



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS



**“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A QUINOLONAS
CONFERIDO POR EL *orf131* DEL PLÁSMIDO pUM505”**

TESIS

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

M.C. Víctor Manuel Chávez Jacobo

Asesora:

D. C. Martha Isela Ramírez Díaz

Co-asesor:

D. C. Jesús Silva Sánchez

Morelia, Mich; Mayo del 2020

ÍNDICE

A. RESUMEN.....	I
B. ABSTRACT.....	III
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Clasificación de las quinolonas.....	3
1.1. Primera generación.....	3
1.2. Segunda generación.....	3
1.3. Tercera generación.....	5
1.4. Cuarta generación.....	5
2. Relación entre la estructura y el efecto de acción de las quinolonas.....	8
3. Mecanismo de acción de la quinolonas.....	9
4. Sistemas de resistencia a quinolonas.....	13
4.1. Sistemas de resistencia codificados en genes cromosómicos.....	15
4.1.1. Modificación de los sitios blanco.....	15
4.1.2. Sistemas de expulsión.....	15
4.2. Sistemas de resistencia codificados en genes plasmídicos.....	16
4.2.1. Proteínas Qnr.....	16
4.2.2. Modificación enzimática.....	17
4.2.3. Sistemas de expulsión.....	18
II. ANTECEDENTES.....	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVOS.....	26
A) Objetivo general.....	26
B) Objetivos particulares.....	26
VI. RESULTADOS.....	27
1. Capítulo I.....	28
II. Capítulo II.....	39
III. Capítulo III.....	46
IV. Capítulo IV.....	54
V. Capítulo V.....	62
VII. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.....	73
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente	2
Figura 2.	Primera y segunda generación de quinolonas.....	4
Figura 3.	Tercera y cuarta generación de quinolonas.....	6
Figura 4.	Nuevas moléculas derivadas de quinolonas.....	7
Figura 5.	Acción de las topoisomerasas tipo IIA sobre el ADN.....	10
Figura 6.	Representación esquemática de la acción de las quinolonas.....	12
Figura 7.	Mecanismos de resistencia a quinolonas.....	14
Figura 8.	Alineamiento de la secuencia de la proteína codificada por el <i>orf131</i> con la enzima APH II-b de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18.....	22
Figura 9.	Resistencia a ciprofloxacina conferida por el <i>orf131</i> del plásmido pUM505...	23

I. RESUMEN

Las quinolonas son una familia de antibióticos sintéticos utilizados principalmente en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las topoisomerasas tipo IIA: la DNA girasa y la topoisomerasa IV. No obstante, ciprofloxacina, la quinolona de mayor prescripción en el mundo, también presenta actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*. El uso y abuso de las quinolonas ha contribuido a la selección de bacterias resistentes a su acción y actualmente, los sistemas de resistencia a estos antibióticos se encuentran ampliamente distribuidos y se pueden dividir en dos grupos: I) Sistemas codificados por genes cromosómicos: Incluyen las mutaciones en los genes que codifican a las proteínas blanco de las quinolonas y los sistemas de expulsión; y II) Sistemas codificados por genes presentes en plásmidos: Comprenden a las proteínas Qnr, los sistemas de expulsión QepA y OqxAB, y la enzima aminoglucósido acetiltransferasa modificada (AAC(6')-Ib-cr).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo identificó que el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* contiene el *orf131* que codifica una proteína de 65 aminoácidos. Esta proteína presenta un 18% de identidad y 26% de similitud con la aminoglucósido fosfotransferasa IIb (APH-IIb) de *P. aeruginosa* M18. El *orf131* al ser transferido a *Escherichia coli* confirió resistencia a ciprofloxacina. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar el mecanismo mediante el cual la proteína codificada por el *orf131* confiere resistencia a ciprofloxacina, además de analizar su distribución en aislamientos de origen clínico.

El *orf131*, renombrado como *crpP* (Proteína de resistencia a ciprofloxacina codificada en un plásmido) se clonó en el vector pTrcHISC y se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 con el

objetivo de realizar la sobreexpresión del gen y purificar la proteína CrpP. La proteína purificada se empleó para realizar ensayos de actividad enzimática mediante la reacción acoplada PK-LDH y se determinó que CrpP presenta actividad dependiente de ATP. Para confirmar el tipo de modificación que sufre ciprofloxacina se empleó HPLC-MS y se determinó que la molécula se fosforila en el grupo hidroxilo de la posición tres.

Con el objetivo de determinar la distribución de *crpP* en aislados de origen clínico, se analizaron 77 aislados y 68 cepas transconjugantes colectadas de hospitales de México desde 1988 hasta 2012. El gen *crpP* fue identificado en cuatro (5.19%) de los aislados y en cinco (7.35%) de las transconjugantes. Se encontró que los genes identificados codifican probables proteínas de tamaños similares a CrpP (63-70 aa) y una identidad entre 10.1-43.7%. Se transfirieron los genes homólogos a *E. coli* y se determinó que confieren resistencia a ciprofloxacina por lo que se concluye que el determinante se encuentra distribuido y que confiere resistencia mediante la probable modificación del antibiótico.

Con el objetivo de identificar los residuos de la proteína CrpP asociados con la resistencia a ciprofloxacina se generaron mutaciones independientes en los codones que codifican para los residuos conservados de las posiciones G7, D9, I26, K33 y C40 para sustituirlos por alanina. Se encontró que la modificación del residuo C40 abate la actividad completamente; mutaciones en los residuos G7, D9 y K33 disminuyen la actividad casi diez veces con respecto del control y la mutación en el residuo I26 disminuye la actividad 1.8 veces. Finalmente, las pruebas de susceptibilidad correlacionan con los resultados enzimáticos, ya que la susceptibilidad disminuye en cada una de las mutantes, por lo que los residuos modificados están relacionados con la actividad enzimática de CrpP.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, ciprofloxacina, enzima, fosforilación y proteínas homólogas.

II. ABSTRACT

Quinolones are a family of synthetic antibiotics used primarily in the treatment of infections caused by enterobacteria. Its mechanism of action consists in the inhibition of topoisomerase type IIA: DNA gyrase and topoisomerase IV. However, ciprofloxacin, the most prescribed quinolone in the world, also has activity against *Pseudomonas aeruginosa*. The use and abuse of quinolones has contributed to the selections of bacteria resistant to its action. Currently, resistance systems to these antibiotics are widely distributed and can be divided into two groups: I) Systems encoded by chromosomal genes: They include mutations in the genes encoding the quinolone target proteins and, efflux systems; and II) Systems encoded by genes present in plasmids: They comprise the Qnr proteins, the QepA and OqxAB efflux systems, and the modified aminoglycoside acetyltransferase enzyme (AAC (6')-Ib-cr).

Recently, our work group identified that plasmid pUM505 from *P. aeruginosa* contains the *orf131* that encodes a 65 amino acid protein. This protein has identity of 18% and 26% of similarity to the aminoglycoside phosphotransferase IIb (APH-IIb) of *Pseudomonas aeruginosa* M18. When we transferred *orf131* to an *Escherichia coli* strain it conferred resistant to ciprofloxacin. Therefore, the objective of this work was to characterizes the mechanism by which the protein encoded by *orf131* confers resistance to ciprofloxacin, in addition to analyze its distribution into clinical origin isolates.

The *orf131*, were renamed as *crpP* (ciprofloxacin resistance protein plasmid encoded) was cloned into the pTrcHISC vector and transferred to *E. coli* strain BL21 in order to overexpressed the gene and purify the CrpP protein. The purified protein was used to perform enzymatic activity assays by the PK-LDH coupled reaction and it was determined that CrpP exhibits ATP-dependent activity. To confirm the type of modifications that ciprofloxacin

undergoes, HPLC-MS was used and it was determined that the molecule is phosphorylated in the hydroxyl group at position three.

In order to determine the distribution of *crpP* in isolates of clinical origin, 77 isolates and 68 transconjugants strains isolated from hospitals in Mexico collected from 1988 to 2012, were analyzed. The *crpP* genes were identified in four (5.19%) of the isolates and in five (7.35%) of the transconjugants. The identified genes were found to encode probable CrpP-like proteins (63-70 aa) and an identity between 10.1-43.7%. Homologous genes were transferred to *E. coli* and it was determined that they confer resistance to ciprofloxacin so it is concluded that the determinant is distributed and that confers resistance through the probable modification of the antibiotic.

In order to identify the CrpP protein residues associated with ciprofloxacin resistance, independent mutations were generated in the codons for the conserved residues of position G7, D9, I26, K33 and C40 to exchange them for alanine. It was found that the modification of residue C40 completely depletes enzymatic activity. Mutation in residues G7, D9 and K33 decrease activity almost tenfold with respect to the control and mutation in residue I26 decreases activity 1.8 times. Finally, susceptibility test correlates with enzymatic results, since susceptibility decreases in each of the mutants, so the modified residues are related to the enzymatic activity of CrpP.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, ciprofloxacin, enzyme, phosphorylation, homologue proteins.

I. INTRODUCCIÓN

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos con gran relevancia clínica, siendo uno de los agentes más prescritos en el mundo. Inicialmente, las quinolonas se empleaban para el tratamiento de infecciones de vías urinarias causadas por bacterias Gram (-), sin embargo, han sido modificadas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas y extender su espectro antibacteriano y hoy en días las quinolonas son efectivas contra una gran variedad de bacterias patógenas tanto Gram (-) como Gram (+) (Redgrave y col., 2014).

La historia de las quinolonas inició cuando Lesher y colaboradores descubrieron de forma accidental el ácido nalidíxico (1,8-naftiridina) como un subproducto de la síntesis de la cloroquina, compuesto utilizado en el tratamiento de la malaria (Lesher y col., 1962). Posteriormente, en 1967 la introducción del ácido nalidíxico para uso clínico en el tratamiento de infecciones urinarias causadas por bacterias Gram (-) marcó el inicio de más de cinco décadas de desarrollo y uso de las quinolonas (Bisacchi y Mancherter. 2015). No obstante, las quinolonas permanecieron como un grupo de antibióticos de poca relevancia clínica hasta la aparición de las fluoroquinolonas en los 70's, las cuales surgieron al añadir un flúor a la posición 6 de la molécula base (**Figura 1**) (Ezelarab y col., 2018). La modificación mejoró su efectividad frente a bacterias Gram (-) y enterobacterias resistentes al ácido nalidíxico, además de proveer actividad frente a bacterias Gram (+) (Bisacchi y Mancherter. 2015). Hoy en día, ciprofloxacina, patentada en 1981, es la fluoroquinolona más empleada en el tratamiento contra bacterias Gram (-); es activa contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp, sin embargo, a pesar de los excelentes resultados en muchas infecciones respiratorias, se reportó el fallo en el tratamiento de infecciones neumocócicas, limitando su uso en esta área (Redgrave y col., 2014).

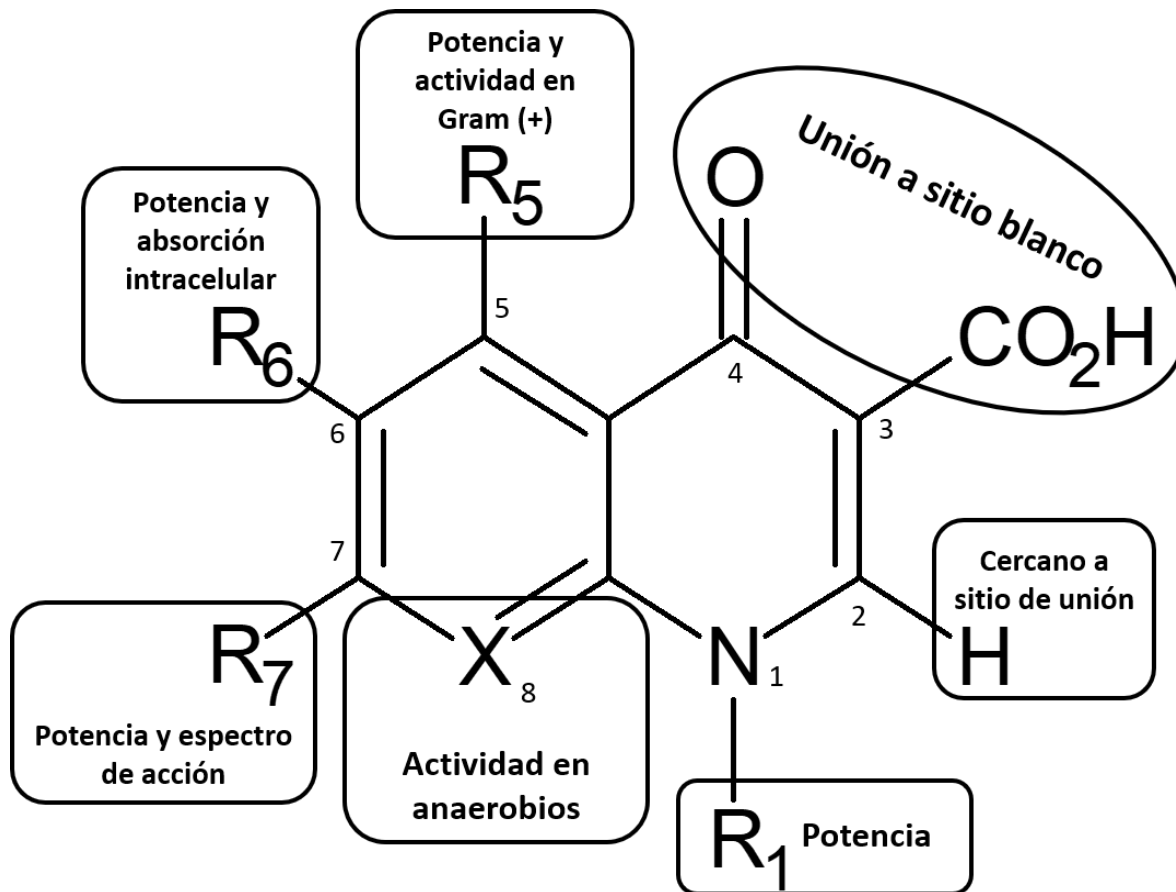


Figura 1. Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente. Se marcan con grupos R las posiciones más comúnmente sustituidas. X puede ser un átomo de carbono en el caso de quinolonas o un átomo de nitrógeno en el caso de naftiridinas. Se indican los principales procesos en los que participan las modificaciones en cada posición (Modificado de Ezelarab y col., 2018).

Al introducir distintas modificaciones, se ha logrado obtener una serie de nuevas quinolonas, sin embargo, ante la aparición de severos efectos adversos, algunas de ellas han sido retiradas inmediatamente del mercado, como la temofloxacina por su toxicidad renal y hematológica, la trovafloxacina, que presenta hepatotoxicidad y la grepafloxacina que genera toxicidad cardíaca (Zhang y col., 2018). La actividad contra *Streptococcus pneumoniae* ha sido un gran logro en el grupo de nuevas quinolonas, reemplazando la escasa o moderada actividad contra dicho patógeno de sus predecesores. Además, muestran buena actividad *in vitro* sobre patógenos respiratorios como: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* (Zhang y col., 2018).

1. Clasificación de las quinolonas

Las quinolonas se pueden clasificar con base en su actividad antimicrobiana y en sus parámetros farmacocinéticos en cuatro generaciones:

1.1 Primera generación

Las quinolonas de la primera generación presentan actividad contra bacterias aerobias y Gram (-). En esta generación se encuentran el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico (**Figura 2A**), ambas son utilizadas en el tratamiento de infecciones de vías urinarias producidas por microorganismos Gram (-), incluyendo especies de *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia coli* (Brighty y Gootz, 2000).

1.2 Segunda generación

La segunda generación de quinolonas fue introducida en la década de los 80's. Las principales características de esta generación fue la actividad contra bacterias aerobias Gram (+) y el incremento en la actividad contra las Gram (-), generando un enorme avance en el

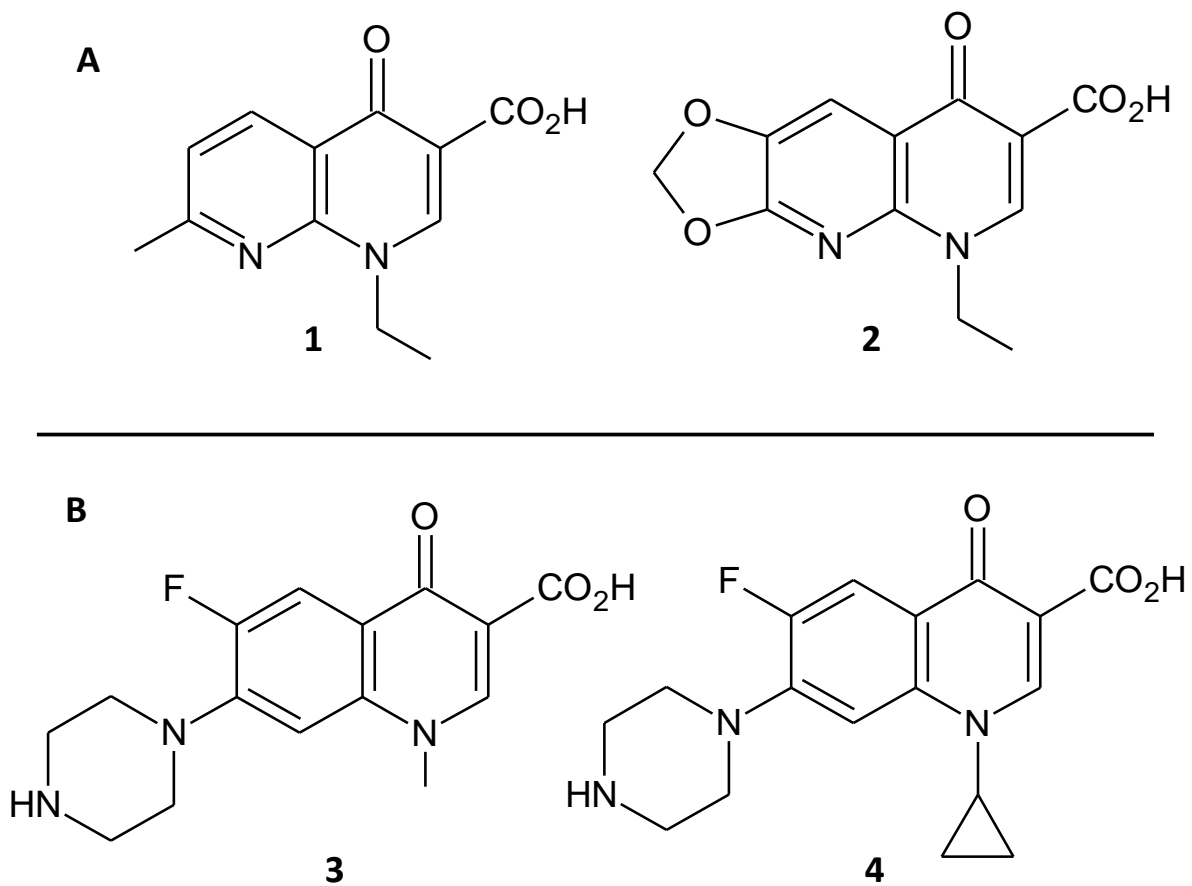


Figura 2. Primera y segunda generación de quinolonas. (A) Se muestran moléculas de la primera generación: (1) ácido nalidíxico y (2) ácido oxolínico; y (B) de la segunda generación: (3) norfloxacina y (4) ciprofloxacina.

tratamiento de importantes infecciones clínicas, como pielonefritis, prostatitis y osteomielitis (Ball y col., 1998). Entre ellas se encuentran norfloxacin y ciprofloxacina (**Figura 2B**); la primera es utilizada principalmente en el tratamiento de infecciones urinarias y la segunda se emplea en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, osteomielitis causada por enterobacterias, infecciones de oído, infecciones gonocócicas y prostatitis crónica bacteriana, siendo así una de las quinolonas más utilizadas (Redgrave y col., 2014).

1.3 Tercera generación

Las quinolonas pertenecientes a la tercera generación incluyen a gatifloxacina (**Figura 3A**), utilizada en el tratamiento de gonorrea, infecciones pulmonares, infecciones de piel y del tracto urinario, y levofloxacina (**Figura 3A**), la cual se indica para el tratamiento de neumonía, bronquitis crónica, infecciones urinarias, infecciones renales y de la próstata. Las moléculas de esta generación presentan una mayor actividad contra bacterias Gram (+), particularmente contra neumococos; además, son capaces de actuar contra bacterias anaerobias (Ezelarab y col., 2018).

1.4 Cuarta generación

Las quinolonas de cuarta generación presentan actividad contra bacterias anaerobias y un incremento de actividad contra neumococos, entre ellas se encuentran moxifloxacina y gemifloxacina (**Figura 3B**), que son utilizadas en el tratamiento de neumonía, bronquitis e infecciones de los senos paranasales (Brighty y Gootz, 2000).

Actualmente, la demanda por quinolonas con mayor actividad y menor resistencia microbiana ha impulsado el desarrollo de nuevos compuestos, como en el caso de los híbridos 1,2,3-triazol (**Figura 4**) que han demostrado mayor actividad contra bacterias Gram (+) (S.

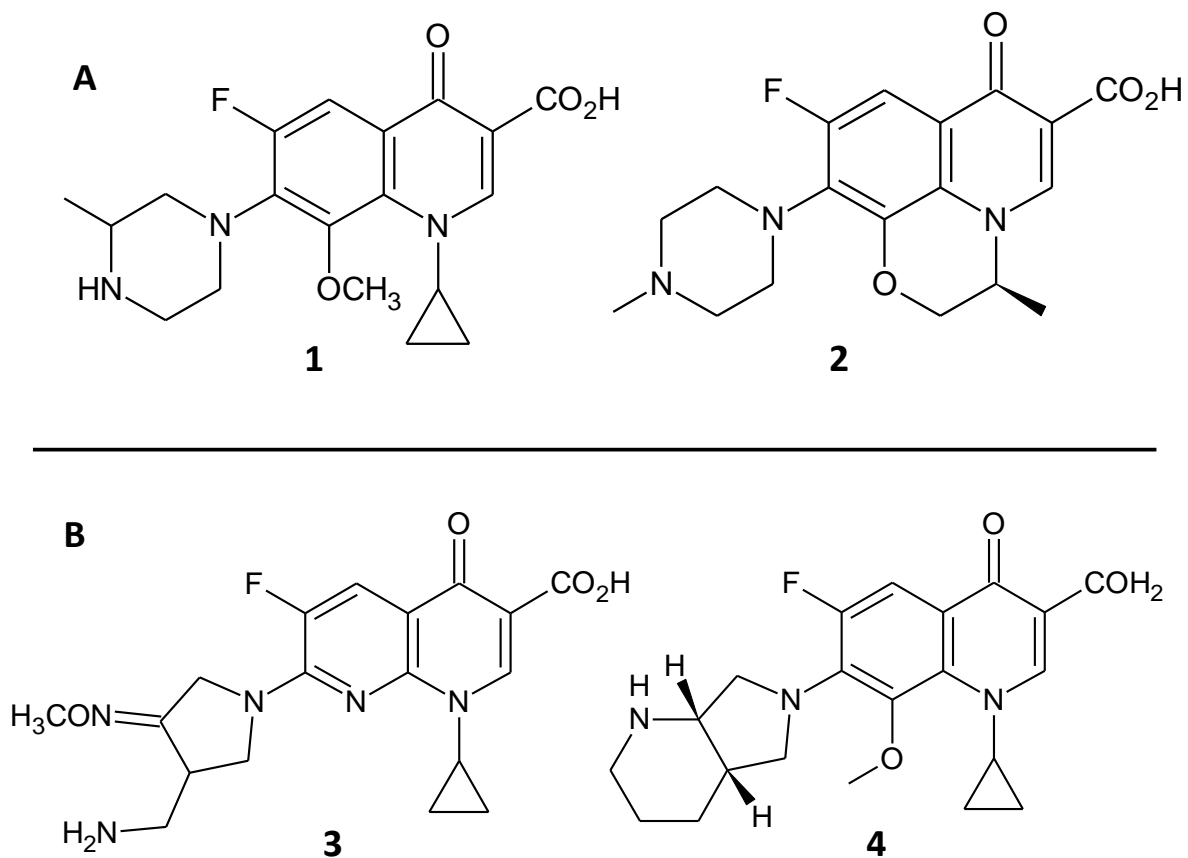


Figura 3. Tercera y cuarta generación de quinolonas. (A) Se muestran moléculas de la tercera generación: (1) gatifloxacin y (2) levofloxacin; y (B) de la cuarta generación: (3) gemifloxacin y (4) moxifloxacin.

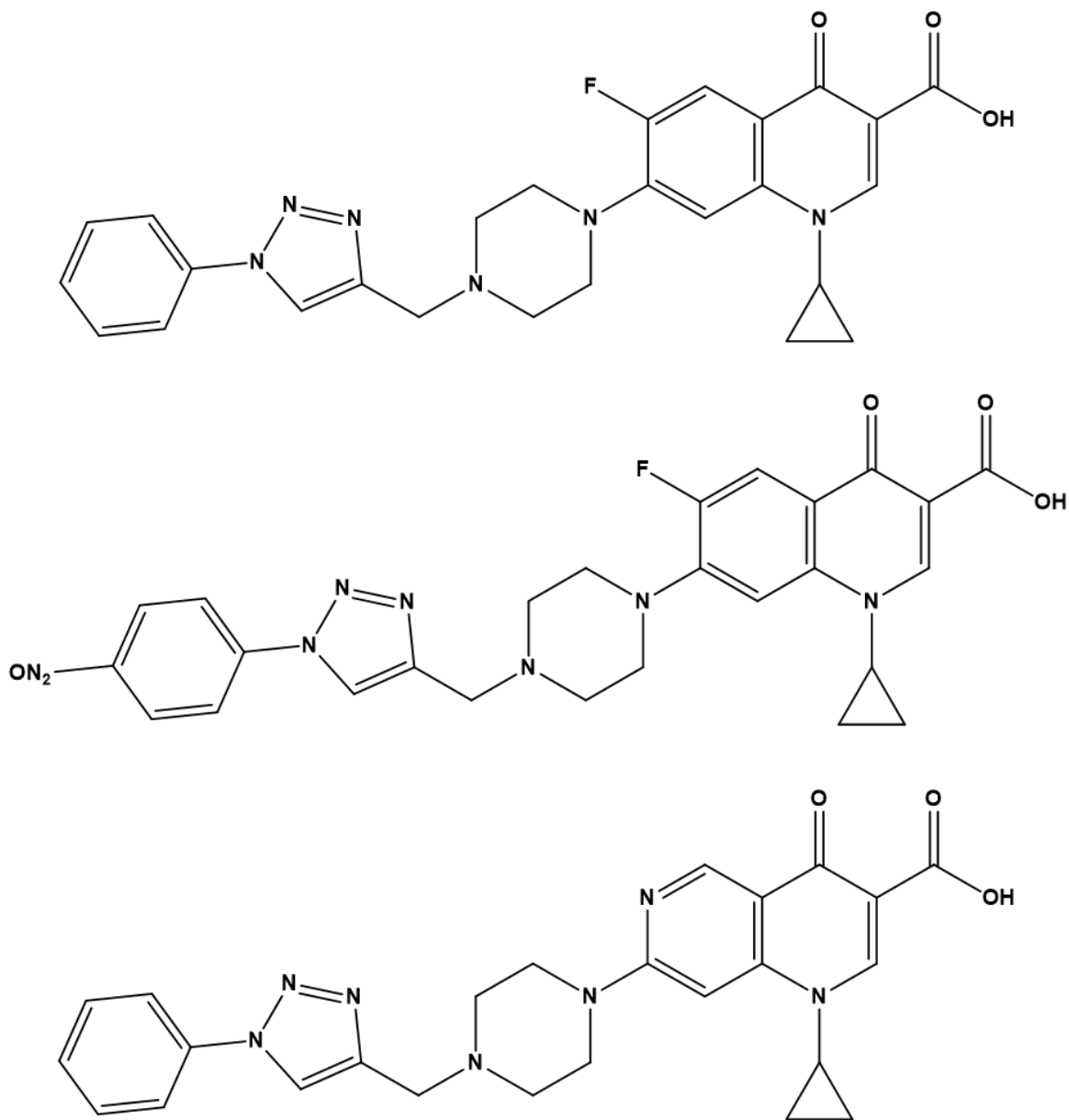


Figura 4. Nuevas moléculas derivadas de quinolonas. Híbridos de triazol con actividad prometedora contra bacterias Gram (+) y Gram (-). (Tomado de Ezelarab y col., 2018).

aureus y *Streptococcus pyogenes*) que las quinolonas que se encuentran actualmente en el mercado.

2. Relación entre la estructura y el espectro de acción de las quinolonas

La clave en la evolución de las quinolonas fue la modificación de su estructura base (**Figura 1**) a través de la adición de diferentes sustituyentes en las posiciones 1, 6 y 7 (Zhang y col., 2018) Dichas modificaciones afectan la actividad antibacteriana y las propiedades farmacocinéticas de las quinolonas. Algunas de las sustituciones clave son:

- La adición de un grupo ciclopropil en la posición 1 (**Figura 1**), incrementa la actividad antibacteriana (Zhang y col., 2018).
- La adición de un átomo de flúor en la posición 6 (**Figura 1**) incrementó más de 10 veces su potencia y se cree que estabiliza la unión con su sitio blanco al influir en la distribución de cargas de la molécula (Laponogov y col., 2009).
- La adición de un grupo de piperazina en la posición 7 (**Figura 1**) provee una mayor actividad frente a bacterias Gram (-) aerobias y aumenta la actividad frente a *Staphylococcus* y *Pseudomonas*; además se sugiere que juega un papel importante en la inhibición de los sistemas de expulsión, mejorando así la potencia del antibiótico (Zhang y col., 2018).
- La alquilación de la posición 7 (**Figura 1**) incrementa la actividad frente a bacterias Gram (+) aerobias y aumenta la vida media (Zhang y col., 2018).
- La adición de un grupo metilo al nitrógeno del anillo de piperazina en la posición 7 (**Figura 1**) incrementa la vida media y la biodisponibilidad (Zhang y col., 2018).

A pesar de que ciertos sustituyentes, como los mencionados anteriormente, pueden producir importantes cambios en la actividad biológica de las quinolonas, las características finales de la molécula derivan de la interacción entre cada uno de los radicales (Zhang y col., 2018).

3. Mecanismo de acción de las quinolonas

Las quinolonas son antibióticos con una gran capacidad para eliminar diversos tipos de bacterias de forma rápida (Redgrave y col., 2014), por lo cual era importante determinar su mecanismo de acción. Fue en 1976 cuando se observó que el ácido nalidíxico causaba una acumulación anormal de precursores de DNA monocatenario cuando los dominios cromosómicos se presentaban superenrollados; además, la concentración de DNA monocatenario disminuía por la acción de una enzima que era específicamente inhibida por la quinolona (Crumplin y Smith, 1976). Estas primeras observaciones ayudaron a explicar el mecanismo de acción de las quinolonas que se describirá a continuación.

Los blancos de las quinolonas son dos enzimas esenciales en los procesos celulares de replicación, transcripción y reparación del DNA; la DNA girasa y la topoisomerasa IV (**Figura 5**). Dichas enzimas están encargadas del superenrollamiento del DNA que le permite mantenerse de forma compacta dentro de la célula (Forterre y col., 2007). Ambas enzimas pertenecen a la familia de las topoisomerasas tipo IIA y están compuestas de dos subunidades; GyrA de 97 kilodaltones (kDa) y GyrB de 90 kDa correspondientes a la DNA girasa y ParC de 75 kDa y ParE de 70 kDa correspondientes a la topoisomerasa IV (Champoux, 2001).

Las topoisomerasas presentan una acción homóloga con pequeñas diferencias; ambas enzimas actúan reduciendo la tensión molecular causada por el superenrollamiento

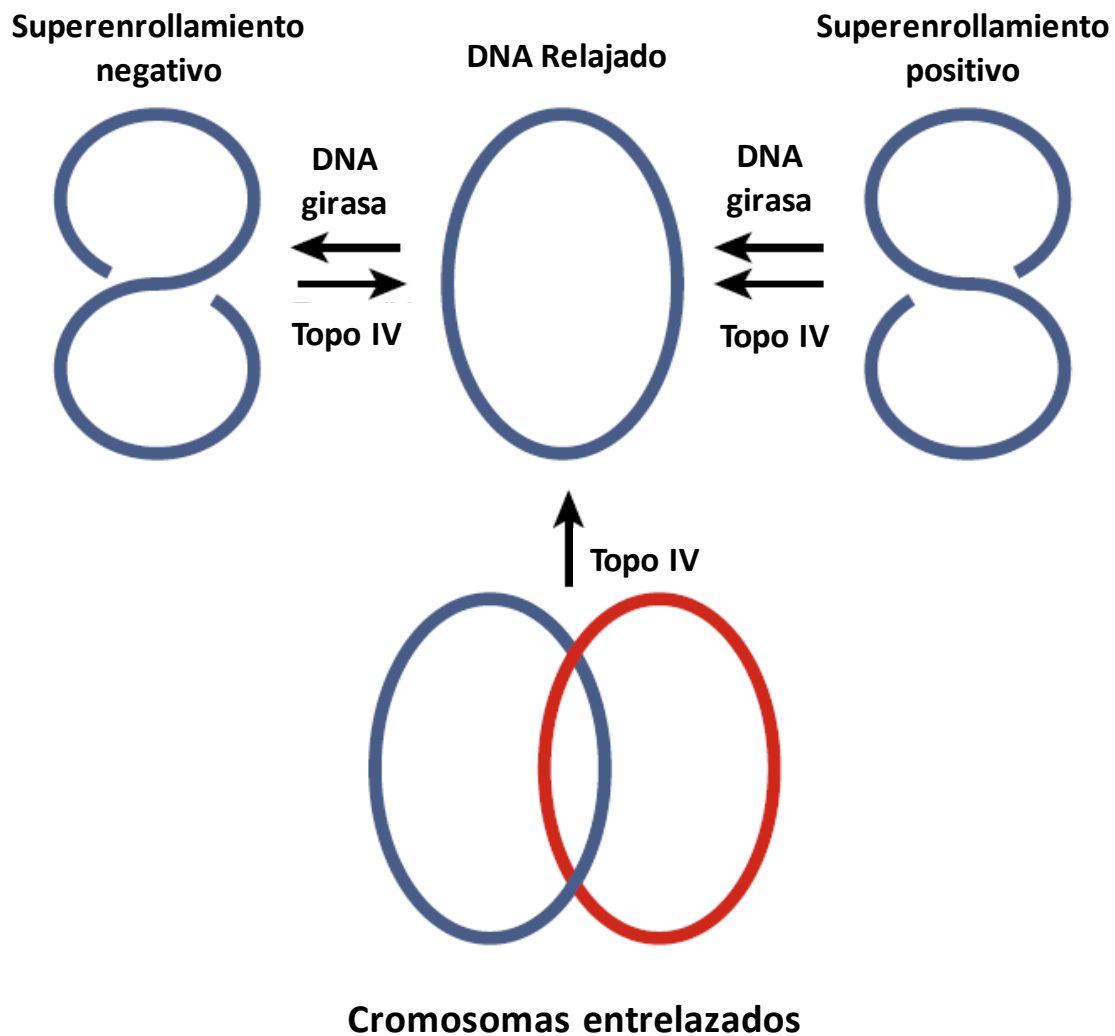


Figura 5. Acción de las topoisomerasas tipo IIA en el DNA. Se muestra de manera esquemática la acción de las topoisomerasas tipo IIA en el superenrollamiento del DNA en las bacterias (Modificado de Redgrave y col., 2014).

realizando cortes a la doble cadena de DNA. La DNA girasa remueve superenrollamientos positivos y avanza delante de la horquilla de replicación, mientras que la topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación, además de ser responsable de la segregación de los cromosomas al final de la replicación (Drlica y col., 2009) (**Figura 5**).

Durante su mecanismo de acción, las topoisomerasas tipo IIA introducen un par de cortes en la cadena sencilla de DNA y se unen de forma covalente al extremo 5' formando un complejo DNA-topoisomerasa, relajando el superenrollamiento del DNA (Mizuuchi y col., 1980). Las quinolonas se unen rápidamente al complejo, probablemente antes de que la ruptura del DNA ocurra, mediante la región GyrA de la DNA girasa y la región ParC de la topoisomerasa IV, generando el complejo terciario DNA-Topoisomerasa-Quinolona que bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, inhibiendo así el crecimiento bacteriano (**Figura 6**). Sin embargo, se ha observado que los efectos son reversibles si se remueve la quinolona, ya sea por la adición del agente quelante EDTA o por un tratamiento térmico (Leo y col., 2005). En los sistemas *in vitro*, cuando la DNA girasa es el blanco, la inhibición ocurre en minutos mientras que si el blanco es la topoisomerasa IV la inhibición ocurre más lentamente (Khodursky y col., 1995). Al ser la formación del complejo terciario un proceso reversible es el punto crucial en el mecanismo de acción de las quinolonas. Puede tomar dos cursos irreversibles que concluyen en la muerte celular; la ruta dependiente de la síntesis de proteínas en condiciones aeróbicas y la ruta independiente de la síntesis de proteína, la cual se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis, característica de la primera generación de quinolonas; sin embargo, ambas rutas tienen como objetivo la fragmentación cromosómica y finalmente la muerte celular (**Figura 6**). Adicional a estas

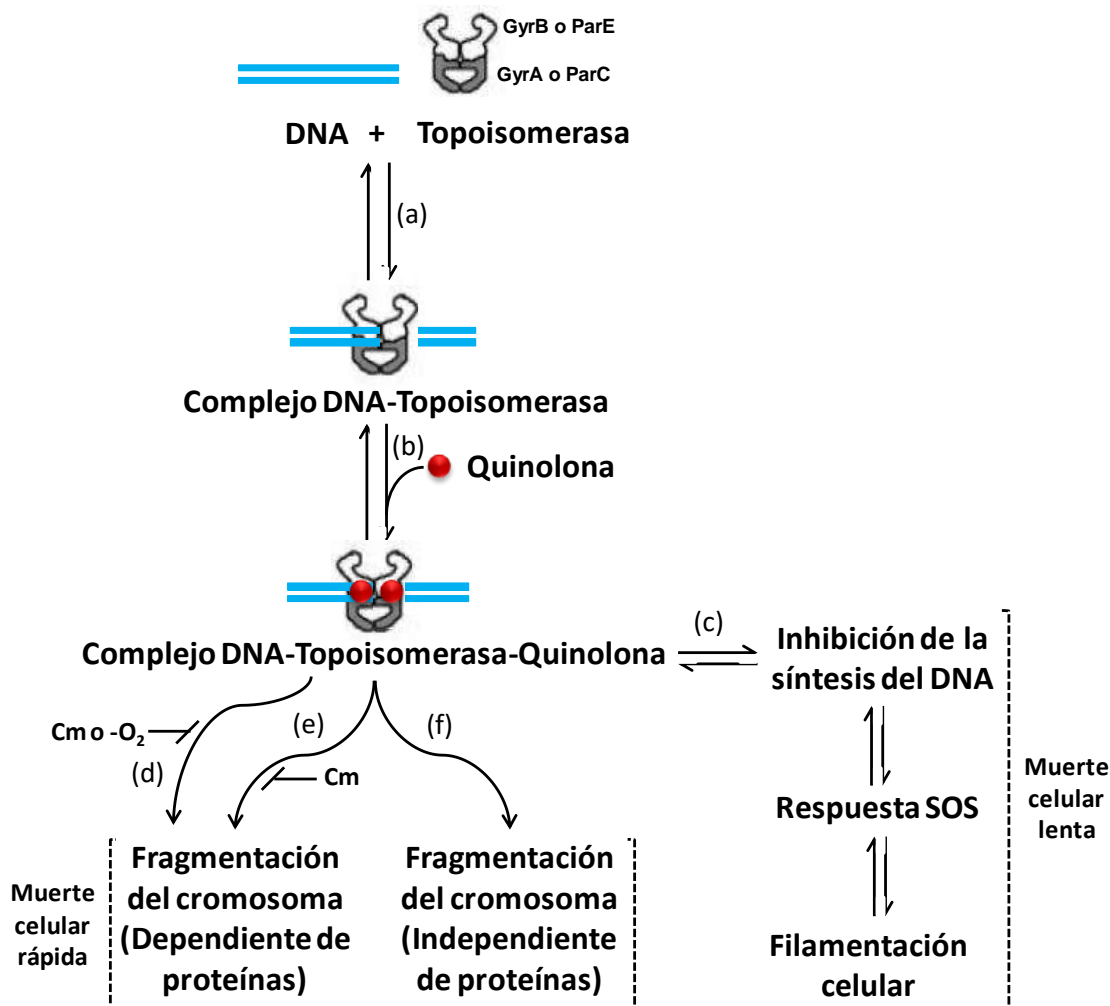


Figura 6. Representación esquemática de la acción de las quinolonas. (a) Unión de la topoisomerasa con el DNA y formación del complejo DNA-Topoisomerasa; (b) unión de la quinolona y formación del complejo DNA-Topoisomerasa-Quinolona; (c) inhibición de la replicación que conduce a la inducción del sistema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

rutas, la reversibilidad del bloqueo de la replicación del DNA activa la respuesta del sistema SOS, que inhibe la división celular y propicia la formación de estructuras celulares filamentosas contribuyendo a una muerte celular lenta que no ha sido estudiada a profundidad (Pidcock y col., 1990).

4. Sistemas de resistencia a quinolonas

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

Debido a que las quinolonas son antibióticos completamente sintéticos, se propuso que los únicos sistemas de resistencia que las bacterias podían adquirir de manera inmediata serían las mutaciones en los genes que codifican las proteínas blanco, las topoisomerasas tipo IIA, y la expulsión de quinolonas mediada por los transportadores de membrana (Martínez. 2009).

En cuanto a la adquisición de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes, aquella que ocurre cuando una bacteria que ya posee los genes de resistencia los transfiere a otra que no es su descendiente, para el caso de las quinolonas se pensó que esto no sería posible, ya que el origen de los genes de resistencia a antibiótico de origen biológico son los propios organismos productores (Hernández y col., 2011). Actualmente, podemos clasificar los sistemas de resistencia en dos grupos (**Figura 7**): A) Sistemas codificados por genes cromosómicos, como lo son las modificaciones de los sitios blanco y los sistemas de expulsión, y B) Sistemas codificados por genes plasmídicos, tales como proteínas Qnr,

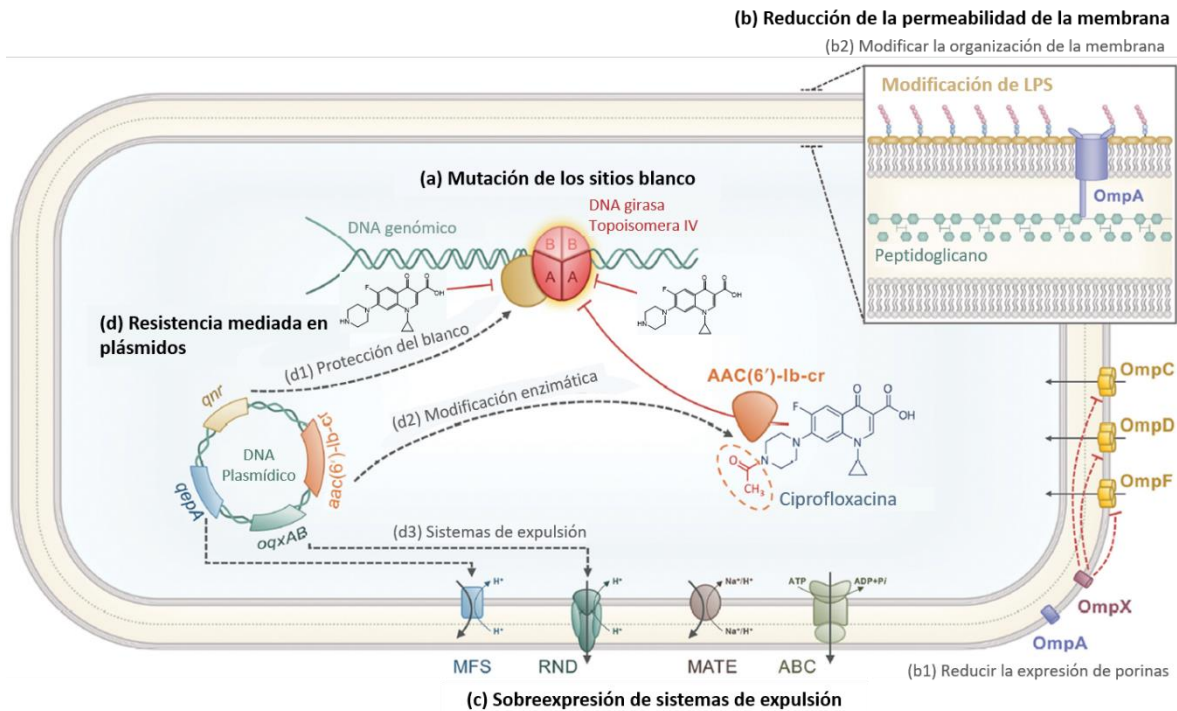


Figura 7. Mecanismos de resistencia a quinolonas. (a) mutaciones de los genes que codifican a los blancos de las quinolonas. (b) reducción de la permeabilidad mediante (b1) modificaciones en la expresión de porinas o (b2) la alteración de la organización de la membrana. (c) incrementar la expulsión de quinolonas mediante la sobreexpresión de los sistemas de expulsión. (d) los plásmidos que confieren resistencia a quinolonas contienen determinantes que pueden (d1) proteger al sitio blanco como las proteínas qnr, (d2) modificar quinolonas como la aac (6')-Ib-cr y (d3) disminuir la concentración intracelular de las quinolonas como los sistemas de expulsión QepA y OqxAB (Modificado de Correia y col., 2017).

sistemas de expulsión y la enzima aminoglucósido acetil transferasa modificada (aac(6′)-Ib-cr) (Aldred y col., 2014).

4.1. Sistemas de resistencia codificados por genes cromosómicos

4.1.1. Modificaciones de los sitios blanco

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

Las mutaciones dan como resultado la sustitución de aminoácidos, las cuales generan alteraciones en la estructura de la enzima, principalmente la región de unión con la molécula de DNA, afectando la formación del complejo DNA-topoisomerasa y como consecuencia su unión a la quinolona, favoreciendo así la resistencia al antibiótico (Friedman y col., 2001). La mutación más frecuente es la sustitución de la serina 83 por un triptófano (Redgrave y col., 2014), región cercana al sitio activo, además de estar cerca de la tirosina 122, residuo donde se forma el enlace de fosfotirosina entre la enzima y el DNA (Shen y Pernet. 1985).

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

4.1.2. Sistemas de expulsión

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

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

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

4.2. Sistemas de resistencia codificados por genes plasmídicos

4.2.1. Proteínas Qnr

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

Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos (PRP, por sus siglas en inglés), llamadas así porque sus miembros contienen un motivo recurrente de cinco aminoácidos en tándem [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly];

hasta la fecha se han descrito cinco familias de proteínas Qnr; QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD (Vetting y col., 2006). Estas proteínas han mostrado tener participación en la resistencia a ciprofloxacina al unirse al complejo DNA-Topoisomerasa, impidiendo la unión de las quinolonas, aunque no se conoce con detalle su mecanismo de acción (**Figura 7**) (Tran y col., 2005). Por sí mismas dichas proteínas proveen una baja resistencia a ciprofloxacina en cepas de *E. coli*, sin embargo, adquieren importancia clínica cuando se asocian con otros mecanismos de resistencia al antibiótico (Tran y Jacoby, 2002).

4.2.2. Modificación enzimática

Debido al origen sintético de las quinolonas no se esperaba que, de una forma tan rápida, las bacterias desarrollaran la capacidad de modificar el fármaco; la degradación de quinolonas se había descrito únicamente en hongos (Wetzstein y col., 1997). Sin embargo, en 2006 se identificó en cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina el plásmido pHSH10-2, que posee el gen *qnrA*, el cual al ser transferido a la cepa *Rec⁻ E. coli* DH10B, una cepa que presenta sensibilidad a ciprofloxacina si se compara con las cepas *E. coli Rec⁺*, confería cuatro veces mayor resistencia al antibiótico que lo reportado anteriormente para los genes *qnr* (Robicsek y col., 2006). Mediante mutagénesis por transposición, se identificó al gen *aac(6')-Ib* presente en el plásmido pHSH10-2, el cual codifica una enzima aminoglucósido acetiltransferasa que confiere resistencia a algunos antibióticos del grupo de los aminoglucósidos: kanamicina, amikacina y tobramicina (Robicsek y col., 2006). El análisis *in silico* del gen *aac(6')-Ib* reveló que se encuentra modificado en los codones 102 (Trp → Arg) y 179 (Asp → Tyr) y se demostró que en ausencia de dichas mutaciones, el gen no se asociaría con la resistencia a quinolonas (Robicsek y col., 2006). El mecanismo de acción de la enzima *aac(6')-Ib-cr* (llamada así por que confiere resistencia a ciprofloxacina), se

determinó mediante ensayos de acetilación, utilizando kanamicina y ciprofloxacina como sustratos. Se demostró que la enzima puede introducir un grupo acetilo en el nitrógeno del grupo piperazil que poseen ciprofloxacina y norfloxacina en la posición 7, reduciendo la afinidad del antibiótico por las topoisomerasas (**Figura 7**) (Robicsek y col., 2006).

4.2.3. Sistemas de expulsión

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

El plásmido pHPA, aislado de la cepa clínica de *E. coli* C316, contiene el gen *qepA* el cual codifica la proteína de membrana interna QepA, con 14 segmentos transmembranales, que se agrupa en la superfamilia de transportadores facilitadores mayores (MFS, por sus siglas en inglés). La proteína confiere resistencia mediante la expulsión del citoplasma de quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina y norfloxacina (Yamane y col., 2007).

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

complejo tripartita de expulsión similar a los codificados por genes cromosómicos de bacterias Gram (-) (Hansen y col., 2004).

II. ANTECEDENTES

El compuesto sintético ciprofloxacina es actualmente uno de los antibióticos de mayor prescripción en el mundo (Redgrave y col., 2014). Se usa principalmente en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias (Emmerson y Jones. 2003); sin embargo, también presenta actividad contra *P. aeruginosa* (Hoiby. 2011). El extenso uso de ciprofloxacina ha generado la aparición de bacterias resistentes a su acción (Hernández y col., 2011). Actualmente, los sistemas de resistencia a este antibiótico se encuentran ampliamente distribuidos y podemos dividirlos en dos grupos (Aldred y col., 2014), aunque dichos sistemas no son excluyentes entre sí y pueden combinarse para conferir mayor resistencia.

- I) Sistemas codificados por genes cromosómicos. Se incluyen las mutaciones en los genes que codifican a las proteínas blanco de las quinolonas, que son las topoisomerasas de la familia IIA (DNA girasa (Cambau y col., 1995) y topoisomerasa IV (Khodursky y col., 1998)) y los sistemas de expulsión, como MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Martínez y col., 2009).
- II) Sistemas codificados por genes presentes en plásmidos. Comprenden a las proteínas Qnr (Tran y Jacoby, 2002), que bloquean la unión del antibiótico con su sitio blanco (Xiong y col., 2011), los sistemas de expulsión QepA (Yamane y col., 2007) y OqxAB (Hansen y col., 2004) y la enzima aminoglucósido acetiltransferasa (AAC(6')-Ib-cr) capaz de acetilar y como consecuencia inactivar a ciprofloxacina (Robicsek y col., 2006).

El hallazgo de la enzima AAC(6')-Ib-cr capaz de modificar ciprofloxacina (Robicsek y col.,

2006) representó un nuevo sistema de resistencia que funciona para dos familias distintas de antibióticos, los aminoglucósidos y las quinolonas. Aunque la enzima confiere un bajo nivel de resistencia a ciprofloxacina, puede actuar de manera conjunta al menos con el sistema de resistencia mediado por el gen *qnrA* (Robicsek y col., 2006) incrementando la resistencia. Además, se encontró que AAC(6′)-Ib-cr facilita la selección de mutantes resistentes a ciprofloxacina entre poblaciones bacterianas expuestas a este antibiótico (Robicsek y col., 2006), lo que representa una ventaja adaptativa adicional al hecho de encontrarse codificada en un plásmido.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo determinó que la proteína de 65 aminoácidos codificada por el *orf131* del plásmido pUM505, un plásmido conjugativo aislado de *P. aeruginosa* que confiere resistencia a ciprofloxacina (Ramírez-Díaz y col., 2011), presenta 18% de identidad y 26% de similitud con la aminoglucósido fosfotransferasa (APH-IIb) de *P. aeruginosa* M18 (**Figura 8**), enzima relacionada con la resistencia a aminoglucósidos. Debido a que se realizaba la búsqueda de los genes responsables de la resistencia a ciprofloxacina, a la homología que presenta con la enzima APH-IIb y al antecedente de la enzima aminoglucósido acetil transferasa, se clonó el *orf131* en el vector pUCP20 y el plásmido recombinante se transfirió a *E. coli* J53-2. Mediante pruebas de susceptibilidad a ciprofloxacina se observó un mayor crecimiento en concentraciones altas del antibiótico en la cepa que contiene el *orf131* en comparación con el control (**Figura 9**). Se concluyó que la proteína codificada por el *orf131*, que en adelante llamaremos ORF131, confiere resistencia a ciprofloxacina y debido a la homología que presenta con la enzima APH-IIb, que esta resistencia puede deberse a la fosforilación del antibiótico (Chávez-Jacobo. 2015). Debido a lo anterior, resulta de interés determinar el mecanismo de acción de la proteína codificada por el *orf131* del plásmido pUM505.

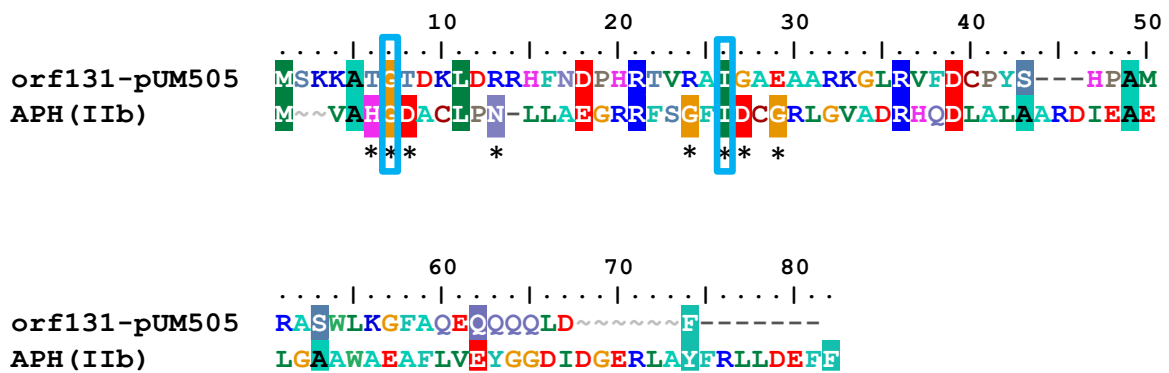


Figura 8. Alineamiento de la secuencia de la proteína codificada por el *orf131* con la enzima APH-IIb de *P. aeruginosa* M18. Se muestran con asteriscos los residuos catalíticos en la APH-IIb. En recuadros se muestran los residuos catalíticos conservados en la proteína codificada por el *orf131* (Chávez- Jacobo, 2015).

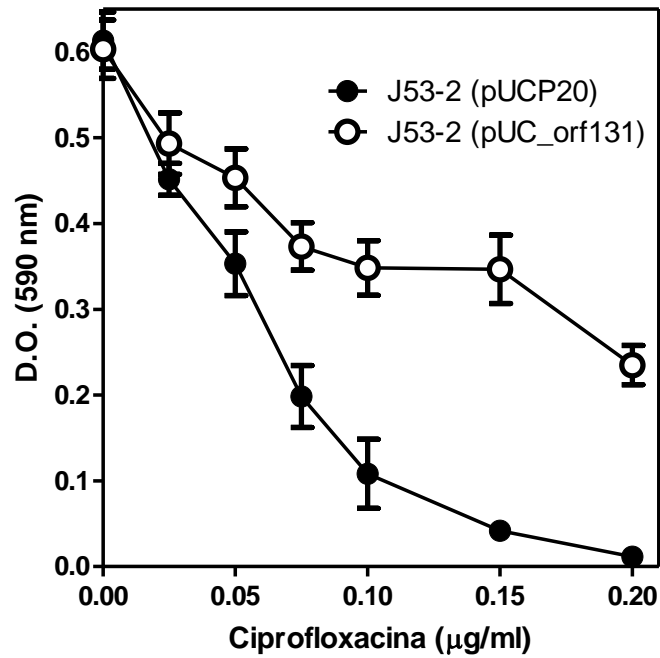


Figura 9. Resistencia a ciprofloxacin conferida por el *orf131* del plásmido pUM505.

Los cultivos se crecieron en caldo M9 por 24 h a 37°C con agitación constante a las concentraciones de ciprofloxacin indicadas. Posteriormente se midió la absorbencia a 590 nm. Se muestran barras de error estándar de la media, n=6 (Chávez- Jacobo, 2015).

susceptibilidad a ciprofloxacina se observó un mayor crecimiento en concentraciones altas del antibiótico en la cepa que contiene el *orf131* en comparación con el control (**Figura 2**). Se concluyó que la proteína codificada por el *orf131*, que en adelante llamaremos ORF131, confiere resistencia a ciprofloxacina y debido a la homología que presenta con la enzima APH-IIb, que esta resistencia puede deberse a la fosforilación del antibiótico (Chávez-Jacobo, 2015). Debido a lo anterior, resulta de interés determinar el mecanismo de acción de la proteína codificada por el *orf131* del plásmido pUM505.

III. JUSTIFICACIÓN

El *orf131* confiere resistencia a ciprofloxacina cuando se transfiere a *Escherichia coli*. En un análisis *in silico* se determinó que la proteína ORF131, codificada en el plásmido pUM505, muestra similitud con la enzima aminoglucósido fosfotransferasa IIb de *P. aeruginosa* M18. Debido a que las enzimas capaces de modificar antibióticos han coevolucionado con sus sustratos y generalmente son específicas para una sola familia de antibióticos, resulta de interés caracterizar el mecanismo de acción de la proteína ORF131 que confiere resistencia a un antibiótico sintético, así como determinar su distribución.

IV. HIPÓTESIS

La proteína ORF131, que se encuentra ampliamente distribuida, confiere resistencia a ciprofloxacina mediante la fosforilación del antibiótico.

V. OBJETIVOS

A) Objetivo general

Caracterizar el mecanismo mediante el cual la proteína ORF131 del plásmido pUM505 confiere resistencia a ciprofloxacina y determinar su distribución.

B) Objetivos específicos

1. Determinar el mecanismo molecular y enzimático mediante el cual la proteína ORF131 fosforila a la molécula de ciprofloxacina.
2. Analizar la distribución del *orf131* en aislados clínicos.
3. Identificar los residuos de la proteína ORF131 asociados con la resistencia a ciprofloxacina.

VI. RESULTADOS

Los principales resultados obtenidos durante la realización del presente proyecto se presentan en los capítulos I, II y III. El capítulo I corresponde a un artículo publicado en una revista internacional (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American society for microbiology), el capítulo II corresponde a un artículo publicado en una revista internacional (Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Oxford Academic) y el capítulo III corresponde a un manuscrito publicado en la revista internacional (Microbiology, Microbiology Society). Finalmente los capítulos IV y V corresponden a dos artículos de revisión publicados en una revista indexada en el índice CONACyT (TIP, Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, FES Zaragoza).



CrpP Is a Novel Ciprofloxacin-Modifying Enzyme Encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid

Victor M. Chávez-Jacobo,^a Karen C. Hernández-Ramírez,^a Pamela Romo-Rodríguez,^b Rocío Viridiana Pérez-Gallardo,^c Jesús Campos-García,^a J. Félix Gutiérrez-Corona,^b Juan Pablo García-Merinos,^a Victor Meza-Carmen,^a Jesús Silva-Sánchez,^d Martha I. Ramírez-Díaz^a

^aInstituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

^bDepartamento de Biología, DCNE, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Mexico

^cLaboratorio de Inocuidad Química, Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán, A.C., Morelia, Michoacán, Mexico

^dCentro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelia, México

ABSTRACT The pUM505 plasmid, isolated from a clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate, confers resistance to ciprofloxacin (CIP) when transferred into the standard *P. aeruginosa* strain PAO1. CIP is an antibiotic of the quinolone family that is used to treat *P. aeruginosa* infections. *In silico* analysis, performed to identify CIP resistance genes, revealed that the 65-amino-acid product encoded by the *orf131* gene in pUM505 displays 40% amino acid identity to the *Mycobacterium smegmatis* aminoglycoside phosphotransferase (an enzyme that phosphorylates and inactivates aminoglycoside antibiotics). We cloned *orf131* (renamed *crpP*, for ciprofloxacin resistance protein, plasmid encoded) into the pUCP20 shuttle vector. The resulting recombinant plasmid, pUC-*crpP*, conferred resistance to CIP on *Escherichia coli* strain J53-3, suggesting that this gene encodes a protein involved in CIP resistance. Using coupled enzymatic analysis, we determined that the activity of CrpP on CIP is ATP dependent, while little activity against norfloxacin was detected, suggesting that CIP may undergo phosphorylation. Using a recombinant His-tagged CrpP protein and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, we also showed that CIP was phosphorylated prior to its degradation. Thus, our findings demonstrate that CrpP, encoded on the pUM505 plasmid, represents a new mechanism of CIP resistance in *P. aeruginosa*, which involves phosphorylation of the antibiotic.

KEYWORDS *Pseudomonas aeruginosa*, ciprofloxacin, enzyme, phosphorylation, plasmid-mediated resistance, quinolones

Quinolones are synthetic antibiotics that constitute an important class of biologically active, broad-spectrum antibacterial drugs (1). These antibiotics are used in humans to treat a variety of bacterial infections and represent one of the most commonly prescribed classes of antibacterial drugs in the world (2). Ciprofloxacin (CIP), a fluoroquinolone, was the first quinolone to display considerable activity outside the urinary tract (3). Due to the pharmacological characteristics of CIP, as well as its potency, activity spectrum, oral bioavailability, and good safety profile, this antibiotic has been extensively used clinically worldwide (4). Importantly, CIP is the most active quinolone against *Pseudomonas aeruginosa* and is used to treat infections generated by this bacterium. CIP is also used to treat infections with various Gram-negative and Gram-positive bacteria and is the most commonly prescribed antibacterial drug to date according to guidelines (4, 5).

The mechanism of action of quinolone antibiotics consists of the inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV (Topo IV), enzymes that modulate the topological state of

Received 3 January 2018. Returned for modification 28 January 2018. Accepted 13 March 2018.

Accepted manuscript posted online 26 March 2018.

Citation Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Romo-Rodríguez P, Pérez-Gallardo RV, Campos-García J, Gutiérrez-Corona JF, García-Merinos JP, Meza-Carmen V, Silva-Sánchez J, Ramírez-Díaz MI. 2018. CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e02629-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02629-17>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All rights reserved.

Address correspondence to Martha I. Ramírez-Díaz, marthaisela_ramirez@hotmail.com.

TABLE 1 Results of susceptibility tests

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for:						
	<i>P. aeruginosa</i>				<i>E. coli</i>		
	ATCC 27853	PAO1(pUCP20)	PAO1(pUC _{crpP})	PAO1(pUM505)	ATCC 25922	J53-3(pUCP20)	J53-3(pUC _{crpP})
Ciprofloxacin	0.5	0.5	0.5	2.0	0.004	0.008	0.06
Levofloxacin	0.5	1.0	1.0	1.0	0.008	0.008	0.008
Norfloxacin	0.5	0.5	0.5	2.0	0.03	0.03	0.03
Moxifloxacin	1.0	2.0	2.0	8.0	0.008	0.03	0.03
Nalidixic acid	>256	>256	>256	>256	2.0	8.0	8.0
Kanamycin	>256	32	32	32	4.0	4.0	2.0
Streptomycin	8.0	8.0	4.0	4.0	8.0	4.0	4.0
Amikacin	1.0	0.5	0.5	0.5	2.0	1.0	1.0
Gentamicin	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5

the DNA and are essential for transcription, DNA replication, and the repair/recombination of DNA (1). These two enzymes display structural and functional similarities; however, their specific mechanisms of action during DNA replication differ (6). The quinolones stabilize the cleavage complexes by binding the enzyme-DNA interface in the cleavage-ligation active site, resulting in the inhibition of DNA ligation (1). Therefore, the intercalation of quinolones into DNA results in increased cell death (1).

Resistance to quinolones can involve chromosomal gene mutations or may be plasmid mediated. A correlation between CIP resistance and the number of resistance-associated alterations in GyrA, GyrB subunits of topoisomerase II, and ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in *P. aeruginosa* isolates has been reported previously (7). In *Escherichia coli*, mutations in *marR* (a *marA* repressor) lead to the MarA-mediated activation of genes encoding the AcrAB-TolC efflux pump, which plays a major role in quinolone efflux. The *marR* mutations also decrease the translation of *ompF*, a gene encoding the OmpF outer membrane porin, thus decreasing quinolone influx (4). Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) confers decreased susceptibility to these antibiotics. Some examples of PMQR systems include the Qnr protein, which prevents quinolone binding to target proteins, and QepA, an efflux pump that decreases susceptibility to CIP and norfloxacin (NOR) (4, 6). Moreover, mutations in the gene encoding the aminoglycoside *N*-6'-acetyltransferase [AAC(6')-Ib] enzyme, which confers resistance to aminoglycoside antibiotics, results in a variant [AAC(6')-Ib-cr] that promotes CIP and NOR resistance (8).

pUM505 is a self-conjugating 123-kbp plasmid isolated from a clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate (9). This plasmid carries several adaptive genes, including the *umuD* gene (encoding a transcriptional regulator of the SOS response) (10), genes involved in *Pseudomonas* virulence (11, 12), and genes that increase plasmid stability (12). The aim of this work was to identify and study the product of the *orf131* (renamed *crpP*) gene on pUM505, which confers resistance to CIP. We show that the mechanism underlying this resistance to CIP involves CIP phosphorylation.

RESULTS

Quinolone resistance is conferred by the pUM505 plasmid. The pUM505 plasmid, originally isolated from a clinical isolate of *P. aeruginosa* (9), confers resistance to CIP when transferred into *P. aeruginosa* strain PU21. This observation suggested that pUM505 encodes a factor involved in susceptibility to this antibiotic (13). To determine whether pUM505 confers resistance to other quinolones, the pUM505 plasmid was transferred into *P. aeruginosa* strain PAO1, and the antimicrobial susceptibilities to CIP, NOR, levofloxacin (LVX), moxifloxacin (MXF), and nalidixic acid (NAL) were investigated. Our results showed that CIP, NOR, and MXF displayed 4-fold higher MICs for *P. aeruginosa* PAO1(pUM505) than for the *P. aeruginosa* receptor strain PAO1. In addition, the MIC values for strain PAO1 were similar to those measured for the *P. aeruginosa* reference strain, ATCC 27853 (Table 1). These findings indicated that the pUM505 plasmid encodes a protein involved in quinolone resistance.

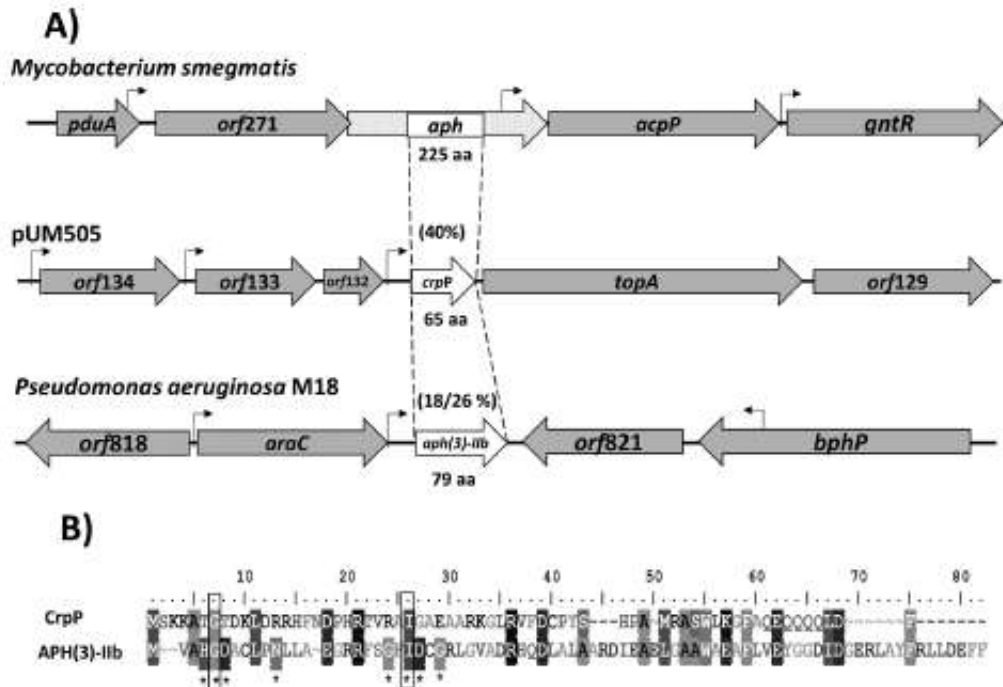


FIG 1 Comparison of CrpP to aminoglycoside phosphotransferases. (A) The coding regions and transcriptional directions of the *aph*, *crpP*, and *aph(3)-IIB* genes from *M. smegmatis*, the pUM505 plasmid, and *P. aeruginosa* M18, respectively, are indicated by open arrows, with the sizes of predicted polypeptides (in amino acids) indicated. Percentages of amino acid identity/similarity for the proteins compared are given in parentheses; stippled areas of the *aph* gene from *M. smegmatis* were not considered for the alignments. Shaded arrows represent adjacent genes, and the locations of the putative promoters' sequences are marked by bent arrows. (B) Alignment of the putative protein encoded by the *crpP* gene with the APH(3)-IIB protein from *P. aeruginosa* M18. Asterisks denote conserved catalytic residues in the APH(3)-IIB gene from *P. aeruginosa* M18. Filled squares indicate conserved catalytic residues identified in the protein encoded by the *crpP* gene.

Identification of the *crpP* gene. *In silico* analysis of pUM505 failed to identify a PMQR element (13). Moreover, a BLAST analysis revealed that the protein encoded by the *orf131* gene (RefSeq accession number NC_016138; region, nucleotides 119072 to 119269; renamed *crpP*, for ciprofloxacin resistance protein, plasmid encoded) shares 40% identity with a 42-amino-acid (42-aa) region of the aminoglycoside phosphotransferase (APH) from *Mycobacterium smegmatis* (Fig. 1A). The *crpP* gene possesses a putative sigma-70 promoter in the 5' region and is predicted to encode a 65-aa protein (Fig. 1A; see also Fig. S1A in the supplemental material). In contrast, the APH protein from *M. smegmatis* contains 225 aa and is much longer than the protein encoded by *crpP*; however, several members of this protein family are smaller. For example, the 79-aa aminoglycoside phosphotransferase [APH(3)-IIB] from *P. aeruginosa* M18 confers kanamycin (KAN), gentamicin (GEN), and streptomycin (STR) resistance (14). CrpP and APH(3)-IIB display a low degree of identity (18%) and 26% similarity (Fig. 1A); however, CrpP contains two residues conserved in APH enzymes, 7-Gly (involved in catalysis) and 26-Ile (involved in ATP binding) (Fig. 1B). Hence, these analyses suggest the product encoded by the *crpP* gene may confer resistance to antibiotics.

The protein encoded by *crpP* confers resistance to CIP. To test whether *crpP*, including the 5' putative regulatory region, is involved in resistance to CIP, the regions were amplified by PCR and were cloned into the high-copy-number vector pUCP20. The pUC-*crpP* recombinant plasmid was transferred into *P. aeruginosa* strain PAO1, and susceptibility to CIP was determined. Our results showed that *P. aeruginosa* strain PAO1 expressing the pUC-*crpP* plasmid had a level of susceptibility to CIP similar to that observed with strain PAO1 (Table 1). These results suggest that the *crpP* product does

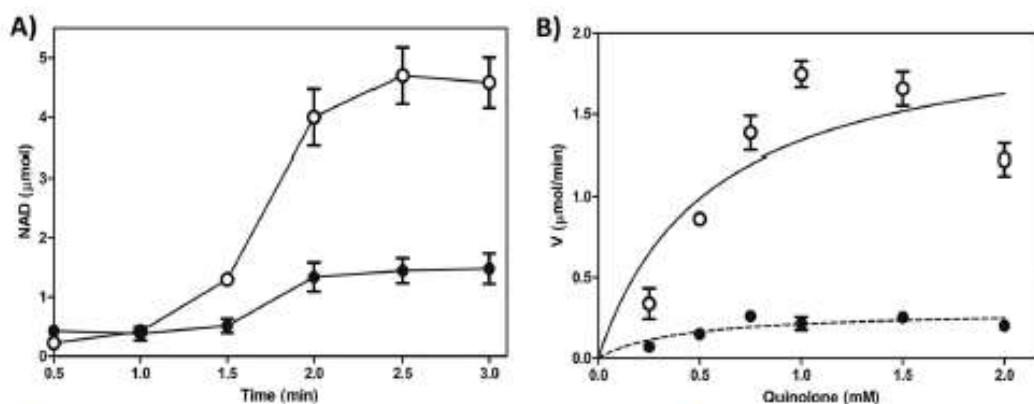


FIG 2 CrpP enzyme kinetics. (A) NADH oxidation rate comparisons for CIP (○) and NOR (●); 2.0 mM each antibiotic was incubated in the presence of 5.0 µg/ml His-CrpP protein at 37°C for 15 min. NADH oxidation was measured spectrophotometrically at 390 nm. (B) Michaelis-Menten plots for CIP (○) and NOR (●). The plot shows the NADH oxidation data. Data are means from four independent duplicate assays, with standard errors.

not confer significant resistance to quinolones in the genetic background of *P. aeruginosa* PAO1, a strain known for its intrinsic high resistance to many antibiotics (15). However, another explanation may be that in PAO1, the *crpP* gene is not expressed under the control of its own promoter in the pUC20 vector. To distinguish between these possibilities, *crpP* gene expression in cultures of *P. aeruginosa* PAO1 containing the recombinant pUC-*crpP* plasmid was determined by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) assays. The results showed that the *crpP* gene was expressed in *P. aeruginosa* strain PAO1 (Fig. S1B in the supplemental material). This finding suggested that this gene is functional in this strain. To determine whether *crpP* confers susceptibility to quinolones, the more-susceptible *E. coli* J53-3 bacterial background was used. MIC assays with *E. coli* J53-3(pUC-*crpP*) showed a 7.5-fold decrease in susceptibility to CIP, while susceptibilities to the other four quinolones tested (LVX, NOR, MXF, and NAL) did not differ from those of *E. coli* strain J53-3 (Table 1). Additionally, RT-qPCR analysis of expression showed that the *crpP* gene was expressed in this strain (Fig. S1B). These results indicated that *crpP* encodes a protein that confers decreased susceptibility to CIP on *E. coli*. In addition, the susceptibilities of *E. coli* J53-3(pUC-*crpP*) to KAN, STR, amikacin (AMK), and GEN were similar to those of the *E. coli* control strain (Table 1), suggesting that the *crpP* gene does not confer resistance to these aminoglycosides. These results indicated that the *crpP* gene on the pUM505 plasmid encodes a protein that confers selective resistance to CIP alone.

Enzymatic activity of the CrpP protein. Because our sequence analysis suggested that *crpP* encodes a protein that is similar to APH antibiotic-modifying enzymes, we next determined the *in vitro* activity of the purified CrpP enzyme. To purify CrpP, the coding region of *crpP* was cloned into an overexpression vector, and a recombinant His-tagged CrpP protein was isolated, as described in Materials and Methods. We first tested whether the recombinant His-CrpP protein was active in cells *in vivo*. To this end, we used isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce overexpression of the His-CrpP protein in *E. coli* BL21(pTrcHis-*crpP*) grown in the presence or absence of CIP. Upon His-CrpP induction, this strain grew better than the noninduced strain in the presence of CIP (see Fig. S2 in the supplemental material). This finding suggested that the N-terminal 6×His tag did not alter the activity of the enzyme, and therefore the His tag was retained as part of the recombinant protein for all subsequent experiments.

To determine the activity of CrpP on CIP, we used a coupled enzymatic assay involving NADH oxidation (16). In the presence of CrpP, NADH oxidation increases proportionally with the reaction time (Fig. 2A). Moreover, NADH oxidation also increased proportionally with the amount of protein in the assay (see Fig. S3 in the

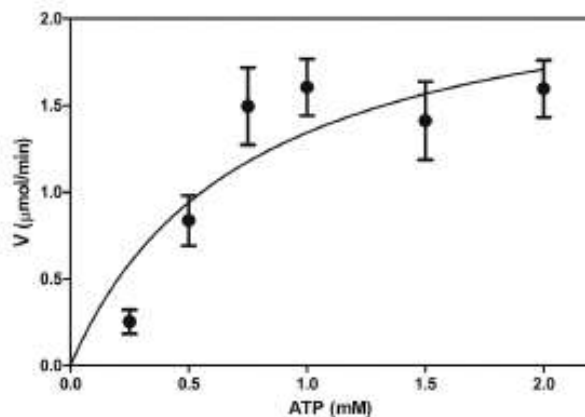


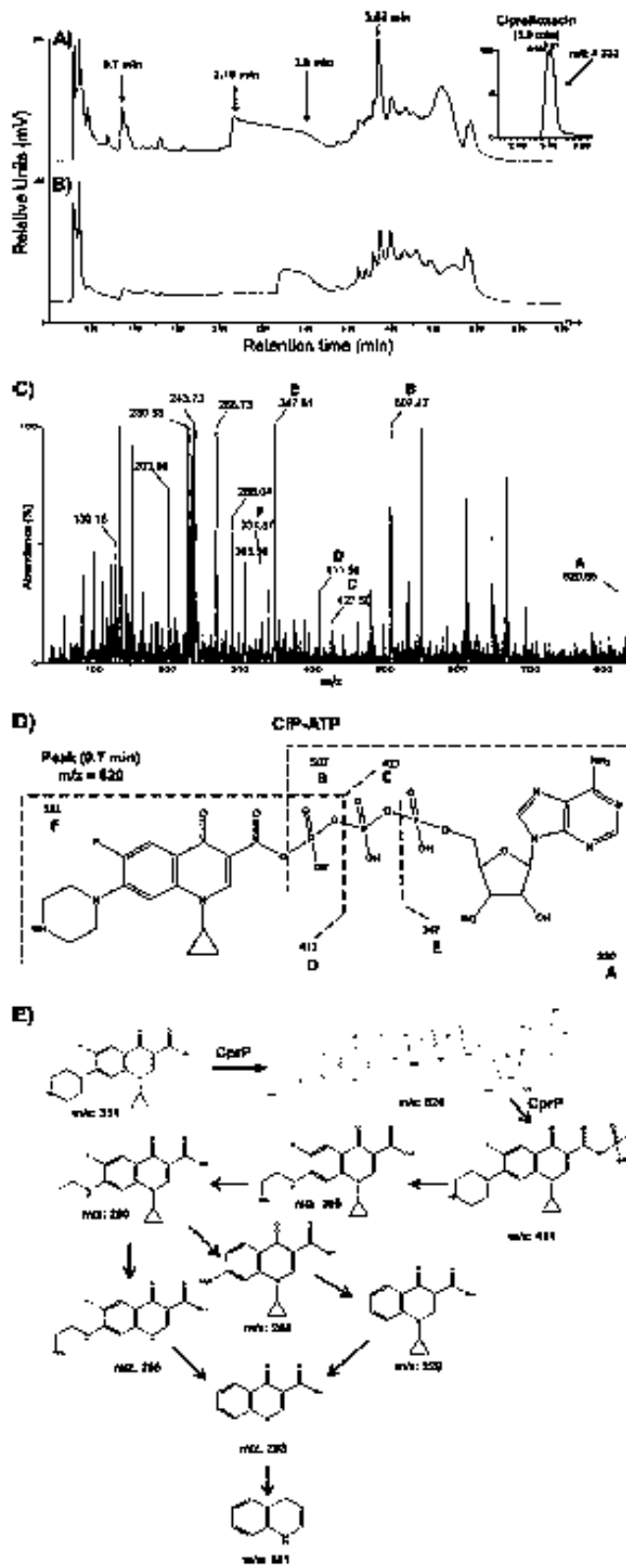
FIG 3 Michaelis-Menten plot of His-CrpP activity on ATP. ATP was incubated at the indicated concentrations in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ His-CrpP protein at 37°C for 15 min, as described in Materials and Methods. The Michaelis-Menten plot shows the data for NADH oxidation, which was measured spectrophotometrically at 390 nm. Data are means and standard errors from four independent duplicate assays.

supplemental material), indicating that CIP is a substrate of CrpP. Additionally, we determined the activity of CrpP on CIP following heat-induced CrpP denaturation. This resulted in a reduced level of CrpP activity from that of the native protein at the same concentration (Fig. S3), suggesting that the activity was specific to CrpP and that the correct structure of the protein is required for its function. Additionally, we analyzed the effects of pH and Mg^{2+} concentration on CrpP activity. The optimal pH was 7.0, and optimal CrpP activity was observed when 10 mM MgCl_2 was used (see Fig. S4 in the supplemental material).

The MICs indicated that *crpP* confers resistance to CIP only, suggesting an enzymatic activity that is specific to this antibiotic; thus, we analyzed the catalytic activity of CrpP against NOR, LVX, MXF, and NAL. We observed a lower level of CrpP activity when NOR was used as a substrate than when CIP was used (Fig. 2A), and no activity against LVX, MXF, or NAL was observed (see Fig. S5 in the supplemental material). These results are consistent with the susceptibility to quinolones observed by measuring MICs (Table 1) and suggest that the low level of CrpP activity on NOR does not enable detection of a decreased susceptibility to this antibiotic in *E. coli*. Moreover, CrpP cannot use aminoglycosides, such as KAN and STR, as substrates, suggesting that CrpP is specific for CIP and NOR (Fig. S5).

We also estimated the apparent kinetic constants of CrpP for CIP and NOR (Fig. 2B). We detected a K_m of 0.5483 ± 0.2762 mM and a V_{max} of 2.071 ± 0.3745 $\mu\text{mol/min}$ for CIP and a K_m of 0.4192 ± 0.2208 mM and a V_{max} of 0.2989 ± 0.4965 $\mu\text{mol/min}$ for NOR. The V_{max}/K_m ratio was approximately 5-fold higher for CIP than for NOR (3.77 for CIP versus 0.713 for NOR). These *in vitro* results demonstrated that CrpP is less efficient at utilizing NOR than it is at utilizing CIP as a substrate. In addition, when ATP was used as the variable cosubstrate, CrpP activity changed as a function of the ATP concentration (Fig. 3), indicating that the activity of CrpP was ATP dependent. This further suggested that the mechanism underlying CrpP function involves phosphorylation, considering that APHs catalyze the transfer of a phosphate group to the aminoglycoside molecule, and several of these enzymes use ATP as the phosphate donor group (17). Taken together, these results indicated that CrpP confers a selective resistance to CIP, probably through a mechanism involving phosphorylation.

To elucidate the mechanism of resistance to CIP, metabolite analysis was performed *in vitro* using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS). When CIP was incubated with the His-CrpP protein, three peaks of interest, with retention times of 0.7, 2.18, and 3.84 min, were observed. These peaks were not observed in the chromatogram of the reaction in the absence of His-CrpP or ATP (Fig. 4A and B), suggesting a modification of the CIP molecule. Analysis of the peak with a retention



time of 0.7 min clearly indicated the presence of a molecular ion corresponding to CIP-ATP (m/z 820) (Fig. 4C). In addition, several intermediary molecular ions were also identified, such as those with m/z 507, m/z 427, m/z 411, m/z 347, and m/z 331; the last ion corresponds to the CIP molecule (Fig. 4D). To better understand the mechanism of CIP inactivation, we analyzed the peaks showing retention times of 2.18 and 3.84 min (Fig. 4A). We detected mass ions corresponding to metabolites produced following fragmentation of the molecule. We propose that CIP is first activated by the binding of the ATP molecule (m/z 820), followed by phosphorylation of the molecule, confirmed by the presence of CIP monophosphate (m/z 411) (Fig. 4E). In addition, infrared spectroscopy assays showed that His-CrpP induced changes in the intensities of the characteristic absorption bands of the carboxyl group in the 2,500-to-3,300 cm^{-1} , 1,200-to-1,420 cm^{-1} , and 1,781 cm^{-1} regions, as well as in the 1,675 cm^{-1} absorption band, which corresponds to the vibration of the ketone carbonyl group at C-3 of the CIP molecule (see Fig. S6 in the supplemental material). This result agrees with the modification of CIP determined by LC-MS-MS, suggesting that CIP is phosphorylated on the carboxyl group. Additionally, these results suggest that the entire structure of CIP is important for CrpP function, since the carboxyl group is part of the central ring system in the quinolones, but CrpP did not show activity against other quinolones. A probable explanation for these results is that LVX and MXF contain oxygenated groups at position 8 of the central ring system in the quinolones, which can provide activation on the aromatic moiety, resulting in a higher electronic density in this part of the molecule. Meanwhile, the ethyl group of position 1 of the central ring of the quinolones in NOR could inject less electron density on the nitrogen atom than the cyclopropyl group present in CIP, producing, as a result, greater reactivity on the carboxyl group in CIP than in the other quinolones. In addition, metabolite analysis when CIP was incubated with crude extracts of an *E. coli* strain overexpressing the His-CrpP protein and ATP showed peaks corresponding to several degradation intermediaries of the phosphorylated CIP (CIP-P) molecule. These included molecular ions such as those with m/z 305, m/z 290, m/z 265, m/z 244, m/z 229, m/z 203, and m/z 131 (Fig. 4E; see also Fig. S7 in the supplemental material), suggesting that after CIP phosphorylation, the molecule is degraded.

DISCUSSION

The pUM505 plasmid is a conjugative plasmid isolated from a clinical isolate of *P. aeruginosa* (9). pUM505 carries different genes, which encode proteins involved in metal resistance, DNA repair, virulence, and plasmid stability (10–13). Additionally, pUM505 conferred CIP resistance on *P. aeruginosa* PU21 (13), suggesting that pUM505 contains genes responsible for quinolone resistance. Because *in silico* analysis of the pUM505 genes did not initially identify genes previously implicated in quinolone resistance (13), these data suggested that the CIP resistance transferred by pUM505 could be conferred by genes not previously reported. The bacterial resistance to quinolones reported to date may involve chromosomal gene mutations or may be plasmid mediated (4, 6). In addition, these systems could provide resistance against several quinolones. For example, the QepA efflux pump decreases susceptibility to CIP and NOR (4, 6). For this reason, we determined whether pUM505 could confer resistance to other quinolones. The results showed that pUM505 confers decreased susceptibility to the fluoroquinolones CIP, NOR, and MXF in *P. aeruginosa* strain PAO1. To

FIG 4 LC-MS-MS analysis of metabolites following CIP inactivation. (A and B) Representative chromatograms correspond to reaction mixtures containing the His-CrpP protein in the presence of CIP and ATP (A) or in the absence of ATP (B). The reactions were conducted as described in Materials and Methods. Arrows indicate peaks showing CIP structures (retention times of 0.7 min, 2.18 min, 3.0 min, and 3.84 min). (C) Representative mass fragmentation profile corresponding to the peak with a 0.7-min retention time. Capital letters above the peaks indicate the molecular ions that correspond to fragmented molecules derived from the ciprofloxacin-ATP molecule. Peak A (m/z 820) corresponds to the CrpP-ATP molecular ion. (D) Structure analysis of the mass fragmentation profile from panel C. (E) Reaction mechanism of CIP inactivation/fragmentation by the His-CrpP protein. The structures and m/z ratios were subtracted from the mass fragmentation profiles of peaks with retention times of 0.7, 2.18, and 3.84 min shown in panel A. Mass fragmentation profiles are shown in Fig. S7 in the supplemental material.

elucidate the molecular elements involved in fluoroquinolone resistance by pUM505, a new *in silico* analysis of the genes carried by this plasmid was conducted. We identified the 65-aa protein encoded by the *crpP* gene as a unique protein that shares sequence similarity with other proteins involved in resistance to antibiotics. CrpP displayed low identity (18%) to the APH-IIb enzyme from *P. aeruginosa* M18. The APH-IIb enzyme confers KAN, GEN, and STR resistance by transferring the phosphoryl group of ATP to the 3-hydroxyl groups of these antibiotics (14, 18). However, while APH enzymes share low (20 to 40%) sequence identity (18), they contain important conserved motifs, particularly at the C terminus, which is primarily responsible for catalysis and aminoglycoside binding. In addition, the ATP-binding domain is mainly located at the N terminus (18). The CrpP protein does not possess the catalytic motifs reported for APH enzymes, although it contains two conserved catalytic residues, 7-Gly (involved in catalysis) and 26-Ile (involved in ATP binding). In addition, it has been reported that the sequences of the catalytic and ATP-binding domains differ between individual APH enzymes and between APH subfamilies (18). Thus, the CrpP protein may confer resistance to antibiotics, while variability in the protein sequence (relative to those of APH enzymes) may promote the recognition of specific substrates.

The presence of the *crpP* gene did not decrease the quinolone susceptibility of *P. aeruginosa* strain PAO1, possibly because this strain has intrinsic high resistance to many antibiotics (15). However, the transfer of pUM505 to *P. aeruginosa* PAO1 was able to confer decreased susceptibility to CIP, NOR, and MXF. These results suggested that pUM505 might encode, in addition to the *crpP* gene, several mechanisms of resistance that, together, could increase *Pseudomonas* resistance to quinolones. It has been reported that PMQR elements [Qnr proteins, the AAC(6′)-Ib-cr enzyme, or the OqxAB, QepA1, and QepA2 efflux pump proteins] could confer reduced susceptibility to quinolones; for example, the AAC(6′)-Ib-cr enzyme increased MIC levels against *E. coli* 4-fold (19). However, PMQR systems are not mutually exclusive and together can confer lower levels of susceptibility to quinolones (1). Transferring *crpP* to *E. coli* J53-3 decreased the susceptibility of this strain to CIP, but not to NOR, MXF, LVX, NAL, or the aminoglycosides KAN, STR, AMK, and GEN. These results indicate that *crpP* encodes a protein that selectively confers resistance to CIP on *E. coli*. The capacity to confer selective resistance to an antibiotic is not uncommon; it is well known that APH enzymes from the same family display variable aminoglycoside resistance profiles (18). APH(3′) enzymes phosphorylate KAN and neomycin, but they tend to differ in their specificities for other aminoglycosides (18). Furthermore, AAC(6′) enzymes differ in their activities against AMK and GEN C1 (17).

The *in vitro* activity of the purified CrpP enzyme on CIP was determined in order to understand the mechanistic involvement of this enzyme in CIP resistance. CrpP showed enzymatic activity toward CIP and NOR when they were used as substrates. No activity toward LVX, MXF, NAL, or the aminoglycosides KAN and STR was observed, suggesting that CrpP is specific for CIP and NOR. Determination of kinetic parameters indicated that the K_m values for CIP and NOR were similar, although the V_{max} for CIP was >7 times higher than that for NOR. The V_{max}/K_m ratio was approximately 5-fold higher for CIP than for NOR, which could explain why *E. coli* transformed with the *P. aeruginosa crpP* gene did not show decreased NOR susceptibility. The APH family includes several members that are differentiated based on their substrate specificities or resistance phenotypes. Thus, members of this family confer resistance to specific antibiotics (20). Similar results were obtained by using the AAC(6′)-Ib-cr enzyme, which was more efficient at modifying KAN than CIP, suggesting its different specificities for different antibiotics (8). Moreover, CrpP used ATP as a variable cosubstrate, indicating that the activity of CrpP was ATP dependent. This further suggested that the mechanism underlying CrpP function involves phosphorylation, since APHs catalyze the transfer of a phosphate group to the aminoglycoside molecule, and several of these enzymes use ATP as the donor of the phosphate group (17).

In addition, *in vitro* CIP metabolite analysis using LC-MS-MS suggested that a modification of the CIP molecule occurred, in agreement with the infrared spectroscopy

results. Our analysis revealed the presence of a molecular ion corresponding to CIP-ATP (m/z 820) and several intermediaries of the fragmented CIP-ATP molecule. These analyses enable us to propose that CIP is first activated by binding to the ATP molecule, followed by phosphorylation and degradation. The AAC(6')-Ib-cr protein from *E. coli* is the only CIP-modifying enzyme described to date. This enzyme is a variant of the aminoglycoside acetyltransferase enzyme AAC(6')-Ib, an acetyltransferase that confers resistance to aminoglycosides such as KAN, AMK, and tobramycin (8). The AAC(6')-Ib-cr protein confers reduced susceptibility to CIP by decreasing the activity of this antibiotic via N-acetylation at the amino nitrogen on its piperaziny substituent (8). Therefore, CrpP may represent a novel protein with specific enzymatic activity against CIP.

In summary, our results show that *crpP* encodes a novel protein capable of specifically conferring resistance to CIP in *E. coli* through an ATP-dependent mechanism that involves phosphorylation of the antibiotic.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture media. *P. aeruginosa* strain PAO1 (21) and *E. coli* strains JM101 (22) and JS3-3 (F⁻ Met⁻ Pro⁻ Rif^r) (23) were used as recipient strains for recombinant plasmids or susceptibility tests. The *P. aeruginosa*(pUM505) strain, expressing the pUM505 plasmid (Hg^r Cr^r) (24), was used to evaluate quinolone resistance, as well as representing a DNA donor of pUM505. The *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP strain (Stratagene, San Diego, CA, USA) was used for protein overexpression. The following culture media were used: nutrient broth (NB), Luria-Bertani (LB) broth (for solid media, 1.5% agar was added) (25), and M9 minimal salts medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 20 mM glucose, 0.1 mM CaCl₂, 2.0 mM MgSO₄, and 0.1% casein peptone. When necessary, ampicillin (AMP) (100 µg/ml) or carbenicillin (CAR) (400 µg/ml) was added to agar plates.

Bacterial growth and susceptibility tests. Bacterial cultures were obtained by diluting overnight cultures 1:50 in tubes containing 4 ml of fresh medium. The MICs for CIP, LVX, NOR, MXF, and aminoglycosides were obtained by broth microdilution in Mueller-Hinton medium according to the CLSI recommendations (26). The *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922 strains were used as reference strains for antibiotic susceptibility testing.

Cloning of *crpP*. The *crpP* gene was PCR amplified from the pUM505 plasmid using the following oligonucleotides: forward, 5'-CAACATGATGAATTCACCGGAAAC-3'; reverse, 5'-GAGAAATGAAGCTTGCGTTGTT-3' (designed with EcoRI and HindIII endonuclease sites [underlined], respectively). The PCR fragment was purified, cloned into the pJET1.2/blunt vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and transferred to *E. coli* strain JM101 by electroporation; the transformants were selected on LB agar plates containing AMP. The DNA fragment containing *crpP* was obtained by digestion with EcoRI and HindIII and was subcloned into the corresponding sites of the pUCP20 shuttle vector (27). The resulting recombinant pUC_{crpP} plasmid was transferred to the *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* JS3-3 strains by electroporation, and transformants were selected on LB agar plates using CAR or AMP, respectively.

RT-qPCR assays. Total RNA from bacterial cells grown in LB medium was isolated by utilizing the Tri reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). After treatment with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA), RNA was quantified by spectrophotometric analysis at 260 nm. Oligonucleotide primers and hydrolysis probes for RT-qPCR of the *crpP* gene and the 16S rRNA reference genes (listed in Table S1 in the supplemental material) were designed employing Biosearch Technologies software and were purchased from Biosearch Technologies (Novato, CA, USA). The *crpP* and 16S rRNA genes were amplified using the 5' exonuclease probe RT-qPCR method. RT-qPCR was performed with total-RNA samples (500 ng) and the SuperScript III Platinum One-Step RT-qPCR reagent kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) on the LightCycler 480 II system (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Amplification signal curves were analyzed at absorption wavelengths of 530 nm. Appropriate positive and nontemplate controls were included in each test run. The relative expression of the *crpP* gene was normalized to expression values obtained from 16S rRNA genes from *P. aeruginosa* (GenBank accession number AE004091; region, nucleotides 722096 to 723631) or *E. coli* (GenBank accession number AJ605115). Relative gene expression was estimated via the classical calibration dilution curve and slope calculation. A 5-fold dilution series (500 to 0.05 ng total RNA) was prepared and was utilized as samples in the RT-qPCR. Efficiency (*E*) was obtained from standard curves utilizing the formula $E = (1 - 10^{-1/\text{slope}}) \times 100$. Relative expression levels were determined with the efficiency correction method, which takes into account amplification efficiencies between target and reference genes (28).

Genetic techniques and sequence analysis. General molecular genetics techniques were used according to standard protocols (25). The cloning process was verified by DNA sequencing and was conducted at Elim Biopharmaceuticals, Inc. (Hayward, CA, USA). Protein sequences were aligned using the ClustalW2 package (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Sequence similarities in protein and DNA databases were searched using the blastp and blastx programs (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Potential promoter sequences were searched using Neural Network Promoter Prediction software (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

Overexpression and purification of CrpP. The *crpP* coding region was PCR amplified using pUM505 plasmid DNA as a template and the 5'-ACGAGGGATCCTGTGTCAAAG-3' forward and 5'-AGCGGGATCAAGCTTAAATCGA-3' reverse oligonucleotides, designed with BamHI and HindIII endonuclease sites (underlined), respectively. The amplified fragments were cloned into the pJET1.2/blunt vector, and the

recombinant plasmids were transferred by electroporation into *E. coli* strain JM101; transformants were selected on LB agar plates using AMP. The *crpP* coding region was obtained by digestion with the BamHI and HindIII enzymes, purified, and subcloned into the corresponding restriction sites of the pTrcHisC vector (Thermo Fisher Scientific). The recombinant pTrcHis-*crpP* plasmid encodes the His-CrpP recombinant protein of ~11 kDa, possessing a 6×His tag at the N terminus. The clones were validated by sequencing with the pTrcHis forward primer (Thermo Fisher Scientific). The recombinant plasmids were transferred by electroporation into the *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP strain, and transformants were selected on LB agar plates using ampicillin. Overnight cultures of *E. coli* BL21(pTrcHis-*crpP*) were diluted at a 1:50 ratio into 250 ml of fresh NB medium and were cultured at 37°C with shaking until the optical density at 590 nm (OD_{590}) reached 0.5. Overexpression of the His-CrpP protein was induced with 0.5 mM IPTG, and the culture was incubated for 6 additional hours. Cells were harvested by centrifugation, and the pellets were suspended in a loading buffer composed of 25 mM Tris (hydroxymethyl) amino methane-HCl (pH 6.8), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.35 mM β -mercaptoethanol, 12.5% glycerol, and 0.005% bromophenol blue, after which they were heated for 5 min at 95°C. His-CrpP overexpression was verified on a 17% SDS-PAGE gel using a Tris-glycine buffer.

His-CrpP protein was purified as described by Watanabe and Takada (29). Cells were disrupted by sonication until the solution was clarified, and the debris was removed by centrifugation. The supernatant was loaded onto a nickel-nitrilotriacetic acid (NTA) resin (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and was packed into a column. His-CrpP was recovered by elution with 200 mM imidazole, as described by Aranda et al. (30). The purification was monitored by 17% SDS-PAGE.

Phosphorylation assays. Phosphorylation of quinolones (CIP, NOR, LVX, MXF, and NAL) or aminoglycosides (KAN and STR) by CrpP was monitored with a coupled assay using pyruvate kinase-lactate dehydrogenase, as described by Kramer and Matsumura (16), with the following modifications. We incubated 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, or 2.0 mM quinolone with 5.0 μ g/ml of His-CrpP protein in a total volume of 1 ml of assay buffer (50 mM Tris [pH 7.6], 40 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.25 mg/ml NADH, 2.5 mM phosphoenolpyruvate, and 2.0 mM ATP) and 5.0 μ l of pyruvate kinase-lactate dehydrogenase (600 to 1,000 μ g/ml pyruvate kinase or 900 to 1,400 μ g/ml lactate dehydrogenase [Sigma]) in a quartz cuvette (catalog no. 14-385-914A; Thermo Fisher). The mixtures were incubated at 37°C for 15 min. The oxidation of NADH was determined by monitoring the absorbance at 340 nm with an Amersham Biosciences Ultrospec 4300 pro UV/visible spectrophotometer (Amersham, UK). In this coupled assay system, the amount of ADP released is monitored at 340 nm through coupling with NADH oxidation. The data were plotted using nonlinear regression, the Michaelis-Menten model, and the least-squares method. GraphPad Prism software, version 5.01 for Windows, was used. Additionally, the activity of the His-CrpP protein on CIP was analyzed after its denaturation by heating at 95°C for 15 min, and the oxidation of NADH was determined as described above. To determine the optimal pH for CrpP activity, the pH of the reaction mixture was adjusted to 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, or 8.0. Moreover, to analyze the effect of the Mg^{2+} concentration on CrpP activity, the $MgCl_2$ concentration in the reaction mixture was modified to 5.0, 10.0, or 15.0 mM. Next, 0.5 mM fluoroquinolone was incubated with 5.0 μ g/ml of His-CrpP protein in a total volume of 1 ml for each reaction mixture, and the oxidation of NADH was determined. Six independent assays with two replicates per experiment were conducted.

Analytical methods. To determine whether CIP is modified by CrpP, LC-MS-MS analysis was conducted. Thus, 5.0 mM CIP was incubated with 5.0 μ g/ml of His-CrpP protein for 1 h at 37°C, in the presence or absence of 2.0 mM Mg -ATP (Sigma), in buffer R (50 mM HEPES [pH 7.0], 40 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$) in a total volume of 1 ml. Next, the samples were centrifuged at 13,700 \times g and were filtered using a 0.2- μ m Millipore (Billerica, MA, USA) membrane. The LC-MS-MS system consisted of an Acquity ultraperformance liquid chromatography (UPLC) column and a Xevo TQ-S instrument (Waters, Milford, MA, USA).

LC-MS-MS measurement was carried out as follows. One microliter of the standard solution or previously filtered samples was injected into a reversed-phase LC column (Acquity UPLC BEH C_{18} column; particle size, 1.7 μ m; inside diameter, 2.1 mm; length, 50 mm). CIP was eluted from the column using the following conditions: water containing 0.01% formic acid (A) and 100% acetonitrile (B). Elution was begun with 100% A–0% B followed by a linear gradient to 90% A–10% B (until 0.25 min), followed by 40% A–60% B (until 3.50 min), and finally by 100% A–0% B (until 4.50 min) plus 1 min for equilibration. A flow rate of 0.4 ml/min was used. A column temperature of 40°C was maintained, while the temperature of the samples in the autosampler was 10°C. For detection, a Xevo TQ-S instrument was used in the scan and multiple-reaction monitoring (MRM) modes. Scanning was carried out from 30 to 1,000 m/z with a 0.2-s scan time, a 40-V cone voltage, in the positive-ionization mode. For the MRM mode, the specific parameters for the MS-MS transition were as follows. For CIP transition, there was a precursor ion of m/z 332.2 and product ions of m/z 245.2, 288.3, and 314.2 with collision energies of 25, 15, and 20 V, respectively. The cone voltage (V) was 5 V, and the dwell time was 0.020 s. All three transitions were measured using a capillary voltage of 2.20 kV, a desolvation temperature of 500°C, a desolvation gas flow (N_2) of 800 liters/h, a cone gas flow of 50 liters/h, and a nebulizer gas flow of 7.0×10^4 Pa. The calculations were performed using the ratios of the peak areas of the quantified transition components of CIP.

Additionally, samples obtained under the conditions described above were analyzed by infrared spectroscopy, and the spectra were recorded using a Nicolet iS10 spectrophotometer (Thermo Scientific) and the attenuated total reflection (ATR) technique (31).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.02629-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1.8 MB.**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the Coordinación de la Investigación Científica (UMSNH grants 2.6 and 2.35) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; grants 181747, 167071, and 256927). K.C.H.-R. and V.M.C.-J. were supported by postgraduate fellowships from CONACYT.

REFERENCES

- Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. 2016. The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules* 21:268. <https://doi.org/10.3390/molecules21040268>.
- Aldred KJ, Kems RJ, Osheroff N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53:1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>.
- Emmerson AM, Jones AM. 2003. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 51(Suppl 1):13–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg208>.
- Hooper DC, Jacoby GA. 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1354:12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>.
- Redgrave I, Sutton SB, Webber MA, Piddock JV. 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanism, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 22:438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.
- Fábrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2:40–61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>.
- Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. 2005. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 25:290–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.11.012>.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Buch K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside-acetyltransferase. *Nat Med* 12:83–88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>.
- Cervantes-Vega C, Chávez J, Córdova NA, De la Mora P, Velasco JA. 1986. Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48:159–163.
- Díaz-Magaña A, Alva-Murillo N, Chávez-Moctezuma MP, López-Meza JE, Ramírez-Díaz MI, Cervantes C. 2015. A plasmid-encoded UmuD homologue regulates expression of *Pseudomonas aeruginosa* SOS genes. *Microbiology* 161:1516–1523. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000103>.
- Rodríguez-Andrade E, Hernández-Ramírez KC, Díaz-Pérez SP, Díaz-Magaña A, Chávez-Moctezuma MP, Meza-Carmen V, Ortiz-Alvarado R, Cervantes C, Ramírez-Díaz MI. 2016. Genes from pUM505 plasmid contribute to *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109:389–396. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0642-9>.
- Hernández-Ramírez KC, Chávez-Jacobo VM, Valle-Maldonado MI, Patiño-Medina JA, Díaz-Pérez SP, Jácome-Galarza IE, Ortiz-Alvarado R, Meza-Carmen V, Ramírez-Díaz MI. 2017. Plasmid pUM505 encodes a toxin-antitoxin system conferring plasmid stability and increased *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb Pathog* 112:259–268. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.060>.
- Ramírez-Díaz MI, Díaz-Magaña A, Meza-Carmen V, Johnstone L, Cervantes C, Rensing C. 2011. Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal genes. *Plasmid* 66:7–18. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.03.002>.
- Wu DQ, Ye J, Ou HY, Wei X, Huang X, He YW, Xu Y. 2011. Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC Genomics* 12:438. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-438>.
- Hancock RE. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27: S93–S99. <https://doi.org/10.1086/514909>.
- Kramer JR, Matsumura I. 2013. Directed evolution of aminoglycoside phosphotransferase (3') type IIIa variants that inactivate amikacin but impose significant fitness costs. *PLoS One* 8:e76687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076687>.
- Ramírez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13:151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>.
- Smith AC, Baker NE. 2002. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2:143–160. <https://doi.org/10.2174/1568005023342533>.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22:664–689. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-09>.
- Wright GD, Thompson PR. 1999. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* 4:D9–D21. <https://doi.org/10.2741/A408>.
- Holloway BW, Krishnapillai V, Morgan AF. 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* 43:73–102.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90120-9).
- Garza-Ramos U, Barrios H, Hernández-Vargas MJ, Rojas-Moreno T, Reyna-Flores F, Tinoco P, Othon V, Poirel L, Nordmann P, Cattoir V, Ruiz-Palacios G, Fernández JL, Santamaría RI, Bustos P, Castro N, Silva-Sánchez J. 2012. Transfer of quinolone resistance gene *qnrA1* to *Escherichia coli* through a 50 kb conjugative plasmid resulting from the splitting of a 300 kb plasmid. *J Antimicrob Chemother* 67: 1627–1634. <https://doi.org/10.1093/jac/dks123>.
- Cervantes C, Ohtake H, Chu L, Misra TK, Silver S. 1990. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J Bacteriol* 172:287–291. <https://doi.org/10.1128/jb.172.1.287-291.1990>.
- Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S18. CLSI, Wayne, PA.
- West SE, Schweizer HP, Hricová K, Uvřil R, Neiser J, Blahut L, 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. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90237-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90237-2).
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Watanabe S, Takada Y. 2004. Amino acid residues involved in cold adaptation of isocitrate lyase of a psychrophilic bacterium, *Colwellia maris*. *Microbiology* 150:3393–3403. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27201-0>.
- Aranda J, Garrido ME, Cortés P, Llagostera M, Barbé J. 2008. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* 76:1590–1598. <https://doi.org/10.1128/IAI.00987-07>.
- Ramer G, Lendl B. 15 March 2013. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. In *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*. John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9287>.

Prevalence of the *crpP* gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals

Víctor M. Chávez-Jacobo¹, Karen C. Hernández-Ramírez¹, Jesús Silva-Sánchez^{2,†}, Ulises Garza-Ramos², Humberto Barrios-Camacho², Rafael Ortiz-Abarca³, Carlos Cervantes¹, Víctor Meza-Carmen¹ and Martha I. Ramírez-Díaz^{1,*†}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México; ²Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México; ³Facultad de Química Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

*Corresponding author. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana, Edificio B-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Mich., México. Tel/Fax: (+52) (443) 326 5788; E-mail: marthaizeta_ramirez@hotmail.com

†These authors made an equal contribution to the article.

Received 12 September 2018; returned 2 October 2018; revised 28 November 2018; accepted 4 December 2018

Objectives: This study investigated the presence of the *crpP* gene, which encodes an enzymatic mechanism of antibiotic phosphorylation that decreases ciprofloxacin susceptibility, in ESBL-producing clinical isolates and its effect in transconjugants.

Methods: A collection of 77 ESBL-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae and 68 ESBL-producing transconjugants that had acquired plasmids from clinical isolates from hospitals in Mexico obtained from 1988 to 2012 was employed. The *crpP* homologue genes were identified by dot-blot and PCR assays; five of them were sequenced and an *in silico* analysis was conducted. Expression of CrpP proteins was determined by western blot assays using antibodies against CrpP from plasmid pUM505. Three *crpP* homologue genes were cloned and transferred to *Escherichia coli* J53-3 as recipient strain.

Results: The *crpP* gene was identified in four (5.19%) ESBL-producing isolates and five (7.35%) ESBL-producing transconjugants with plasmids from clinical isolates. Analysis of the deduced amino acid (aa) sequence of the CrpP protein homologues revealed that they all corresponded to small proteins (63–70 aa) with an identity of 10.1%–43.7% with respect to the pUM505 CrpP sequence. In addition, all *crpP*-positive transconjugants expressed a CrpP protein. Finally, transfer of *crpP* homologues conferred lower ciprofloxacin susceptibility to *E. coli*.

Conclusions: These findings indicate the presence of *crpP* genes among ESBL-producing isolates from Mexican hospitals and point to widespread *crpP*-type genes in old Enterobacteriaceae clinical isolates (from 1994). CrpP probably confers resistance by means of the phosphorylation of ciprofloxacin.

Introduction

Ciprofloxacin, an antibiotic of the fluoroquinolone family, is the most active quinolone against *Pseudomonas aeruginosa*. This antibiotic is widely used to treat infections caused by this bacterium.¹ In addition, ciprofloxacin is used to treat several Gram-negative and Gram-positive bacterial infections, and is the most commonly prescribed antibacterial drug to date.² The most serious infections caused by Gram-negative bacteria occur in clinical settings and are commonly caused by enterobacteria (mainly *Klebsiella pneumoniae*), *Acinetobacter* and *P. aeruginosa*.^{3,4} The emergence and dissemination of resistant bacteria have been shown to be directly related to antibiotic consumption.⁴ In addition, it has been

reported that horizontal transfer of plasmids containing antibiotic resistance genes is an essential mechanism for the dissemination of antimicrobial resistance.⁵ There are three mechanisms of resistance to quinolones: (i) reducing quinolone accumulation through changes in expression of efflux pumps or porin channels; (ii) altering or protecting the antibiotic targets involving mutations in genes encoding target enzymes; and (iii) enzymatic antibiotic modification mediated by plasmids.^{6–8} The first enzymatic mechanism described as conferring resistance to ciprofloxacin and norfloxacin is mediated by the AAC(6′)-Ib-cr enzyme through a variant of the gene encoding aminoglycoside acetyltransferase AAC(6′)-Ib.⁷

Recently, our group reported that the CrpP enzyme, encoded by the pUM505 plasmid, isolated from a *P. aeruginosa* clinical isolate, confers decreased susceptibility to ciprofloxacin when transferred to the *Escherichia coli* J53-3 strain.⁸ CrpP possesses ATP-dependent phosphotransferase activity for ciprofloxacin and it is suggested that when ciprofloxacin is phosphorylated the antibiotic is degraded.⁸

The aim of this study was to analyse the presence of CrpP homologues in a collection of clinical isolates of ESBL-producing Enterobacteriaceae and in plasmids containing ESBLs of nosocomial origin, in an initial attempt to quantify the spread of the *crpP* gene and to understand the factors that favour the prevalence of this gene in bacteria from hospital settings.

Materials and methods

Bacterial strains and culture media

Seventy-seven ESBL-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae and 68 transconjugants of the *E. coli* J53-2 strain containing plasmids encoding ESBLs obtained from clinical isolates from hospitals in Mexico between 1988 and 2012 were included in this study (Tables S1 and S2, available as Supplementary data at JAC Online). The clinical isolates and transconjugants are part of the collection of the Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI/INSP), Cuernavaca, Mexico. The clinical isolates were previously characterized by their resistance to multiple antibiotics,⁹ and they included the following species: *E. coli* (44); *K. pneumoniae* (25); *Enterobacter cloacae* (4); *Enterobacter aerogenes* (1); *Enterobacter agglomerans* (1); *Klebsiella cryocrescens* (1); and *Serratia* spp. (1). Transconjugants contained at least one plasmid harbouring an ESBL enzyme transferred from *E. coli* (34), *K. pneumoniae* (33) and *Klebsiella oxytoca* (1) clinical isolates.

E. coli JM101¹⁰ and J53-3 (F⁻, met^r, pro^r, Rif^r)¹¹ were utilized as recipient strains for plasmids or in antibiotic susceptibility tests. *E. coli* J53-2 (pUC₂-*crpP*) and *E. coli* J53-3 (pUC₂-*crpP*)⁸ were included as a positive control for PCR assays and to evaluate quinolone susceptibility, respectively. Nutrient broth and LB broth¹² were used as culture media (for solid media, 1.5% agar was added), and were supplemented with ampicillin (100 mg/L) when necessary.

Identification of *crpP* gene homologues

Hybridization assays

ESBL-producing clinical isolates were inoculated into LB broth and, after overnight growth at 37°C, total DNA was obtained by heat shock, boiling two or three colonies resuspended in 100 µL of distilled water for 5 min. Samples were cooled on ice for 5 min, boiled again, and centrifuged at 10 000 rpm for 2 min. The supernatant was recovered and stored at -20°C until use. The DNA (100–150 ng) contained in 10 µL was placed on a nitrocellulose membrane (Hybond-N+; Amersham) and fixed by UV light exposure. The coding region of the pUM505 *crpP* gene was amplified from *E. coli* J53-3 (pUC₂-*crpP*) by PCR using forward oligonucleotide 1D (5'-CGAGCTGCTGTTGCTGCTCCTGG-3') and reverse oligonucleotide 1R (5'-CGACCGGTACCGACAAGCTGGAC-3'). To use as a probe for the *crpP* gene, the PCR product was purified with the Wizard SV and PCR Clean-up System (Promega) and labelled with the Gene Images AlkPhos Direct Labelling kit (Amersham). Conditions for labelling, hybridization and signal detection were those recommended by the manufacturer at high stringency (63°C).

PCR assays

Total DNA from transconjugants with plasmids from ESBL-producing clinical isolates was obtained as described above. This DNA was used to identify

crpP gene homologues by PCR using oligonucleotides 1D and 1R. DNA from *E. coli* J53-2 (pUCP20) and *E. coli* J53-3 (pUC₂-*crpP*) was used as a negative and positive control, respectively. PCR was performed as follows: 5 min at 95°C (1 cycle), 30 s at 95°C, 30 s at 64°C, 30 s at 72°C (35 cycles) and 5 min at 72°C. PCR products were visualized after electrophoresis in 0.7% agarose gels in TAE buffer.¹²

Bacterial growth and susceptibility tests

Bacteria were routinely grown by diluting 1:50 overnight cultures in tubes with 4 mL of fresh medium. After incubating for 18 h at 37°C under constant shaking, growth was monitored as OD at 590 nm with a spectrophotometer (Spectronic 21, Milton Roy).

Antimicrobial susceptibility of all isolates and transconjugants was initially determined with the MicroScan (Dade) system, using the Combo 14 panel. Subsequently, MICs of ciprofloxacin for *E. coli* J53-3 transconjugants with *crpP* gene homologues were determined by microdilution in Mueller-Hinton broth following CLSI recommendations.¹³ *E. coli* ATCC 25922 was used as a reference strain.

Plasmid isolation and conjugation experiments

Matings were performed as described by Miller,¹⁴ using *E. coli* J53-3 (F⁻, Rif^r, NAL^s), a more-susceptible *E. coli* bacterial background, as recipient strain. Transconjugants were selected on Luria agar plates supplemented with rifampicin (100 mg/L) and cefotaxime (1 mg/L) and were designated TT2982, TT1235, TT2424, TT2918 and TT5816. DNA was extracted from *crpP*-positive transconjugants from *E. coli* J53-3 containing plasmids encoding ESBL genes, according to the method described by Kieser.¹⁵ DNA was visualized after electrophoresis in 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

Production and purification of antibodies directed against CrpP

Polyclonal antibodies were produced using the CrpP protein purified as described by Chávez-Jacobo et al.⁸ Two rabbits were inoculated utilizing the following inoculation scheme. On day 1, 1 mL of rabbit blood was collected to obtain pre-immune serum, after which the rabbits were inoculated with 500 µg of CrpP protein. After 3 weeks, the rabbits were inoculated with a second dose of CrpP protein. Finally, after 6 weeks, the rabbits were bled and serum was collected (immune serum). The antibodies were then purified by precipitation with 40% ammonium sulphate.¹²

Western blot analysis

Overnight cultures of *E. coli* J53-3 transconjugants with plasmids from ESBL-producing clinical isolates were disrupted by sonication to clarity, and debris was removed by centrifugation at 15 000 rpm in a Dynamica Velocity 14R centrifuge. Protein quantification of the samples was performed by the Lowry method. Total proteins (100 µg) from the cell lysates were boiled at 95°C in buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA) and separated using 14% SDS-PAGE. Then, the proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The membranes were blocked for at least 1 h at room temperature in Tris-buffered saline-0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 5% non-fat dry milk and then incubated with TBS-T containing the anti-CrpP primary antibody at the dilutions indicated. After three washes of 15 min each in TBS-T, the membranes were incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies for 1 h. After three washes of 15 min with TBS-T, ECL (Amersham) detection was performed and hybridization on the membranes was determined using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, CA, USA).

Genetic techniques and sequence analysis

General molecular genetics techniques were employed according to standard protocols.²² Sequencing of *crpP* gene homologues was carried out at Elim Biopharmaceuticals, Inc. (Hayward, CA, USA). To obtain the *crpP* gene sequences, a partial sequence of each *crpP* gene was first obtained using oligonucleotides 1D and 1R (which amplify an internal region) and total DNA from each transconjugant as PCR template. Once the partial DNA sequences had been obtained, they were used to design a pair of oligonucleotides for each *crpP* gene to allow a second DNA sequencing by inverse amplification using the total DNA from each transconjugant as template. Accession numbers (GenBank) of the *crpP* genes from X1235, X2424, X2918, X2982 and X5816 transconjugants are MK093947, MK093948, MK093949, MK093950 and MK093951, respectively. Protein sequence alignments were calculated with the ClustalW2 package (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/ClustalW2/>). Potential promoter sequences were searched for using Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Secondary protein structure was determined using the MINNOCU (Membrane protein identification withOUT explicit use of hydrophobicity profiles and alignments) program (<http://minna.cuhk.edu.hk/>). The recombinant constructions were verified by DNA sequencing carried out at Elim Biopharmaceuticals.

Cloning of *crpP* gene homologues

crpP gene homologues were obtained by PCR using plasmid DNA from TT2424, TT2918 and TT2982 *E. coli* J53-3 transconjugants. The *crpP* gene from TT2424 (297 bp) was amplified using oligonucleotides TT-2424-DIR (5'-GGTGGCAGCACTGGATCCAACTTAG-3'; forward) and TT-2424-REV (5'-GTGCAAGCTTGCAGGCCCATTA-3'; reverse) designed with BamHI and HindIII endonuclease sites (underlined), respectively. The *crpP* gene from TT2918 (286 bp) was amplified using oligonucleotides TT-2918-DIR (5'-GAGAAGAAGGATCCAGCACCT-3'; forward) and TT-2918-REV (5'-CTCCTTCAACCAAGCTTCAAGTAA-3'; reverse) designed with BamHI and HindIII endonuclease sites (underlined), respectively. The *crpP* gene from TT2982 (286 bp) was amplified using oligonucleotides TT-2982-DIR (5'-TGGGATCCGTACTTCAAGCCG-3'; forward) and TT-2982-REV (5'-CAAGTGAAGCTTCCCTTC-3'; reverse) designed with BamHI and HindIII endonuclease sites (underlined), respectively. PCR fragments were purified as described previously and were cloned into the pJET1.2/blunt vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and recombinant plasmids were transferred into the JM101 *E. coli* strain by electroporation. Transformants were selected on LB agar plates with ampicillin. To subclone *crpP* gene homologues into the pUCP20 shuttle vector, recombinant plasmids from pJET derivatives were digested with restriction enzymes BamHI and HindIII, and DNA fragments were ligated into the corresponding sites of pUCP20.²⁶ Recombinant plasmids were transferred by electroporation to *E. coli* J53-3 and the transformants were selected by culturing on LB agar with ampicillin.

Results

Identification of *crpP*-homologous genes

To investigate the distribution of the *crpP* gene in clinical isolates, a collection of 77 ESBL-producing clinical isolates of enterobacteria causing nosocomial infections in Mexico was used (Table S1). *crpP* homologues from the ESBL-producing isolates were assayed by dot-blot hybridization using a PCR probe of the *crpP* gene obtained from the pUC-*crpP* plasmid. The results revealed a positive hybridization signal in four clinical isolates (10-221, 04-242, 01-1288, 01-1393) obtained during the years 2008-11 (Figure S1a and Table S1), indicating the possession of a *crpP* homologue.

The presence of *crpP* homologues in these isolates was confirmed by PCR amplification using oligonucleotides 1D and 1R. The

results showed a band of the size expected (177 bp) for the *crpP* gene from pUM505 when DNA from *E. coli* J53-2 (pUC-*crpP*) was used as a template but not when DNA from *E. coli* J53-2 (pUCP20) was used. In addition, the four isolates identified displayed a sharp DNA band of ~200 bp, corresponding to *crpP* (Figure S1b), confirming that *crpP* homologues are present in the clinical isolates and indicating that this gene is present in bacteria from hospitals. Ciprofloxacin susceptibility of *crpP*-positive isolates as determined by MicroScan showed that three (10-221, 04-242 and 01-1288) were resistant to this antibiotic (Table S1). These data suggest that *crpP* homologues could be responsible for changes in ciprofloxacin susceptibility.

With the purpose of determining whether *crpP* gene homologues might be located on mobile elements, a collection of 68 ESBL-producing transconjugants with plasmids from clinical isolates from hospitals in Mexico was employed. Identification of *crpP* homologues was performed by PCR employing oligonucleotides 1D and 1R. The results showed a band of the size expected (177 bp) for the *crpP* gene from pUM505 when DNA from *E. coli* J53-2 (pUC-*crpP*) was used as a template but not when DNA from *E. coli* J53-2 (pUCP20) was used. In addition, the results showed that five of the transconjugants (X2982, X1235, X2424, X2918 and X5816) displayed a sharp DNA band of ~200 bp, corresponding to *crpP* (Figure S2), indicating that *crpP* genes are present in plasmids from clinical isolates. Additionally, ciprofloxacin susceptibility MicroScan tests of the *crpP*-positive transconjugants demonstrated that all were resistant to the antibiotic (Table S2). These results indicate that the *crpP* gene is present in clinical isolates on conjugative plasmids, suggesting that spread of this gene to other bacteria in the clinical environment is possible.

Sequence analysis of *crpP* homologues

In silico analysis of the nucleotide sequence of *crpP* homologues from plasmids of ESBL-producing isolates revealed a putative conserved promoter region of the λ gt10 (σ^7)-type (Figure 1a) at the 5' end, similar to that of the *crpP* gene from the pUM505 plasmid, suggesting that these genes are functional and that they have similar regulation. The proteins encoded by these *crpP* homologues were all small, with sizes ranging between 63 and 70 aa, similar to the length of the pUM505 CrpP protein of 65 aa (Figure 1b). With the exception of the CrpP sequence encoded by the transconjugant X2918, which exhibited 10.1% identity and 18.8% similarity with the pUM505 CrpP protein, the other CrpP sequences showed 33.3%-43.7% identity and 43.8%-53.5% similarity (Table 1), suggesting that these putative proteins represent CrpP homologues and that they probably confer decreased susceptibility to ciprofloxacin by the same mechanism as that of the pUM505 CrpP. The CrpP proteins are more conserved in the N-terminal region, displaying 4.0%-65.7% identity with the first 35 aa of CrpP from pUM505, with the exception of the CrpP protein from X2918, which exhibited 17.6% identity. However, the C-terminal region of the CrpP proteins displayed a low identity (5.7%-10.5%) with the last 30 aa of CrpP from pUM505, suggesting that the N-terminal region could possess residues important for their function. In addition, it was found that all of the putative CrpP homologues possessed the Gly residue at position 7, which has been previously suggested to be involved in protein function.⁶ Residue Ile at position 27 of CrpP from pUM505, which was also

suggested to be important for ATP binding,⁸ was conserved in three of five of the CrpP homologues (X2982, X1235 and X5816); the CrpP protein from X2424 showed a change to leucine at position 27, suggesting that the essential residue could be changed by mutation for a similar aa (Figure 1b). Additionally, the alignment shows that the residues Thr8, Asp9, Lys33, Gly34 and Cys40 are conserved in all the proteins, suggesting that these residues could have a role in CrpP activity. However, an extended analysis of the role of these residues in CrpP enzymatic function is required. To explore whether the CrpP proteins possess motifs that could be related to its function, a secondary-structure analysis was conducted. The results revealed that the pUM505 CrpP protein possesses a predicted secondary structure composed of three α helices (α 1 from residues 21–25, α 2 from residues 28–32 and α 3 from residues 46–63) (Figure 1c). This structure was not conserved in the CrpP homologues; however, proteins from transconjugants X2982, X2424 and X5816 exhibited a similar α 1 helix and part of the α 3 helix, whereas X2424, in addition to α 1 and α 3 helices, possessed the α 2 helix. These analyses suggest that CrpP homologues do not possess a conserved secondary structure; however, it could mean that conserved residues may play an important role in CrpP function.

Determination of CrpP protein homologue expression

With the purpose of determining whether *crpP* gene homologues from ESBL-producing isolates produce CrpP-type proteins, plasmids from *crpP*-positive transconjugants were transferred to the *E. coli* J53-3 strain and western blot assays were performed using a polyclonal antibody against pUM505 CrpP. The results showed only one band corresponding to the CrpP protein in the transconjugants tested (Figure 2). These results clearly indicate that the *crpP* genes are expressed in the clinical isolates and their products are recognized by the antibody against CrpP protein, suggesting similar conformation features among them.

Determination of CrpP protein homologue functionality

In order to demonstrate the functionality of CrpP homologues from the plasmids of ESBL-producing isolates, the *crpP* genes from the TT2424, TT2918 and TT2982 transconjugants were cloned into the pUCP20 vector and transferred to *E. coli* J53-3. The results showed that the three *crpP* genes were able to increase the MICs of ciprofloxacin in *E. coli* J53-3 (Table 2). Transformants with the *crpP* gene from TT2424 and TT2918 exhibited similar MICs to those conferred by pUM505 *crpP*, whereas *crpP* transformants from TT2982 increased the MIC 2-fold with respect to the pUM505 *crpP* gene (Table 2). Furthermore, as previously described, the transconjugants that encode the CrpP-homologous proteins showed resistance to ciprofloxacin (Table S2), suggesting that the plasmids contained in these strains, in addition to possessing *crpP*, contain other genes that encode additional quinolone-resistance mechanisms. These results indicate that plasmid-borne *crpP* genes are spread among clinical isolates and suggest that they could participate in decreasing susceptibility to ciprofloxacin, most likely through the phosphorylation of the antibiotic, a mechanism described for the CrpP protein of the pUM505 plasmid, together with other mechanisms of plasmid-encoded resistance.

Discussion

Quinolones have been extensively used to treat a large number of bacterial infections and ciprofloxacin is the most active antibiotic of this group, utilized to treat infections generated by *P. aeruginosa*.^{1,17} However, it is known that quinolone resistance in infecting microorganisms can be associated with therapeutic failure.¹⁸ In addition to the quinolone resistance mediated by chromosomal gene mutations (*gyrA*, *parC*), resistance can be attributed to plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes such as *qnr*, *qepA*, *oqxAB*, *aac(6)-Ib-cr* and *crpP*.^{6–8} Several studies have been conducted to identify the presence of PMQR genes, as well as *qnr* and *aac(6)-Ib-cr*, in enterobacterial isolates from humans, animals and food, and the results showed that the average prevalences of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6)-Ib-cr* in a compiled database were 1.5%, 4.6%, 2.4% and 10.8%, respectively.^{19–22}

The *crpP* gene, obtained from the pUM505 plasmid isolated from a *P. aeruginosa* clinical isolate, was identified in 1986 and fully sequenced in 2011.^{23,24} Recently, our group reported that the *crpP* gene encodes a novel mechanism that decreases susceptibility to ciprofloxacin by means of the enzymatic phosphorylation of the antibiotic,⁸ however, there are no studies describing the presence of this gene in clinical isolates. To investigate whether this gene could be spreading in other groups of Gram-negative bacteria, a collection of ESBL-producing enterobacterial clinical isolates and transconjugants containing plasmids encoding ESBL genes was analysed. *crpP* gene homologues were identified in these isolates with a frequency of 5.19%, indicating that this gene is moderately spread in bacteria causing infections in hospitals. In general, the prevalence of the *crpP* gene was higher among *E. coli* isolates (75%), followed by those of *K. pneumoniae* (25%). Comparing the prevalence of other PMQR elements reported in previous studies⁹ with those found in the clinical isolates studied here, we found the *crpP* gene at a lower frequency than the *qnr* (21%) and *aac(6)-Ib-cr* (43%) genes. The reduced susceptibility to ciprofloxacin of these *crpP*-positive isolates suggests that the *crpP* gene could play a role in susceptibility to this antibiotic.

Because quinolone resistance usually resides on plasmids, with the purpose of determining whether *crpP* gene homologues could be located on mobile elements, we also analysed a collection of 68 transconjugants with plasmid-borne ESBL genes obtained from clinical isolates from hospitals in Mexico. The results showed that 7.35% of the transconjugants possess a *crpP* gene, indicating that the *crpP* gene is moderately spread in plasmids from clinical isolates, and suggest that this gene could be mobilized by horizontal gene transfer and contribute to the prevalence of clinical bacteria with decreased susceptibility to ciprofloxacin.

crpP homologues displayed a putative AlgU (σ^F)-type conserved promoter, suggesting similar regulation. AlgU is the *P. aeruginosa* orthologue of *E. coli* and *Salmonella* σ^F , an alternative sigma factor that directs the transcription of genes in response to extreme stress conditions;²⁵ however, more analysis of their effect on *crpP* genes is required. In general, *crpP* genes encode small proteins, similar in size to CrpP from pUM505, and are more conserved in the N-terminal region than in the C-terminal region, with low aa sequence identity to CrpP of pUM505. This suggests that CrpP-type proteins could be a group of proteins not conserved in primary structure but possessing the same function. It has been reported that the aminoglycoside O-phosphotransferases (APH), a family of

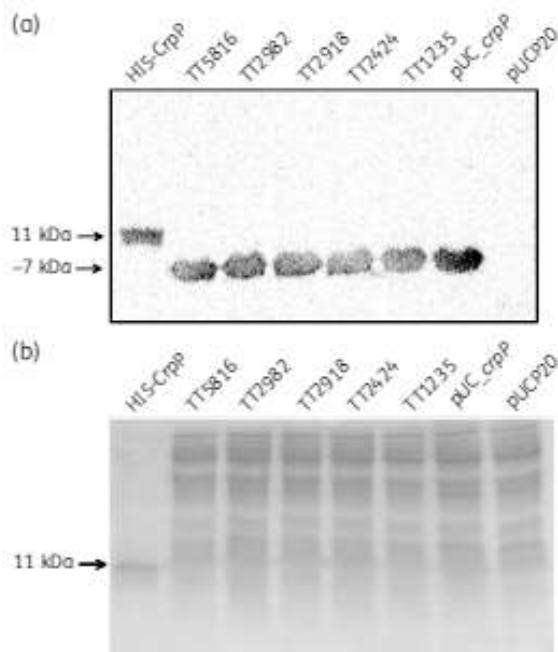


Figure 2. Expression of CrpP protein homologues from transconjugant ESBL-producing isolates. (a) Autoradiography of the expression of CrpP-homologous proteins from transconjugants of *E. coli* J53-3 with plasmids encoding ESBLs. An antibody against CrpP was utilized for the western blot analysis. Total protein (250 µg) from extracts of cultures of the indicated transconjugants and 0.05 µg of His-CrpP purified protein and *E. coli* J53-3 (pUC_crpP) were used. The J53-3 (pUCP20) strain was included as a negative control. (b) Ponceau red staining of the western blot membrane for CrpP protein detection. Data are reported as representative results from two independent experiments.

Table 2. Ciprofloxacin susceptibility tests

<i>E. coli</i> strain	Ciprofloxacin MIC (mg/L)
ATCC 25922	0.004
J53-3	0.004
J53-3 (pUC_crpP)	0.06
J53-3 (pUC_crpP2424)	0.06
J53-3 (pUC_crpP2918)	0.06
J53-3 (pUC_crpP2982)	0.125

CLSI MIC breakpoints for ciprofloxacin are ≤ 1.0 mg/L (susceptible), 2.0 mg/L (intermediate) and ≥ 4.0 mg/L (resistant).

while variability in the protein sequence may promote the recognition of specific substrates. A deeper study of the participation of the residues conserved among the CrpP proteins could help us understand their role in ciprofloxacin susceptibility.

Expression of CrpP in the transconjugants tested suggests that these proteins could participate in conferring ciprofloxacin resistance. Moreover, transfer of *crpP* homologues from the plasmids of transconjugants conferred on *E. coli* J53-3 a decrease in

susceptibility to ciprofloxacin, indicating that the *crpP* genes encode a functional protein that confers decreased susceptibility to the antibiotic, probably by the mechanism of phosphorylation of ciprofloxacin, similar to that employed by the CrpP protein from pUM505.⁸ Additionally, the ability of the CrpP-homologous protein from TT2918, which showed the lowest identity (10.1%) with CrpP of pUM505, to confer decreased susceptibility to ciprofloxacin in *E. coli* strengthens the idea that conserved residues could be important in the function of CrpP proteins instead of a similar secondary structure. CrpP proteins decrease susceptibility to ciprofloxacin, increasing MIC values with respect to *E. coli* J53-3; however, these changes are not enough to be considered as resistance according to the breakpoint value (≥ 4 mg/L) reported for this interpretation by the CLSI. Nevertheless, *crpP* is not the first gene described that encodes a mechanism that confers a low level of resistance to ciprofloxacin, in that it has been reported that PMQR genes can confer low-level resistance while facilitating the selection of mutants with a higher level of quinolone resistance.²⁷

Additionally, the transconjugants that encode the CrpP-homologous proteins showed resistance to ciprofloxacin, suggesting that the plasmids contained in these strains contain other genes (in addition to *crpP*) that encode additional quinolone resistance mechanisms, which together could be responsible for the resistant phenotype observed.

In conclusion, our results showed that *crpP* homologues are found in plasmids of enterobacterial isolates of nosocomial origin and suggest that the *crpP* genes may be transferred among hospital bacteria owing to their location within genetic mobile elements, probably co-selected by antibiotic exposure.

Funding

The present work was partially supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Conacyt, No. 167071, 256927, 256988 and 181747), and Coordinación de la Investigación Científica (IUMSNH; 2.6, 2.35). V. M. C.-J. and K. C. H.-R. were recipients of fellowships from Conacyt.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 and S2 and Figures S1 and S2 are available as Supplementary data at JAC Online.

References

- Swiatlo E, Moore E, Watt J et al. *In vitro* activity of four fluoroquinolones against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* determined by the E test. *Int J Antimicrob Agents* 2000; **15**: 73–6.
- Hedgrave L, Sutton SB, Webber MA et al. Fluoroquinolone resistance: mechanism, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014; **22**: 438–45.
- Rossolini GM, Ariena F, Pecile P et al. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 2014; **18**: 56–60.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *PT* 2015; **40**: 277–83.

- 5 Carattini A. Rasmiids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**: 298–304.
- 6 Aldred KJ, Kems RI, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014; **53**: 1565–74.
- 7 Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside-acetyltransferase. *Nat Med* 2006; **12**: 83–8.
- 8 Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Ramo-Rodríguez P et al. CnpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: e02629–17.
- 9 Silva-Sánchez J, Barrios H, Reyna-Flores F et al. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico. *Microb Drug Resist* 2011; **17**: 497–505.
- 10 Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; **33**: 103–19.
- 11 Garza-Ramos U, Barrios H, Hernández-Vargas MJ et al. Transfer of quinolone resistance gene *qnrA1* to *Escherichia coli* through a 50 kb conjugative plasmid resulting from the splitting of a 300 kb plasmid. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1627–34.
- 12 Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- 13 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighteenth Informational Supplement M100–S18*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 14 Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- 15 Meser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; **12**: 10–36.
- 16 West SE, Schweizer HP, Hricova R et al. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 1994; **148**: 81–6.
- 17 Nabeem A, Badshah SL, Muska M et al. The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules* 2016; **21**: 268.
- 18 Ruiz J, Gómez J, Navia MM et al. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; **42**: 257–61.
- 19 Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC et al. Rasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 664–89.
- 20 Frassin I, Cavallaro A, Bergo C et al. Prevalence of aac(6)-Ib-cr plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae in Italy. *Gut Pathog* 2011; **3**: 12.
- 21 Pattansing S, Kradaman MEM, Ras JMC et al. Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital: reveals the presence of an *Escherichia coli* ST131 clone with a specific mutation in *parE*. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 40–5.
- 22 Wasyl D, Hozowski A, Zajac M. Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in *Salmonella* spp. *Vet Microbiol* 2014; **171**: 307–14.
- 23 Cervantes-Vega C, Chavez J, Cprbva NA et al. Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 1986; **48**: 159–63.
- 24 Ramirez-Diaz MI, Diaz-Margaña A, Meza-Carmen V et al. Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal genes. *Plasmid* 2011; **66**: 7–18.
- 25 Firoved AM, Baucher JC, Devetic V. Global genomic analysis of σ_{70} (σ^{70})-dependent promoters (*sigmatan*) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes in cystic fibrosis. *J Bacteriol* 2002; **184**: 1057–64.
- 26 Smith AC, Baker NE. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; **2**: 143–60.
- 27 Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015; **1354**: 12–31.

Identification of Essential Residues for Ciprofloxacin Resistance of Ciprofloxacin-Modifying Enzyme (CrpP) of pUM505

Víctor M. Chávez-Jacobo, Juan Pablo García Merinos, Yliana López, Víctor Meza-Carmen and Martha I. Ramírez-Díaz*

Abstract

The ciprofloxacin-resistance *crpP* gene, encoded by the pUM505 plasmid, isolated from a *P. aeruginosa* clinical isolate, confers an enzymatic mechanism of antibiotic phosphorylation, which is ATP-dependent, that decreases ciprofloxacin susceptibility. Homologous *crpP* genes are distributed across extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing isolates obtained from Mexican hospitals and which confer decreased susceptibility to CIP. The analysis of sequences of the CrpP of proteins showed that the residues Gly7, Thr8, Asp9, Lys33 and Gly34 (located at the N-terminal region) and Cys40 (located at the C-terminal region) are conserved in all proteins, suggesting that these residues could be essential for CrpP function. The aim of this study was to investigate the amino acids essential to ciprofloxacin resistance, which is conferred by the CrpP protein of pUM505 plasmid. Mutations in the codons encoding Gly7, Asp9, Lys33 and Cys40 of CrpP protein from pUM505 were generated by PCR fusion. The results showed that all mutations generated in CrpP proteins increased ciprofloxacin susceptibility in *Escherichia coli*. In addition, the CrpP modified proteins were purified and their enzymatic activity on ciprofloxacin was assayed, showing that these modified proteins do not exert catalytic activity on ciprofloxacin. Moreover, by infrared assays it was determined that the modified proteins were not able to modify the ciprofloxacin molecule. Our findings are the first report that indicate that the amino acids, namely Gly7, Asp9, Lys33 and Cys40, which are conserved in the CrpP proteins, possess an essential role for the enzymatic mechanism that confers ciprofloxacin resistance.

INTRODUCTION

Quinolones are synthetic antibiotics that constitute an important class of biologically active, broad-spectrum antibacterial drugs. Ciprofloxacin (CIP) [1], an antibiotic of the fluoroquinolone family, is the most active quinolone against *Pseudomonas aeruginosa*. CIP is used to treat several Gram-negative and Gram-positive bacterial infections, and is the most commonly prescribed antibacterial agent until date [2]. The pharmacological characteristics of CIP as well as its potency, activity spectrum, oral bioavailability, and good safety profile allow extensive clinical utilization of this antibiotic worldwide [3]. The mechanism of action of quinolone antibiotics involves inhibition of two enzymes essential for DNA replication: DNA gyrase and topoisomerase IV (Topo IV). These proteins generate double-stranded breaks in the bacterial chromosome and enable one double-stranded DNA molecule to pass through the other, which is followed by re-ligation of the original strand; thus, they modulate the

topological state of DNA [1]. The quinolones stabilize the cleavage complexes by binding the enzyme–DNA interface in the cleavage–ligation active site, resulting in the inhibition of DNA ligation [1]. Most serious infections caused by Gram-negative bacteria occur in clinical settings and are commonly caused by Enterobacteria (mostly *Klebsiella pneumoniae*), *Acinetobacter*, and *P. aeruginosa* [4, 5]. Emergence and dissemination of resistant bacteria has been directly related to inappropriate antibiotic consumption [5]. Resistance to quinolones can involve chromosomal gene mutations or may be plasmid-mediated and may be conferred in three ways: i) by reducing quinolone accumulation through altered expression of efflux pumps or porin channels; ii) by altering or protecting antibiotic targets involving mutations in genes encoding target enzymes, and iii) by enzymatic antibiotic modification [6–8]. Chromosomal mutations in the *gyrA* and *ParC* genes, encoding gyrase and topoisomerase IV subunits, respectively, are associated with high-level fluoroquinolone

Received 09 October 2019; Accepted 09 January 2020; Published 28 January 2020

Author affiliations: *Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

*Correspondence: Martha I. Ramírez-Díaz, marthaisela_ramirez@hotmail.com

Keywords: CrpP; ciprofloxacin resistance; essential residues; *Pseudomonas aeruginosa*.

Abbreviations: CIP, Ciprofloxacin; *crpP*, ciprofloxacin resistance protein plasmid encoded; LDH, Lactate dehydrogenase; PK, Pyruvate kinase.

Two supplementary figures are available with the online version of this article.

resistance in the clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* [9].

The CrpP enzyme, encoded by the pUM505 plasmid, isolated from a *P. aeruginosa* clinical isolate, confers decreased susceptibility to CIP when transferred to the *E. coli* J53-3 strain [8]. CrpP exerts ATP-dependent phosphotransferase activity on CIP, and it is suggested that the antibiotic is degraded on phosphorylation of CIP [8]. Homologous *crpP* genes are distributed across extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing isolates obtained from Mexican hospitals and confer decreased susceptibility to CIP when transferred to the *E. coli* J53-3 strain as well as *crpP* gene from pUM505. All CrpP homologous proteins identified from clinical isolates correspond to small proteins (63–70 amino acids) with an identity of 10.1–43.7% with respect to the pUM505 CrpP sequence [10]. In general, CrpP homologous proteins are more conserved in the N-terminal region, showing 40–65.7% identity with respect to the CrpP of pUM505. However, the C-terminal region displayed low identity (5.7–10.5%) with the last 30 amino acids of CrpP, suggesting that the N-terminal region could consist of some residues important for CrpP enzymatic activity [10]. In addition, alignment of CrpP homologues and CrpP protein of pUM505 showed that some residues are conserved in all proteins, such as Gly7, Thr8, Asp9, Lys33 and Gly34 (located at the N-terminal region) and Cys40 (located at the C-terminal region), suggesting that these residues could be essential for CrpP function. The aim of this study was to identify the residues involved in the enzymatic activity of CrpP, which confers CIP resistance. In this study, we discuss conserved residues that are essential for CrpP function.

METHODS

Bacterial strains and culture media

E. coli JM101 [11] strain was used as the recipient strain for recombinant plasmids [10]. *E. coli* BL21 (pTrcHisC_{crpP}) strain was used as the DNA donor of *crpP* gene as well as a positive control in susceptibility testing and to obtain His-CrpP wild-type (wt) purified protein for enzymatic and infrared assays [8]. *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP strain (Stratagene, San Diego, USA) was used as a recipient for recombinant plasmids and protein overexpression. The following culture media were used: nutrient broth (NB) (Bioxon) and Luria–Bertani broth (LB) [1% NaCl (J.T. Baker), 1% peptone of casein (Bioxon) and 0.05% of yeast extract (Bioxon) per one liter of H₂O distilled] (solid media, 1.5% agar) [12]. If necessary, ampicillin (100 µg ml⁻¹) was also added.

Genetic techniques and sequence analysis of mutants

Molecular genetics procedures were carried out by following standard methods [12]. Cloning processes and the mutations generated were verified by DNA sequencing conducted by Elim Biopharmaceuticals, Inc. (Hayward, CA, USA). The sequences of mutant *crpP* genes were analysed by the BioEdit

Table 1. Primers used in this study

Mutation	Primer	Sequence (5'-3')
	OD1	GACAGCTTATCATCGACTGCACGGTGCACC
	OR1	GATGTAACCCACTGCTGCAAGCAACTGATC
G7A	FwrG7A	CGGACCGCTACCGACAAGCTGGACAGACGA
	RevG7A	GTCCGTAGCGCTGGCTTTCTTTGACACAGG
D9A	FwrD9A	ACCGGTACCCGCAAGCTGGACAGACGACAC
	RevD9A	GTCCAGCTTGGCGCTACCGCTGGCTTTCTT
I26A	FwrI26A	CGGCGTGGCTGGCTGAGGCCGGCCGCGAA
	RevI26A	AGCAOCCAGCAGCCGCTAGAGTCCGGTGGGG
K33A	FwrK33A	GCCCGCCGGCCAGGGCTACGGGTGTTCGAC
	RevK33A	CCGTAGCCCGCTCCCGCCGGCCCTCAGCACC
C40A	FwrC40A	GTGTTCCGACCCCGCTACAGTCATCCTGGC
	RevC40A	ACTGTAGGGCGCTGGAAACACCCGTAGCCC

The site of mutation in the primer sequences is shown underlined.

Sequence Alignment Editor Software ver. 7.2.5.0 compared to the *crpP* wild-type gene sequence to determine that the mutation was generated.

Site-directed mutagenesis of *crpP* gene

The amino acids Gly7, Asp9, Ile26, Lys33 and Cys40 of the CrpP protein of pUM505 were changed to alanine by site-directed mutagenesis of the *crpP* gene, by fusion PCR. For mutagenesis, we designed a pair of oligonucleotides that contains in their DNA sequences the respective nucleotide changes to modify the codon sequence for the amino acid changes (Table 1). For each mutation, three PCR fragments were amplified: (1) a PCR fragment was obtained using the oligonucleotide OD1 (forward) and a specific oligonucleotide for mutagenesis (reverse), (2) the second PCR fragment was obtained using a direct specific oligonucleotide for mutagenesis and the oligonucleotide OR1, and (3) a PCR fragment, containing the encoding region of the *crpP* gene, was obtained using the oligonucleotides OD1 and OR1, and the fragments 1 and 2 as template. Each amplified mutant gene was cloned into the pJET1.2/blunt vector, and the recombinant plasmids were transferred by electroporation into the *E. coli* JM101 strain; transformants were selected on LB agar plates containing ampicillin. To overexpress and purify modified CrpP proteins for further assays, *crpP* coding regions with different mutations were obtained by digestion with *Bam*HI and *Hind*III enzymes, and purified and subcloned into the corresponding restriction sites of pTrcHisC vector (Thermo Fisher Scientific). The recombinant pTrcHisC-*crpP* plasmids encode His-CrpP recombinant modified proteins, possessing a 6×-His tag at the N-terminus. The recombinant plasmids were transferred by electroporation into the *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP strain, and the transformants were selected on LB agar plates containing ampicillin.

Bacterial growth and susceptibility testing

Bacterial strains were routinely grown, by preparing 1:50 dilution of overnight cultures in tubes containing 4 ml of fresh medium. After incubating for 18 h at 37 °C with constant shaking, growth was recorded as the optical density at 590 nm (OD_{590}) by using a spectrophotometer (Spectronic 21, Milton Roy).

CIP susceptibility of wt and mutant strains was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) method using the broth microdilution assay in Mueller-Hinton broth, following CLSI recommendations. To induce the expression of *crpP* mutant genes, 0.5 mM IPTG was added to the medium at the beginning of the culture period. *E. coli* ATCC 25922 was used as the reference strain.

Growth kinetics

Overnight culture suspensions of *E. coli* BL21 carrying recombinant plasmids containing wt or mutant genes were diluted at a ratio of 1:50, in 250 ml of fresh LB medium, and subjected to three different types of treatments: 1) supplementation with 0.5 mM IPTG, 2) supplementation with CIP (0.2 mg ml⁻¹), and 3) supplementation with both IPTG and CIP. The compounds were added at the beginning of the growth period; the suspension was incubated at 37 °C with constant shaking, and growth was monitored by measuring OD_{590} using a spectrophotometer (Spectronic 21, Milton Roy) at 8 h time intervals.

Western blot analysis

Overnight culture suspensions of *E. coli* BL21 transformants carrying recombinant plasmids were grown in NB containing 0.5 mM IPTG and disrupted by sonic oscillation until a clear suspension was obtained; debris was removed by centrifugation at 15 000 r.p.m. in a Dynamica Velocity 14R centrifuge. Protein content of the samples was measured by Lowry method. Total proteins (100 µg) from the cell lysates were boiled at 95 °C in buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA) and separated by 14% SDS-PAGE. Then, the proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The membranes were blocked for a minimum of 1 h at room temperature in Tris-buffered saline-0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 5% non-fat dry milk, and then incubated with TBS-T containing anti-CrpP primary antibody at the dilutions indicated previously [10].

Overexpression and purification of modified CrpP proteins

Overnight culture suspensions of *E. coli* BL21 carrying recombinant plasmids containing the wt and mutant genes were diluted 1:50 in 250 ml of fresh LB and cultured at 37 °C with shaking, until an OD_{590} of 0.5 was reached. Overexpression of His-CrpP proteins was induced with 0.5 mM IPTG, and the cultures were incubated for additional 6 h. The cells were harvested by centrifugation, and the pellets were suspended in loading buffer containing 25 mM Tris

(hydroxymethyl) amino methane-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 0.35 mM β-mercaptoethanol, 12.5% glycerol, and 0.005% bromophenol blue, after which they were heated for 5 min at 95 °C. His-CrpP proteins overexpression was verified on 17% SDS-PAGE gel by using Tris-glycine buffer. Purification of His-CrpP wt and modified CrpP proteins was performed as described by Chávez-Jacobo *et al.* [8] which was verified by 17% SDS-PAGE. To conduct these cells were disrupted by sonication until the solution was clarified, and the debris was removed by centrifugation. The supernatant was loaded onto a nickel-nitrilotriacetic acid (NTA) resin (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and was packed into a column. His-CrpP proteins were recovered by elution with 200 mM imidazole. Eventually the His-CrpP proteins were obtained by elution from polyacrylamide gel according to Thermo Scientific Tech tip #51 with a few modifications according to the protocol described by Burgess [13]. To conduct this, the His-CrpP overexpressed proteins were separated by electrophoresis at 17% SDS-PAGE and once identified the band corresponding to the overexpressed proteins there were excised and placed in a microcentrifuge tube. The gel excised fragments were immersed in elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1 mM EDTA pH 7.5) and crushed using a clean pestle and incubated in a rotary shaker at 30 °C overnight. To collect the eluted proteins the samples were centrifuged at 10000 g for 10 min and supernatant were carefully transferred to a new clean tube. This procedure was repeated at least once. Finally, the supernatants were analysed by 17% SDS-PAGE.

Phosphorylation assays

Phosphorylation of CIP by CrpP proteins was studied by a coupled assay using pyruvate kinase/lactate dehydrogenase, as described by Chávez-Jacobo [8]. To conduct this we proceeded to incubate 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 and 2.0 mM of Cp with 10 µg ml⁻¹ of His-CrpP modifying proteins and 1 mM ATP in a total volume of 1 ml of mix of reaction [assay buffer (50 mM Tris pH 7.6, 40 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 mg ml⁻¹ NADH, 2.5 mM phosphoenolpyruvate) and 5 µl of pyruvate kinase/lactate dehydrogenase (600–1000 u ml⁻¹ of pyruvate kinase (PK), 900–1400 u ml⁻¹ of lactate dehydrogenase (LDH) (Sigma)] in a quartz cuvette (Fisher #14-385-914A). The mixtures were incubated at 37 °C for 15 min. The oxidation of NADH was determined by the absorbance at 340 nm with an Amersham Biosciences Ultrospec 4300 pro UV/visible Spectrophotometer (Amersham, UK). In this coupled assay system, the amount of ADP released is monitored at 340 nm by coupling it to the oxidation of NADH. In addition, it was determined the His-CrpP protein activity on CIP when ATP was used as the variable co-substrate, to conduct this we proceeded to incubate 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 and 2.0 mM of ATP with 10 µg ml⁻¹ of His-CrpP modifying proteins in a total volume of 1 ml of mix of reaction contained 1 mM of CIP. Data were graphed using a Nonlinear Regression, Michaelis-Menten model. Least squares method using GraphPad Prism version 5.01 for Windows. Six independent assays, with four replicates per experiment, were conducted.

Analytical methods

To determine whether CIP was modified by wt and modified CrpP, infrared spectroscopy was performed. CIP (5.0 mM) was incubated with or without 5.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ His-CrpP modified proteins for 1 h at 37 °C, in the presence of 2.0 mM Mg-ATP (Sigma), in buffer R [50 mM HEPES (pH 7.0), 40 mM KCl, 10 mM MgCl_2] in a total volume of 1 mL. Samples were vacuum-dried, and the infrared spectra were recorded using a Nicolet iS10 spectrophotometer (Thermo Scientific) by the attenuated total reflection (ATR) method.

RESULTS

Role of the conserved residues of CrpP proteins in CIP resistance

The CrpP homologous proteins identified from the clinical isolates as well as the CrpP protein of pUM505 contain some conserved residues such as Gly7, Thr8, Asp9, Lys33 and Gly34 (located at the N-terminal region) and Cys40 (located at the C-terminal region) [10], suggesting that these could be essential for the functioning of CrpP. For identifying the involvement of these residues in CIP susceptibility, site-specific mutations of nucleotides were generated to change the codon sequence of Gly7, Asp9, Lys33 and Cys40 to Ala in the pUM505 *crpP* gene by fusion PCR. Because the mutant genes were cloned in an inducible vector without their own promoter, with the aim to purify CrpP modified proteins for further assays, the *E. coli* BL21 strains possessing a *crpP* gene mutant were grown with or without IPTG and/or CIP. It was found that in absence of IPTG and presence of CIP, the growth of these strains was inhibited (Fig. S1, available in the online version of this article). As expected, the growth of *E. coli* BL21 (pTrcHis_{wt}-*crpP*_{wt}) (that possesses the *crpP* wt gene) increased by the addition of IPTG, indicating that the overexpression of His-CrpP_{wt} recombinant protein decreases the susceptibility to the antibiotic. However, the *E. coli* BL21 strains containing the *crpP* mutant gene were not able to increase their growth by IPTG addition (Fig. S1), suggesting the production of nonfunctional proteins.

To determine if the changes in the *crpP* gene affect protein expression, Western blotting was performed to detect His-CrpP modified proteins. A band was observed with anti-CrpP antibody in cases of the cell extracts of all mutants and *E. coli* BL21 (pTrcHisC-*crpP*_{wt}) (Fig. S2), indicating that CrpP proteins are produced in all strains, suggesting that the mutations affected the CrpP protein function. Once it was verified that the mutations in the *crpP* gene do not modify the production of these proteins, CIP susceptibility was evaluated by microdilution assay. The results showed that all changes in the CrpP protein decrease the MIC values (0.002 $\mu\text{g ml}^{-1}$) with respect to the MIC with CrpP_{wt} (0.125 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Table 1). In addition, the MIC values observed for the *E. coli* strains with mutated *crpP* gene were the same as those observed for *E. coli* BL21 (pTrcHisC) strain, which do not possess *crpP* gene (Table 2). These results indicate that the mutated residues in CrpP increase bacterial susceptibility to CIP and are related to CrpP function.

Table 2. Ciprofloxacin susceptibility tests of wide type and mutant strains

<i>E. coli</i> strain	Ciprofloxacin MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
ATCC 25922	0.004
BL21 (pTrcHisC)	0.002
BL21 (pTrcHisC- <i>crpP</i> _{wt})	0.125
BL21 (pTrcHisC- <i>crpP</i> _{G7A})	0.002
BL21 (pTrcHisC- <i>crpP</i> _{D9A})	0.002
BL21 (pTrcHisC- <i>crpP</i> _{L33A})	0.06
BL21 (pTrcHisC- <i>crpP</i> _{C40A})	0.002
BL21 (pTrcHisC- <i>crpP</i> _{G34A})	0.002

Because all changes to the CrpP protein occurred in the conserved residues, we evaluated the participation of Ile26 of CrpP protein, a semiconserved residue in the CrpP homologous proteins. The change in Ile26 to Ala was generated by PCR fusion. The results showed that this change does not modify protein production (because of the detection of the band corresponding to CrpP protein by Western blotting) (Fig. S2). Incubation of *E. coli* BL21 strain carrying the I26 mutation (*crpP*_{I26A}) in the presence of CIP and IPTG showed a slight increase in the extent of growth, compared to the growth observed without IPTG (Fig. S2). Although the MIC value for CIP (0.06 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was lower than the MIC value for CrpP_{wt} (0.125 $\mu\text{g ml}^{-1}$), it was higher than the MIC observed for *E. coli* BL21 (pTrcHisC) strain (0.002 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Table 1). This suggests that Ile26 is related to the functioning of CrpP, and a change in this residue could affect the level of resistance to the antibiotic, but is not essential to its role in CIP resistance.

Enzymatic activity of CrpP modified proteins

CrpP protein is capable of conferring resistance to CIP in *E. coli*, through an ATP-dependent mechanism that involves phosphorylation of the antibiotic [8]. As the results of MIC assay showed that the *crpP* mutations negatively affect CIP susceptibility of *E. coli* transformant strains, we next determined the *in vitro* activity of the purified CrpP modified enzymes. To purify these CrpP modified proteins, the coding region of each *crpP* mutant gene was cloned into an overexpression vector, and recombinant His-tagged CrpP modified proteins were isolated, as described previously [8].

To determine the effect of CrpP modified proteins on CIP, a coupled enzymatic assay involving NADH oxidation was used [8, 14]. As expected, the enzymatic activity of CrpP_{wt} increased proportionally with CIP concentration (Fig. 1a). In addition, we observed a reduced level of CrpP activity on CIP when CrpP_{G7A}, CrpP_{D9A}, and CrpP_{L33A} modified proteins were used, compared to the activity observed in case of CrpP_{wt}. No effect on CIP was observed when the His-CrpP_{C40A} modified protein was used (Fig. 1a). However, we did observe an effect on CIP when CrpP_{I26A} modified protein was used (Fig. 1a).

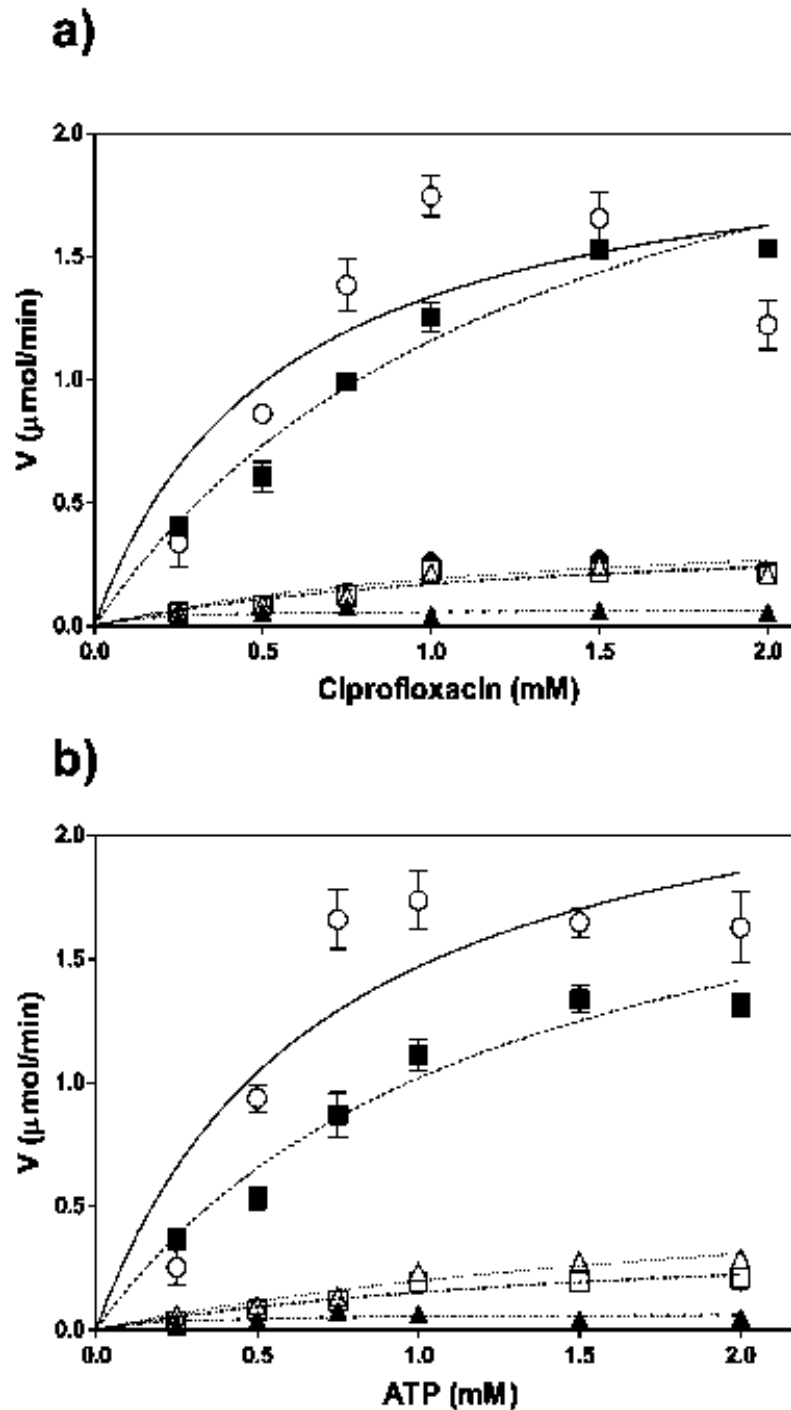


Fig. 1. Enzymatic activity of CrpP_w and modified CrpP proteins CIP (a) or ATP (b), at the indicated concentrations, were incubated with 5 μg ml⁻¹ His-CrpP_w (○), His-CrpP_{cw} (◼), His-CrpP_{fm} (○), His-CrpP_{ow} (◼), His-CrpP_{ow} (-) (△), and His-CrpP_{ow} (▲) proteins, at 37 °C for 15 min, as described in the Methods section. The Michaelis-Menten plot shows the NADH oxidation data, which was spectrophotometrically measured at 390 nm. Data represent the mean and standard error (se) values of four independent duplicate assays.

Table 3. Kinetic parameters of the wild-type and modified CrpP proteins

Protein	Ciprofloxacin			ATP		
	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Vmax/Km	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Vmax/Km
CrpP _{wt}	0.548±0.276	2.071±0.374	3.777	0.701±0.306	2.498±0.439	3.476
CrpP _{I7A}	1.319±0.625	0.442±0.109	0.335	1.871±0.704	0.437±0.097	0.234
CrpP _{D9A}	1.245±0.071	0.385±0.450	0.309	1.630±0.517	0.403±0.072	0.247
CrpP _{I26A}	1.383±0.281	2.760±0.281	1.995	1.265±0.319	2.305±0.299	1.822
CrpP _{K33A}	1.392±0.606	0.409±0.095	0.294	2.452±0.732	0.685±0.132	0.279
CrpP _{C40A}	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND, not determined.

These results are consistent with those obtained for MIC assay (Table 2), indicating that the increase in CIP susceptibility in these mutants can be attributed to the decrease in or the lack of CrpP activity on CIP, which suggests that these residues are important for the recognition and binding of the antibiotic.

In addition, to evaluate if the modified residues of CrpP are involved in the activity on ATP, we determined the enzymatic activity of the CrpP-modified proteins by using ATP as the variable co-substrate. When ATP was used CrpP_{G7A}, CrpP_{D9A}, CrpP_{K33A} and CrpP_{C40A} showed slow or null CrpP activity (Fig. 1b), indicating that their respective mutations affected the activity of CrpP on ATP. The His-CrpP_{I26A} protein showed a decrease in the activity on ATP compared to CrpP_{wt} activity; however, this enzymatic activity was higher compared to the rest of the modified CrpP proteins (Fig. 1b), thereby confirming that the I26 residue in CrpP protein can be altered without loss of activity.

The estimated apparent kinetic constants of CrpP proteins to CIP showed an increase, at the least twice that of the Km values of CrpP_{G7A}, CrpP_{D9A}, CrpP_{I26A} and CrpP_{K33A} versus the Km value of CrpP_{wt} (Table 3). The Vmax value of CrpP_{G7A}, CrpP_{D9A} and CrpP_{K33A} to CIP is around 4–5-times that of the Vmax value of CrpP_{wt}; whereas that of CrpP_{I26A} (2.760±0.281 $\mu\text{mol min}^{-1}$) was similar to the Vmax value of CrpP_{wt} (2.071±0.374 $\mu\text{mol min}^{-1}$) (Table 3). However, the Km and Vmax values of CrpP_{C40A} to CIP could not be determined because no effect was observed on CIP or ATP. The Vmax/Km ratio for CIP was ~10-fold lower in case of CrpP_{G7A} (0.335), CrpP_{D9A} (0.309), and CrpP_{K33A} (0.294) proteins compared to that in case of CrpP_{wt} (3.777); and the Vmax/Km ratio for CrpP_{I26A} was one-fold lower than CrpP_{wt} (1.995). The *in vitro* results showed that the conserved residues Gly7, Asp9, Lys33, and Cys40 of CrpP are essential for the enzymatic activity, whereas Ile26, although related to the functioning of CrpP, is not an essential residue.

Conserved residues of CrpP are important to CIP modification

To elucidate if the decrease in the enzymatic activity of the CrpP mutant proteins is related to the inability of these

enzymes to modify CIP, we proceeded to confirm the modification on the C2 of CIP molecule by infrared spectroscopy. First, CIP was incubated in presence of CrpP_{wt} protein, and as expected, a significant decrease was noted in the intense N-H and O-H stretching absorptions, in the 3366 and 3018 cm^{-1} regions, giving an evidence of the classical dimeric cleavage of carboxylic acid (Fig. 2a). In addition, the C=O stretching band previously noted at 1784 cm^{-1} was considerably less intense and appeared at a lower frequency (1781 cm^{-1}), confirming modification of the carboxylic function by CrpP_{wt} activity, whereas the characteristic strong C=O stretching absorption band at 1674 cm^{-1} corresponding to the conjugated ketone remained unmodified (Fig. 2a). In addition, the presence of absorption bands in the region from 1050 to 700 cm^{-1} provided information about P=O and P-O stretching vibrations, which were assigned as follows: For P-OH, 1042–908 cm^{-1} (strong); P-O-P, 1000–870 cm^{-1} (strong) and 721 cm^{-1} (weak); P-O-C (aliph), 1042–964 cm^{-1} (strong) and 836–761 cm^{-1} (strong) (Fig. 2a), indicating the phosphorylation of CIP by CrpP_{wt}. Phosphorus compounds are known to show absorption bands for P-O-H around 3000–2800 cm^{-1} and 2400–2200 cm^{-1} , for P=O(OH) (single OH), 2800–2700 cm^{-1} , 2400–2300 cm^{-1} , and 1750–1600 cm^{-1} broad band [15, 16]. At exception of mutation in I26, mutations in Gly7, Asp9, Lys33, and Cys40 in CrpP affect negatively the protein ability to modify the CIP molecule, since the infrared results showed that the -OH and C=O stretching bands remains in the same region at 3100–3000 cm^{-1} and 1784 cm^{-1} showing a similar pattern to the CIP without CrpP incubation, (Fig. 2b, d and e), confirming that these residues are essential to CrpP to modify the carboxylic group of CIP.

DISCUSSION

Quinolones have been extensively used to treat many bacterial infections, and CIP is the most active antibiotic of this group used to treat infections caused by *P. aeruginosa*. The *crpP* gene of the pUM505 plasmid isolated from a *P. aeruginosa* clinical isolate encodes a novel mechanism that decreases the susceptibility to CIP by enzymatic phosphorylation of the antibiotic [8]. Destruction or modification of the antibiotic

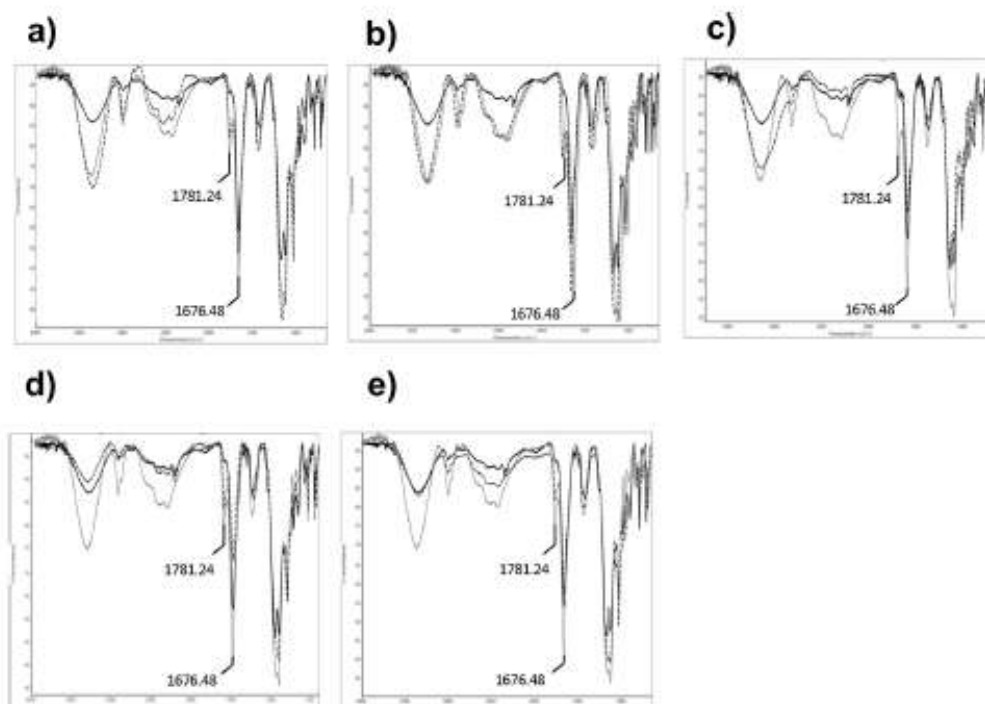


Fig. 2. Infrared spectroscopy of the CIP modification effected by CrpP_{wt} and modified CrpP proteins. Representative spectroscopy of CIP after its incubation without CrpP protein (gray) or with 5.0 µg ml⁻¹ His-CrpP_{wt} (black) or His-CrpP_{G7A} (a), His-CrpP_{A9A} (b), His-CrpP_{L33A} (c), His-CrpP_{G34A} (d), and His-CrpP_{G34A} (e) proteins (dotted) in a reaction mixture containing 2.0 mM Mg-ATP, as described in Methods.

structure is one of the most common resistance-conferring mechanisms involving the action of enzymes [17]. One of the best examples of resistance via modification of antibiotics is the covalent modification of the hydroxyl or amino groups of the aminoglycoside molecule by the aminoglycoside-modifying enzymes [18]. The *crpP* gene was identified in the clinical isolates (and their plasmids) obtained from the hospitals in Mexico, at a frequency of 5.19 and 7.35%, respectively, indicating that this gene is moderately spread across bacteria causing infections in hospitals, compared to the *qnr* (21%) or *aac(6)-Ib-cr* (43%) genes, which suggested that this gene could be mobilized by horizontal gene transfer and can contribute to the prevalence of clinical bacteria with decreased susceptibility to ciprofloxacin [10].

The CrpP proteins identified to date are small in size, being more conserved in the *N*-terminal region than in the *C*-terminal region, with a low identity in the amino acid sequence to CrpP of pUM505. The aminoglycoside O-Phosphotransferases (APH), a family of enzymes that confers resistance on aminoglycosides, share low sequence identity (20–40%) but do contain important conserved motifs, the *C*-terminal region being responsible for catalysis and aminoglycoside binding, whereas in the *N*-terminal region the ATP binding domain is mainly located [19]. The CrpP proteins also differ in their secondary structure, but several

residues are conserved in all of the CrpP homologues as well as Gly7, Thr8, Asp9, Lys33, Gly34 (located into the *N*-terminal region), and Cys40, suggesting that these residues could be important to protein function [10]. With the aim to determine the role of most of these conserved residues in the CrpP function, site-directed mutagenesis of the codons encoding these amino acids from the *crpP* gene was performed.

Change in nucleotides encoding Gly7, Asp9, and Lys33, to Ala in the *crpP* gene caused an increase in CIP susceptibility as observed in *E. coli* BL21 transformants, a phenotype in which the decrease in the enzymatic activity was related to the inability to modify the antibiotic by the modified CrpP proteins, compared to CrpP_{wt}. These data indicated that Gly7, Asp9, and Lys33 are essential for the functioning of CrpP, suggesting that these residues are critical for catalysis, because the replacement of this amino acid by Ala produces a pronounced increase (at the least, twice) in the Km value as well as a decrease (~four-times) in the Vmax value. We also determined the effect of these mutations on the co-substrate ATP; similar results were obtained, showing a decrease in the enzymatic activity, which strengthened the hypothesis that Gly7, Asp9, and Lys33 are critical for catalysis. The Gly residue is unique among these amino acids in that all side chains are hydrogen atoms; therefore, it has been suggested to play a special role in enzyme structure and function by

providing flexibility for enzyme active sites [20]. Moreover, it is well known that Gly to Ala mutations tend to increase protein stability [21]. Mutation of Cys40 by the Ala residue in CrpP increases the extent of CIP susceptibility in *E. coli* BL21, similar to what was observed because of the mutations in Gly7, Asp9, and Lys33. However, this mutation eliminated the enzymatic activity of the CrpP protein to both CIP and ATP. These data suggest that Cys40 is an essential residue with catalytic activity, thanks to CrpP. Cysteine residues have been described as important residues, both at catalytic sites as well as for regulatory aspects of enzymes, because of the unique chemistry of the sulfur-containing side chain that can be strongly influenced by the microenvironment of the surrounding protein [22]. Finally, change of Ile26 (a semiconserved residue in CrpP proteins) to Ala caused an increase in CIP susceptibility in *E. coli* BL21 and a slight decrease in the enzymatic activity of CrpP on CIP and ATP; these changes do not compare to the rest of mutated residues, suggesting that Ile26 is not essential for the functioning of CrpP, but is important to keep the correct enzymatic activity and not decrease the level of resistance to the antibiotic. It has been described that the mutations, which conserve important residue properties, are much more likely to preserve the structure and function of a protein, than those, which dramatically change these properties [23].

The results of infrared assays showed that the C=O stretching band appeared at a lower frequency (1781 cm^{-1}), confirming CrpP_{wt} activity-induced modification of the carboxylic function. Moreover, the absorption bands observed for CIP incubated in presence of CrpP_{wt} were found to be at the same frequency as known organophosphorus compounds [15, 16], suggesting that this could be the reason for the few bands that overlap with CIP. In addition, significant changes such as band intensity and the appearance of new bands in the region from $1000\text{ to }700\text{ cm}^{-1}$ provided evidence about CIP phosphorylation by CrpP_{wt}. Interestingly, CrpP proteins with mutations in Gly7, Asp9, Lys33, and Cys40 were not able to modify the CIP molecule, compared to CrpP_{wt}, while Ile26 could modify CIP as well as CrpP_{wt}, confirming that Gly7, Asp9, Lys33, and Cys40 residues are essential for CrpP activity.

To summarize, our results show that the conserved residues, namely, Gly7, Asp9, Lys33, and Cys40, in CrpP proteins are essential for the functioning of CrpP.

Funding information

This work was supported by grants from Coordinación de la Investigación Científica (UMSNH; 2.6 and 2.35). VMC-J was supported by post-graduate fellowships from CONACYT.

Acknowledgements

We thank JA. Patiño-Medina for the valuable technical support.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules* 2016;21:268.

2. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014;22:438–445.
3. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann NY Acad Sci* 2015;1354:12–31.
4. Rossolini CM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 2014;18:56–60.
5. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: Part 1: causes and threats. *P T: a peer-reviewed journal for formulary management* 2015;40:277–283.
6. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D et al. Fluoroquinolone-Modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2004;12:83–88.
7. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014;53:1565–1574.
8. Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Romo-Rodríguez P, Pérez-Gallardo RV, Campos-García J et al. CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e02629–17.
9. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:290–295.
10. Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H et al. Prevalence of the crpP gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:1253–1259.
11. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985;33:103–119.
12. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 4th ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2012.
13. Burgess RR. Elution of proteins from gels. *Methods in Enzymology*, Chapter 32. New York: Academic Press; 2009. p. 565.
14. Kramer JR, Matsumura I. Directed evolution of aminoglycoside phosphotransferase (3) type IIIa variants that inactivate amikacin but impose significant fitness costs. *PLoS One* 2013;8:e76687.
15. McIvor RA, Hubley CE. Infrared spectra of organo-phosphorus compounds: III. phosphoramidates, PHOSPHORAMIDOTHIONATES, and related compounds. *Can J Chem* 1959;37:869–876.
16. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric identification of organic compounds*, 95. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2005.
17. Egorov AM, Ulyashova MM, Rubtsova MY. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae* 2018;10:33–48.
18. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr* 2016;4.
19. Smith CA, Baker EN. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002;2:143–161.
20. Yan BX, Sun YQ. Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *J Biol Chem* 1997;272:3190–3194.
21. Serrano L, Neira JL, Sancho J, Fersht AR. Effect of alanine versus glycine in alpha-helices on protein stability. *Nature* 1992;356:453–455.
22. Cortese-Krott MM, Koning A, Kuhnle GGC, Nagy P, Bianco CL et al. The reactive species interactome: evolutionary emergence, biological significance, and opportunities for redox metabolomics and personalized medicine. *Antioxid Redox Signal* 2017;27:684–712.
23. Rudnicki WR, Mroczek T, Cudek P. Amino acid properties conserved in molecular evolution. *PLoS One* 2014;9:e98983.

Edited by: D. Grainger and S. P. Diggle

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(2): 116-123, 2018.
DOI: 10.22201/fez.23958723e.2018.2.5

EL SISTEMA DE EDICIÓN GENÉTICA CRISPR/CAS Y SU USO COMO ANTIMICROBIANO ESPECÍFICO

Victor M. Chávez-Jacobo

Laboratorio de Microbiología, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Gral. Francisco J.
Mújica s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México.
E-mail: victor_mch@hotmail.com

RESUMEN

El sistema CRISPR/Cas es parte de un sistema inmune adaptativo que los organismos procariontes desarrollaron para defenderse de la incorporación de material genético exógeno. Este sistema de inmunidad está mediado por una nucleasa específica que degrada al DNA invasor y posteriormente algunos fragmentos de la molécula degradada se almacenan para reconocer y eliminar secuencias similares en el futuro. Recientemente fue posible reprogramar este sistema para reconocer cualquier secuencia de DNA y realizar ediciones genéticas en una gran cantidad de organismos de manera altamente específica. El sistema CRISPR/Cas ha sido adaptado para el desarrollo de una estrategia altamente específica en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias resistentes a antimicrobianos. En esta revisión se describe de manera general el origen biológico del sistema CRISPR/Cas, el mecanismo de edición genética desarrollado con base en él, la aplicación del sistema en el desarrollo de un método específico para tratar infecciones bacterianas y finalmente se discutirán algunas limitaciones del sistema.

Palabras Clave: manipulación genética, nucleasa, resistencia a antimicrobianos, sistema CRISPR/Cas, sistema inmune adaptativo.

The genetic edition system CRISPR/Cas and its use as specific antimicrobial

ABSTRACT

CRISPR/Cas system constitutes a prokaryotic adaptive immune system against the incorporation of exogenous genetic material. This immunity system is mediated by a specific nuclease that breaks invasive DNA and later some particles of the broken DNA are stored to recognize and eliminate similar sequences in the future. Recently, it was found that the system could be reprogrammed to recognize any DNA sequence and it was possible to introduce highly specific genetic editions in a huge number of organisms. Furthermore, CRISPR/Cas system has been adapted for the development of a highly specific strategy in the treatment of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. In this review it was described in a general manner the biological origin of CRISPR/Cas system, the mechanism of genetic edition based on it, the employ of the system in the development of a specific treatment method for bacterial infections, and finally some limitations of the system were discussed.

Key Words: genetic manipulations, nuclease, antimicrobial resistance, CRISPR/Cas system, adaptive immune system.

INTRODUCCIÓN

El sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), así como su proteína asociada Cas (CRISPR associated) se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo microbiano, de hecho, están presentes en el 40% de las especies bacterianas y en el 90% de las arqueas reportadas (Mojica *et al.*, 2000). La importancia biológica de este sistema radica en que se constituye como un sistema inmune adaptativo microbiano que responde a elementos de DNA invasores, como pueden ser plásmidos o virus. Recientemente se logró adaptar este sistema como una herramienta para la edición genética y su uso se está extendiendo rápidamente debido a su simplicidad y gran precisión (Doudna & Charpentier, 2014).

Desde el descubrimiento de la doble hélice del DNA por James Watson y Francis Crick en 1953, los investigadores han contemplado la posibilidad de realizar modificaciones sitio específicas en esta molécula, primero con la intención de investigar la función de cada gen y posteriormente con el propósito de revertir o prevenir enfermedades producidas por mutaciones puntuales en el genoma, como la distrofia muscular o la fibrosis quística. Sin embargo, introducir mutaciones sitio específicas en el genoma de células y organismos ha sido una tarea sumamente complicada. Las estrategias más exitosas se basan en el empleo de las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN's) que utilizan los principios de reconocimiento del DNA-proteína para introducir cortes específicos en la molécula de DNA (Kim & Kim, 2014). No obstante, dificultades con el diseño y síntesis de las proteínas específicas necesarias para que ambos sistemas puedan funcionar han supuesto barreras infranqueables en la adopción generalizada de estos dos métodos de edición genética.

Actualmente, el sistema CRISPR/Cas ha sido empleado para generar diversas mutaciones tanto en células de mamíferos y de plantas, así como de microorganismos, con la finalidad de realizar estudios genéticos (Charpentier & Marraffini, 2014), demostrando ser una herramienta de edición genética más eficiente que sus predecesores (los sistemas ZFN y TALEN's).

ORIGEN DEL SISTEMA CRISPR/CAS

El sistema CRISPR/Cas fue descrito por primera vez como una serie de secuencias directas repetidas cortas, e inter-espaciadas por secuencias cortas en el genoma de la bacteria *Escherichia coli* (Ishino *et al.*, 1987). Debido a que las secuencias espaciadoras son altamente diversas inclusive entre cepas estrechamente relacionadas, inicialmente se utilizaron con motivos de tipificación, es decir, para diferenciar distintos aislados, cepas y especies bacterianas (Groenen *et al.*, 1993). Posteriormente, se encontró que el elemento asociado Cas contiene dos dominios clave para su actividad, un dominio de nucleasa (RuvC) y otro de helicasa (HNH) de los cuales se hablará más adelante (Jansen *et al.*, 2002). Una observación clave para descifrar la función

biológica del sistema CRISPR/Cas fue realizada por diversos grupos de investigación, lo cuales reportaron que muchas secuencias espaciadoras eran similares a elementos de DNA exógeno, como plásmidos y virus y por lo tanto podrían ser derivados de los mismos (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005).

Se propuso que el sistema CRISPR/Cas actúa como un sistema inmune adaptativo, que emplea el RNA antisentido codificado por las secuencias espaciadoras como guía para que la nucleasa Cas reconozca como blanco a las moléculas de DNA exógeno y lo desactive mediante la introducción de cortes específicos (Makarova *et al.*, 2006). Posteriormente, se describió que en *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis* los RNA codificados en el locus del sistema CRISPR (crRNA) forman un complejo con la proteína Cas y que dicho complejo es capaz de interferir con la proliferación de fagos (Brouns *et al.*, 2008; Marraffini & Sontheimer, 2008). Adicionalmente, se estableció que el sistema CRISPR/Cas de *Streptococcus thermophilus* opera como un sistema inmune adaptativo de defensa contra la invasión de fagos líticos (Barrangou *et al.*, 2007).

Actualmente, el sistema CRISPR/Cas ha cobrado una gran relevancia en diversos campos de investigación, como la medicina y la biotecnología, ya que gracias a la capacidad del sistema para introducir cortes específicos en la molécula de DNA ha sido posible adaptarlo como una poderosa herramienta para la edición genética. A continuación se describen los componentes del sistema y su mecanismo de acción como determinante en la inmunidad bacteriana y como herramienta para la manipulación genética.

COMPONENTES Y MECANISMO DEL SISTEMA CRISPR/CAS

Hasta la fecha se han identificado seis tipos distintos de sistemas CRISPR/Cas (I-VI) basados en el mecanismo molecular que emplean para el reconocimiento del DNA y la forma en que se unen al mismo (Makarova *et al.*, 2011). Sin embargo, aquí nos enfocaremos únicamente en describir al sistema tipo II, debido a que es el más utilizado para realizar ediciones genéticas (Jiang & Marraffini, 2015).

El locus donde se encuentran codificados los elementos del sistema CRISPR/Cas consta de una región promotora, que se encarga de modular la transcripción de todos los elementos. Posteriormente se encuentra la región CRISPR, que se compone de los elementos repetidos y de los espaciadores, estos últimos codifican moléculas de RNA cortas (30-40 pares de bases) a las cuales se les denomina RNA CRISPR (crRNA) y son las encargadas de guiar a la proteína Cas a su sitio blanco. Finalmente se encuentran los genes que codifican a las proteínas Cas (Figura 1) (Jiang *et al.*, 2013).

El mecanismo mediante el cual el sistema CRISPR/Cas codifica un sistema inmune adaptativo preciso contra elementos de

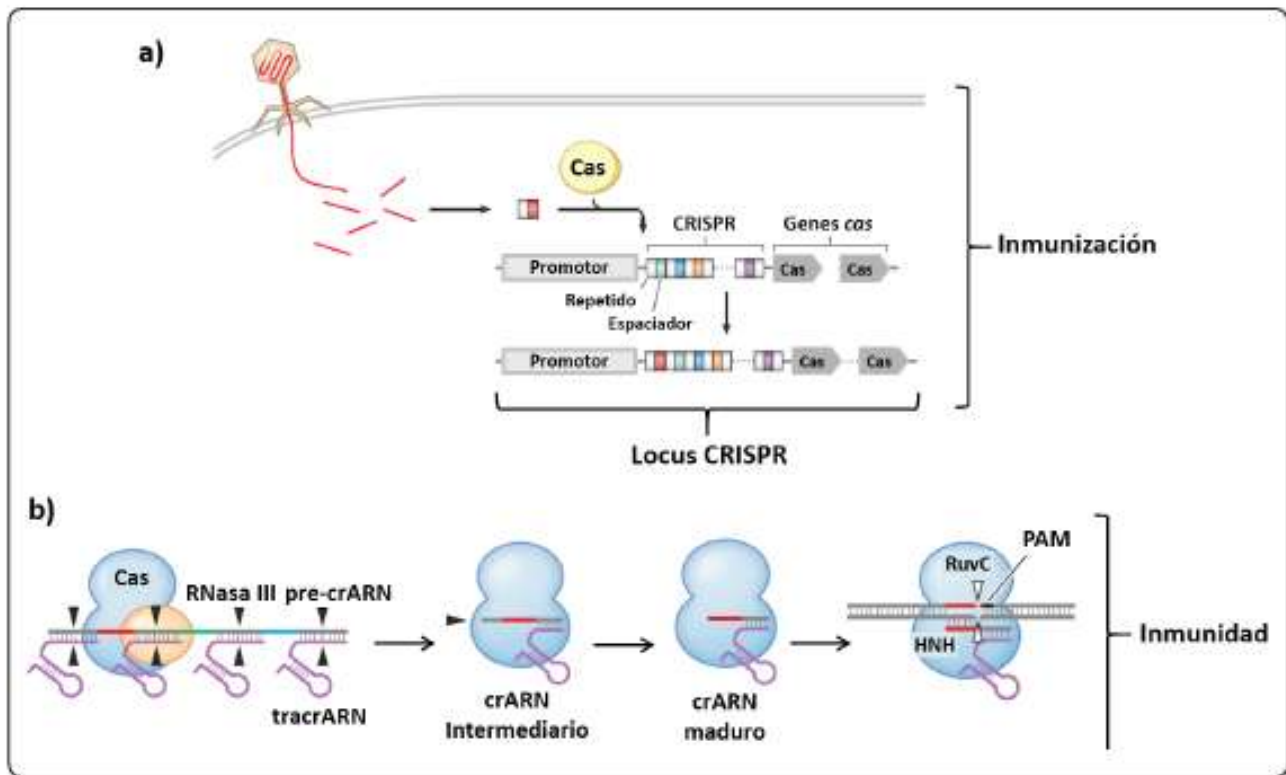


Figura 1. Fases del sistema inmune adaptativo bacteriano CRISPR/Cas. (a) Fase de inmunización. Fragmentos de material genético exógeno adquirido a través de virus o plásmidos es incorporado en el locus CRISPR, donde se utilizará posteriormente para proteger a la bacteria de una reinfección. (b) Fase de inmunidad. La secuencia espaciadora es transcrita desde la región promotora y el transcrito resultante, crRNA intermediario, es procesado en un crRNA maduro. El crRNA es utilizado para guiar a la nucleasa específica Cas, que cuenta con los dominios RuvC y HNH, hasta su sitio blanco. Las puntas de flechas, negras y blancas, indican los sitios de unión del RNA y del DNA respectivamente. Además se muestra el sitio PAM, necesario para el reconocimiento del sitio blanco. Modificado de Jiang & Marraffini, 2015. Ver la versión a color en línea.

DNA invasores consta de dos fases: I) Fase de inmunización: después de la incorporación del DNA exógeno proveniente de virus o de plásmidos, el elemento Cas reconoce a la molécula extraña e integra un fragmento en el locus CRISPR donde se convertirá en un nuevo elemento espaciador (Figura 1) (Horvath & Barrangou, 2010). II) Fase de inmunidad: el elemento espaciador incorporado se transcribe como un crRNA, que posteriormente sirve de guía para que la proteína Cas alcance su blanco, que es el elemento genético invasor (Figura 1) (Horvath & Barrangou, 2010). Los dominios conservados de la proteína Cas son cruciales para su actividad, el dominio de helicasa (HNH) se encarga de abrir la doble hebra del DNA, y el dominio de nucleasa (RuvC) le confiere la capacidad para cortar el DNA en la región definida por los crRNA (Sapranuskas *et al.*, 2011).

Para el proceso de inmunidad es necesario un sitio adicional de reconocimiento compuesto por una secuencia corta de DNA (de 3 a 5 pares de bases, que se encuentra inmediatamente río arriba de la secuencia blanco y que reconocen tanto a los crRNA como a la proteína Cas (Sashital *et al.*, 2012). Este sitio

se conoce como motivo adyacente al protoespaciador (PAM) y se cree que es necesario para evitar la autoinmunidad, ya que sin este elemento de reconocimiento adicional, los crRNA reconocerían su propio gen codificante y la nucleasa podría introducir cortes en su propio genoma (Wang *et al.*, 2015A). Además, las secuencias del elemento PAM difieren entre cada organismo, por ejemplo, en *Streptococcus pyogenes* SF370 la secuencia es NGG (Mojica *et al.*, 2009), por lo que estas secuencias se empleaban para la tipificación bacteriana.

Como se ha descrito, el mecanismo por el que el sistema CRISPR/Cas confiere inmunidad parece bastante simple; sin embargo, para que los crRNAs estén listos para cumplir con su función es necesario un proceso previo de maduración, donde se forma una molécula híbrida (RNA-proteína) entre el crRNA y la proteína Cas. Primero se produce un pequeño crRNA que cuenta con una región complementaria a la secuencia repetida del locus CRISPR, que se denomina crRNA transcrito (tracrRNA). La proteína Cas se une al tracrRNA y este complejo se alinea con las secuencias repetidas que son precursoras de

los crRNA. Este RNA de doble hebra (dsRNA) va a ser cortado por la enzima RNasa III y se genera una nueva molécula que contiene a la proteína Cas cargada con los tracrRNA y el crRNA guía (Figura 1) (Jiang & Marraffini, 2015).

Los elementos del sistema CRISPR se expresan de manera constitutiva, por lo que siempre están listos para el momento en el que ocurra una infección. Cuando la célula entra en contacto con una molécula de DNA invasora, el complejo tracrRNA/crRNA/Cas escanea a la molécula exógena en busca de los elementos de reconocimiento. Una vez localizada una secuencia de unión, el elemento Cas corta a la molécula de DNA y de esta manera desactiva a la potencial amenaza (Gasiunas *et al.*, 2012).

MECANISMO DE EDICIÓN GENÉTICA BASADO EN EL SISTEMA CRISPR/CAS

El primer paso para convertir el sistema inmune bacteriano CRISPR/Cas en una tecnología eficaz para la edición de genes fue convertir a los tracrRNA y crRNA en un único RNA denominado sgRNA (Jinek *et al.*, 2012), de esta manera se puede evitar el paso de maduración y por lo tanto no es necesaria la acción de

la RNasa III. El sgRNA conserva dos características críticas para su función: la región de reconocimiento del extremo 5' que es la responsable de la unión específica con el sitio blanco y el sitio de unión del elemento Cas en el extremo 3' (Jinek *et al.*, 2012). La implementación de un único sgRNA creó un sistema simple y eficaz que necesita únicamente dos componentes (sgRNA y Cas) para cumplir con su acción. Además, la secuencia guía del sgRNA se puede modificar para programar el sitio de corte de manera específica, por lo que potencialmente es posible modificar cualquier molécula de DNA (Doudna & Charpentier, 2014).

La introducción de cortes precisos en la molécula de DNA, aunque es un evento crucial, es sólo en el primer paso para realizar una edición genética exitosa, debido a que dependiendo del tipo de modificación que se desee realizar es necesario, por ejemplo, introducir nuevas pares de bases, o eliminar algunas otras (mutación por inserción o por deleción respectivamente). Una vez que el complejo sgRNA-Cas9 del sistema CRISPR/Cas ha introducido el corte en la doble hélice de DNA y si se requiere reparar el daño por ejemplo en células eucariotas existen

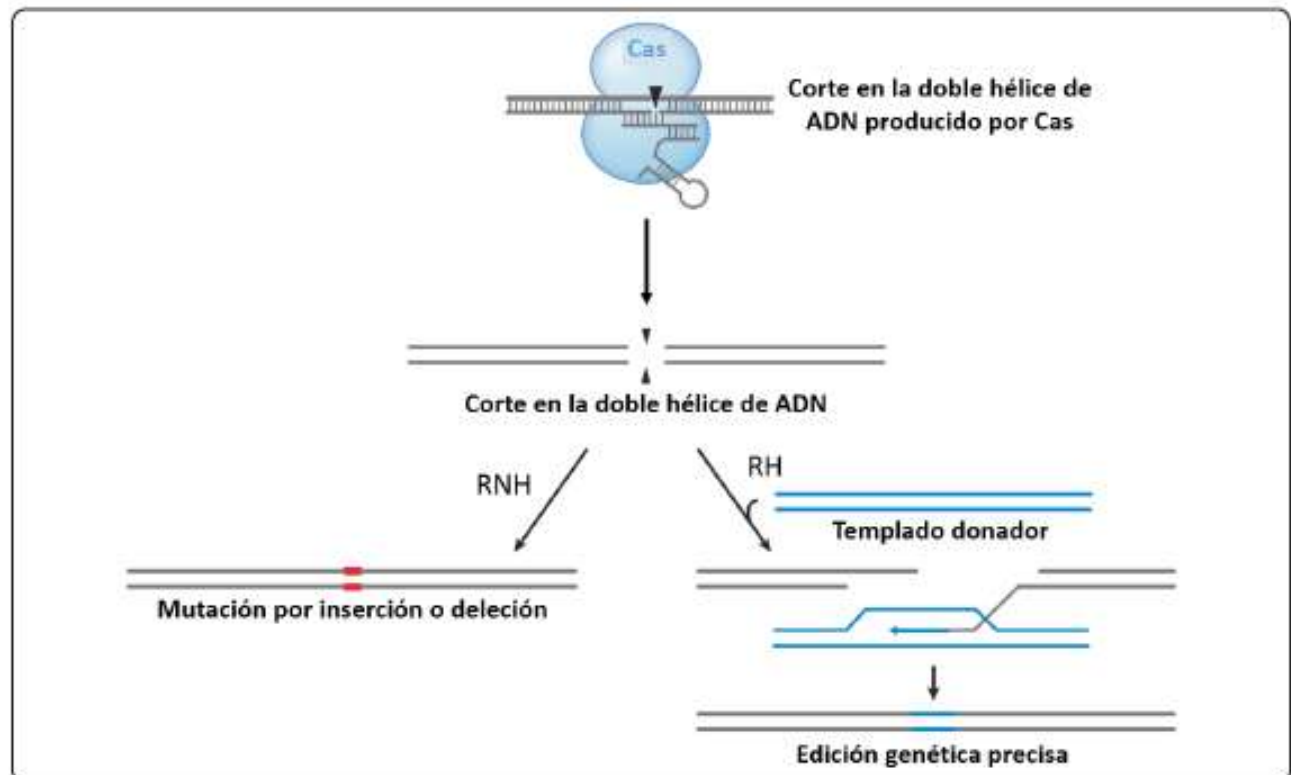


Figura 2. Edición genética mediada por el sistema CRISPR/Cas. La nucleasa Cas introduce cortes precisos en la doble hélice del DNA. Las lesiones genómicas pueden repararse a través de dos vías: El sistemas de reparación homólogo (RH) utiliza un templado adicional como donador para la recombinación, reemplazando la secuencia existente con la secuencia modificada de interés. La vía de reparación no homóloga (RNH) une los extremos cortados en un proceso donde pueden insertarse o removerse secuencias de DNA. Las puntas de flecha indican los sitios de corte del DNA. Modificado de Jiang & Marraffini, 2015. Ver la versión a color en línea.

dos sistemas de reparación de daño, que serán los encargados de insertar las modificaciones y son: la recombinación no homóloga (RNH) y la recombinación homóloga (RH), por otro lado, muchas bacterias, incluyendo a *E. coli*, únicamente cuentan con el sistema RH (Shuman & Glickman, 2007). Para completar el proceso de edición genética, durante la reparación con el sistema RNH se insertan o se escinden regiones de varias pares de bases cercanos al sitio del corte, este evento altera el marco de lectura abierto del probable gen blanco y por lo tanto lo desactiva (mutación knockout) (Figura 2) (Cong *et al.*, 2013; DiCarlo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Por otro lado, el sistema RH necesita de una molécula de DNA adicional que actúe como templado para la reparación del corte, estos templados pueden estar presentes en el cromosoma (genes duplicados) o pueden ser suministrados de manera exógena; por ejemplo, a través de plásmidos. Gracias a que el templado adicional, necesario para el sistema RH, se puede suministrar de manera exógena, esta vía ha sido empleada para introducir secuencias específicas dentro de las regiones cortadas con el sistema CRISPR/Cas (Figura 2). Hasta el momento, el sistema RH ha sido empleado de manera eficiente para realizar modificaciones específicas, como inserciones, deleciones (Gratz *et al.*, 2013) y sustituciones (Shalem *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013).

En contraste con los sistemas de edición que han sido empleados a la fecha como el sistema ZFN y TALEN's, que requieren una cantidad significativa de elementos para modificar el DNA (Kim & Kim, 2014), en el sistema CRISPR/Cas únicamente se requiere modificar los RNA guías para desactivar un gen y una molécula de DNA adicional, que sirva como templado, para introducir modificaciones específicas (Doudna & Charpentier, 2014). Por esta razón, el sistema CRISPR/Cas ha sido adoptado rápida y ampliamente por la comunidad científica para editar genomas en un gran número de células y de organismos como el caso del maíz donde fue mutado en el gen *Fx1*, generando una mutante que presenta un fenotipo con alto contenido de amilopectina (Waltz, 2016) o en cerdos la mutación del gen *MSTN*, que codifica un regulador negativo del crecimiento muscular (Wang *et al.*, 2015B). Aunque el uso del sistema CRISPR/Cas se está extendiendo rápida y ampliamente, esta revisión se centrará en describir una aplicación novedosa, como es el uso del sistema en el desarrollo de un antimicrobiano secuencia específica.

USO DEL SISTEMA CRISPR/CAS COMO ANTIMICROBIANO SECUENCIA ESPECÍFICA

La resistencia a los antimicrobianos representa uno de los más grandes retos de nuestro tiempo debido a que el uso indiscriminado de estos agentes ha permitido la selección de bacterias multirresistentes por lo que las opciones para un tratamiento efectivo han disminuido y en algunos casos se han agotado (Spizek & Havlicek, 2015). Aunado a esto, en la actualidad hay escasos en el desarrollo de nuevos antimicrobianos, ya que desde hace varias décadas no ha salido al

mercado una nueva familia de agentes antimicrobianos (Aminov, 2017). Predicciones recientes estiman que de continuar la misma tendencia, para el año 2050 el número de muertes producidas por bacterias multirresistentes a los antimicrobianos alcanzarán los 10 millones anuales, cifra que superaría a las muertes producidas por cáncer que rondarían los 8.2 millones anuales (O'Neill, 2016). Por lo anterior se han buscado nuevas estrategias para combatir a las infecciones bacterianas y una adaptación en el uso del sistema CRISPR/Cas podría ofrecer una nueva opción eficiente en el tratamiento de infecciones bacterianas.

El desarrollo de una nueva estrategia basada en el uso del sistema CRISPR/Cas surgió de la observación de que los cortes introducidos en el cromosoma por el elemento Cas resultan letales para algunas bacterias cuando no se les suministra un templado exógeno para realizar la reparación con el sistema RH, ya que no cuentan con el sistema RNH, por lo que es posible programar a los sgRNA del sistema para introducir cortes de manera selectiva sobre bacterias de interés (Figura 3) (Citorik *et al.*, 2014). Además, a diferencia de los antimicrobianos convencionales cuya actividad se considera de amplio espectro, es decir, que son tóxicos para una gran cantidad de bacterias, el sistema CRISPR/Cas puede programarse de manera específica para que únicamente actúe sobre un tipo de población bacteriana, quedando intactas otras poblaciones, como por ejemplo, las que conforman la microbiota intestinal humana (Figura 3) (Bikard *et al.*, 2014; Goma *et al.*, 2014).

Uno de los principales retos en el diseño de esta nueva estrategia ha sido idear la forma de llevar el sistema CRISPR/Cas hasta las células blanco. Una opción que está dando buenos resultados, es el uso de fagémidos, plásmidos empaquetados dentro de una cápside vírica, a los que se les han incorporado los genes que codifican la nucleasa Cas y el sgRNA modificado para atacar a los genes de interés (Citorik *et al.*, 2014). Un ejemplo del uso exitoso de esta estrategia es el uso del fago filamentoso M13, donde de manera selectiva fue posible eliminar a una cepa de *E. coli* resistente a antimicrobianos. Además, se observó que el tratamiento con los fagémidos incrementó la supervivencia de la polilla de la cera, *Galleria mellonella*, que es un modelo para estudiar a *E. coli* EHEC O157:H7 capaz de producir infecciones intestinales (Citorik *et al.*, 2014). Otro caso exitoso es el uso del fago Φ NM1, donde los fagémidos fueron empleados para tratar una infección cutánea producida por *Staphylococcus aureus* en ratones (Yosef *et al.*, 2015). Después del tratamiento algunas bacterias lograron sobrevivir, sin embargo, no contenían los genes de resistencia a antimicrobianos contra los que estaba dirigida la nucleasa Cas, por lo que el uso del sistema CRISPR/Cas permitió la eliminación de las bacterias que poseían el determinante de resistencia contra el que estaba dirigido (Yosef *et al.*, 2015).

Hasta el momento, el uso de esta biotecnología para el tratamiento de infecciones bacterianas ha probado ser muy

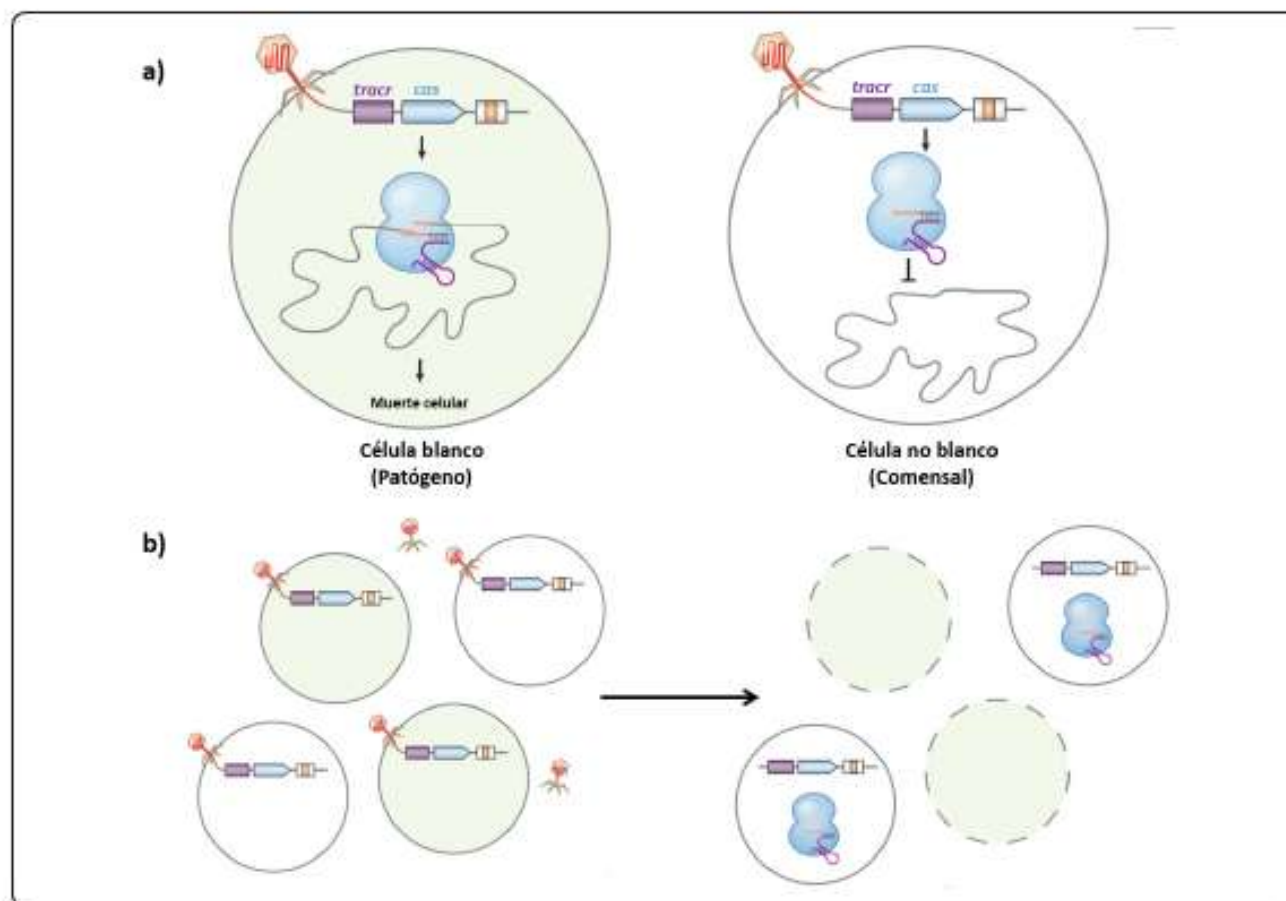


Figura 3. Uso del sistema CRISPR/cas como antimicrobiano de secuencia específica. (a) En la mayoría de las bacterias con sistemas de reparación homóloga la acción de la nucleasa Cas con blancos específicos provoca la muerte celular debido a que los cortes en el DNA no pueden ser reparados. Para transportar al sistema es posible usar fagémidos a los cuales se les incorporan los genes que codifican los crRNA y a la proteína Cas. (b) En teoría, los fagémidos son específicos para un gen o secuencia de interés, por lo que al emplearse contra una población compleja las bacterias comensales permanecerán intactas. Modificado de Jiang & Marraffini, 2015. Ver la versión a color en línea.

eficaz y tiene el potencial para el diseño de tratamientos personalizados, ya que puede utilizarse únicamente en las bacterias responsables de la infección o adaptarse para atacar genes de interés que codifican factores de resistencia a antimicrobianos, como las β -lactamasas de espectro extendido, o factores de virulencia, como los determinantes en la formación de biofilm.

LIMITACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS

Un requisito fundamental de cualquier sistema de edición genética es la ausencia, o al menos una baja frecuencia, de mutaciones secundarias accidentales. Para el caso del sistema CRISPR/Cas la especificidad está directamente relacionada con la capacidad de los sgRNA para reconocer su blanco, ya que son los responsables de guiar a la nucleasa Cas hasta el sitio donde serán introducidos los cortes en la molécula de DNA

y posteriormente los sistemas de reparación se encargan de introducir o remover fragmentos de DNA (Figura 2) (Jiang & Marraffini, 2015). Debido a que se necesita un alineamiento perfecto entre el sgRNA y el DNA blanco para que el elemento Cas se una, la probabilidad de que se modifique una región distinta a la deseada es extremadamente baja. Los sgRNA necesitan de 20 nucleótidos para alcanzar su blanco (Jinek *et al.*, 2012), por lo que la probabilidad para alcanzar un sitio equivocado ha sido predicho que es de $4^{-20} \times 2$ (debido a que la secuencia de 20 nucleótidos puede alinearse en ambas hebras del DNA) (Jiang & Marraffini, 2015). Sin embargo, estudios en células bacterianas (Jackson *et al.*, 2014) y la caracterización bioquímica del elemento Cas (Gasiunas *et al.*, 2012) mostraron que no se necesita un alineamiento perfecto entre los primeros 5-10 nucleótidos del extremo 5', por lo que la probabilidad de alcanzar una secuencia no deseada se incrementa.

Además de la generación de mutaciones indeseadas, una de las limitaciones más importantes del sistemas CRISPR/Cas es la ausencia de métodos eficaces para transportar al sistema dentro de las células de interés (Maggio & Gonçalves, 2015). La primera estrategia para transportar al sistema dentro de células bacterianas es la electroporación (Maggio & Gonçalves, 2015), donde se introduce un plásmido que contiene los genes que codifican para el sistema CRISPR/Cas exponiendo las células a pulsos eléctricos, desde luego que este sistema únicamente podría emplearse *in vitro*. Para un modelo más complejo, como lo es el de una infección bacteriana, donde está involucrado un huésped y bacterias comensales a los cuales se desea mantener intactos, el uso de fagémidos para transportar el sistema se asocia con una gran eficiencia y una baja citotoxicidad comparada con el uso de bacteriófagos (Citorik *et al.*, 2014). No obstante, este sistema está sustancialmente limitado debido a que los fagémidos conservan el mismo blanco de infección que los bacteriófagos del cual derivan, por lo tanto, únicamente pueden infectar a las bacterias que expresen los receptores apropiados (Bikard *et al.*, 2014). Además, los fagémidos son inmunogénicos, por lo que podrían desencadenar efectos no deseables en el huésped. Por otro lado, debido a que el sistema se distribuye en forma de DNA plasmídico, este podría ser neutralizado por la acción de enzimas de restricción (Bikard *et al.*, 2014). Finalmente, una de las limitaciones más serias es la necesidad de realizar una caracterización detallada de la microbiota del paciente a tratar, con el objetivo de que los sgrNA diseñados sean altamente específicos.

CONCLUSIONES

El desarrollo de un método de edición genética basado en el sistema CRISPR/Cas resalta la importancia de la investigación básica, ya que sus principios son los mecanismos de replicación y reparación del DNA, además del mecanismo de defensa contra la incorporación de DNA exógeno. Una vez que se descubrió el mecanismo mediante el cual el sistema CRISPR/Cas confiere inmunidad contra moléculas de DNA invasoras, fue posible incorporar este sistema como una prometedora herramienta para la edición genética. Actualmente, la posibilidad para modificar genomas tanto de organismos procariontes como eucariotes mediante este sistema parece ser ilimitada, lo que a su vez, abre una gran diversidad de posibles aplicaciones médicas y biotecnológicas, mismas que ya se están explorando, como es el caso del diseño de terapias contra una gran cantidad de enfermedades, incluyendo las infecciones bacterianas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Martha Isela Ramírez Díaz (Instituto de investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH) por sus valiosos comentarios para la realización de este escrito. Como alumno del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas: Opción Biología Experimental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo agradezco la beca otorgada por el CONACYT (483024).

REFERENCIAS

- Aminov, R. (2017) History of antimicrobial drug discovery – Major classes and health impact. *Biochem. Pharmacol.*, **133**, 4–19. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.10.001.
- Barrangou, R., Freyman, C., Devesu, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**(5819), 1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- Bikard, D., Bult, C. W., Jiang, W., Nussenzweig, P. M., Goldberg, G. W., Daportier, X., Fischetti, V. A. & Marraffini, L. A. (2014) Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. Biotechnol.*, **32**(11), 1146–1150. DOI: 10.1038/nbt.3043.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacer of extrachromosomal origin. *Microbiology*, **151**, 2551–2561. DOI: 10.1099/mic.0.28048-0.
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., Makarova, E. S., Eicklin, B. V. & Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, **321**(5891), 960–964. DOI: 10.1126/science.1159689.
- Charpentier, E. & Marraffini, L. A. (2014) Harnessing CRISPR-cas9 immunity for genetic engineering. *Curr. Opin. Microbiol.*, **19**, 114–119. DOI: 10.1016/j.mib.2014.07.001.
- Citorik, R. J., Mimee, M. & Lu, T. E. (2014) Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.*, **32**(11), 1141–1145. DOI: 10.1038/nbt.3011.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. & Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**(6121), 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- DiCarlo, J. E., Norville, J. B., Mali, P., Rios, X., Aach, J. & Church, G. M. (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.*, **41**(7), 4336–4343. DOI: 10.1093/nar/gkt135.
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**(6213), 1077–1088. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Gasunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**(39), 2579–2586. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.
- Gomes, A. A., Klumpe, H. B., Lno, M. L., Selle, K., Barrangou, R. & Beisel, C. L. (2014) Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *mBio*, **5**(1), e00928–13. DOI: 10.1128/mBio.00928-13.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. E., Harrison, M. M., Wildonger, J. & O'Connor-Giles, K. (2013) Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, **194**(4), 1029–1035. DOI: 10.1534/genetics.113.152710.
- Groenen, P. M. A., Bunschoten, A. B., Soolingen, D. & Embden, J. D. A. (1993) Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*, application for strain

- differentiation by novel typing method. *Mol. Microbiol.*, **10**(5), 1057-1065. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x.
- Horvath, P. & Barrangou, R. (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, **327**(5962), 167-170. DOI: 10.1126/science.1179555.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, **169**(12), 5429-5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- Jackson, R. N., Golden, S. M., Erp, P. B. G., Carter, J., Westra, E. R., Brouns, S. J. J., Oost, J., Terwilliger, T. C., Read, R. J. & Wiedenheft, B. (2014) Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science*, **345**(6203), 1473-1479. DOI: 10.1126/science.1256328.
- Jansen, R., Embden, J. D. A., Gaastera, W. & Schouls, L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repair in prokaryotes. *Mol. Microbiol.*, **43**(6), 1565-1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Jiang, W. & Marraffini, L. A. (2015) CRISPR-Cas: New tools for genetic manipulation from bacterial immunity systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, **69**, 209-228. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104441.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.*, **31**(3), 233-239. DOI: 10.1038/nbt.2508.
- Jinek, M., Chylinski, E., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**(6096), 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Kim, H. & Kim J. S. (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat. Rev. Genet.*, **15**(5), 321-334. DOI: 10.1038/nrg3686.
- Li, W., Teng, F., Li, T. & Zhou Q. (2013) Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR/Cas systems. *Nat. Biotechnol.*, **31**(6), 684-686. DOI: 10.1038/nbt.2652.
- Maggio, I. & Gonçalves, M. A. F. V. (2015) Genome editing at the crossroads of delivery, specificity, and fidelity. *Trends Biotechnol.*, **33**(5), 280-291. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.02.011.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct.*, **7**(1), 1-26. DOI: 10.1186/1745-6150-1-7.
- Makarova, K. S., Half, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., Oost, J. & Koonin B. V. (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**(6), 467-477. DOI: 10.1038/nrmicro2577.
- Marraffini, L. A. & Southeimer E. J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, **322**(5909), 1843-1845. DOI: 10.1126/science.1165771.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almedros, C. (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defense system. *Microbiology*, **155**, 733-740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.*, **60**(2), 174-182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. & Juez, G. (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.*, **36**(1), 244-246. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.
- O'Neill, J. (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on antimicrobial resistance. amr-review.org. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf.
- Pourcel, C., Salviñol, G. & Vergnaud, G. (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, **151**, 653-663. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
- Sapramauskas, R., Gasimas, G., Frenaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2011) The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **39**(21), 9275-9282. DOI: 10.1093/nar/gkr606.
- Sashital, D. G., Wiedenheft, B. & Doudna, J. A. (2012) Mechanism of foreign DNA selection in bacterial adaptive immune system. *Mol. Cell*, **46**(5), 606-615. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.03.020.
- Shalem, O., Sanjana, N. E. & Zhang, F. (2015) High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**(5), 299-311. DOI: 10.1038/nrm3899.
- Shuman, S. & Glendon, M. S. (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**(11), 852-861. DOI: 10.1038/nrmicro1768.
- Spiztek, J. & Havlicek, V. (2015) Tackling antibiotic resistance. In: Sanchez, S., Demian, A. L. (Eds.), *Antibiotics: Current innovations and future trends*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2015, pp. 83-93. ISBN: 978-1-908230-54-6.
- Waltz, E. (2016). CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nat. Biotechnol.*, **34**(6), 582. DOI: 10.1038/nbt0616-582.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. & Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **153**(4), 910-918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- Wang, J., Li, J., Zhao, H., Sheng, G., Wang, M., Yin, M. & Wang Y. (2015A) Structural and mechanistic basis of PAM-dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems. *Cell*, **163**(4), 840-853. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.008.
- Wang, K., Onyiah, H., Xie, Z., Yao, C., Guo, N., Li, M., Jiao, H. & Pang, D. (2015B). Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.*, **5**, e16623. DOI: 10.1038/srep16623.
- Yosef, I., Manor, M., Kiro, R. & Qimron, U. (2015) Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**(23): 7267-7272. DOI: 10.1073/pnas.1500107112.

© 2020 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 23: 1-11, 2020.

DOI: [10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202)

La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE

Victor M. Chávez-Jacobo

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Av. Gral. Francisco J. Mujica s/n, Morelia, 58030, Michoacán. E-mail: victor_mch@hotmail.com

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los más grandes retos de la medicina moderna. Durante la última década, un grupo de seis bacterias han probado no sólo su capacidad para relativamente “escapar” de los efectos de casi cualquier antimicrobiano, sino también por ser la causa principal de las infecciones hospitalarias. Estos organismos en conjunto se les conoce como ESKAPE, siglas que derivan de la primera letra de la categoría taxonómica género, o sea, del nombre científico de cada una de estas bacterias (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.). La presente revisión tiene como objetivo describir los principales mecanismos de resistencia asociados a este grupo de bacterias y el impacto que han tenido en el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.

Palabras Clave: Bacterias ESKAPE, infecciones hospitalarias, resistencia intrínseca, resistencia adquirida, selección de la resistencia.

The battle against the superbugs: No more antimicrobials, there is no ESKAPE

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the greatest challenges of modern medicine. During the last decade, a group of six bacteria have proven not only their ability to relatively “escape” the effects of almost any antimicrobial but also because they are the main cause of hospital infections. These organisms together are known as ESKAPE, acronyms derived from the first letter of the genus taxonomic from the scientific name of each bacteria (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) This review aims to describe the main resistance mechanisms associated with this group of bacteria and the impact they have had on the development of new antimicrobial strategies.

Key words: ESKAPE bacteria, hospital infections, intrinsic resistance, acquired resistance, selection of resistance.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de los antimicrobianos a principios del siglo XX, la medicina ha evolucionado en múltiples aspectos, salvando vidas gracias al uso de alguno de estos fármacos y convirtiéndose no sólo en uno de los grandes descubrimientos de la medicina moderna, sino también en medicamentos necesarios para el desarrollo de procedimientos médicos complejos como la amputación quirúrgica, el trasplante de órganos y el manejo de pacientes con cáncer, entre muchos otros (Munita & Arias, 2016). Sin importar su estructura o función, que se mencionará más adelante, los antimicrobianos representan un grupo altamente diverso de moléculas que pueden inhibir el crecimiento (efecto bacteriostático) o provocar la muerte (efecto bactericida), específicamente de bacterias y han sido empleados durante décadas para controlar las infecciones en humanos, animales y plantas (Duijkeren, Schink, Roberts, Wang & Schwarz., 2018).

Aunque el primer antimicrobiano que se produjo industrialmente fue la arsfenamina, un compuesto sintético empleado para tratar la sífilis (Aminov, 2017), hoy en día la mayoría de estos fármacos son productos naturales o derivados de los mismos, colectados a partir de microorganismos aislados del suelo, particularmente del género *Streptomyces* (Wright, Seiple & Myers, 2014). Debido a su origen como productos derivados del metabolismo secundario bacteriano, muchos antimicrobianos se encuentran en la naturaleza, inclusive en la toma previa de muestras a la era del uso masivo de éstos (D'Costa *et al.*, 2011) y como resultado de la ubicuidad en su producción ambiental, es posible encontrar bacterias que han desarrollado de manera ancestral mecanismos de defensa y por lo tanto de resistencia contra estos medicamentos (Crofts, Gasparini & Dantas, 2017). En los primeros días de la terapia antimicrobiana, la resistencia no era considerada un problema grave, debido a que el número de bacterias resistentes era muy bajo y se estaban detectando un gran número de antimicrobianos de diferentes clases (Tabla I). Desafortunadamente, la presión selectiva impuesta por el amplio uso y abuso de estos fármacos desde 1950 hasta nuestros días, ha acelerado el desarrollo y distribución de bacterias resistentes.

Hoy en día, las infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos, que llamaremos *superbacterias*, son además un problema económico muy importante. Se estima que el gobierno de los Estados Unidos gasta alrededor de 20 mil millones de dólares al año en la prevención y tratamiento de enfermedades provocadas por estos microorganismos. Además, se considera que para 2050 las muertes prematuras causadas por bacterias multirresistentes alcanzarán cifras de 10 millones al año, mientras que actualmente es de 700,000 (O'Neil, 2016), por lo que la Organización Mundial de la Salud ha decretado a la resistencia antimicrobiana como uno

de los principales problemas del siglo XXI (Tacconelli *et al.*, 2018). Se pone especial atención en un grupo de bacterias denominadas ESKAPE (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonias*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) (Rice, 2008) que serán descritas a través de la presente revisión con el objetivo de entender los mecanismos de resistencia asociados a este grupo de bacterias y el impacto que han tenido en el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la resistencia.

RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana puede dividirse de manera general en dos grupos: intrínseca y adquirida (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu & Piddock, 2014). Para comenzar a entender el problema de la resistencia, es necesario comprender que las bacterias han interactuado con los antimicrobianos de manera ancestral y por lo tanto han desarrollado mecanismos para resistir su efecto y sobrevivir o incluso prosperar en estos ambientes. Es por ello que estas bacterias se consideran intrínsecamente resistentes, no obstante, este grupo no es el principal foco del problema (Munita & Arias, 2016). Por otro lado, la resistencia adquirida se da cuando una población bacteriana que era originalmente sensible a algún antimicrobiano se vuelve resistente mediante la adquisición de mutaciones en genes cruciales o mediante la adquisición externa de determinantes de resistencia transferidos de organismos intrínsecamente resistentes (Figura 1) (Blair *et al.*, 2014). Debido a que no existen límites en la cantidad de determinantes que las bacterias pueden adquirir, han surgido poblaciones bacterianas altamente resistentes a múltiples familias de antimicrobianos, que denominamos como *superbacterias*.

La resistencia puede ser mediada por múltiples mecanismos que se pueden englobar dentro de tres tipos principales: Primero, aquellos que reducen la concentración intracelular del fármaco, ya sea impidiendo la entrada o a través de la expulsión; Segundo, la protección del sitio blanco mediante la adquisición de mutaciones en los genes que codifican para estos determinantes o mediante moléculas que interfieren con la unión del antimicrobiano; Tercero, la modificación del fármaco mediante hidrólisis o la adición de grupos funcionales (Figura 2) (Crofts *et al.*, 2017).

DISMINUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTIMICROBIANO

Reducción de la permeabilidad

De manera general, las bacterias Gram (+) son menos permeables que las bacterias Gram (-) y por lo tanto sus membranas externas forman una barrera impermeable a muchos antimicrobianos (Kojima & Nikaido, 2013). Los fármacos hidrofílicos pueden atravesar la membrana mediante difusión a través de proteínas de membrana llamadas porinas y las principales en *Escherichia coli* son OmpF y OmpC,

Tabla I. Agentes antimicrobianos.

Clase	Agente antimicrobiano	Organismo productor	Año de aislamiento/ descripción
Arsfenaminas	Salvarsan	Sintético	1907
B-Lactámicos	Penicilinas Cefalosporinas Imipenem Aztreonam	<i>Penicillium notatum</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces cattleya</i> <i>Chromobacterium violaceum</i>	1929-1940 1945-1953 1976 1981
Glucopéptidos	Vancomicina Teicoplanina, ovaparcina	<i>Amycolaptosis orientalis</i> <i>Amycolaptosis coloradensis</i>	década de los 50 1975
Macrólidos	Eritromicina Espiramicina	<i>Streptomyces erythreus</i> <i>Streptomyces ambofaciens</i>	1952 1955
Lincosamidas	Lincomicina	<i>Streptomyces lincolnesis</i>	1963
Estreptograminas	Estreptogramina A+B Virginiamicina A+B	<i>Streptomyces diastaticus</i> <i>Streptomyces virginiae</i>	1953 1955
Tetraciclinas	Clortetraciclina Oxitetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces rimosus</i>	1948 1950
Fenicoles	Cloranfenicol	<i>Streptomyces venezueleae</i>	1947
Aminoglucósidos	Estreptomina Neomicina Kanamicina Gentamicina Tobramicina	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces fradiae</i> <i>Streptomyces kanamyceticus</i> <i>Micromonospora purpura</i> <i>Streptomyces tenebrarius</i>	1943 1949 1957 1963 1967
Aminociclitolos	Espectinomicina	<i>Streptomyces spectabilis</i>	1961
Pleuromutilinas	Pleuromutilina, Tiamulina	<i>Pleurotus</i> sp., Sintético	1951, 1976
Polipéptidos	Polimixina B Colistina Bacitracina	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>B. Polymyxa</i> var. <i>colistinus</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	1947 1949 1943
Epóxidos	Fosfomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	1969
Ácidos pseudomónicos	Mupirocina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1971
Esteroides	Ácido fusídico	<i>Fusidium coccineum</i>	1960
Estreptotricina	Nourseotricina	<i>Streptomyces noursei</i>	1963
Sulfonamida	Sulfametoxazol	Sintético	1935
Trimetoprima	Trimetoprim	Sintético	1956
Quinolonas	Ácido Nalidixico	Sintético	1962
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Sintético	1973
Oxazolidinonas	Linezolida	Sintético	1987

Modificado de Duijkeren *et al.*, 2017.

que actúan de manera inespecífica, al transportar desde nutrientes hasta colorantes, detergentes y antimicrobianos (Tran, Williams Farid, Erdemli & Pearlstein, 2013). Debido a que reducir la permeabilidad de la membrana externa limita la entrada del antimicrobiano a la célula, las bacterias pueden disminuir la expresión de los genes que codifican para estas porinas y expresar genes que codifican para otras porinas. En *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* la reducción en la expresión de porinas contribuye de manera significativa con la resistencia a B-lactámicos (Pang, Raudonis, Glick, Lin & Cheng, 2019; Baroud *et al.*, 2013; Lavigne *et al.*, 2013).

Expulsión del antimicrobiano

Los sistemas de expulsión bacterianos transportan de manera activa a la gran mayoría de los antimicrobianos mencionados en la Tabla I y son los principales responsables de la resistencia intrínseca. Mientras que algunos sistemas de transporte tienen sustratos específicos, por ejemplo, los sistemas Tet, que expulsan de manera específica tetraciclinas, muchos otros pueden expulsar una gran cantidad de sustancias

con estructuras totalmente distintas y a éstos se les conoce como sistemas de expulsión múltiple (Du *et al.*, 2018). Actualmente, se han identificado seis familias diferentes de transportadores bacterianos capaces de conferir resistencia a los antimicrobianos, uno de ellos son los de unión al ATP (ABC por sus siglas en inglés, ATP-binding cassette) que utilizan directamente al ATP como fuente de energía para realizar el transporte, mientras que las otras cinco familias de transportadores funcionan a través del potencial de membrana y son: facilitadores mayores (MFS, major facilitator or superfamily), expulsión de antimicrobianos y toxinas (MATE, multidrug and toxin extrusion), proteínas pequeñas de resistencia a antimicrobianos (SMR, small multidrug resistance), resistencia, nodulación y división celular (RND, resistance-nodulation-cell division) y los sistemas de expulsión de proteobacterias (PACE, proteobacterial, antimicrobial compound efflux) (Du *et al.*, 2018).

Todas las bacterias contienen diversos genes que codifican sistemas de expulsión múltiples dentro de sus cromosomas, algunos pueden ser movilizados a través de plásmidos,

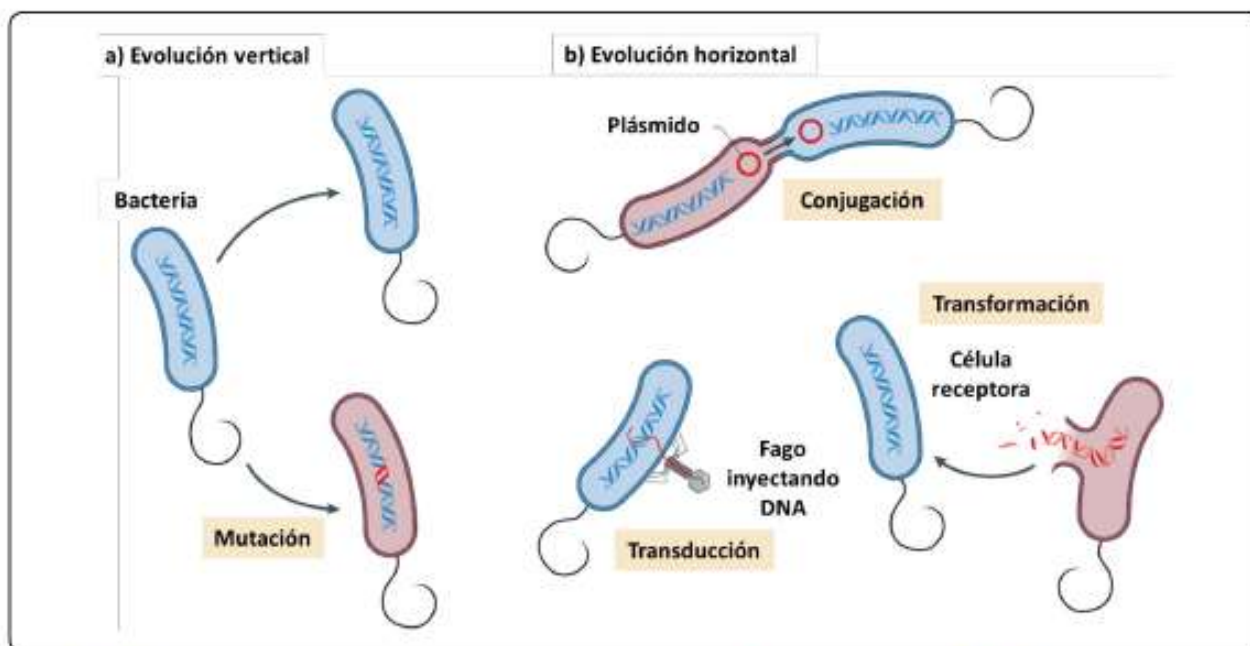


Figura 1. Evolución de la resistencia. La resistencia puede evolucionar a través de dos mecanismos básicos. Evolución vertical y horizontal. a) La evolución vertical representa la generación de una nueva mutación en el genoma bacteriano y la subsecuente transferencia a su progenie. Las bacterias azules son sensibles a antimicrobianos, mientras que, las rojas son resistentes. b) La adquisición de genes de resistencia de manera horizontal puede ocurrir mediante transducción, conjugación o transformación. La transducción es el proceso mediante el cual un bacteriófago introduce material genético al interior de una célula bacteriana y éste se incorpora a su genoma. La conjugación ocurre mediante el contacto directo entre dos células bacterianas, una donadora y la otra receptora y media la transferencia de plásmidos conjugativos y mobilizables así como de elementos integrativos. La transformación ocurre cuando el material genético se libera mediante la lisis de la célula donadora y la célula receptora lo incorpora a su genoma. Todos estos procesos median la adquisición de genes que confieren resistencia. Las células azules son receptoras, mientras que las rojas son donadoras (Modificado de Sommer, Munck, Toft-Kehler & Andersson, 2017).

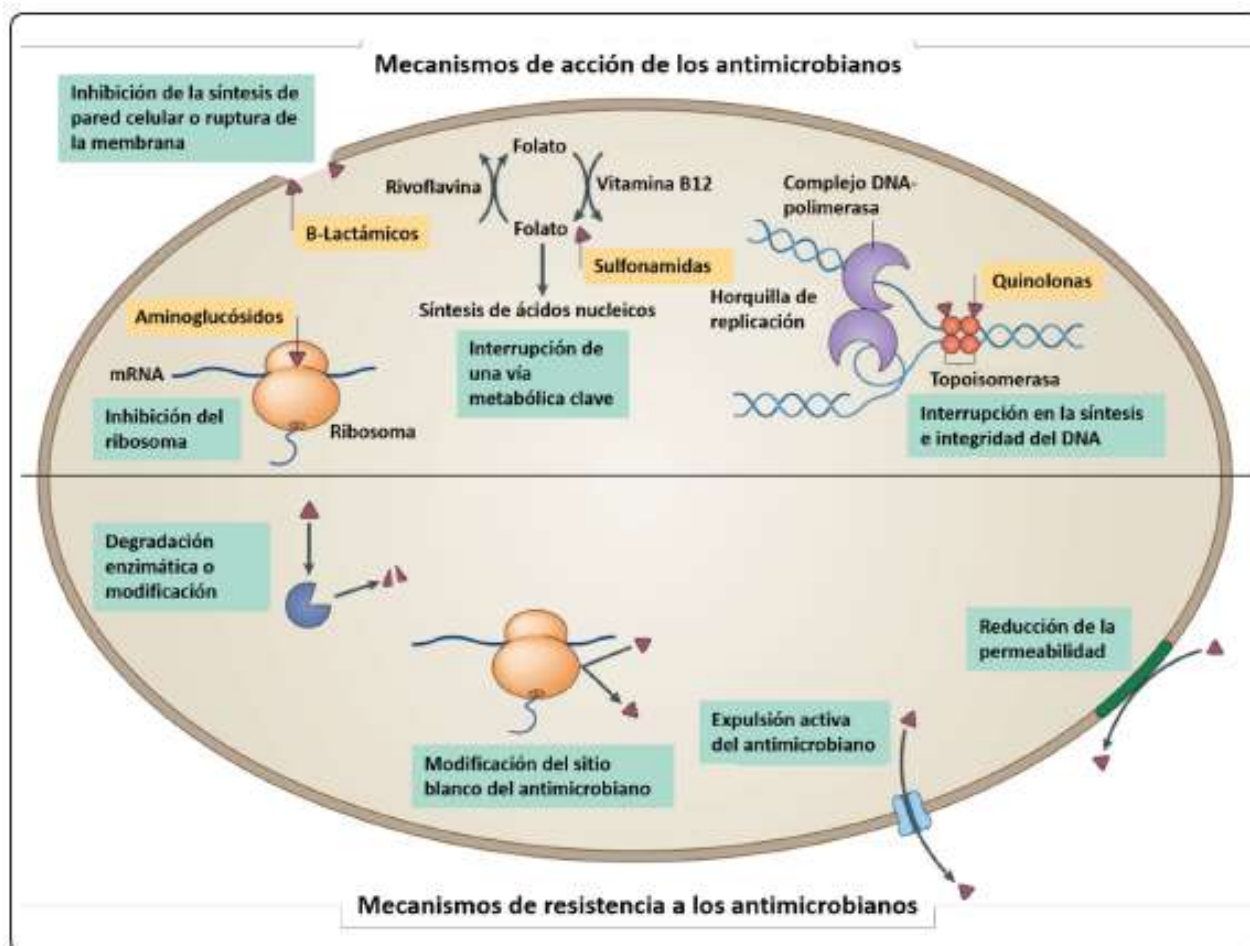


Figura 2. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Los blancos de los antimicrobianos se encuentran conservados entre las bacterias y normalmente se encuentran ausentes o son los suficientemente diferentes en células eucariotas. Aunque existan cientos de blancos potenciales, el arsenal de antimicrobianos con el que contamos ataca principalmente al ribosoma, la síntesis de pared celular, la interrupción de una vía metabólica clave y el metabolismo del DNA. Las células bacterianas comúnmente resisten la acción de los antimicrobianos mediante la inactivación del antimicrobiano a través de enzimas que degradan o modifican al fármaco. Otras estrategias de resistencia son la protección, alteración o sobreexpresión del blanco y una última estrategia consiste en la expulsión del antimicrobiano a través de sistemas de expulsión tanto específicos como inespecíficos (Modificado de Crofts *et al.*, 2017).

transposones o bacteriófagos (Figura 1) por lo que estos sistemas están ampliamente distribuidos y en la actualidad aproximadamente el 80% de las infecciones hospitalarias severas se atribuyen a bacterias Gram (-) con sistemas de expulsión múltiple activos (Viale, Giannella, Tedeschi & Lewis, 2015). Se conoce, además, que para que estos sistemas sean aún más efectivos pueden sobreexpresarse, es decir, aumentar el número de proteínas transportadoras presentes en las células y por lo tanto aumentar aún más la expulsión. Desde 1990, se han aislado cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* capaces de sobreexpresar sistemas de expulsión (Pumbwe & Piddock, 2000; Kosmidis *et al.*, 2012), por lo que el entendimiento de estos sistemas es importante debido

a que es muy común encontrarlo en *superbacterias* y hoy en día es urgente diseñar nuevas estrategias para prevenir la expulsión de los antimicrobianos.

PROTECCIÓN DEL SITIO BLANCO DEL ANTIMICROBIANO

Mutación de genes que codifican el sitio blanco

La mayoría de los antimicrobianos tienen alta afinidad por su sitio blanco y una vez que se unen con éste, tienen la capacidad de desestabilizar las funciones normales de un organelo específico o una vía metabólica fundamental para la célula bacteriana, por lo que cambios en la estructura del blanco que impidan la unión del fármaco pero que permitan

continuar con su funcionamiento normal, confieren resistencia a los antimicrobianos (Figura 2). Durante el transcurso de una infección bacteriana puede ocurrir un fenómeno llamado selección, donde dentro de una población de bacterias surgen algunas que pueden desarrollar una mutación simple que confiere resistencia y por lo tanto pueden proliferar, a pesar del antimicrobiano y volver obsoleta la terapia contra ellas. Para el caso de las *superbacterias* se reduce significativamente el número de fármacos viables, ya que pueden acumular múltiples mutaciones en diversos genes y sobrevivir a una gran cantidad de antimicrobianos.

Interferencia con la unión del antimicrobiano

La protección del sitio blanco es una manera muy efectiva de protegerse contra el efecto de un antimicrobiano y básicamente consiste en sintetizar una molécula que pueda modificar al blanco sin inhibirlo o pueda unirse al antimicrobiano y por lo tanto bloquearlo. En los últimos años la protección de los sitios blanco se ha vuelto de interés clínico debido a la resistencia conferida contra importantes antimicrobianos: por ejemplo, la protección mediada por la metilasa del RNA ribosomal 16S, codificada por el gen *erm*, que previene la unión de macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (Shore *et al.*, 2011). Es decir, sólo un factor de resistencia puede inactivar a tres diferentes familias de antimicrobianos. Otro ejemplo de interferencia son las proteínas Qnr que son capaces de bloquear la unión de las quinolonas con su sitio blanco, las topoisomerasas II y IV, y de esta manera conferir resistencia (Goto, Kawamura & Arakawa, 2015).

MODIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

Modificación mediante hidrólisis

La modificación enzimática de los antimicrobianos es uno de los mecanismos más eficientes para inactivarlos y ha sido un problema desde la introducción de los B-lactámicos en 1940. Actualmente han sido reportadas cientos de enzimas capaces de degradar o modificar B-lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles y macrólidos. El aumento en el número de antimicrobianos de la misma familia a los cuales se les han introducido modificaciones para hacerlos más efectivos, ha provocado que las enzimas capaces de degradarlos incrementen su espectro de acción y hoy en día, tenemos B-lactamasas de espectro extendido (ESBLs), enzimas capaces de romper B-lactámicos, que proporcionan resistencia a todos los antimicrobianos de esta familia, y que se encuentran comúnmente en aislados de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Rossolini, D'Andrea & Mugnaioli, 2008). En algunos casos el rápido aumento en la diseminación de bacterias resistentes a B-lactámicos se ha tratado de explicar con la capacidad de estos determinantes de transferirse a través de plásmidos. Sea cual sea la explicación, el fenómeno de resistencia a B-lactámicos se ha expandido muy rápido y hoy es uno de los principales retos en el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.

Modificación mediante la adición de grupos funcionales

La adición enzimática de grupos funcionales provoca resistencia debido a que disminuye la afinidad del antimicrobiano por su sitio blanco y las enzimas mejor estudiadas capaces de transferir estos grupos funcionales son las aminoglucósido transferasas (Smith & Baker, 2002).

Los aminoglucósidos son particularmente susceptibles a la adición de grupos funcionales, debido a que su estructura cuenta con diversos grupos hidroxilo y amino expuestos. Existen tres clases diferentes de aminoglucósido transferasas: las acil transferasas, fosfo transferasas y nucleotidil transferasas las cuales confieren altos niveles de resistencia y se encuentran ampliamente distribuidas (Serio, Keepers, Andrews & Krause, 2018). Además, se han reportado dos enzimas pertenecientes a las aminoglucósido transferasas que son capaces de modificar a la ciprofloxacina (un antimicrobiano sintético de la familia de las quinolonas), la AAC-Ib-cr, que es capaz de adicionar un grupo acilo (Robicsek *et al.*, 2006) y CrpP, que es capaz de adicionar un grupo fosfato (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018). Por lo que la visión hacia el futuro es muy preocupante, ya que la resistencia, que este grupo de enzimas proporcionaba y que parecía ser exclusiva para aminoglucósidos, se ha extendido hacia un grupo de antimicrobianos completamente diferente. Además, se ha reportado que CrpP, descubierto inicialmente en un plásmido de *P. aeruginosa*, se encuentra distribuido en *E. coli* y en *K. pneumoniae* (Chávez-Jacobo *et al.*, 2019).

Superbacterias ESKAPE

El término ESKAPE hace referencia a un grupo de seis bacterias responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales que son capaces de, relativamente, escapar de los efectos de los antimicrobianos. Dentro de este grupo se incluyen *Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* y *aeruginosa* *Enterobacter* spp. (Rice, 2008). Debido a la amplia distribución de infecciones causadas por este grupo de bacterias el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) ha emitido una alerta para incentivar la creación de nuevas estrategias para el tratamiento de infecciones causadas principalmente por las siguientes bacterias: *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *E. faecium* resistente a vancomicina, *P. aeruginosa* resistente a fluoroquinolonas, *Enterobacteriaceae* productoras de B-lactamasas de espectro extendido (ESBL) y *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (Nakonieczna *et al.*, 2019).

Enterococcus spp. es un género de bacterias Gram (+), anaerobias facultativas, catalasa negativas y no esporuladas, que se pueden encontrar distribuidas extensamente en la naturaleza, tanto en suelo, agua y plantas, pero también formar parte de la flora normal del tracto entérico de humanos y animales (Fisher & Phillips, 2009). *Enterococcus faecium*

y *Enterococcus faecalis* son los principales patógenos de este grupo, asociados con una gran variedad de enfermedades como: infecciones de heridas, bacteremia, infecciones de vías urinarias, infecciones dentales, endocarditis, infecciones abdominales y sepsis neonatal (Fisher & Phillips, 2009). Además, en Europa se han aislado *Enterococcus* resistentes a vancomicina, en carne (Messi, Guerrieri, Niederhaussern, Sabia & Bondi, 2006) y en productos lácteos (Ogier & Serron, 2008), lo cual convierte a estos alimentos contaminados en un gran riesgo sanitario.

Tradicionalmente, para las infecciones causadas por *E. faecium* se empleaban B-lactámicos o glucopéptidos; sin embargo, la resistencia para los primeros es casi total, por ejemplo, para ampicilina e imipenem tenía una prevalencia del 98.8% en Reino Unido en el 2006 (Brown *et al.*, 2008) y hoy en día se espera que la resistencia sea total, por lo que este grupo de antimicrobianos es completamente inútil en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria. Para el caso de los glucopéptidos, específicamente vancomicina, existen al menos nueve determinantes de resistencia, *vanA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, *L*, *M* y *vanN*, siendo *vanA* el más distribuido alrededor del mundo y el más comúnmente asociado con la resistencia de *E. faecium* (Kang *et al.*, 2014).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram (+) con un crecimiento característico formando lo que se denomina "racimos de uvas". Forma parte de la flora normal de la piel y se encuentra principalmente en el tracto nasal y en el perineo de los mamíferos (Appelbaum, 2007). *S. aureus* cuenta con todo un arsenal de proteínas extracelulares que emplea durante la infección como factores de virulencia: hemolisinas, proteasas, hialuronidasas y colagenasas que le ayudan a la colonización y en la búsqueda de nutrientes (Boubaker *et al.*, 2004). Normalmente, las infecciones causadas por *S. aureus* eran tratadas con penicilina, sin embargo, el uso y abuso de este tratamiento ha causado que la resistencia se extienda, por lo que actualmente el 90% de los aislamientos clínicos de *S. aureus* son resistentes a la penicilina y aproximadamente el 60% de éstos son resistentes a la meticilina (MRSA), que era empleado como última opción (Sakoulas & Moellering, 2008).

El tratamiento de primera línea para las infecciones causadas por bacterias MRSA es la vancomicina, sin embargo, una vez más, la fuerte presión selectiva causada por el extenso uso de este antimicrobiano ha causado la aparición de dos tipos de resistencia, intermedia y completa. *S. aureus*, con resistencia intermedia, ha evolucionado para generar una membrana poco permeable a la mayoría de los antimicrobianos, por lo que es virtualmente insensible a la mayoría de los tratamientos empleados, lo cual, sumado con los factores de virulencia, la convierte en una *superbacteria* que pone en riesgo a todas las personas, especialmente a las que tienen problemas

inmunitarios (Vestergaard, Frees & Ingmer, 2019). El primer reporte de resistencia intermedia fue emitido en Japón a mediados de los años 90 y se ha vuelto un problema de interés global, debido a la cada vez más frecuente aparición de cepas con resistencia intermedia en Asia, Europa y América (Chambers & DeLeo, 2009). La resistencia completa es muy poco común y ha surgido debido a la transferencia de genes inter-especies con *Enterococcus* resistentes a la vancomicina, ya que se han identificado *S. aureus* con genes *vanA* (Gardete & Tomasz, 2014).

Klebsiella pneumoniae es un miembro de la familia Enterobacteriaceae, donde también se agrupa *Escherichia coli*: es un bacilo Gram (-) y se considera una bacteria intrínsecamente virulenta debido a la presencia de adhesinas y de una cápsula que actúa como un factor antifagocítico (Clegg & Murphy, 2016). Se considera un patógeno oportunista y se asocia comúnmente con infecciones de las vías urinarias y de las vías respiratorias. *K. pneumoniae* es notoria por la acumulación y rápida diseminación de múltiples determinantes de resistencia a los antimicrobianos: uno de los más importantes es la adquisición de una gran variedad de B-lactamasas, enzimas capaces de hidrolizar el anillo B-lactámico común en todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Debido a que los carbapenémicos son los antimicrobianos de primera línea en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria, las opciones de tratamiento son limitadas y en países como Estados Unidos, *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) ha sido el agente causal de infecciones a gran escala, debido principalmente a que el determinante de resistencia es capaz de transferirse entre diferentes especies y en Reino Unido es causante del 20% de las bacteriemias (Queenan & Bush, 2007. Livemore, Hope, Brick, Lillie & Reynolds, 2008).

El panorama completo es aún más complicado, ya que, en el laboratorio, cepas altamente virulentas de *K. pneumoniae* son capaces de formar un *biofilm*, una matriz polimérica compuesta por polisacáridos y proteínas que le confieren protección contra elementos exógenos del medio, como los antimicrobianos (Clegg & Murphy, 2016). En la naturaleza, son capaces de asociarse con otras especies bacterianas que comparten una distribución espacial similar: por ejemplo, se han reportado asociaciones con *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Candida albicans*, entre otros. Mientras que las interacciones que se llevan a cabo en estas comunidades complejas permanecen sin resolver, por el momento sólo se ha podido establecer el hecho de que lidiar con infecciones de esta naturaleza es sumamente complicado (Nakonieczna *et al.*, 2019).

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo aeróbico, Gram (-), no presenta movilidad y no es capaz de fermentar glucosa. Se considera un patógeno oportunista y es el

responsable del 2-10% de las infecciones hospitalarias causadas por bacterias Gram (-) y se asocia comúnmente con infecciones en la piel, bacteriemia, meningitis, neumonía e infección de heridas (Lee *et al.*, 2017). *A. baumannii* puede ingresar fácilmente al cuerpo humano a través de heridas abiertas, catéteres intravasculares y ventiladores mecánicos, debido a su capacidad para crecer en un gran intervalo de temperaturas, pH y niveles de nutrientes, puede sobrevivir dentro del cuerpo humano, así como en diferentes vectores (Antunes, Visca & Towner, 2014). Además, *A. baumannii* posee una citotoxina, que consiste en una proteína de membrana externa llamada *Omp38*, que es capaz de inducir la apoptosis de las células epiteliales humanas y se considera un factor de virulencia crucial para las primeras fases de la infección (Choi *et al.*, 2005).

Un fenómeno observado desde hace algunos años ha sido la asociación de infecciones causadas por *A. baumannii* en heridas producidas en zonas de conflictos armados; por ejemplo, en veteranos y soldados que estuvieron en Irak y Afganistán se detectaron 85 casos, donde el 35% de las cepas fueron susceptibles únicamente a una clase de antimicrobiano y el 4% fueron resistentes a todos los tratamientos estándar (Peleg, Seifert & Paterson, 2008). Existen evidencias que indican que el efecto inmunosupresor de la morfina puede incrementar el riesgo de contraer una infección causada por esta bacteria: no obstante, es el tratamiento habitual después de sufrir una herida en combate (Breslow *et al.*, 2011).

La principal preocupación en el caso de *A. baumannii* ha sido la rápida aparición y propagación de cepas que contienen B-lactamasas de espectro extendido, ya que éstas muestran resistencia a colistina e imipenem. Además, la combinación con otros factores de resistencia intrínsecos, como son la presencia de sistemas de expulsión, ha provocado que esta bacteria sea capaz de evadir la acción de la gran mayoría de los tratamientos estándar que consistían anteriormente en el uso de carbapenémicos, B-lactámicos y fluoroquinolonas (Lee *et al.*, 2017).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram (-), anaerobia facultativa, que puede encontrarse en animales, plantas y suelo y ha sido reconocida como la bacteria patógena oportunista más asociada a infecciones hospitalarias en pacientes que utilizan ventiladores (Lupo, Haenni & Madec, 2018). En personas sanas raramente puede llegar a afectar su salud, sin embargo, presenta una mortalidad alta en pacientes con fibrosis quística y en individuos inmunocomprometidos (Pang, Raudonis, Glick, Lin & Cheng, 2019). Esta bacteria presenta una resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos: especialmente puede desarrollar resistencia durante el tratamiento con imipenem, que anteriormente era el tratamiento de elección, mediante la sobreexpresión o la modificación del gen que codifica a la porina AmpC (Pang *et*

al., 2019). *P. aeruginosa* puede producir también B-lactamasas de espectro extendido y han surgido aislados capaces de resistir los efectos de las fluoroquinolonas, que llegaron a ser consideradas como la nueva esperanza en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria, mediante la mutación de los genes que codifican los blancos de las fluoroquinolonas, la DNA girasa y la topoisomerasa IV, así como con el reciente reporte del determinante de resistencia CrpP codificado en un plásmido (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018).

Durante las primeras etapas de la colonización, *P. aeruginosa* se adhiere a las células gracias a la presencia de flagelos y de un pili, que es un apéndice especial de naturaleza proteínica que además se emplea en la transferencia de material genético entre especies. Una vez que la adhesión es exitosa, *P. aeruginosa* comienza a secretar dos colorantes, que utiliza como sideróforos, moléculas especializadas en la quelación del hierro y como resultado las células hospederas entran en estado de privación de hierro, lo cual activa una vía de respuesta inmune innata, que en personas sanas acabaría rápidamente con la infección, pero que en personas inmunocomprometidas su única opción es el uso de fármacos antimicrobianos (Nikaido, 2003).

Enterobacter spp. un bacilo Gram (-), anaerobio facultativo que se puede encontrar encapsulado y se asocia comúnmente con infecciones de las vías urinarias y del tracto respiratorio, aunque también se encuentra en infecciones sanguíneas en pacientes inmunocomprometidos (Mezzatesta, Gona & Stefani, 2012). *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* son las bacterias más representativas de este grupo y las más comúnmente asociadas con multiresistencia a antimicrobianos. Aunque se han reportado aislados resistentes a B-lactámicos y fluoroquinolonas, que eran la primera opción para tratar este tipo de infecciones, hasta el momento el empleo de colistina ha dado buenos resultados (Davin-Regli, Lavigne & Pagés, 2019).

Fue en 1989 cuando se reportó el primer caso de infecciones hospitalarias debido a *E. cloacae* productora de B-lactamasas de espectro extendido (De Champs *et al.*, 1989). Actualmente, junto con *E. coli* y *K. pneumoniae* representan a las tres enterobacterias con mayor número de casos de resistencia a los antimicrobianos. La resistencia se encuentra ampliamente distribuida y para imipenem se reporta hasta el 0.4% (Lee *et al.*, 2005), para aminoglucósidos hasta el 51%, y para fluoroquinolonas del 64 al 100% (Corkill, Anson & Hart, 2005), por lo que las opciones para el correcto tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacter* sp son limitadas.

CONCLUSIONES

Actualmente, existe una urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias para combatir específicamente la resistencia a los antimicrobianos del grupo de bacterias

ESKAPE, ya que este grupo es la mayor amenaza a los sistemas de salud pública en todo el mundo, por lo que es necesaria una rápida acción para tratar este problema tan grave. Hasta el momento no ha sido suficiente la implementación de terapias empleando combinaciones de fármacos y desafortunadamente, no parecen existir avances en el desarrollo de nuevos antimicrobianos contra *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Se han hecho grandes esfuerzos en el desarrollo de nuevos inhibidores de B-lactamasas y de sistemas de expulsión; sin embargo, esto no ha sido suficiente y por el momento es urgente explorar nuevas alternativas, como podrían ser: terapia con bacteriófagos acoplados con la tecnología CRISPR/Cas (Chávez-Jacobo, 2018) y el uso de terapia fotodinámica (Nakoneczna *et al.*, 2019). Por el momento tenemos que poner todas nuestras esperanzas en el desarrollo y perfeccionamiento de estas nuevas estrategias, ya que siguen siendo inestables y resultan tóxicas para el paciente. Sin embargo, podrían convertirse en la mejor alternativa para tratar infecciones causadas principalmente por el grupo de bacterias ESKAPE.

AGRADECIMIENTOS

Como alumno del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas: Opción Biología Experimental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo agradezco la beca otorgada por el CONACYT (483024).

REFERENCIAS

- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery – Major classes and health impact. *Biochem. Pharmacol.*, 133, 4-19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.001>.
- Antunes, L. C. S., Visca, P. & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.*, 71(3), 292-301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>.
- Appelbaum, P. C. (2007). Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.*, 45(3), 165-170. <https://doi.org/10.1086/519474>.
- Baroud, M., Dandache, I., Araj, G. F., Wakim, R., Kanj, S., Kanafani, Z., Khairallah, M., Sabra, A., Shehab, M., Dbaibo, G. & Matar, G. M. (2013). Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *Int. J. Infect. Dis.*, 41, 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.08.010>.
- Boubaker, K., Diebold, P., Blanc, D. S., Vandenesch, F., Praz, G., Dupuis, G. & Troillet, N. (2004). Panton-Valentine leukocidin and Staphylococcal skin infections in schoolchildren. *Emerg. Infect. Dis.*, 10(1), 121-124. <https://doi.org/10.3201/eid1001.030144>.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- Breslow, J. M., Momroy, M. A., Daly, J. M., Meissler, J. J., Gaughan, J., Adler, M. A. & Eisenstein, T. K. (2011). Morphine, but not trauma, sensitizes to systemic *Acinetobacter baumannii* infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 6(4), 551-565. <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9303-6>.
- Brown, D. F. J., Hope, R., Livermore, D. M., Brick, G., Broughton, K., George, R. C. & Reynolds, R. (2008). Non-susceptibility trends among enterococci and non-pneumococcal streptococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J. Antimicrob. Chemother* 62(2), 75-85. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn354>.
- Chambers, H. F. & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(9), 629-641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>.
- Chávez-Jacobo, V. M. (2018). El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.*, 21(2), 116-123. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.138>.
- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Pérez-Gallardo, R. V., Campos-García, J., Gutiérrez-Corona, J. F., García-Merinos, J. P., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, J. & Ramírez-Díaz, M. I. (2018). CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother*, 62 (6), e02629-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02629-17>.
- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios Camacho, H., Ortiz-Alvarado, R., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, J. & Ramírez-Díaz, M. I. (2019). Prevalence of the crpP gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican Hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* DOI: 10.1093/jac/dky562 <https://doi.org/10.1093/jac/dky562>.
- Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S. & Lee, J. C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol.*, 7(8), 1127-1138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x>.
- Clegg, S. & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol. Spectr.*, 4(1), UTI-0005. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>.
- Crofts, T. S., Gasparini, A. J. & Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15(7), 422-434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>.
- Corkill, J. E., Anson, J. J. & Hart, A. (2005). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA

- in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 1115-1117. <https://doi.org/10.1093/jac/dki388>.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. & Pagés, J. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**(4), e00002-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>.
- De Champs, C., Sauviant, M. P., Chanal, C., Sirot, D., Gazuy, N., Malhuret, R., Bagnuet, J. C. & Sirot, J. (1989). Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- β -lactamases-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, **27**(12), 2887-2890.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V. & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**(9), 523-239. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>.
- D'Costa, V. M., King, E. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N. & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, **477**, 457-561. <https://doi.org/10.1038/nature10388>.
- Duijkeren, E., Schink, A., Roberts, M. C., Wang, Y. & Schwarz, S. (2018). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbiol. Spectr.* **6**(1), ARBA-0019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017>.
- Fisher, K & Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, **155**, 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>.
- Gardete, S. & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, **124**(7), 2836-2840. <https://doi.org/10.1172/JCI68834>.
- Goto, K., Kawamura, K. & Arakawa, Y. (2015). Contribution of QnrA, a plasmid-mediated quinolone resistance peptide, to survival of *Escherichia coli* exposed to a lethal ciprofloxacin concentration. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **68**, 196-202. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.153>.
- Kang, M., Xie, Y., He, C., Chen, Z. Y., Guo, L., Yang, Q., Liu, J. Y., Du, Y., Ou, Q. S. & Wang, L. L. (2014). Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu, China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **33**(6), 933-939. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2029-z>.
- Kojima, S. & Nikaido, H. (2013). Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110** (28), E2629-2634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310333110>.
- Kosmidis, C., Schindler, B. D., Jacinto, P. L., Patel, D., Bains, K., Seo, S. M. & Kaatz, G. W. (2012). Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **40**, 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.014>.
- Lavigne, J. P., Sotto, A., Nicolas-Chanoine, M. H., Bouziges, N., Pagés, J. M. & Davin-Regli, A. (2013). An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **41**, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.010>.
- Lee, C., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C., Jeong, B. C. & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect. Microbiol.*, **7**, 55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.
- Lee, H. K., Park, Y., Kim, J., Chang, E., Cho, S. G., Chae, H. S. & Kang C. S. (2005). Prevalence of decreased susceptibility to carbapenems among *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, and *Citrobacter freundii* and investigation of carbapenemases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **52**(4), 331-336. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.04.012>.
- Livermore, D. M., Hope, R., Brick, G., Lillie, M. & Reynolds, R. (2008). Non-susceptibility trends among enterobacteriaceae from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-2006. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**(2), 41-54. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn351>.
- Lupo, A., Haenni, M. & Madec, J. (2018). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol. Spectrum.*, **6**(3), ARBA-0007. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017>.
- Messi, P., Guemieri, E., Niederhaussem, S., Sabia, C. & Bondi, M. (2006). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **107**(2), 218-222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.026>.
- Mezzatesta, M. L., Gona, F. & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clonical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.*, **7**(7), 887-902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>.
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016). Mechanism of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.*, **4**(2), VMF-0016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- Nakonieczna, J., Wozniak, A., Pieranski, M., Rapacka-Zdonczyk, A., Ogonowska, P. & Grinholc, M. (2019). Photoinactivation of ESKAPE pathogens: overview of novel therapeutic strategy. *Futurs Med. Chem.* **11**(5), 443-461. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0329>.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**(4), 593-656. <https://doi.org/10.1128/mmb.67.4.593-656.2003>.
- O'Neil, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on antimicrobial resistance. amr-review.org. <https://amr-review.org>.

- review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. Revisado el 8 de Agosto de 2019.
- Ogier, J. & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, **126**, 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.*, **37** (1), 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.
- Peleg, A. Y., Seifert, H. & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**(3), 538-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>.
- Pumbwe, L. & Piddock, L. J. V. (2000). Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**(10), 2861-2864. <https://doi.org/10.1128/aac.44.10.2861-2864.2000>.
- Quennan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**(3), 440-458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.*, **197**(8), 1079-1081. <https://doi.org/10.1086/533452>.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Buch, K. & Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.*, **12**(1), 83-88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>.
- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M. & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**(1), 33-41. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x>.
- Sakoulas, G. & Moellering, R. C. (2008). Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin. Infect. Dis.*, **46**(5), 360-367. <https://doi.org/10.1086/533592>.
- Serio, A. W., Keepers, T., Andrews, L. & Krause, K. M. (2018). Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation. *Eco. Sal. Plus*, **8**(1), e1-20. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018>.
- Shore, A. C., Deasy, E. C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R. & Coleman, D. C. (2011). Detection of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**(8), 3765-3773. <https://doi.org/10.1128/AAC.00187-11>.
- Smith, C. A. & Baker, E. N. (2002). Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr. Drug Target Infect. Disord.*, **2**(2), 143-160. <https://doi.org/10.2174/1568005023342533>.
- Sommer, M. A. O., Munck, C., Toft-Kehler, R. S. & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**(11), 689-696. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75>.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ovellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U. & Magrini, N. (2018). Discovery, research, and the development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotics-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*, **18**, 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- Tran, Q., Williams, S., Farid, R., Erdemli, G. & Pearlstein, R. (2013). The translocation kinetics of antibiotics through porin OmpC: insights from structure-based solvation mapping using Water Map. *Proteins*, **81**(2), 291-299. <https://doi.org/10.1002/prot.24185>.
- Vestergaard, M., Frees, D. & Ingmer, H. (2019). Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiol. Spectr.*, **7**(2), GPP3-0057. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018>.
- Viale, P., Giannella, M., Tedeschi, S. & Lewis, R. (2015). Treatment of MDR-Gram negative infections in the 21st century: a never ending threat for clinicians. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **24**, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.07.001>.
- Wright, P. M., Seiple, I. B. & Myers, A. G. (2014). The evolving role of chemical synthesis in antimicrobial drug discovery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**(34), 8840-8869. <https://doi.org/10.1002/anie.201310843>.

VII. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Las quinolonas han sido el centro de un considerable interés tanto científico como clínico desde la síntesis del primer fármaco de este grupo, el ácido nalidíxico (**Figura 1**) (Leshner y col., 1962). Hoy en día ciprofloxacina es una de las quinolonas más empleadas en el tratamiento contra bacterias Gram (-) como *P. aeruginosa* (Emmerson y Jones, 2003), a pesar de que tiene más de tres décadas en uso y del surgimiento de distintos sistemas de resistencia bacterianos.

En nuestro grupo de trabajo se aisló el plásmido pUM505 de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1986; Cervantes y Ohtake. 1988) y se determinó que cuando se transfiere a la cepa estándar de laboratorio *P. aeruginosa* PAO1 confiere resistencia a ciprofloxacina; sin embargo, cuando el plásmido fue secuenciado y su secuencia analizada, no se identificó ninguno de los genes de resistencia a quinolonas reportados hasta ese momento (Ramírez-Díaz y col., 2011), por lo que resultó de interés identificar los genes responsables de la resistencia a quinolonas. Debido a que los sistemas de resistencia reportados hasta el momento pueden conferir resistencia a múltiples quinolonas, por ejemplo, QepA confiere resistencia a ciprofloxacina y a norfloxacina; se decidió determinar si el plásmido pUM505 puede conferir resistencia a otras quinolonas, además de a ciprofloxacina. Nuestros resultados muestran que el plásmido pUM505 puede conferir resistencia a ciprofloxacina, norfloxacina y moxifloxacina en *P. aeruginosa* PAO1. Para determinar cuál determinante genético es responsable de la resistencia a quinolonas conferido por el plásmido pUM505 se realizó un nuevo análisis *in silico* y se encontró que la proteína de 65 aminoácidos codificada por el *orf131* posee similitud con la proteína APH-IIb, una proteína de la familia de las aminoglucósido fosfotransferasas (APH) que es capaz de conferir resistencia a

kanamicina, gentamicina y estreptomina (Smith y Baker. 2002). La proteína CrpP muestra identidad baja (18%) con la proteína APH-IIb de *P. aeruginosa* M18 que es capaz de conferir resistencia a kanamicina, gentamicina y estreptomina mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP a alguno de los grupos hidroxilo que presentan estos antibióticos (Wu y col., 2011). Se ha encontrado que para las enzimas de la familia APH los porcentajes de identidad son del 20–40% y presentan importantes residuos conservados particularmente en el extremo carboxilo terminal, que se encargan de la catálisis y la unión con los aminoglucósidos, mientras que en el extremo amino terminal se encuentran residuos involucrados principalmente con la unión al ATP (Smith y Baker. 2002). La proteína CrpP no posee los residuos catalíticos reportados para las proteínas APH, sin embargo, presenta dos residuos conservados, la Gly7 (involucrado en la catálisis) y la Ile26 (relacionado con la unión a ATP). Además, ha sido reportado que los residuos de los dominios involucrados en catálisis y en la unión con el ATP puede variar entre las subfamilias de APH, por lo que, la proteína CrpP puede conferir resistencia a antibióticos y las variaciones en la secuencia le pueden permitir el reconocimiento de sustratos diferentes.

La sola presencia del gen *crpP* no confiere resistencia cuando se transfiere a una cepa de *P. aeruginosa* PAO1, sin embargo, esto puede deberse a la resistencia intrínseca que presenta esta cepa (Hancock. 1998), ya que la transferencia del plásmido pUM505 confiere resistencia a ciprofloxacina, norfloxacina y moxifloxacina lo que sugiere que el plásmido pUM505 puede contener determinantes de resistencia adicionales a *crpP* que juntos confieren la resistencia en *P. aeruginosa*. El gen *crpP* fue transferido a la cepa *E. coli* J53-3 y se encontró que confiere resistencia a ciprofloxacina, pero no al resto de las quinolonas que se probaron (ácido nalidíxico, norfloxacina, moxifloxacina y levofloxacina), ni a los aminoglucósidos

(kanamicina, estreptomina, gentamicina y amikacina) lo cual indica que la proteína CrpP confiere resistencia de manera selectiva a ciprofloxacina en *E. coli*. La capacidad de conferir resistencia de manera selectiva a un solo antibiótico no es algo inusual y se sabe que las proteínas de la familia APH presentan perfiles de resistencia muy variables, por ejemplo, APH(3') únicamente fosforila kanamicina y neomicina (Smith y Baker. 2002).

La actividad *in vitro* de la enzima CrpP purificada se determinó para entender el mecanismo de la enzima en la resistencia a ciprofloxacina. CrpP mostró actividad enzimática a ciprofloxacina y norfloxacina cuando estos fueron usados como sustratos. Debido a que no se observó actividad contra las quinolonas: ácido nalidíxico, moxifloxacina y levofloxacina, y los aminoglucósidos kanamicina y estreptomina, se sugiere que la enzima CrpP es específica contra ciprofloxacina y norfloxacina. La determinación de los parámetros cinéticos indica que los valores de K_m para ambos antibióticos son similares, mientras que la V_{max} para ciprofloxacina fue siete veces superior que la de norfloxacina. El cociente calculado V_{max}/K_m fue 5 veces superior para ciprofloxacina, lo cual puede explicar porque no se observa un fenotipo de resistencia a norfloxacina cuando se clonó el gen *crpP* en *E. coli* J53-3. La familia APH incluye varios miembros que son capaces de conferir patrones de resistencia diferenciales y específicos, así que los miembros de esta familia pueden conferir resistencia a antibióticos específicos (Robicsek y col., 2006). Se obtuvieron resultados similares cuando se caracterizó la enzima AAC(6')-Ib-cr, que es más eficiente modificando kanamicina que ciprofloxacina, lo que sugiere especificidades diferenciales entre estos dos antibióticos. Además, CrpP utiliza ATP como cosustrato, lo que indica que la actividad es dependiente del ATP y por lo tanto sugiere que el mecanismo de acción de CrpP puede consistir en la fosforilación del antibiótico, debido a que las enzimas APH catalizan la

transferencia de un grupo fosfato a un aminoglucósido, y muchas de estas enzimas utilizan ATP como donador del grupo fosfato (Ramírez y Tolmasky. 20).

Adicionalmente, se analizaron los metabolitos derivados de la reacción de CrpP y ciprofloxacina mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS-MS) y los resultados sugieren que la molécula de ciprofloxacina sufre una modificación. Los resultados revelaron la presencia de un ion molecular que corresponde a ciprofloxacina-ATP (mz=820), además de varios intermediarios de la degradación de esta molécula. De manera adicional se verificó la modificación de la molécula de ciprofloxacina mediante espectrometría de infrarrojo. Los resultados obtenidos sugieren que la molécula de ciprofloxacina se activa mediante la unión con el ATP, posteriormente se fosforila y finalmente se degrada. Por lo que *crpP* codifica una proteína capaz de conferir resistencia a ciprofloxacina de manera específica, dependiente de ATP y que involucra la fosforilación del antibiótico.

La resistencia a quinolonas es cada vez más común de encontrar en infecciones bacterianas y se han realizado múltiples estudios para identificar la presencia de determinantes plasmídicos de resistencia (PMQR por sus siglas en inglés) en enterobacterias aisladas de humanos, animales y comida; y los resultados encontrados muestran que la prevalencia promedio de *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *aac(6')-Ib-cr* son: 1.5%, 4.6%, 2.4% y 10.8% respectivamente (Strahilevitz y col., 2009). Por lo que respecta al determinante de resistencia *crpP*; el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* fue aislado desde 1986 y aunque su secuencia se reportó en 2011 no se había investigado hasta el momento la presencia del gen *crpP* en aislados de origen clínico (Ramírez-Díaz y col., 2011). Para determinar la presencia de *crpP* en diferentes grupos de bacterias Gram (-), se analizó una colección de aislados clínicos de

enterobacterias productoras de β lactamasas de espectro extendido (ESLB por sus siglas en ingles). Se identificaron homólogos a *crpP* en estos grupos de cepas con una frecuencia de 5.19%, lo que indica que se encuentra moderadamente distribuido y debido a que las cepas que contiene el gen presentan resistencia a ciprofloxacina, se sugiere que *crpP* participa en la resistencia hospitalaria. En general, la prevalencia de *crpP* fue superior en *E. coli* (75%), seguido por *K. pneumoniae* (25%). Comparando la prevalencia de otros determinantes reportados previamente, con los resultados obtenidos aquí, se encontró a *crpP* con una frecuencia más baja comparado con los genes *qnr* (21%) y *aac(6')-Ib-cr* (43%) (Silva-Sánchez y col., 2011).

Debido a que la resistencia a quinolonas se asocia comúnmente con determinantes plasmídicos, con el propósito de determinar la distribución de homólogos a *crpP* en elementos móviles se analizó también un grupo de 68 transconjugantes con plásmidos de origen clínico con ESBL aislados de diferentes hospitales de México. Los resultados muestran que el 7.35% de las transconjugantes posee un gen homólogo a *crpP*, lo que indica que el gen se encuentra moderadamente distribuido y que puede ser movilizado mediante transferencia horizontal para contribuir a la resistencia hospitalaria a ciprofloxacina.

Se analizó la secuencia de los genes homólogos a *crpP* y se encontró que todos presentan un probable promotor AlgU (σ^E) lo cual indica una probable regulación similar. El promotor AlgU de *P. aeruginosa* es ortólogo al promotor σ^E de *E. coli*, un factor sigma alternativo que dirige la transcripción de genes de respuesta a condiciones extrema de estrés, como podría ser, la presencia de moléculas antibióticas (Firoved y col., 2002). En general, los homólogos a *crpP* codifican proteínas pequeñas, similares en tamaño a CrpP de pUM505 y se encuentran más conservadas en la región amino terminal que en el extremo carboxilo. Estos resultados

nos indican que las proteínas parecidas a CrpP podrían constituir una familia no conservada en cuanto a su secuencia primaria, pero que poseen la misma función. A pesar de las diferencias entre las estructuras secundarias se observaron aminoácidos conservados en todos los homólogos: Gly7, Thr8, Asp9, Lys33, Gly34 y Cys40, lo que sugiere que estos residuos podrían ser importantes para la función de las proteínas. Debido a las diferencias estructurales presentadas por las proteínas estos genes homólogos fueron clonados y transferidos a *E. coli* J53-3 donde se determinó que todos los genes confieren resistencia a ciprofloxacina probablemente mediante el mismo mecanismo de fosforilación de CrpP de pUM505.

Debido a que se observaron diversos aminoácidos conservados en las proteínas homólogas se decidió introducir modificaciones en los codones que codifican estos residuos para determinar su importancia en la función de la proteína CrpP. Los cambios en los residuos Gly7, Asp9 y Lys33 por un residuo de alanina, provocó que las cepas de *E. coli* BL21 transformadas con el gen modificado adquirieran un fenotipo de susceptibilidad a ciprofloxacina con respecto de una cepa que contiene el gen *crpP* nativo. Se determinó también la actividad enzimática de las proteínas modificadas y se confirmó su incapacidad para modificar ciprofloxacina con respecto de la proteína nativa. Los resultados nos indican que los residuos de Gly7, Asp9 y Lys33 son esenciales para la función de la proteína CrpP, lo cual sugiere que podrían estar relacionados con la catálisis, debido a que cuando se reemplazaron estos residuos la K_m aumenta al menos dos veces, mientras que la V_{max} disminuye hasta cuatro veces. Cuando se modificaron las concentraciones del cosustrato ATP se observó un resultado similar, lo cual refuerza la hipótesis de que los residuos Gly7, Asp9 y Lys33 son esenciales para la catálisis.

La modificación en el codón que codifica para el residuo Cys40 por un residuo de alanina, provocó un fenotipo de susceptibilidad a ciprofloxacina, similar al observado con las modificaciones mencionadas anteriormente, sin embargo, cuando se determinó la actividad enzimática se observó que está se encuentra totalmente eliminada, tanto a ciprofloxacina como a ATP. Estos resultados sugieren que el residuo de cisteína es esencial para la actividad catalítica de la proteína CrpP, debido a la capacidad de los residuos de cisteína para formar puentes disulfuro, se cree que puede estar involucrado tanto en la catálisis como en la regulación estructural de la proteína CrpP. Finalmente, la modificación del codón que codifica el residuo de Ile26 por alanina, provocó un fenotipo de susceptibilidad intermedia a ciprofloxacina, pero solo un ligero decremento en su actividad enzimática, lo cual sugiere que el residuo de Ile26 no es esencial para la actividad de la proteína CrpP.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que el gen *crpP* confiere resistencia a ciprofloxacina a través de un sistema de modificación de fosforilación del antibiótico, que emplea ATP como sustrato. Además, fue posible determinar que *crpP* se encuentra distribuido en aislados de origen clínico de hospitales mexicanos y que los homólogos encontrados conservan residuos importantes para la función de la proteína CrpP, como son Gly7, Asp9, Lys33 y Cys40.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aldred, K. J., Kerns R. J. y Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53: 1565-1574.

Alekshun, M. N. y Levy, S. B. (1999). Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *J Bacteriol* 181: 4669-4672.

Ball, P., Fernald, A. y Tillotson, G. (1998). Therapeutic advances of new fluoroquinolones. *Expert Opin. Investig. Drugs* 7: 761-783.

81

Bisacchi, G. S. y Mancherter, J. L. (2015). A new-class antibacterial-almost. Lessons in drug discovery and development: a critical analysis of more than 50 years of effort toward ATPase inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV. *ACS Infect Dis* 1 (1): 4-41.

Brighty, K. E. y Gootz, T. D. (2000). Chapter 2: Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. En Andriole V., T., ed. *The quinolones* 3rd ed. San Diego: Academic Press.

Cambau, E., Perani, E., Dib, C., Petinon, C., Trias, J. y Jarlier, V. (1995). Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to Imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2248-2252.

Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 56: 173-176.

Cervantes-Vega, C., Chávez, J., Córdova, NA., De la Mora, P. y Velasco, J. A. (1986). Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48: 159-163.

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

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

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

Correia, S., Poeta, M., Hebraud, M., Capelo, J. L. y Igrejas, G. (2017). Mechanism of quinolone action and resistance of quinolone action and resistance: Where do we stand? *J Med Microbiol* 66: 551-559.

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

- Emmerson, A. M. y Jones, A. M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother.* 51: 13-20.
- Ezelarab, H. A. A., Abbas, S. H., Hassan, H. A. y Abu-Rahma, G. E. A. (2018) Recent updates of fluoroquinolone as antibacterial agents. *Arch Pharm* 351(9): 1-13.
- Firoved, A. M., Boucher, J. C. y Deretic, V. (2002) Global genomic analysis of AlgU (E)-dependent promoters (Sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and implications for inflammatory processes y cystic fibrosis. *J Bacteriol* 184 (4): 1057-1064.
- Friedman, S. M., Lu, T. y Drlica, K. (2001). Mutation in the DNA gyrase a gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2378-2380.
- Forterre, P. Gribaldo, S., Gadelle, D. y Serre, M. C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 89: 427-446.
- Hancock, R. E. (1998) Resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27: S93-S99.
- Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A. H. y Sorensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3332-3337.
- Hernández, A., Sánchez, M. B. y Martínez J. L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front Microbiol* 2: 1-6.
- Hoiby, N. (2011). Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Medicine* 9: 1-7.
- Khodursky, A. B., Zechiedrich, E. I. y Cozzarelli, N. R. (1995). Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl acad Sci USA* 92: 11801-11805.
- Khodursky, A. B. y Cozzarelli N. R. (1998). The mechanism of inhibition of Topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem* 273: 27668-27677.
- Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X., Sawhney, R., Thompson, A. W., McAuley, K. E., Fisher, L. M. y Sanderson, M. R. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat Struct Mol Biol* 16: 667-669.
- Leo, E., Gould, K., Pan, S., Capranico, G., Sanderson, M., Palumbo, M. y Fisher, L. M. (2005). Novel symmetric and asymmetric DNA scission determinants for *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV and gyrase are clustered at the DNA breakage site. *J Biol Chem* 280: 14252-14263.

- Leshner, G. Y., Froelich, E. J. Gruett, M. D., Bailey, J. H. y Brundage R. P. (1962). 1,8-Naphthyridine derivates: a new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* 5: 1063-1068.
- Martínez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 276: 2521-2530.
- Martínez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernández, A., Garmendia, L., Fajardo, A. y Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 33: 430-449.
- Martínez, M. L., Pascual, A. y Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351: 797-799
- Mizuuchi, K., Fisher, L. M., O'Dea, M. y Gellert, M. (1980). DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1847-1851.
- Piddock, L. J., Walters, R. N. y Diver, J. M. (1990). Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2331-2336.
- Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4: 629-636.
- Poirel, L., Cattoir, V. y Nordmann, P. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance: interactions between human, animal, and environment ecologies. *Front Microbiol* 3: 1-7.
- Ramírez, M. S. y Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Update* 13(6): 151-171.
- Redgrave, S. L., Sutton, B. S., Webber, A. M. y Piddock, J. L. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 22: 438-445.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K. y Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside-acetyltransferase. *Nat Med* 12: 83-88.
- Shen, L. L. y Pernet, A. G. (1985). Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: the target of the drugs is DNA. *Proc Natl Acad. Sci USA* 82:307-311.
- Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Bello-Díaz, M., Sánchez-Pérez, A., Rojas, T., Bacterial Resistance Consortium y Garza-Ramos, U. (2011). Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Mexico. *Microb Drug Resist* 17(4): 497-505.

- Smith, C. A. y Baker, E. N. (2002) Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Current Drug Targ Infect Disord* 2(2): 1-18.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. y Robicsek A. Plasmid mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. (2009). *Clin Microbiol Rev* 22(4): 664-689.
- Tran, J. H., Jacoby, G. H. y Hooper D. C. (2005). Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 49:118-125.
- Tran, J. H. y Jacoby, G. H. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5638-5642.
- Vetting, M. W., Hegde, S. S., Fajardo, J. E., Fiser, A., Roderick, S. L., Takiff, H. E. y Blanchard, J. S. (2006). The pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 45: 1-10.
- Wang, H., Dzink-Fox. J. L., Chen, M. y Levy, S. B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1515-1521.
- Wetzstein, H. G., Schmeer, N. y Karl, W. (1997). Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gleophyllum striatum*: identification of metabolites. *Appl Environ Microbiol* 63: 4272-4281.
- Wu, D., Ye, J., Ou, H., Wei, X., Huang, X., He, Y. y Xu, Y. (2011). Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strains *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC Genomics* 12: 1-17.
- Xiong, X., Bromley, E. H. C., Oelschlaeger, P., Woolfson D. N. y Spencer, J. (2011). Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res* 39: 3917-3927.
- Yamagishi, J., Yoshida, H., Yamyoshi, M. y Nakamura, S. (1986). Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 204: 367-373.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T. y Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolones efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3354-3360.
- Yoshida, H. y col., (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1271-1272.

Zhang, G. F., Liu, X., Zhang, S., Pan, B. y Liu, M. L. (2018) Ciprofloxacin derivates and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem* 146: 599-612.