreción de proteínas, pueden ser codificadas por las PAIs (Hacker y Kaper,

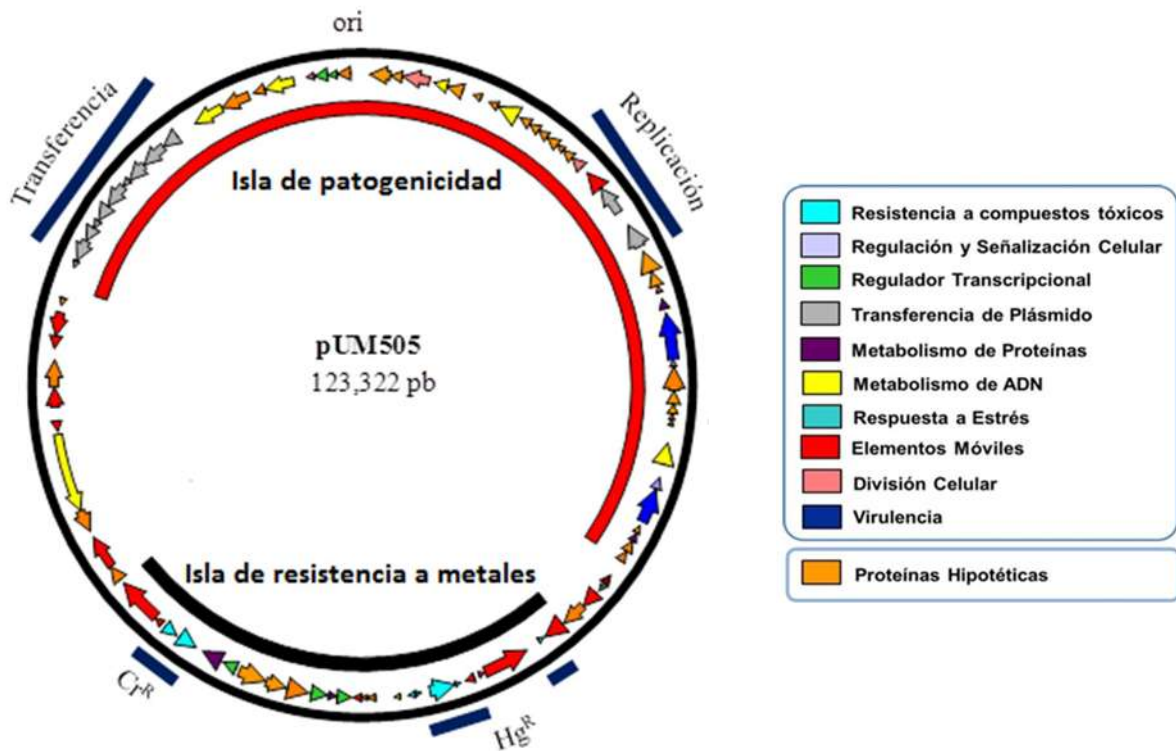


Figura 5. Mapa genético del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Las regiones codificantes se muestran con flechas o puntas de flecha, indicando la dirección de la transcripción. Las posibles funciones asignadas de las proteínas codificantes se agrupan de acuerdo a los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha, indicando también las proteínas hipotéticas. La isla de patogenicidad (PAI) 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).

2000). La PAI de pUM505 consiste en 78 marcos de lectura abiertos (*orfs* 1-51 y 112-138), posee genes implicados en la replicación del plásmido, la transferencia por conjugación y genes relacionados con virulencia, así como genes que codifican proteínas putativas con funciones desconocidas, equivalentes a ~56% de los genes de la isla genómica (Ramírez-Díaz y col., 2011).

2.1 Probable sistema Toxina-Antitoxina

En la PAI del plásmido pUM505 se identificó mediante análisis con las bases de datos, que los *orfs* 123 y 124 codifican un probable sistema toxina-antitoxina. El *orf* 123 codifica una proteína 55% idéntica a la proteína RelE (componente tóxico) del sistema TA de *Klebsiella pneumoniae*. El *orf* 124 codifica un probable regulador transcripcional 82% similar a la proteína de la antitoxina HTH (Helix-Turn-Helix) de *Pseudomonas alcaligenes* (**Figura 6**). Este sistema podría ser un mecanismo importante para mejorar la prevalencia de pUM505 en las células de *Pseudomonas* (Ramírez-Díaz y col., 2011).

A)

Orf No.	Gene	pUM505 co-coordinates (5'-3')	Length (bp)	No. of amino acids	Sequence identity to best homolog (Accession No.) ^a
Orf123	<i>relE</i>	110952-111251	300	99	55% to RelE from <i>K. pneumoniae</i> (ZP_06016753)
Orf124	<i>hth</i>	111248-111538	291	96	92% to HTH from <i>P. alcaligenes</i> (AAD40346)

B)

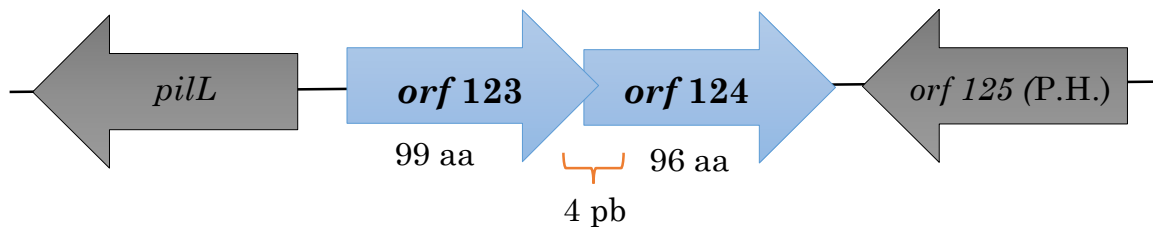


Figura 6. Probable sistema TA en el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. A)

Tabla con las características de los *orfs* 123 y 124 después de hacer el cluster. B)

Arreglo genómico del probable sistema TA en el plásmido pUM505. Con flechas azules se indican el *orf* 123 (*RelE*) y el *orf* 124 (*hth*) con una región sobrepuesta de 4 pb. Se indica el tamaño predicho en aa de las proteínas toxina y antitoxina codificadas y en gris se muestran los genes aledaños (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

III.-JUSTIFICACIÓN

Los sistemas TA participan en la estabilidad de plásmidos o en la virulencia. La presencia de un probable sistema TA tipo II codificado en el plásmido pUM505 podría contribuir a su estabilidad en *P. aeruginosa*. Por lo anterior, la caracterización de este sistema, incluyendo el análisis de su expresión, el efecto tóxico de la toxina y su participación en virulencia, es esencial para entender el papel que desempeña dicho sistema del plásmido pUM505.

IV.-HIPÓTESIS

Los *orfs* 123 y 124 del plásmido pUM505 codifican a un sistema Toxina-Antitoxina que incrementa la estabilidad plasmídica y confiere virulencia.

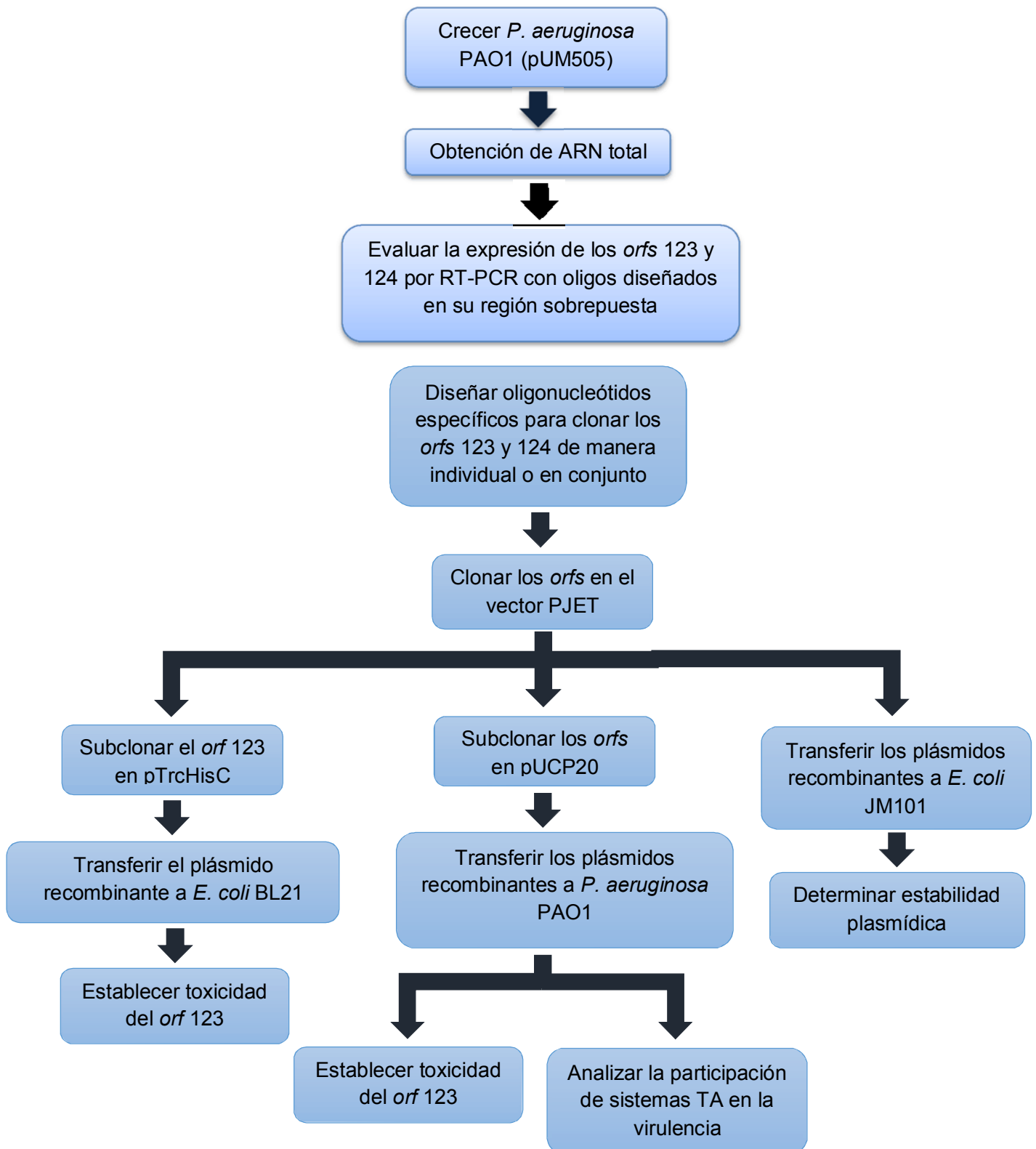
V.-OBJETIVO GENERAL

Determinar la funcionalidad del probable sistema Toxina-Antitoxina del plásmido pUM505.

VI.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si los *orfs* 123 y 124 se expresan en conjunto.
2. Establecer la participación de los *orfs* 123 y 124 en la estabilidad plasmídica.
3. Analizar la toxicidad de la proteína codificada por el *orf* 123 en la bacteria huésped.
4. Determinar la participación del probable sistema TA en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

VII.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII.-MATERIALES Y MÉTODOS

1. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo o sus componentes se adquirieron de los laboratorios Bioxon de México S. A., Merck-México S.A. o Sigma Chemical Corporation.

- I. Caldo Luria Bertani (CL): NaCl (J. T. Baker) 1%, peptona de caseína (Bioxon) 1% y extracto de levadura (Becton Dickinson) 0.5%.
- II. Agar Luria Bertani (AL): al CL se le agrego 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon).
- III. Caldo nutritivo (CN): peptona de gelatina 0.5% y extracto de carne de res 0.3% (Bioxon).
- IV. Agar nutritivo (AN): al CN se le agrego 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon).
- V. Medio mínimo M9 (M9): sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM, CaCl₂-2H₂O 0.1 mM y MgSO₄-7H₂O 2 mM (Sambrook y col., 1989).

2. CEPAS EMPLEADAS

- 1) *P. aeruginosa* PAO1 (colección de la Dra. Iglewski's) (Li y col., 2007): Cepa que se empleó como receptora de los plásmidos recombinantes derivados del vector pUCP20 y como cepa control.
- 2) *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505): Cr^R, Hg^R. Cepa que se utilizó para obtener el DNA molde para la amplificación por PCR de los *orfs* 123 y 124, y como control positivo en ensayos de virulencia.

- 3) *P. aeruginosa* PAO1 (pUCP20): Cepa que se utilizó como control negativo en las pruebas de toxicidad y virulencia.
- 4) *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 vectores pJET1.2/Blunt y pUCP20, y para análisis de estabilidad de plásmidos.
- 5) *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RP (Stratagene): Cepa receptora del plásmido recombinante derivado del vector pTrcHisC, permite la eficiente sobreexpresión proteínas heterólogas.

3. PLÁSMIDOS Y VECTORES EMPLEADOS

- a) pUM505 (Cervantes y col., 1986): Plásmido conjugativo, confiere resistencia a Cr^R , Hg^R y Cp^R (**Figura 5**).
- b) pJET 1.2/Blunt (Fermentas): Vector que se utilizó para la recuperación de productos de PCR y para ensayos de estabilidad, confiere resistencia a Ap^R (**Figura 7**).
- c) pUCP20 (West y col., 1994): Vector binario que se utilizó para la expresión de los genes de interés, confiere resistencia a Ap^R y Cb^R (**Figura 8**).
- d) pTrcHis C (Invitrogen): Vector para la sobreexpresión de proteínas recombinantes regulada por el promotor trc en *E. coli* (**Figura 9**).

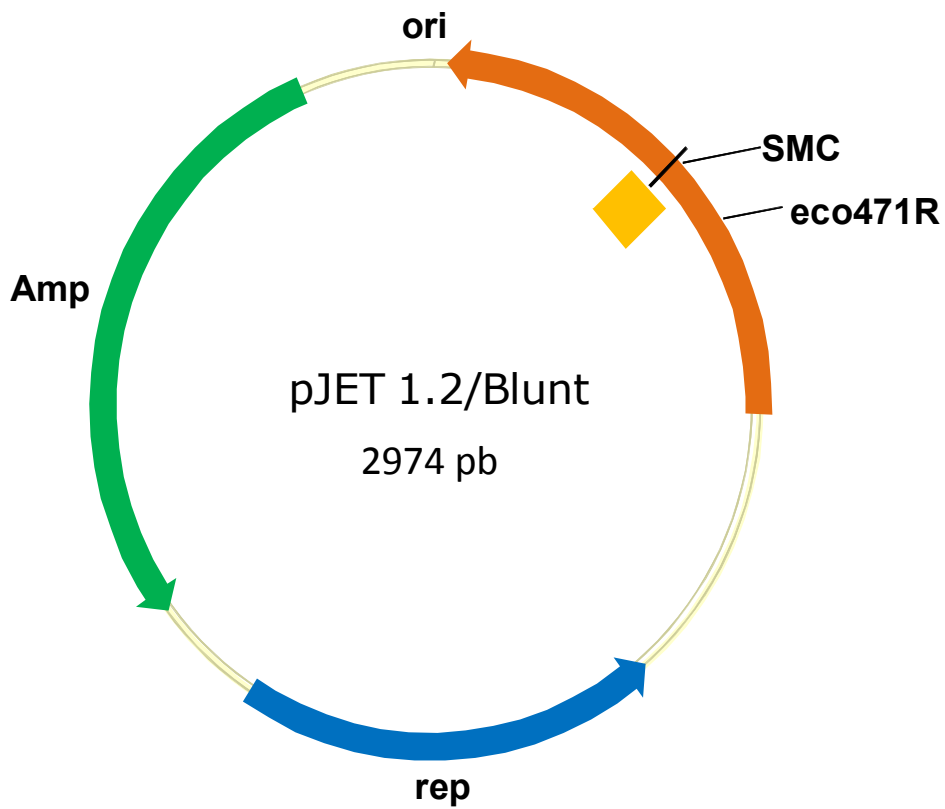


Figura 7. Vector pJET 1.2. El vector de clonación pJET 1.2/Blunt tiene un tamaño de 2974 pb. Posee un origen de replicación para *E.coli* (ori) y un gen letal *eco471R* que permite la selección positiva de las transformantes con el inserto en el vector. Contiene un gen de resistencia a ampicilina (Amp) y un sitio de clonación múltiple (SMC) (Fermentas).

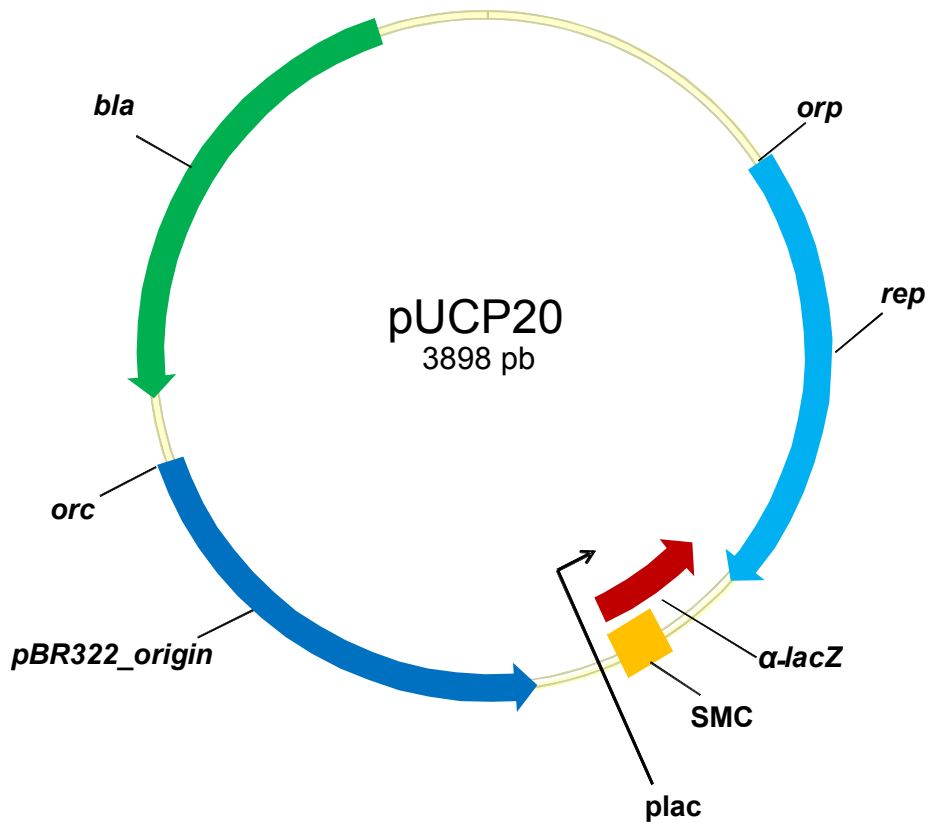


Figura 8. Vector de clonación pUCP20. El vector tiene un tamaño de 3898 pb, con el gen *bla* de resistencia a ampicilina y carbenicilina; orígenes de replicación para *E. coli* (*orc*) proveniente del plásmido pBR322 (*pBR322_origin*) y *P. aeruginosa* (*orp*); el gen *rep*, que codifica una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; *α-lacZ*, una parte del gen que codifica la β-galactosidasa; el promotor *plac* y un sitio múltiple de clonación (SMC) (Modificado de West y col., 1994).

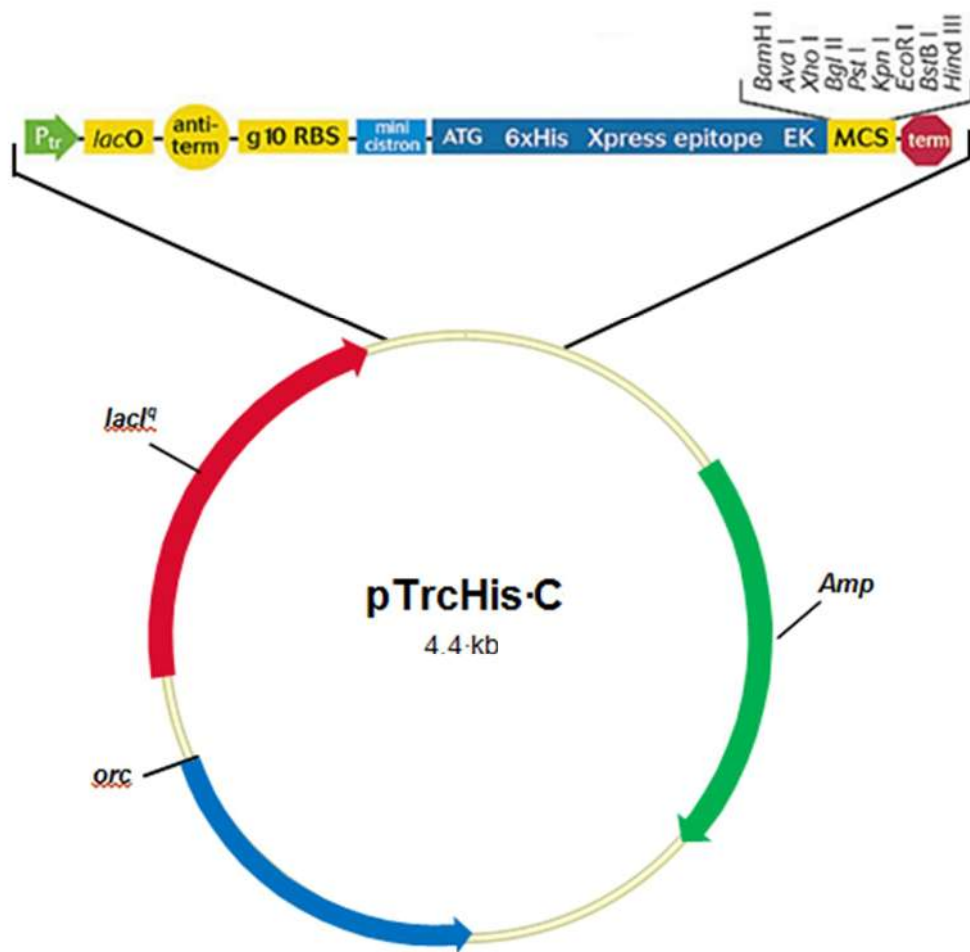


Figura 9. Vector de sobreexpresión pTrcHisC. El vector tiene un tamaño de 4.4 kb, con el gen *Amp* de resistencia a ampicilina, origen de replicación (*orc*) para *E. coli*; el operador *lacO* y el gen represor *lacI^q* del operón *lac*, que regulan la transcripción en *E. coli*; el promotor *P_{trc}* y un sitio múltiple de clonación (MCS) (Invitrogen).

4. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS

Se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos diseñados con base en la secuencia del plásmido pUM505 para la amplificación de los *orfs* 123 y 124 de manera independiente o en conjunto. Las secuencias de los oligos y sus características se enlistan en la **Tabla 2**.

5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Se realizó la búsqueda de secuencias a través del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para elaborar alineamientos de las secuencias de interés con las bases de datos. Mediante el programa BPRM (Prediction of bacterial promoters) se realizó el análisis de probables promotores. En <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2> se realizaron alineamientos entre proteínas homólogas a la proteína codificada por el *orf* 123.

6. AISLAMIENTO DE RNA

Un cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) se creció en un matraz con 50 ml de CL, hasta una absorbencia (Abs) a 600nm (Abs_{600nm}) fuera de 0.6 (fase exponencial) o 1.1 (fase estacionaria). Se resuspendió 1 ml del cultivo (fase exponencial) y 0.4 ml (fase estacionaria), de manera independiente, en 1 ml de reactivo TRI (Ambion), se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C y se transfirió

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para la amplificación por PCR.

<i>orf</i>	Oligonucleótido	Secuencia 5'—————>3'
123*	Dir123prom	GTGAGAGCAGGATCCGATTG ^A
	Dir123	CGTGGGATCCGACTGTTTGTG ^A
	Rev123 ¹	CCAAAGCGTCTAGAATGAACAG ^B
124*	Dir124prom	CTTCCGATTGGATCCTGGAC ^A
	Dir124 ²	CCAGGCCAGGGATCCAGAAATG ^A
	Rev124	GGGAAGTTCTAGACCCTAGGTATG ^B
123**	Dir123pTrc	CCCCTGCAGGAAGTCAAACAAAC ^C
	Rev123pTrc	CATAAATTTGCTCAAGCTTTGCGGC ^D
124**	Dir124pTrc	GCCGCACTGCAGGAGCAAATTTATG ^C
	Rev124pTrc	CTGGACGAGTAAGCTTTGAGCATGC ^D

Se indica la secuencia y el sentido de los oligonucleótidos empleados: Dir (Directo), Rev (Reverso) y prom (promotor). Se subrayan los sitios de restricción para las enzimas ^A *Hind*III, ^B *Pst*I, ^C *Pst*I y ^D *Hind*III, introducidos en la secuencia de oligonucleótidos. *Oligos usados para clonar en PJET 1.2/Blunt y subclonar en pUCP20. ** Oligos usados para clonar en PJET 1.2/Blunt y Subclonar en pTrcHisC. ^{1,2} Oligos empleados para analizar por RT-PCR la región sobrepuesta.

el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 100 μ l de cloroformo, se mezcló bien y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C; entonces se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se adicionaron 500 μ l de isopropanol, se agitó y centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 rpm por 5 min. Se removió el etanol y se secó la pastilla de RNA. Se disolvió la pastilla en 50 μ l de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

6.1 Tratamiento enzimático con DNasa

El RNA total fue tratado con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) utilizando una unidad por μ g de RNA. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 10 min. Posteriormente se adicionó 1 μ l de solución de paro y se procedió a incubar a 65°C durante 5 min para inactivar la DNasa. Las muestras se almacenaron a -70°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5%.

6.2 Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

El RT-PCR fue realizado con el RNA total aislado y con el Kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas), siguiendo las instrucciones del proveedor.

En la **Tabla 2** se muestran los oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión de la región sobrepuesta. Las condiciones empleadas se describen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones empleadas para la amplificación por RT-PCR.

Ciclos		Temperatura	Tiempo
1	Activación de la Transcriptasa reversa	45°C	45 min
1	Desnaturalización inicial	94°C	2 min
40	Desnaturalización	94°C	30 seg
	Alineamiento	55°C	30 seg
	Extensión	68°C	1 min
1	Extensión final	68°C	7 min

7. 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 CN durante 18-20 h a 37°C con agitación constante se centrifugó durante 2 min a 12000 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 incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 13000 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 12000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa superior, se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó durante 20 min a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. El sedimento se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugando durante 5 min a 12000 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

(Promega) 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.

8. PCR

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a la secuencia de los *orfs* 123 y 124 o a las regiones aledañas (**Tabla 2**). Se hizo una mezcla de DNA plasmídico de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (~100 ng), oligonucleótidos directo y reverso a una concentración de 20 picomoles, 12.5 µl de la mezcla de reacción Master Mix (Promega) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl₂, dNTPs y un amortiguador de reacción a concentraciones optimizadas. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 25 µl. El proceso se realizó empleando un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyce, utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 4**.

9. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos que se amplificaron por PCR se sometieron a un corrimiento electroforético, para lo cual se preparó un gel de agarosa (Sigma) al 1 % (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, con el mismo amortiguador. La muestra de la amplificación se mezcló con 2 µl de amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05 %, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5 %, sacarosa 40 %) y se descargó en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder (E-C Apparatus

Tabla 4. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR.

		Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
Condiciones	Desnaturalización	95°C	30 seg
de	Alineamiento	55°C	30 seg
amplificación	Extensión	72°C	1 min
(30 ciclos)			
	Extensión final	72°C	5 min

Corporation modelo EC452) y se sometió a una corriente constante de 120 voltios durante 30-40 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01 % durante 10 min. Para observar las bandas obtenidas se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (UV-Products Inc.). Como marcador de tamaño se utilizó el marcador de 1 Kb plus (Invitrogen).

10. PURIFICACIÓN DE DNA DE 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 se sometió 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 CloneJET™ 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 o pTrcHisC 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. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para la preparación de células competentes de *P. aeruginosa* y 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 13000 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 agua fría desionizada estéril.

13. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

Para la preparación de células competentes 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 6000 rpm a 4°C. La pastilla celular se lavó dos veces con 40 ml de agua desionizada, estéril y fría, centrifugando 10 min a 6000 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. 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) y se sometió a un pulso eléctrico de 1.8 kilovoltios. 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.

15. PRUEBAS DE ESTABILIDAD PLASMÍDICA

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés (**Tabla 5**) en 4ml de CN a 37°C por 24 h. Los cultivos fueron diluidos a una Abs_{600nm} de 0.8 con 20 ml de CN con y sin Amp (100 mg/ml) y los cultivos diluidos fueron incubados a 37°C con agitación constante durante 24 h. Se repitió el mismo proceso durante siete días. Cada día se obtuvo una muestra de cultivo la cual se diluyó 1×10^{-6} y 1×10^{-7} en $MgSO_4$ y se plaqueó 100 μ l de estas en cajas con AN y otras con AN adicionada con Amp. Las cajas se incubaron a 37°C por 18 h y se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

16. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Las cepas de interés se crecieron en CN durante 18-20 h a 37°C con agitación constante. Los cultivos fueron diluidos en CN a una Abs_{600nm} de 0.2 y se incubaron a 37°C con agitación constante. Se tomaron muestras de 1 ml desde el tiempo inicial, durante cada hora y se midió su Abs_{600nm} (medida en espectrofotómetro Spectronic 21).

17. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

A partir de cultivos de BL21 (pTrcHisC) y BL21 (pTrc_orf123), crecidos durante 18 h a 37°C con agitación constante, se inocularon matraces de 500 ml con CL en

Tabla 5. Cepas utilizadas en las pruebas de estabilidad plasmídica.

Cepas	Descripción
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_orf131)	<i>E. coli</i> JM101 con el <i>orf</i> 131 (gen que confiere resistencia a ciprofloxacina) clonado en el vector pJET 2.1/blunt.
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_orf123-124)	<i>E. coli</i> JM101 con los <i>orfs</i> 123-124 clonados en el vector pJET (Probable sistema TA estabilizador plasmídico)

una dilución 1:50 adicionando 100 µg/ml de Ap, y 0.1 mM del inductor isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma). Se incubaron a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una Abs_{600nm} de 0.5. Las muestras se procesaron para la obtención de extractos crudos, o bien se almacenaron a -20°C.

Los cultivos fueron procesados de la siguiente manera:

- 1) Se centrifugó a 12000 rpm por 1 min para obtener la pastilla celular y se desechó el sobrenadante.
- 2) Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 100 µl del amortiguador frío Tris-HCl 1 M pH 8.0, SDS 10% y se calentaron a 95°C por 15 min.
- 3) Los extractos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida.

18. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

El análisis de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 14% y se utilizó una cámara de corrimiento electroforético Thermo EC Ec120 Mini vertical gel system.

- 1) Preparación del gel:

Los geles de separación y condensación se hicieron con los siguientes componentes (Sambrook y col., 1989):

Gel de separación

Acrilamida/bisacrilamida 30%	4.64 ml	H ₂ O	3.07 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.52 ml	Persulfato de amonio 10%	51.2 µl
SDS 10%	100.88 µl	TEMED	15 µl

Gel de condensación

Acrilamida/bisacrilamida 30%	540 µl	H ₂ O	2.44 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	1 ml	Persulfato de amonio 10%	20.6 µl
SDS 10%	39.6 µl	TEMED	10 µl

2) Preparación y corrimiento de las muestras

Se cargaron en los geles de acrilamida 5 µl de muestra correspondientes a los extractos crudos utilizando 15 µl de amortiguador de corrida 5X (Tris 0.5 M, SDS 10%, glicerol 25% v/v, mercaptoetanol 14 mM, azul de bromofenol 0.3%, pH 6.8). El corrimiento se realizó por 30 min a 120 v, seguido por 1 h a 150 v, empleando el amortiguador Tris glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%, pH 8.3) (Sambrook y col., 1989)

3) Tinción del gel

Todos los pasos se hicieron con agitación suave a temperatura ambiente. Se colocó el gel en una solución de tinción (0.1375 g de azul brillante de coomassie, 150 ml de una mezcla metanol-agua 1:5, 25 ml de ácido acético

glacial) por 5 min. Finalmente se incubó en solución de desteñido (100 ml de metanol, 17.5 ml ácido acético glacial y 132.5 ml agua destilada) por 30 min.

19. ENSAYOS DE VIRULENCIA

19.1 Virulencia en el modelo de hojas de lechuga

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés (**Tabla 6**) en CL a 37 °C toda la noche, los cultivos se diluyeron en MgSO₄ 100 mM (1:3). Adicionalmente, se desinfectaron hojas de *lectuca sativa var. parris island* (lechuga orejona comercial) durante 30 min con una solución de cloro al 0.1 %, las cuales se enjuagaron con agua destilada y después con agua estéril. Las hojas se colocaron en un recipiente (desinfectado previamente con la solución de cloro 0.1 %) que contiene una base de papel Whatman impregnado con MgSO₄ 100 mM y se inocularon en la nervadura de la hoja con 1x10⁶ UFC, de las cepas a probar contenidas en 10 µl de la dilución del cultivo. Se incubaron a 30 °C durante 4 días y se revisó diariamente la necrosis producida en la hoja de lechuga. Al cuarto día se cortó la región dañada, se colocó en un mortero estéril, se trituró el tejido y se maceró en 15 ml de MgSO₄. Se realizó una dilución con MgSO₄ a 1x10⁻⁵ y se inoculó 100 µl de las diluciones en AL incubando durante 18 h a 37°C, para realizar el conteo de UFC.

Tabla 6. Cepas utilizadas para determinar la toxicidad y virulencia de las proteínas codificadas por los *orfs* 123 y 124.

Cepas	Descripción
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> empleada como control negativo de virulencia
PAO1 (pUCP20)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 transformada con el vector pUCP20, empleada como control negativo de virulencia conferida por el plásmido vacío
PAO1 (pUM505)	Transconjugante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con el plásmido pUM505, empleada como control positivo de virulencia
PAO1 (pUC_orf123)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 que contiene el <i>orf</i> 123 (probable toxina) clonado en el vector pUCP20
PAO1 (pUC_orf124)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 que contiene el <i>orf</i> 124 (probable antitoxina) clonado en el vector pUCP20
PAO1 (pUC_orf123-4)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 que contiene clonados los <i>orfs</i> 123-124 en el vector pUCP20

19.2 VIRULENCIA EN MODELO DE RATÓN

19.2.1 Pruebas de sobrevivencia

Se emplearon cinco ratones machos BALB/c de 6-8 semanas de edad para cada tratamiento. Se crecieron preinóculos de cada cepa (**Tabla 6**) en 4 ml de CL a 37°C por 24 h. Los cultivos de 0.8 de Abs_{600nm} se colocaron en 20 ml de LB y se incubaron por 4 h o hasta alcanzar una Abs_{600nm} de 0.4. Los ratones se dividieron en lotes por cada cepa y se marcaron mediante códigos numéricos, se pesaron y se anestesiaron con pentobarbital (15 mg/kg de peso). Posteriormente, se inocularon con 3x10⁶ UFC contenidos en 100 µl por vía intravenosa en la cola. Se monitorearon los ratones diariamente por 12 días, revisando su peso y la sobrevivencia.

19.2.2 Pruebas de invasividad

Se emplearon siete ratones machos BALB/c de 6-8 semanas de edad por cada cepa utilizada (**Tabla 6**). Los ratones fueron sedados con pentobarbital (15 mg/kg de peso) y se les inocularon con 5x10⁶ UFC de bacterias contenidos en 100 µl, por vía parenteral. A las 48 h, a los ratones se les provocó eutanasia con pentobarbital. Los ratones fueron disectados y se les extrajo el corazón, los pulmones y los riñones. De cada órgano se cortó una porción equivalente a ~0.3 gr de corazón, ~0.4 gr de pulmones y ~0.9 gr de riñones, las cuales se lavaron con agua ultrapura estéril y se trituraron los tejidos en morteros con 5 ml de MgSO₄ 100 mM. Posteriormente se realizaron diluciones 1X10⁻⁴ y se plaqueó 100 µl de la

dilución en cajas de AN. Se incubaron las cajas a 37°C por 18 h y por último se contaron las UFC obtenidas por gramo de tejido.

IX.- RESULTADOS

1. Análisis *in silico* de los *orfs* 123 y 124 de pUM505.

Con la finalidad de encontrar regiones conservadas que sugieran que se trata de un gen funcional, se analizó la secuencia de los *orfs* 123 y 124 del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* en busca de elementos genéticos de regulación. Se identificaron elementos genéticos solamente de una región consenso -35 y -10 de un probable promotor tipo sigma 70 río arriba del *orf* 123, pero no se identificó algún promotor para el *orf* 124. Adicionalmente, se observó que las regiones codificantes de los *orfs* 123 y 124 se encuentran sobrepuestas por 4 nt, y también se identificó un posible sitio de unión al ribosoma para cada una de estas regiones (**Figura 10**). Esto nos sugiere que el *orf* 123 es un gen funcional y que posiblemente ambos *orfs* forman parte de un operón.

2. Análisis BLAST de los *orfs* 123 y 124.

Debido a que la base de datos NCBI se está actualizando día con día y el análisis realizado por nuestro grupo de trabajo fue en el 2011, se realizó un análisis BLAST con la secuencia de los *orfs* 123 y 124 mediante el programa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> para compararla con secuencias de las bases de datos y determinar el grado de identidad con otras proteínas. La **Tabla 7** muestra los homólogos identificados de la proteína codificada por el *orf* 123. Se observó que tiene un porcentaje de identidad alto con módulos antitoxinas RelB así como con toxinas.

Tabla 7. Proteínas homólogas al producto codificado por el orf 123.

Descripción	% de Identidad
Proteína hipotética PSPA7_4469 [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7]	100
Módulo de adicción, Antitoxina RelB [<i>Pseudomonas chlororaphis</i>]	80
Módulo de adicción, Antitoxina RelB [<i>Pseudomonas sp.</i> GM17]	80
Proteína hipotética [<i>Pseudomonas syringae</i>]	80
Módulo de adicción, proteína [<i>Pseudomonas chlororaphis</i>]	79
Módulo de adicción, Antitoxina RelB [<i>Pseudomonas chlororaphis</i>]	78
Modulo toxina de un sistema toxina-antitoxina [<i>Pseudomonas sp.</i> GLE121]	77
Módulo de adicción, Proteína killer [<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060]	73
Toxina de la familia RelE [<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15]	62

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

En la **Tabla 8** se observan los homólogos de la proteína codificada por el *orf* 124, y se muestra claramente que el producto del *orf* 124 tiene un alto porcentaje de identidad con antitoxinas, sugiriendo que el *orf* 124 codifica a una antitoxina y que por lo tanto los *orfs* 123 y 124 codifican a un sistema TA.

3. Expresión de la región sobrepuesta de los *orfs* 123 y 124.

Para determinar si los *orfs* 123 y 124 forman parte de un operón, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a partir del RNA extraído de cultivos obtenidos de las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. En la **Figura 11** se muestra una fotografía representativa del RNA empleado. En la **Figura 12** panel A, se observa el gel control donde se realizó una PCR convencional para confirmar que las muestras no tuvieran RNA. Adicionalmente, se observa que la expresión es mayor en las muestras del RNA obtenido de la fase exponencial. En el panel B de la figura 12, se muestra un banda de 0.44 kb correspondiente al tamaño esperado de la región sobrepuesta de ambos *orfs*, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. La presencia de esa banda indica que se trata de un ARN mensajero bicistrónico y nos indica que los *orfs* forman parte de un operón.

4. Clonación de los *orfs* 123 y 124 en el vector pJET 1.2/Blunt.

Siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos se realizó la amplificación de los *orfs* 123 y 124 con su probable promotor mediante una PCR y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1.0 kb. Se realizó la ligación en el

Tabla 8. Proteínas homólogas al producto codificado por el orf 124.

Descripción	% de Identidad
Regulador transcripcional [<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8]	83
Módulo de adicción, Antitoxina [<i>Ectothiorhodospira</i> sp. PHS-1]	81
Módulo de adicción, Antitoxina [<i>Marinobacter lipolyticus</i>]	78
Módulo de adicción, Antitoxina [<i>Pseudomonas syringae</i>]	80
Módulo de adicción, Antitoxina [<i>Pseudomonas savastanoi</i>]	79
Módulo de adicción, Antitoxina [<i>Pseudomonas chlororaphis</i>]	76
Módulo de adicción, Antitoxina [<i>Pseudomonas fluorescens</i> FH5]	73
Módulo de adicción, Antitoxina [<i>Pseudomonas montellii</i>]	74

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

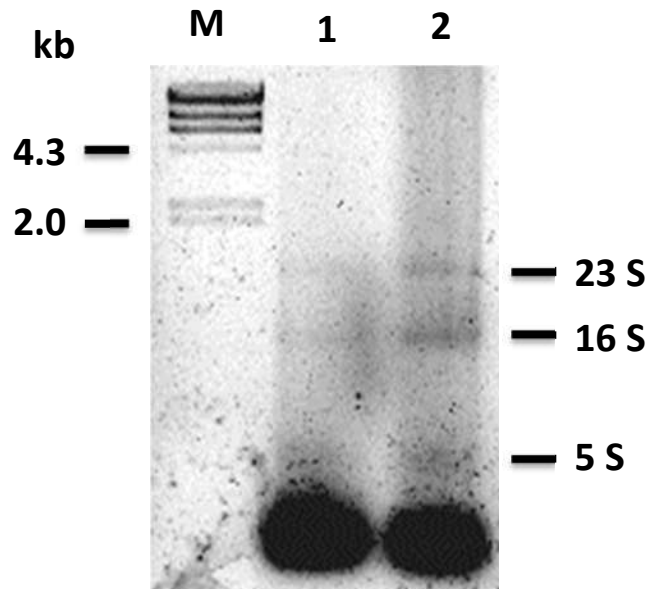


Figura 11. Aislamiento del RNA total en fase exponencial y fase estacionaria.

Se creció un cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) durante 4 h y 8 h a 37°C con agitación constante. Se aisló el RNA total utilizando el procedimiento descrito en materiales y métodos. Se muestra la fotografía de un gel de agarosa al 1.5 %, donde se observa en el primer carril el marcador de tamaño molecular (λ HindIII); en el carril 1, se observan las bandas del RNA de las subunidades ribosomales 23S, 16S y 5S, de la muestra de RNA obtenida en fase exponencial; en el carril 2, de la muestra de RNA obtenida de la fase estacionaria.

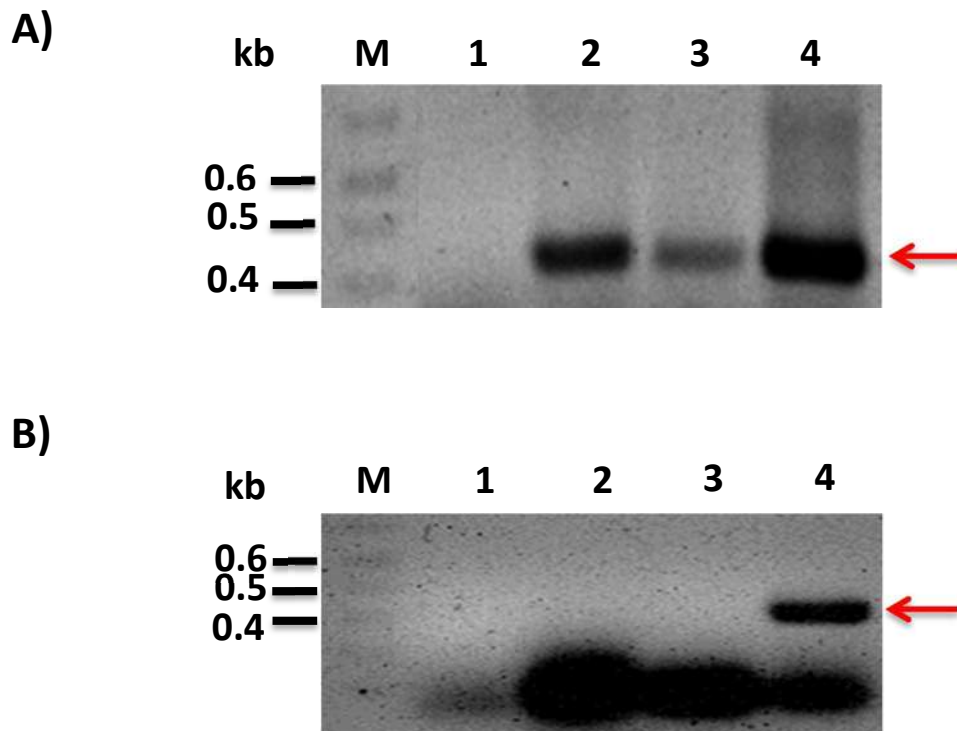


Figura 12. Expresión de la región sobrepuesta de los *orfs* 123 y 124. Se crecieron cultivos en CL hasta 0.6 y 1.1 de Abs_{600nm} . Se aisló el RNA total, se generó cDNA y se realizaron PCRs como se indica en métodos. Fotografías de los geles de agarosa: A) PCR con retrotranscriptasa utilizando las muestras obtenidas de cDNA, B) PCR convencional con las muestras de RNA. M: marcador de tamaño molecular (1 kb); carril 1: H₂O (control negativo); carril 2: muestra obtenida de la fase exponencial; carril 3: muestra obtenida de la fase estacionaria; carril 4: DNA de pUM505 (control positivo).

vector de recuperación de fragmentos de PCR pJET 1.2/Blunt y se obtuvo el plásmido recombinante pJET_orf123-4 que se empleó para transformar células competentes de *E. coli* JM101 como se describe en Materiales y Métodos. Con la finalidad de verificar la correcta ligación de los *orfs* 123 y 124 en el vector pJET 1.2/Blunt se realizó la digestión con las enzimas de restricción *Pst*I y *Xba*I, y se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados de aproximadamente 3.0 y 1.0 kb (**Figura 13**).

5. Determinación de la participación de los *orfs* 123 y 124 en la estabilidad plasmídica.

Para determinar si los *orfs* 123 y 124 tienen participación en la estabilidad plasmídica, primero se buscó un plásmido que fuera inestable, es decir que se fuera perdiendo después de varias resiembras en ausencia de presión selectiva. Se analizó la estabilidad del vector pJET, que es utilizado como un vector de clonación, empleando para esto la cepa *E. coli* JM101 (pJET_orf131) que contiene el vector pJET con el *orf* 131 del plásmido pUM505, implicado en resistencia a ciprofloxacina (**Tabla 5**). En la **Figura 14**, se observan las gráficas de las resiembras de los días 2, 4 y 6 del tratamiento sin el antibiótico. Se encontró que conforme aumentan los días de resiembra, las colonias obtenidas en cajas con Amp disminuyen y a los 6 días no hay presencia de colonias. Esto sugiere que el vector pJET se pierde fácilmente en ausencia de presión selectiva, por lo que este vector fue empleado en la determinación de la estabilidad plasmídica. Posteriormente se analizó la estabilidad del vector pJET conferida por los *orfs* 123

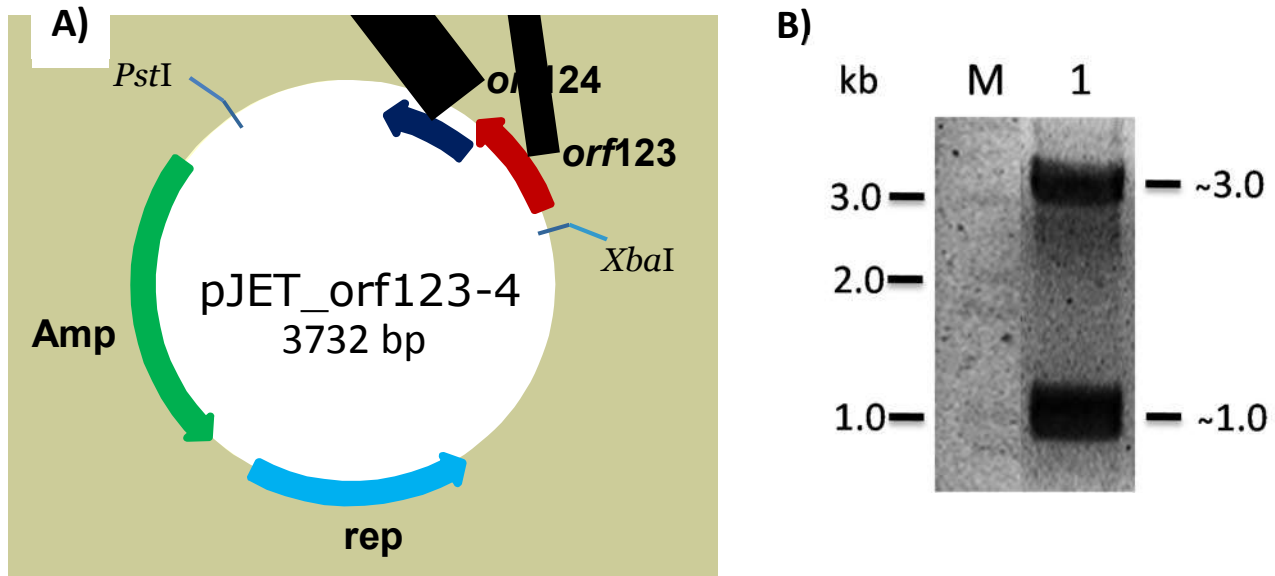


Figura 13. Clonación de los orfs 123 y 124 en el vector pJET 1.2/Blunt. A) Mapa genético del plásmido recombinante pJET_orf123-4. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *PstI* y *XbaI*. B) Digestión enzimática del plásmido pJET_orf123-4. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; 1, producto de la digestión con las enzimas de restricción *PstI* y *XbaI*; en el lado derecho se muestran las bandas del tamaño esperado de aproximadamente 3.0 y 1.0 kb.

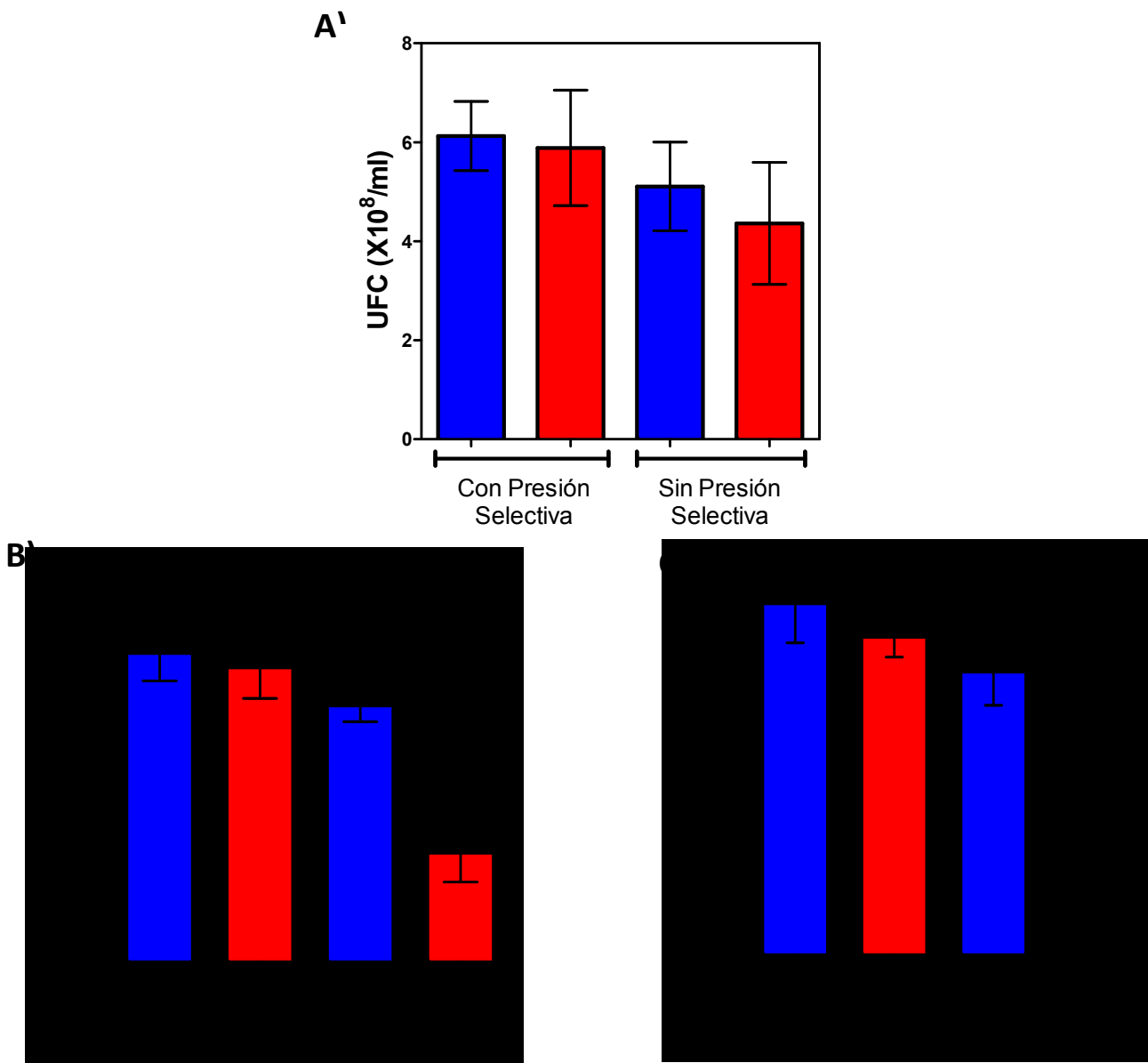


Figura 14. Determinación de la estabilidad en *E. coli* con pJET. Los cultivos se crecieron en 20 ml de CN, con o sin presión selectiva, a 37°C con agitación constante. Se observan las UFC; en barras azules de cajas sin Amp; en barras rojas de cajas con Amp. A) UFC de la resiembra del día 2; B) UFC de la resiembra del día 4; C) UFC de la resiembra del día 6. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3.

y 124, para lo cual se utilizó la cepa *E. coli* JM101 (pJET_orf123-4). En la **Figura 15**, se muestra que en la resiembra del día 6, se recuperan las UFC de cajas con Amp obtenidas del tratamiento de resiembra sin el antibiótico. Las UFC obtenidas del tratamiento sin Amp de los diferentes días de resiembra de las colonias obtenidas de la cepa con pJET_orf131 disminuyen durante las resiembras (disminuyendo a partir de la resiembra 3), en cambio el número de colonias obtenidas de la cepa con pJET_orf123-4, no se modifica conforme aumenta el número de resiembra (**Figura 16**). Esto nos indica que los *orfs* 123 y 124 aumentan la estabilidad del plásmido pJET cuando no hay presencia del marcador de selección.

6. Determinación de la toxicidad producida por la proteína codificada por el *orf* 123 en *P. aeruginosa* PAO1.

Con el fin de saber si el producto codificado por el *orf* 123 es una toxina que causa daño en la célula huésped, se realizaron cinéticas de crecimiento con PAO1 (pUCP20) y PAO1 (pUC_orf123) en CN con agitación constante y se mido su crecimiento cada hora durante 8 h. Se observó que no hay cambios en el crecimiento con respecto al control entre ambas cepas (**Figura 17**). Para determinar si bajo otras condiciones de crecimiento la proteína es tóxica para la célula, se empleó de manera independiente un medio de cultivo mínimo y 30°C como temperatura de incubación, pero no se notó ningún cambio en el crecimiento entre ambas cepas (datos no mostrados).

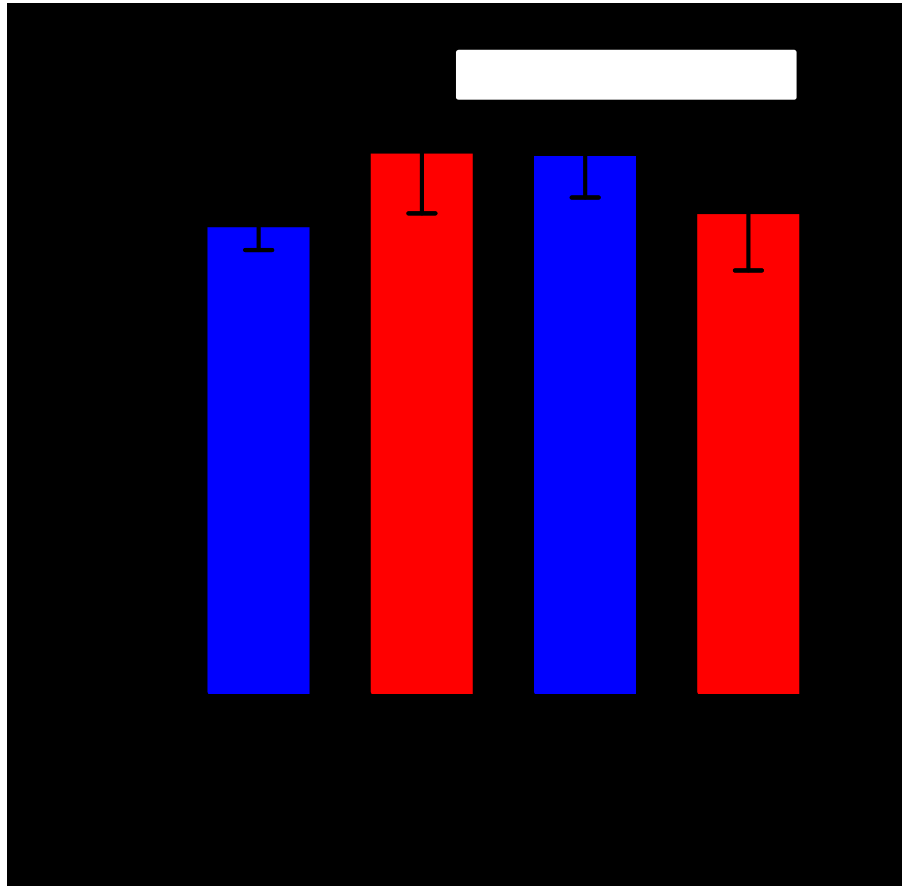


Figura 15. Determinación de la estabilidad en *E. coli* con pJET_orf123-4. Los cultivos se crecieron en 20 ml de CN, con o sin presión selectiva, a 37°C con agitación constante. Se observan las UFC; en barras azules de cajas sin Amp; en barras rojas de cajas con Amp. UFC de la resiembra del día 6. Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3.

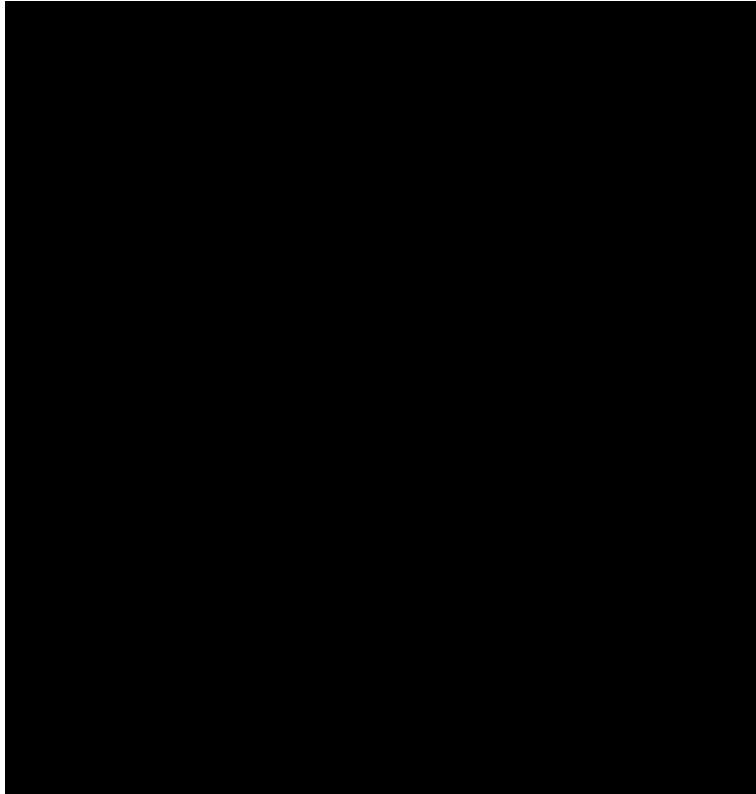


Figura 16. Determinación de la estabilidad de pJET en presencia o ausencia de los *orfs* 123-124. Los cultivos se resembraron durante 6 días en 20 ml de CN, con o sin presión selectiva, incubando a 37°C con agitación constante. Se observa la determinación de las UFC obtenidas en el tratamiento sin presión selectiva (Ampicilina) y de las resiembras del día 2 al 6. *E. coli* JM101 (pJET_131) (○) y *E. coli* JM101 (pJET_123-4) (●). Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3.

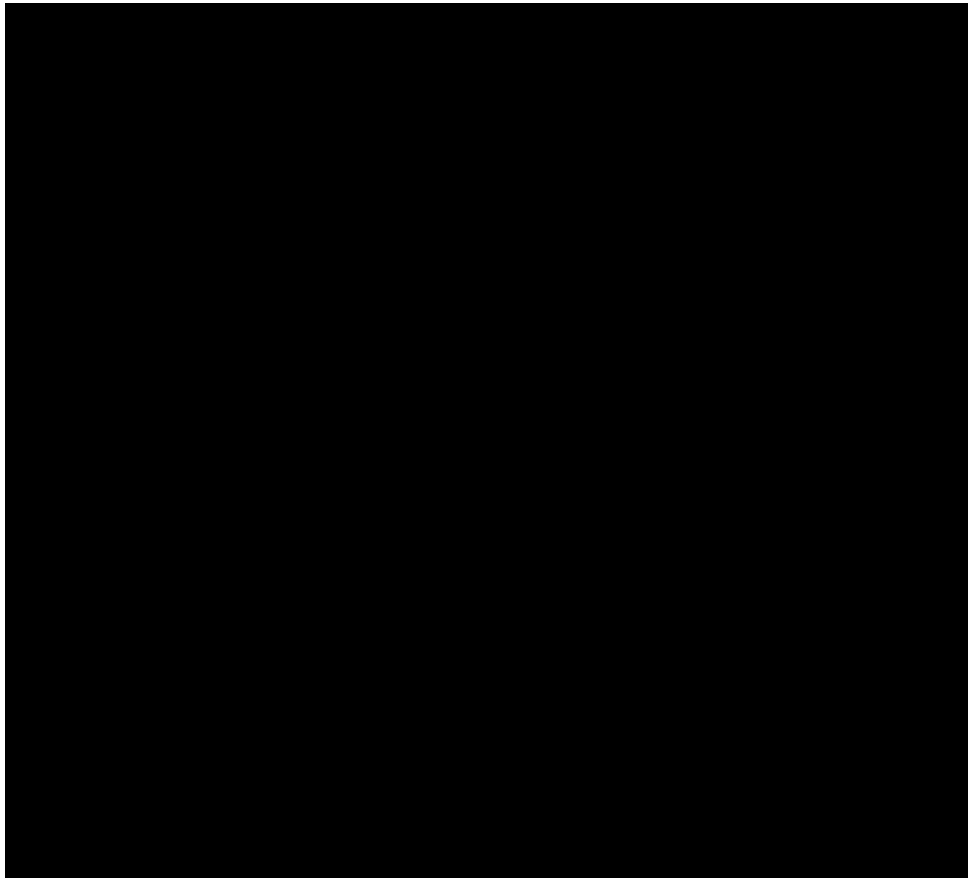


Figura 17. Cinéticas de crecimiento de la transformante *P. aeruginosa* (pUC_orf123). Los cultivos se crecieron en CN a 37 °C con agitación constante por los tiempos señalados y se midió la Abs_{600nm} de PAO1 (pUCP20) cepa control y PAO1 (pUC_orf123) la transformante. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3.

7. Transferencia del plásmido recombinante pTrc_orf123 a *E. coli* BL21.

Debido a que no se encontró que el producto codificado por el *orf* 123 inhibiera el crecimiento de *E. coli* JM101, se clonó el *orf* 123 en el vector de sobreexpresión pTrcHisC y el plásmido recombinante se transfirió a *E. coli* BL21, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. El plásmido recombinante pTrc_orf123 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* BL21. Con la finalidad de verificar la correcta ligación del *orf* 123 en el vector pTrcHisC se realizó una PCR, las transformantes obtenidas se caracterizaron por amplificación de PCR del *orf* 123, observando una banda del tamaño de aproximadamente 318 pb (**Figura 18**).

8. Determinación de la toxicidad producida por la proteína codificada por el *orf* 123 en *E. coli* BL21.

Debido a que el vector pTrcHisC posee un promotor pTrc que queda en fase con el *orf* 123, este elemento permite la sobreexpresión de la proteína codificada por el *orf* 123 al adicionar IPTG al medio de cultivo. Primero se verificó la sobreexpresión de la proteína 123 mediante un SDS-PAGE y se observó la presencia de una banda de aproximadamente 17 kDa, la cual corresponde al tamaño predicho para la probable toxina 123, solamente en los cultivos donde se adicionó el inductor IPTG (**Figura 19**). Después de determinar que la proteína 123 (codificada por el *orf* 123) se sobreexpresa en presencia de IPTG, se realizaron cinéticas de crecimiento en presencia y ausencia del inductor, observando que hay una disminución del crecimiento en la transformante *E. coli* (pTrc_orf123) cuando está

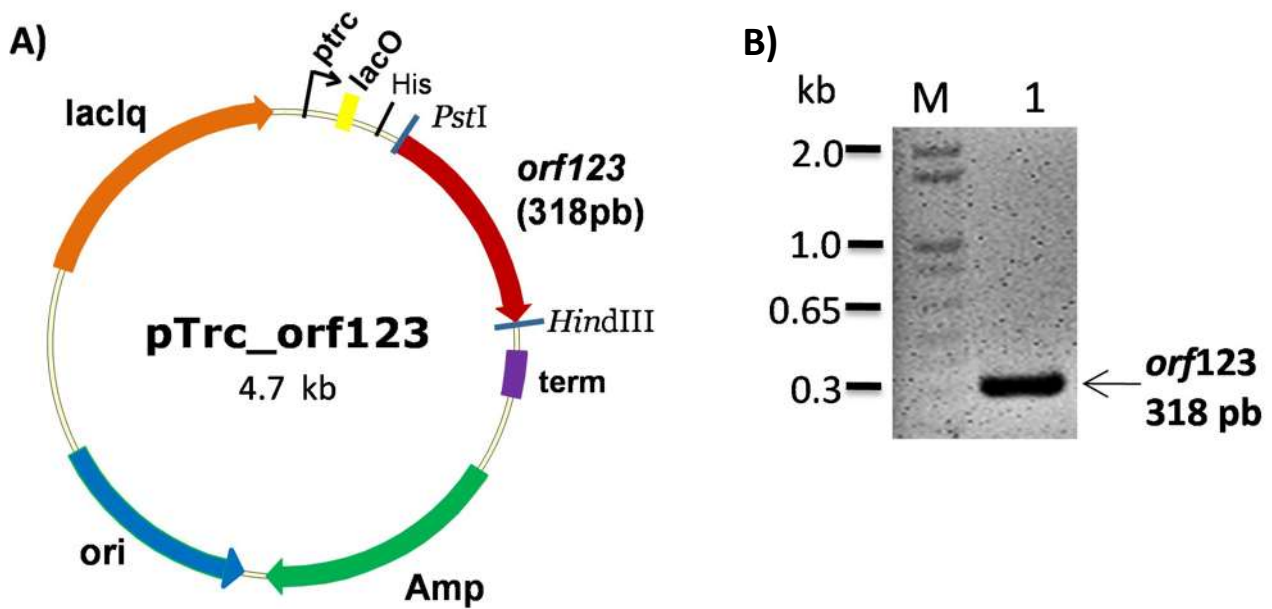


Figura 18. Subclonación del *orf 123* en el vector de expresión pTrcHisC. A) Mapa genético del plásmido pTrc_orf123. B) Amplificación por PCR del *orf 123*. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; 1, producto de amplificación de la PCR, empleando el DNA de una transformante con pTrc_orf123 (tamaño esperado de aproximadamente 318 kb).

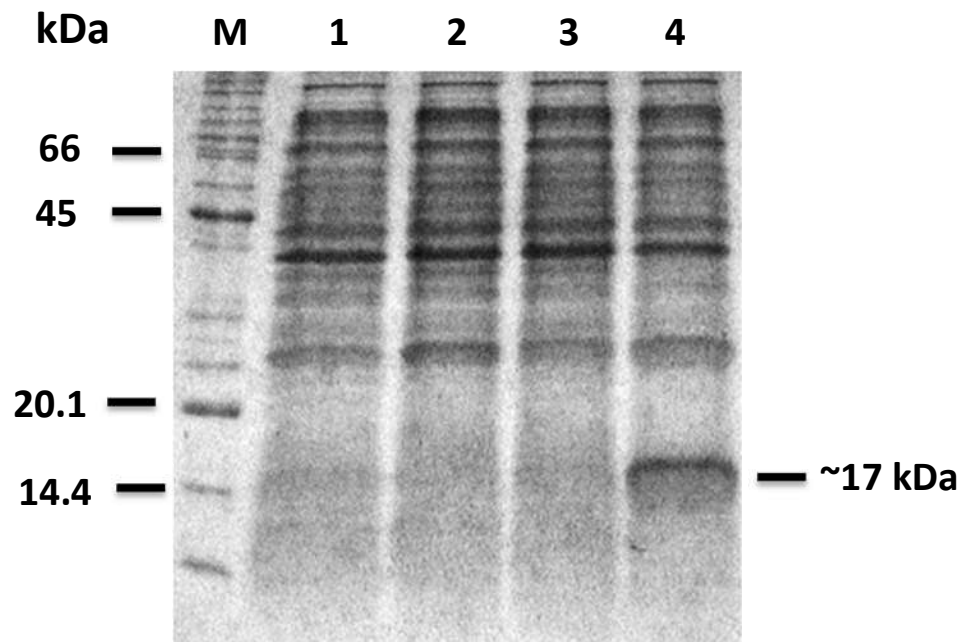


Figura 19. Separación de extractos celulares de la cepa *E. coli* BL21 con los plásmidos pTrcHisC y pTrc_orf123. Análisis SDS-PAGE de extracto crudo de células *E. coli* BL21-Codon-Plus-(DE3)-RP que contienen el vector pTrcHisC o pTrc_orf123 sin tratar (líneas 1 y 3, respectivamente) o inducido con 0.1 mM IPTG (líneas 2 y 4, respectivamente). M, Marcador de masa molecular se muestra a la izquierda en kilodaltons (kDa).

presente el inductor (**Figura 20**). Estos resultados sugieren que el producto del *orf* 123 es una toxina que disminuye el crecimiento de *E. coli* BL21.

9. Subclonación de los *orfs* 123 y 124 en conjunto y por separado en el vector pUCP20.

Con la finalidad de determinar si el producto codificado por el *orf* 123 está relacionado con la virulencia de *P. aeruginosa* y si el producto codificado por el *orf* 124 puede neutralizar tal efecto, se realizó la subclonación de ambos *orfs* de forma individual y en conjunto en el vector de expresión binario pUCP20. Para ello se realizó la digestión de los plásmidos recombinantes pJET_orf123, pJET_orf124 y pJET_orf123-4 con las enzimas de restricción *Pst*I y *Eco*RI, liberando los insertos y de esta manera poder dirigir la ligación de los *orfs* en el vector pUCP20 de acuerdo al método descrito en materiales y métodos. Se obtuvieron los plásmidos recombinantes pUC_orf123, pUC_orf124 y pUC_123-4 (**Figura 21**), los cuales se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* JM101. La subclonación de los *orfs* en el vector pUCP20 se comprobó por la digestión con enzimas de restricción. De acuerdo al corrimiento electroforético se obtuvo una banda de aproximadamente 3.8 kb en todas las digestiones, la cual corresponde al vector pUCP20 y además se observaron bandas de aproximadamente 1.1, 0.7 y 0.5 kb correspondientes a cada *orf* (**Figura 21D**). De manera adicional, se secuenció un fragmento de cada plásmido verificando que contienen los *orfs* 123 y 124 en conjunto y por separado. Posteriormente se realizó la transferencia de los plásmidos

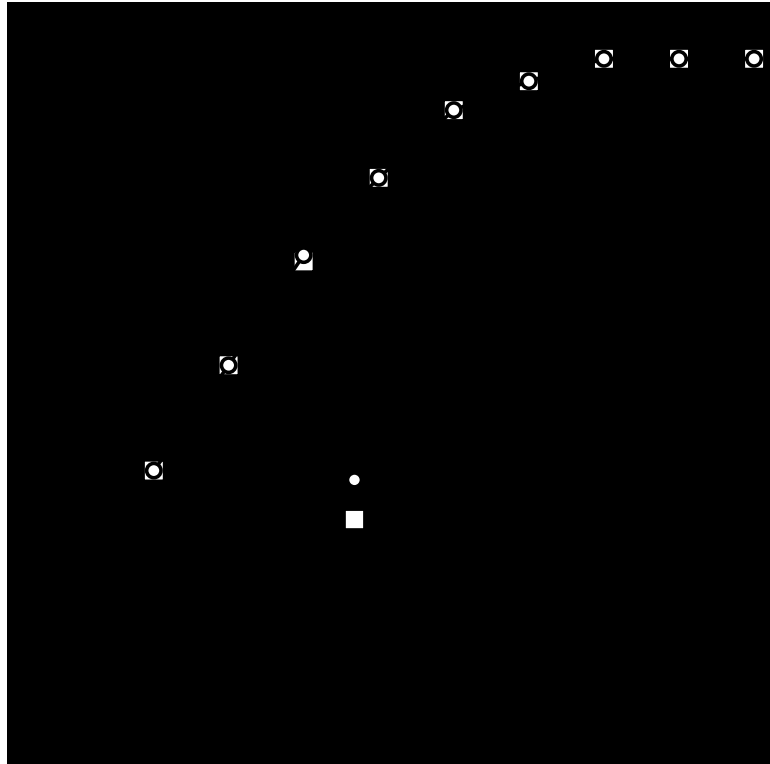


Figura 20. Cinética de crecimiento de la transformante *P. aeruginosa* (pUC_orf123) en presencia y ausencia de IPTG. Los cultivos se crecieron en CN a 37 °C con agitación constante por los tiempos señalados y se midió la Abs_{600nm}. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 4.

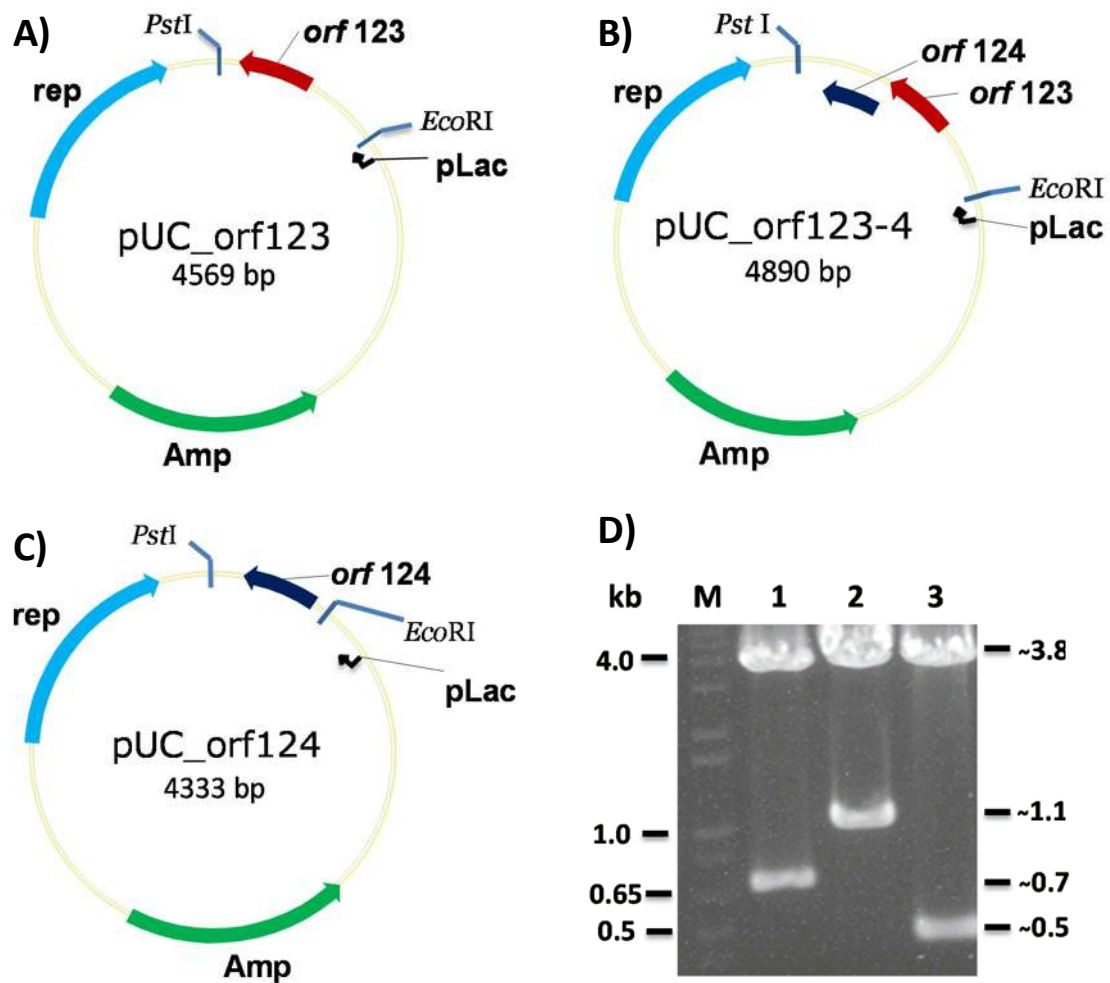


Figura 21. Subclonación de los *orfs* 123 y 124 en conjunto o por separado en el vector pUCP20. A) Mapa genético del plásmido recombinante pUC_orf123. B) Mapa genético del plásmido recombinante pUC_orf123-4. C) Mapa genético del plásmido recombinante pUC_orf124. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Pst*I y *Eco*RI de cada plásmido. D) Gel de agarosa donde se muestra la restricción con las enzimas *Pst*I y *Eco*RI. M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; 1, producto de la digestión de pUC_orf123; 2, producto de la digestión de pUC_orf123-4; 3, producto de la digestión de pUC_orf124, con las enzimas correspondientes.

recombinantes mediante electroporación a células competentes de *P. aeruginosa* PAO1.

10. Determinación de la participación del sistema TA en la virulencia de *P. aeruginosa*.

Para determinar si la proteína producida por el *orf* 123 confiere virulencia a *P. aeruginosa* sobre un huésped, se llevaron a cabo pruebas de virulencia empleando el modelo de hoja de lechuga y en ratón como modelo mamífero.

Los resultados de virulencia en hoja de lechuga mostraron que los valores de UFC obtenidos de PAO1 (pUC_orf123) fueron 3 veces mayores a los de la cepa control (**Figura 22**); en cambio las UFC obtenidas de PAO1 (pUC_orf124) y PAO1 (pUC_orf123-4) fueron similares a las del control PAO1 (pUCP20) (**Figura 22**). Esto indica que la toxina producida por el *orf* 123 aumenta la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 en el modelo de lechuga. Además sugiere que la antitoxina codificada por el *orf* 124 neutraliza la actividad de la toxina.

Con el propósito de determinar si los productos codificados por los *orfs* 123 y 124 incrementan también la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo de mamíferos, se realizaron ensayos de sobrevivencia empleado como modelo el ratón. Los ensayos de sobrevivencia mostraron que en los ratones inoculados con PAO1 (pUC_orf123) disminuyó al 40 % la sobrevivencia de los ratones, lo que indica que la toxina incrementa la virulencia de *P. aeruginosa*. Por lo contrario, se observó que en la inoculación con PAO1 (pUC_orf124) los ratones no fallecieron durante el

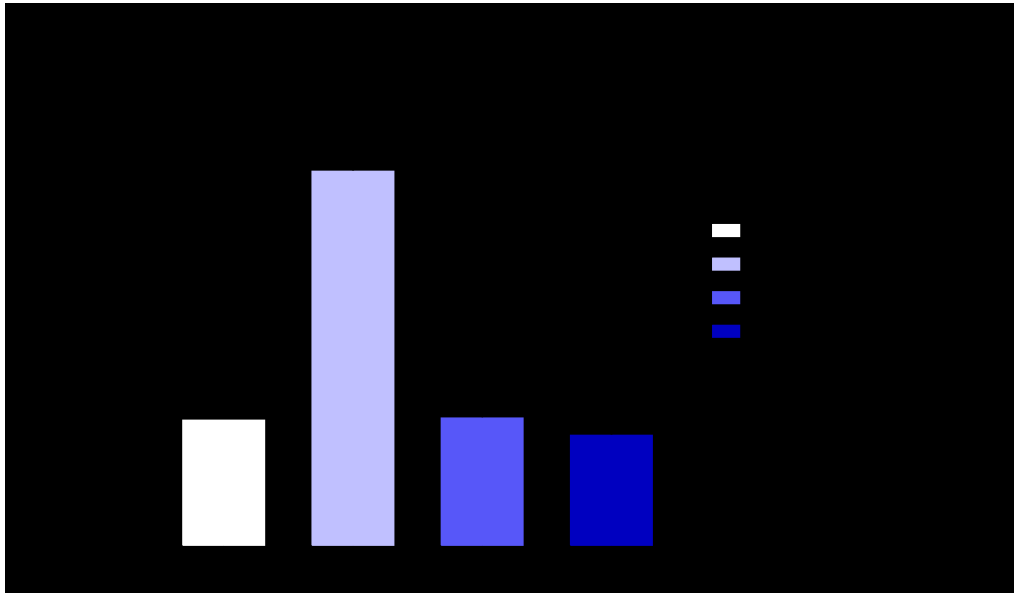


Figura 22. Virulencia causada por los *orf* 123 y 124 en *P. aeruginosa* PAO1 empleando el modelo de lechuga. Se inoculo en la nervadura de una hoja de lechuga las diferentes cepas, se incubo a 25 °C por cuatro días y se cortó el área de lesión. Se determinó las UFC de las transformantes con los *orfs* 123, 124 o 123-124, en placas de AL a 37°C. Se grafican barras en diferentes colores dependiendo de la cepa utilizada. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 4.

periodo de observación (12 días), al igual que aquellos que fueron inoculados con la cepa control PAO1 (pUCP20) (**Figura 23**). Sin embargo, se observó que los ratones inoculados con PAO1 (pUC_orf123-4) mostraron una disminución en la sobrevivencia, de manera similar a los inoculados con PAO1 (pUM505).

Para determinar si el efecto de virulencia de PAO1 inducida por el producto del *orf* 123 se debe a un incremento en la invasividad de la bacteria en los tejidos, se realizaron ensayos de invasividad en ratón. Los resultados mostraron que el producto codificado por el *orf* 123 aumenta la invasividad de *P. aeruginosa* en los tres tejidos analizados (**Figura 24**). El caso del corazón, las UFC obtenidas en los ratones con PAO1 (pUC_orf123), fue mayor con respecto a lo obtenido al inocular PAO1 (pUCP20), mientras que los inóculos con PAO1 (pUC_orf123-124) y PAO1 (pUC_orf124) mostraron valores similares al control. En los pulmones y los riñones se observó un resultado similar. Estos resultados indican que la toxina producida por el *orf* 123 aumenta la invasividad de *P. aeruginosa* y que la antitoxina del *orf* 124 neutraliza la capacidad de invasividad de la toxina.

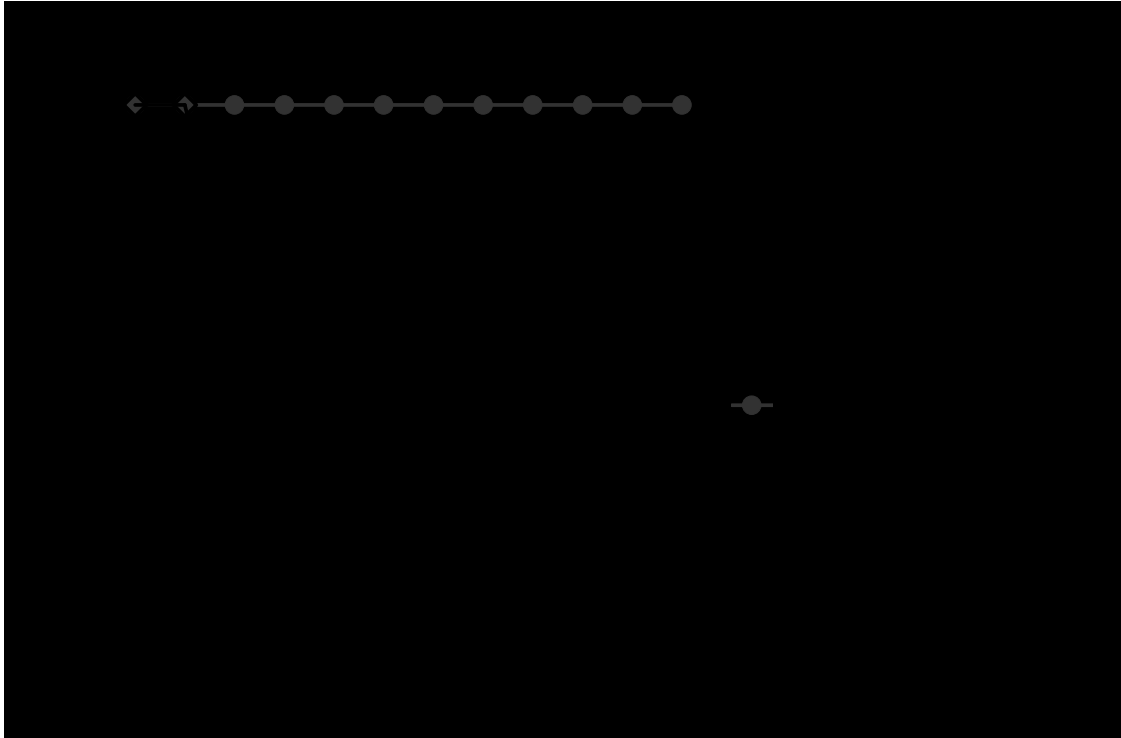


Figura 23. Supervivencia de ratones al inocularlos con *P. aeruginosa* PAO1 en ausencia o presencia de los *orfs* 123 y 124. Se inyectaron ratones por vía intravenosa con las diferentes cepas y se monitorearon diariamente por doce días. Se graficó el % de supervivencia de los ratones por cada cepa utilizada para inocularlos contra los días en que duró el experimento. n= 5.

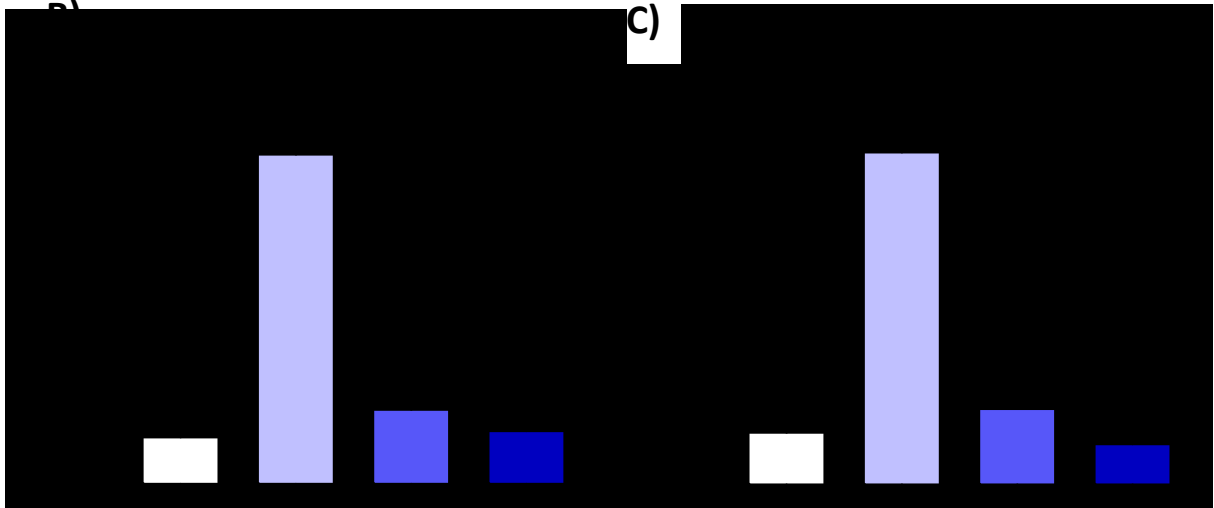
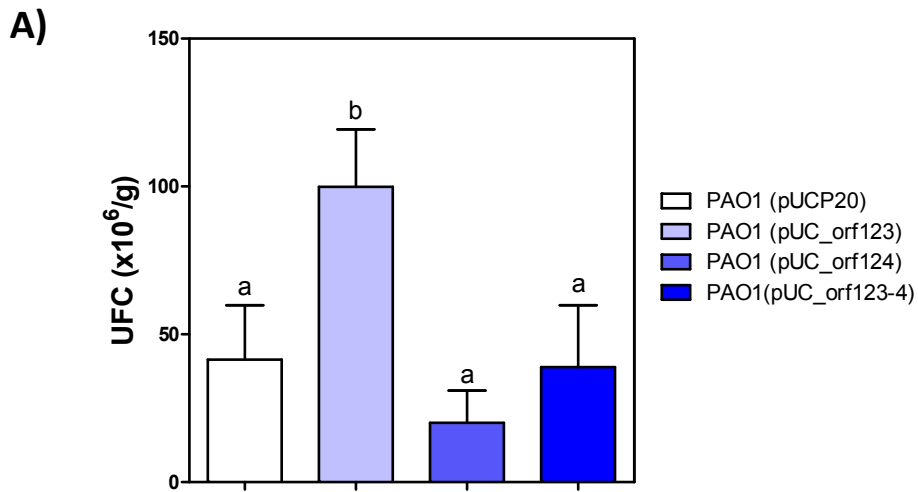


Figura 24. Invasividad de *P. aeruginosa* en presencia y ausencia de los *orfs* 123 y 124 en órganos de ratón. Se inocularon ratones por vía intravenosa con la diferentes cepas, después de 48 h se extrajeron diferentes tejidos y se determinó las UFC obtenidas de placas de AN a 37°C. A) UFC en corazón; B) UFC en pulmones y C) UFC en riñones. Se grafican barras en diferentes colores dependiendo de la cepa utilizada. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 7. $P > 0.05$, pos hoc, prueba de Tukey.

X.-DISCUSIÓN

Los plásmidos bacterianos son moléculas de DNA extracromosómico que juegan un papel importante en la adaptación bacteriana a diferentes ambientes, ya que promueven la transferencia de genes entre estos microorganismos (Loeza y col., 2004). La autorreplicación no es suficiente para asegurar la continuidad en la línea celular, existen mecanismos que aseguran la segregación de los plásmidos bacterianos a las células hijas como son: los sistemas de partición, incompatibilidad plasmídica y los sistemas de adicción, también conocidos como sistemas Toxina-Antitoxina (TA) (Actis, 1999). La principal característica de los sistemas de TA es que están formados por dos componentes. Uno de ellos es una toxina de larga vida media y el otro una antitoxina con una vida media mucho más corta, capaz de antagonizar el efecto tóxico de la toxina (Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009). Los sistemas TA se identificaron primero en plásmidos y se caracterizan por su papel en la muerte post-segregacional (**Figura 2A**) (Zielenkiewicz y Ceglowski, 2001). Después de la división celular, las células hijas que no heredan una copia de un plásmido que expresa un módulo de la adicción ya no pueden producir la proteína antitoxina. Por lo tanto, después de una rápida degradación de la proteína antitoxina residual, el exceso de proteína de la toxina restante es libre para unirse e inhibir un blanco celular específico (**Tabla 1**), proporcionando un mecanismo de selección para el mantenimiento del plásmido en la población (Brown y Shaw, 2003). Estos sistemas se clasifican en tres tipos, de acuerdo con la naturaleza de la antitoxina y su modo de interacción con la toxina. En el tipo I la antitoxina y la toxina son proteínas, las antitoxinas se unen a

las toxinas y bloquean el sitio activo de las toxinas; este tipo de sistema es el más estudiado en la actualidad (**Figura 3**) (Park y col., 2013). Los sistemas TA están ampliamente distribuidos entre muchas especies bacterianas, incluyendo patógenos humanos (Brzozowska y Zielenkiewicz, 2013).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa capaz de resistir a varios antibióticos y desinfectantes, y es uno de los principales organismos causantes de infecciones oportunistas en los seres humanos (Madigan y col., 2004).

El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado (Cervantes y Ohtake, 1988). pUM505 contiene a los *orfs* 123 y 124, localizados en una isla de patogenicidad, que probablemente codifican un sistema TA. El *orf* 123 codifica una proteína 55% idéntica a la toxina RelE del sistema TA de tipo II de *Klebsiella pneumoniae* y el *orf* 124 codifica un probable regulador transcripcional 82% similar a la antitoxina HTH (Helix-Turn-Helix) de un sistema TA de tipo II de *Pseudomonas alcaligenes* (**Figura 6**) (Ramírez-Díaz y col., 2011).

Para identificar regiones regulatorias que indiquen que los *orfs* 123 y 124 del plásmido pUM505 son genes funcionales, en este trabajo se realizó un análisis *in silico* de ambos *orfs*, encontrando un probable promotor río arriba del *orf* 123; también se identificó una región de 4 pb donde se sobreponen el codón de término e inicio de las regiones codificantes de los *orfs* 123 y 124, respectivamente (**Figura 10**). Este análisis sugiere que los *orfs* 123 y 124 son funcionales y que se transcriben a través de un RNAm bicistrónico.

Adicionalmente, se realizó un análisis BLAST con la secuencia de los *orfs* 123 y 124 mediante el programa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> para determinar con qué homólogos muestran identidad los productos de estos genes. Se determinó que el producto del *orf* 124 tiene un alto porcentaje de identidad con probables antitoxinas de sistemas TA (**Tabla 8**). Se determinó que el *orf* 123 codifica una proteína que tiene identidad con una toxina RelE, antitoxinas y proteínas hipotéticas no caracterizadas (**Tabla 7**). El producto codificado por el *orf* 123 mostró 62 % de identidad con una toxina no caracterizada de la familia RelE de *Geobacter metallireducens* GS-15. Este grado de identidad sugiere que el producto del *orf* 123 probablemente codifica a una toxina. Ha sido descrito que los miembros pertenecientes a la familia de toxinas relE no presentan un alto porcentaje de homología en la secuencia primaria (Gerdes y Maisonneuve, 2012). Por lo que las toxinas de la familia RelE han sido agrupadas con base a su estructura y función.

Los genes que codifican a sistemas TA generalmente forman operones, en donde el gen que codifica a la toxina se encuentra río arriba del que codifica a toxina (**Figura 1**) (Sevin y Barloy-Hubler, 2007). Sin embargo también se conocen sistemas con la organización invertida de los genes; por ejemplo, *higBA* (Tian y col., 1996), *mqsRA* (Brown y col., 2009). El análisis *in silico* de la secuencia de los *orfs* 123 y 124 sugirió que éstos forman un operón. Para determinar si los *orfs* 123 y 124 se transcriben a través de un RNAm bicistrónico se realizaron ensayos de RT-PCR con oligos diseñados para amplificar el cDNA sintetizado de transcritos que abarcan la región sobrepuesta de estos *orfs*. Cuando se empleó el RNA total extraído de cultivos obtenidos de las fases exponencial y estacionaria de

crecimiento, se observó la presencia de una banda de aproximadamente 0.44 kb que corresponde a la región sobrepuesta de ambos *orfs*. Este resultado indicó que los *orfs* 123 y 124 se transcriben a través de un RNA mensajero bicistrónico. Se concluyó que estos genes forman un operón cuya expresión es regulada por un probable promotor río arriba del *orf* 123. Debido a que los *orfs* 123 y 124 son co-transcritos en una sola molécula de RNAm podría estar relacionado con el hecho de que a menudo los genes bacterianos co-transcritos actúan como parte de una misma vía metabólica; además, los genes co-transcritos pueden ser regulados a nivel transcripcional. Los *orfs* 123 y 124 de pUM505, como se mencionó anteriormente, tienen sus regiones codificantes traslapados, ya que comparten cuatro nucleótidos entre el codón de inicio del *orf* 123 y el codón de paro del *orf* 124 (**Figura 10**). La regulación de la expresión de genes traslapados podría resultar en un control más eficiente y reducir la necesidad de rutas regulatorias complejas (Johnson y Chriholm, 2004).

El primer sistema de TA, *ccdA/ccdB*, fue descrito hace más de 30 años como un módulo que mejoraba la estabilidad del plásmido F de *E. coli* por exterminio post-segregacional (Ogura y Hiraga, 1983), por lo tanto, a los sistemas TA encontrados en plásmidos se les atribuyó como principal función evitar la pérdida del plásmido. Para determinar si los *orfs* 123 y 124 participan en la estabilidad de un plásmido, se clonaron ambos *orfs* con su probable promotor en el vector pJET 1.2/Blunt que es resistente a ampicilina (Ap). El plásmido recombinante se transfirió a la cepa *E. coli* JM101 y se corroboró la presencia de ambos *orfs* en el plásmido pJET (**Figura 13**). Primero se analizó la estabilidad del plásmido pJET_*orf*131 (*orf* 131, implicado en resistencia a ciprofloxacina), realizando resiembras cada 24 h en

presencia o ausencia de presión selectiva y de cada tratamiento se tomaron muestras para determinar las UFC. Se demostró que al aumentar los días de resiembra, las UFC obtenidas en cajas con Ap del tratamiento sin presión selectiva disminuyó hasta no obtener ninguna colonia en el día 6 de resiembra (**Figura 14**). Esto indicó que el plásmido pJET requiere de la presión selectiva para no perderse durante la duplicación celular. Para determinar si los *orfs* 123 y 124 participan en la estabilidad del plásmido pJET, se realizó la misma metodología usada con el plásmido vacío y los resultados demostraron que las UFC obtenidas de la cepa *E. coli* pJET_orf123-4 se mantiene constante al aumentar el número de resiembras (**Figura 16**). Esto indicó que los *orfs* 123 y 124 confieren estabilidad al plásmido pJET y por lo tanto sugiere que los *orfs* 123 y 124 codifican a un sistema TA en pUM505, que probablemente está formado por una toxina codificada por el *orf* 123 y una antitoxina codificada por el *orf* 124.

Se sabe que las toxinas de los sistemas TA caracterizadas inhiben el crecimiento celular. Estas toxinas tienen blancos celulares específicos en la bacteria huésped. Por ejemplo, la toxina Hok se integra en la membrana interna de la célula deteniendo la síntesis de ATP (Gerdes y col., 1986); la toxina ParE inhibe a la DNA girasa interrumpiendo la replicación (Jiang y col., 2002) y la toxina RelE corta el RNAm unido al sitio A del ribosoma interrumpiendo la traducción de proteínas (Christensen y col., 2003). Por lo tanto, con la finalidad de conocer si el producto codificado por el *orf* 123 es una toxina, el gen se subclonó en el vector pUCP20 y el plásmido recombinante se transfirió a *P. aeruginosa* PAO1. Se realizaron cinéticas de crecimiento y los resultados mostraron que el crecimiento fue similar al del control *P. aeruginosa* pUCP20 (**Figura 17**), indicando que el producto del *orf*

123 no inhibe el crecimiento de PAO1 en las condiciones analizadas. Estos resultados sugieren que la cantidad de toxina que se produce en la transformante probablemente no es suficiente para inhibir el crecimiento o bien que por alguna razón la proteína esté inactiva. Sin embargo, se ha reportado que algunas toxinas se expresan más bajo condiciones de estrés como bajas concentraciones de nutrientes, cambio de temperatura y estrés oxidativo, debido a que pueden inducir un estado de persistencia (células bacterianas son temporalmente tolerantes a los antibióticos sin ser genéticamente resistentes a ellos) o favorecer la sobrevivencia celular (Yamaguchi y col., 2011; Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009). Para determinar si el producto del *orf* 123 produce un efecto tóxico bajo condiciones de estrés, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio de cultivo mínimo y a 30°C como temperatura de incubación; sin embargo, no se observó diferencia en el crecimiento de la transformante con respecto al control. Estos resultados pueden indicar que la falta de inhibición por el producto del *orf* 123 puede deberse a una baja expresión de la proteína. Debido a que se determinó que los *orfs* 123 y 124 confieren estabilidad plasmídica en *E. coli*, esto sugiere que el *orf* 123 debe causar un daño tóxico a la célula que lo contiene, para poder matar a las células hijas que no heredan el plásmido con el sistema TA, además en otro estudio previo han descrito que es necesario clonar el gen de la toxina en vectores de sobreexpresión (De la Cruz y col., 2013). Para observar el efecto de las toxinas, De la Cruz y colaboradores en el 2013, clonaron varios sistemas TA encontrados en el cromosoma de *Salmonella*, en un vector de expresión y pudieron observar la disminución del crecimiento *E. coli* BL21 (DE3) causado por la sobreexpresión de las toxinas. Esto sugirió que las diferencias en el grado de inhibición generado por

las diferentes toxinas se debía a la diferencia en los niveles de expresión de éstas. Debido a lo anterior, el *orf* 123 se subclonó bajo el promotor pTrc que es inducible por IPTG en el vector de expresión pTrcHisC. El plásmido recombinante se transfirió a la cepa *E. coli* BL21-Codon Plus® (DE3)-RP, la cual permite la eficiente sobreexpresión de proteínas heterólogas. Primero se verificó mediante una PCR la presencia del *orf* 123 en el plásmido pTrcHisC (**Figura 18**); después, mediante un SDS-PAGE se comprobó la sobreexpresión de la proteína codificada por el *orf* 123 (**Figura 19**). Por último, se realizaron cinéticas de crecimiento en presencia del inductor IPTG en medio líquido. Se observó que el crecimiento en la cepa BL21 pTrc_orf123 fue inhibido en presencia de IPTG en comparación con el control (**Figura 20**). Este resultado indica que el producto codificado por el *orf* 123 tiene el comportamiento de una proteína tóxica ya que disminuye el crecimiento de *E. coli* BL21, y sugiere que éste corresponde al módulo toxina del sistema toxina-antitoxina codificado en el plásmido pUM505.

Mientras que la función de los sistemas TA localizados en plásmidos es clara y se relaciona con la estabilidad de plásmidos, la función de los sistemas TA codificados en cromosomas es variada. Una gran cantidad de sistemas TA han sido encontrados en cromosomas bacterianos (Unterholzner y col., 2013). De manera interesante, se identificaron bacterias consideradas como patógenas que contienen docenas de sistemas de TA putativos en su genoma; por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (Gupta, 2009) y *Nitrosomonas europaea* (Pandey y Gerdes, 2005), mientras que bacterias no patógenas contienen ninguno o muy pocos (menos de tres) sistemas TA putativos, como *Rickettsia prowazeki*,

Campylobacter jejuni o *Bacillus subtilis* (Leplae y col., 2011). Estos datos llevaron a sugerir que los sistemas TA están implicados en la patogenicidad de las bacterias (Leplae y col., 2011). De la Cruz y colaboradores en el 2013, mediante un análisis bioinformático encontraron que en el genoma de *Salmonella typhimurium* están presentes 11 sistemas TA de tipo II, de los cuales varios se conservan en otras cepas patógenas de la misma especie pero están ausentes en cepas no patógenas, lo cual sugirió que ciertos sistemas TA podrían tener un papel en la patogenicidad de *Salmonella*. Ellos llegaron a la conclusión de que los sistemas TA puede aportar una ventaja selectiva que favorece la virulencia al demostrar que estos sistemas están involucrados en la patogénesis de *Salmonella* (De la Cruz y col., 2013). Se ha descrito que algunos sistemas TA encontrados en cromosoma causan aumento de la virulencia de sus huéspedes bacterianos, incluyendo *M. tuberculosis* (Sala y col., 2014) y *E. coli* (Norton y Mulvey, 2012). Por lo tanto, fue de nuestro interés conocer si la toxina codificada por el *orf* 123 aumenta la virulencia de *P. aeruginosa*. Para determinar esto, inicialmente se realizaron pruebas de virulencia en modelo de hoja de lechuga, se clonaron los *orfs* 123 y 124 en conjunto y por separado en el vector pUCP20 y los plásmidos recombinantes pUC_orf123, pUC_orf124 y pUC_123-4 se transfirieron a la cepa *P. aeruginosa* PAO1. Se comprobó la clonación de los *orfs* en el vector mediante una restricción enzimática (**Figura 21**). Los resultados mostraron que las UFC obtenidas de las transformantes con PAO1 (pUC_orf123) fueron 3 veces mayores a los de la cepa PAO1 (pUCP20) (**Figura 22**); esto indica que la probable toxina producida por el *orf* 123 aumenta la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 en el modelo de lechuga. Por el contrario, las UFC resultantes de la probable antitoxina

y el probable sistema completo (PAO1 pUC_orf124 y PAO1 pUC_orf123-4) no variaron con respecto al control PAO1 (pUCP20), lo cual indica que el sistema completo no produce cambios en la virulencia. Estos resultados indican que la proteína producida por el *orf* 123 ayuda a que *P. aeruginosa* aumente su capacidad de causar un daño a las hojas de lechuga y que este efecto es neutralizado por la presencia del producto codificado por el *orf* 124.

Los resultados obtenidos en modelo de ratón mostraron que la presencia del producto codificado por el *orf* 123 aumenta la invasión de *P. aeruginosa* en tejidos como corazón, pulmón y riñón, en comparación con el control PAO1 (pUCP20) y las transformantes que contienen al *orf* 124 y los *orfs* 123-124 (**Figura 24**). Estos datos indican que la toxina producida por el *orf* 123 aumenta la virulencia de *P. aeruginosa*. Además, la antitoxina neutraliza el efecto de la toxina, los resultados obtenidos confirman que los *orfs* 123 y 124 forman un sistema TA, conformado por una toxina (producto del *orf* 123) y su antitoxina (producto del *orf* 124).

Cabe destacar que sólo se ha reportado la presencia de dos sistemas TA en el cromosoma de *P. aeruginosa*, pero no se ha dilucidado su función (Williams y col., 2011). Hasta donde sabemos, éste es el primer reporte de un sistema TA encontrado en un plásmido de *P. aeruginosa*, el cual además de dar estabilidad plasmídica también participa en la virulencia de dicha bacteria.

XI.-CONCLUSIONES

1. El plásmido pUM505 contiene un operón que codifica a un sistema Toxina-Antitoxina (*orfs*123-124) que incrementa la estabilidad plasmídica.
2. La proteína codificada por el *orf* 123 del sistema Toxina-Antitoxina del plásmido pUM505, incrementa la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en modelo vegetal y animal.
3. El efecto de la toxina es neutralizado por la antitoxina codificada por el *orf* 124 del plásmido pUM505.

XII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Actis, L. A., Tolmasky, M. E. y Crosa, H. S. (1999). Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci.* 3: d43-62.
2. Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H. y Glaser, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine 3, 5-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6059–6063.
3. Alonso, J. C., Balsa, D., Cherny, I., y col. (2007). Bacterial toxin–antitoxin systems as targets for the development of novel antibiotics. *Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics: Mechanisms, Dissemination, and Prospects for Inhibition.* Washington: *ASM Press.* p313–329.
4. Anantharaman, V. y Aravind, L. (2003). New connections in the prokaryotic toxin antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA. *Genome Biol.* 4(12): R81.
5. Battle, S. E., Meyer, F., Rello, J., Kung, V. L. y Hauser, A. 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.
6. Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
7. Blower, T. R., Pei, X. Y., Short, F. L., Fineran, P. C., Humphreys, D. P., Luisi, B. F. y Salmond, G. P. (2011). A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat Struct Mol Biol.* 18(2): 185-90.
8. Bouet, J. Y., Nordström, K. y Lane, D. (2007). Plasmid partition and incompatibility – the focus shifts. *Mol Microbiol.* 65(6): 1405-1414.
9. Brown, B.L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J. M., Davenport, A., Wood, T. K., Peti, W., Page, R., (2009). Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog.* 5(12): e1000706.

10. Brown, J. M. y Shaw, K. J. (2003). A novel family of *Escherichia coli* toxin-antitoxin gene pairs. *J bacteriol.* 185(22): 6600-6608.
11. Brzozowska, I. y Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70: 33-41.
12. Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M. H., Wyns, L. y Loris, R. (2005). Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci.* 30: 672-679.
13. Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173-176.
14. Cervantes-Vega, C., Chávez, J., Córdova, N. A., De la Mora, P. y Velasco, J. A. (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48: 159-163.
15. Christensen, S. K. y Gerdes, K. (2003). RelE toxins from bacteria and archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol Microbiol.* 48: 1389-400.
16. Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K. y Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14328-14333.
17. Cooper, T. F. y Heinemann, J. A. (2000). Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 12643-12648.
18. Courcelle, J., Khodursky, P. B., Brown, P. O. y Hanawalt, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158: 41-64.
19. De la Cruz, M. A., Zhao, W., Farenc, C., Gimenez, G., Raoult, D., Cambillau, C., Gorvel, J. y Méresse, S. (2013). A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. *PLOS Pathogens* 9(12): e1003827.
20. De la Hoz, A. B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernandez, S., Pankiewicz, R., Alonso, J. C. y Ceglowski, P. (2000). Plasmid copy-number control and better than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 728-733.

21. Del Solar, G., Alonso, J. C., Espinosa, M. y Diaz-Orejas, R. (1996). Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol Microbiol.* 21: 661-666.
22. DeNap, J. C. y Hergenrother, P. J. (2005). Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drugresistant bacteria. *Org Biomol Chem.* 3: 959–966.
23. Dobrindt, U. y Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Infect Diss.* 4: 550-557.
24. Dörr, T., Vulić, M. y Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 8(2): e1000317.
25. Enderle, P. J. y Farwell, M. A. (1988). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25: 955-958.
26. Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I. y Hazan, R. (2006). Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet.* 2(10): 1518–1526.
27. Engelberg-Kulka, H., Sat, B., Reches, M., Amitai, S. y Hazan, R. (2004). Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends Microbiol.* 12: 66–71.
28. Fernández de Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J. J., y col. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 35: 1560–1572.
29. Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S. y Salmond, G. P. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein- RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 894-9.
30. Fivian-Hughes, A. S. y Davis, E. O., (2010). Analyzing the regulatory role of the HigA antitoxin within *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 192: 4348–4356.

31. Gerdes, K. (2000). Toxin–antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol.* 182: 561–572.
32. Gerdes, K. y Maisonneuve, E. (2012). Bacterial persistence and toxin–antitoxin Loci. *Annu Rev Microbiol.* 66: 103-123.
33. Gerdes, K., Bech, F. W., Jørgensen, S. T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P. B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., Von Meyenburg, K. (1986). Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. *EMBO J.* 5: 2023-2029.
34. Gerdes, K., Christensen, S. K. y Lobner-Olesen, A. (2005) Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol.* 3: 371–382.
35. Gerdes, K., Moller-Jensen, J. y Jensen, R. B. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol.* 37(3): 455-466.
36. Gerdes, K., Rasmussen, P. B. y Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 3116–3120.
37. Gupta, A. (2009). Killing activity and rescue function of genome-wide toxin–antitoxin loci of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 290: 45-53.
38. Hacker, J. y Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
39. Hardalo, C. y Edberg, S. C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol.* 23(1): 47-75.
40. Hayes, F. y Van Melderer, L. (2011). Toxins–antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 46: 386–408.
41. Heaton, B. E., Herrou, J., Blackwell, A. E., Wysocki, V. H. y Crosson, S., (2012). Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin antitoxin system of *Brucella abortus*. *J. Biol. Chem.* 287: 12098–12110.
42. Holloway, B. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 13: 572-581.

43. Ish-Horowics, D. y Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.
44. Jaffe, A., Ogura, T. y Hiraga, S. (1985). Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. *J Bacteriol.* 163: 841–849.
45. Jensen, R. B. y Gerdes, K., (1995). Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol. Microbiol.* 17: 205–210.
46. Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D. R. y Konieczny, I. (2002). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol Microbiol.* 44: 971-979.
47. Johnson, Z. I. y Chisholm, S. W. (2004). Properties of overlapping genes are conserved across microbial genomes. *Genome Res.* 14(11): 2268-2272.
48. Jørgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M. y Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J Bacteriol.* 191: 1191-1199.
49. Kawano, M., Aravind, L. y Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol. Microbiol.* 64: 738–754.
50. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. y Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 186: 8172–8180.
51. Khan, S. A. (1997). Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61: 442-455.
52. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. y Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797–810.
53. Koonin, E. V. y Wolf, Y. I., (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* 36: 6688–6719.
54. Korch, S. B. Y Hill, T. M. (2006). Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J Bacteriol.* 188: 3826-3836.

55. Kunin, V. y Ouzounis, C. A. (2003). The balance of driving forces during genome evolution in prokaryotes. *Genome Res.* 13: 1589–1594.
56. Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Dre`ze, P., y col. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* 39: 5513-5525.
57. Lewin, B. (2008). Genes IX. 1ª. Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 392-393.
58. Li, L. L., Malone, J. E. y Iglewski, B. H. (2007). Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol.* 189: 4367-4374.
59. Liu, M., Zhang, Y., Inouye, M. y Woychik, N. A. (2008). Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 5885-5890.
60. Loeza, P. D., Valdez, J. J., Baizabal V. M. y López J. E. (2004). Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *REB* 23(2): 71-78.
61. López-Meza, J. E. (2001). Biología molecular de los plásmidos RC y su función en *Bacillus thuringiensis*. *Ciencia Nicolaita.* 29: 23-30.
62. Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (1999). Brock Biología de los microorganismos. 8ª Edición. Ed. Prentice Hall. pp. 306, 338-342, 374, 375.
63. Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N. y Horiuchi, T. (1992). Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress *letD* (*ccdB*) product growth inhibition. *J Mol Biol.* 225: 39-52.
64. Mochizuki, A., Yahara, K., Kobayashi, I. y Iwasa, Y. (2006). Genetic addiction: selfish gene's strategy for symbiosis in the genome. *Genetics* 172: 1309–1323.
65. Muñoz-Gómez, A. J., Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A. y Díaz-Orejas, R. (2005). RNase/anti-RNase activities of the bacterial *parD* toxin-antitoxin system. *J Bacteriol.* 187: 3151-3157.

66. Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L. y Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol.* 9(3): e1001033.
67. Nariya, H. y Inouye, M. (2008). MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* 132: 55–66.
68. Ning, D., Ye, S., Liu, B. y Chang, J. (2011). The proteolytic activation of the relNEs (ssr1114/slr0664) toxin–antitoxin system by both proteases Lon and ClpP2s/Xs of *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Curr. Microbiol.* 63: 496-502.
69. Novick, R. P. (1987). Plasmid Incompatibility. *Microbiol Rev.* 51(4): 381-395.
70. Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 139-144.
71. Pandey, D. P. y Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33: 966-976.
72. Park, S. J., Son, W. S. y Lee, B. J. (2013). Structural overview of toxin–antitoxin systems in infectious bacteria: A target for developing antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta* 1834: 1155–1167.
73. Pecota, D. C. y Wood, T. K. (1996). Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *J Bacteriol.* 178: 2044-2050.
74. Pedersen, K. y Gerdes, K. (1999). Multiple *hok* genes on the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 32: 1090–1102.
75. 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 genes. *Plasmid* 66: 7-18.
76. Romero, D. y Palacios, R. (1997). Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet.* 31: 91-111.

77. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
78. Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., Brennan, R. G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323: 396- 401.
79. Sevin, E. W. y Barloy-Hubler, F. (2007). RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol.* 8: R155.
80. Smith, A. S. G. y Rawlings, D. E. (1997). The poison antidote stability system of the broad-host-range *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid pTF-FC2. *Mol Microbiol.* 26: 261–270.
81. Stover, C., Pham, Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrenner, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D. y Lagrou, M. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
82. Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D. y Rowe-Magnus, D. A. (2007). Chromosomal toxin–antitoxin loci can diminish larges cale genome reductions in the absence of selection. *Mol Microbiol.* 63: 1588–1605.
83. Tian, Q. B., Ohnishi, M., Tabuchi, A. y Terawaki, Y., (1996). A new plasmid encoded proteic killer gene system: cloning, sequencing, and analyzing *hig* locus of plasmid Rts1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 280–284.
84. Tsuchimoto, S., Nishimura, Y. y Ohtsubo, E., (1992). The stable maintenance system *pem* of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *J Bacteriol.* 174: 4205–4211.
85. Unoson, C. y Wagner, E. G. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 70: 258–70.
86. Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., y Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems; Biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements.* 3(5):e26219.
87. Van Melderen, L. y Saavedra De Bast, M. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities?. *PLoS Genet.* 5: e1000437

88. Van Melderen, L., Bernard, P. y Couturier, M. (1994). Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol Microbiol.* 11: 1151–1157.
89. Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. y Altuvia, S. (2004). The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS induced toxic peptide. *Curr. Biol.* 14: 2271–2276.
90. 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.
91. Williams, J. J. y Hergenrother, P. J. (2008). Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* 12: 389-399.
92. Williams, J. J., Halvorsen, E. M., Dwyer, E. M., DiFazio, R. M. y Hergenrother, P. J. (2011). Toxin-antitoxin (TA) systems are prevalent and transcribed in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 322: 41–50.
93. Winther, K. S. y Gerdes, K. (2011). Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 7403-7407.
94. Yamaguchi, Y., Park, J. H. y Inouye, M. (2011). Toxin–antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet.* 45: 61–79.
95. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUCP19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
96. Yarmolinsky, M. B. (1995). Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267: 836–837
97. Zhang, Y. y Inouye, M. (2011). RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol Microbiol.* 79: 1418-1429.

98. Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G. y Inouye, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell*. 12: 913-923.
99. Zielenkiewicz, U. y Ceglowski, P. (2001). Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochim Pol*. 48: 1003–1023.