



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

## **“Participación del sistema Toxina-Antitoxina de pUM505 en el crecimiento celular y la estabilidad de plásmidos”**

TESIS

Para Obtener el Título de:

Licenciado en Químico Farmacobiología

Presenta:

p.Q.F.B. Daniel Ángel Ávila Torres

Asesora:

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

Doctora en Ciencias en Biología Experimental

Co-asesora:

M.C. Karen Cecilia Hernández Ramírez

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Morelia Mich., Febrero del 2016

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>I.-INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.- Plásmidos.....	2
2.- Estabilidad plasmídica.....	3
3.- Sistemas Toxina-Antitoxina (TA).....	5
3.1.- Clasificación de los sistemas TA.....	9
3.2.- Mecanismo de acción de los sistemas TA.....	11
3.3.- Usos y aplicaciones de los sistemas TA.....	14
<b>II.-ANTECEDENTES</b> .....	15
1.- Plásmido pUM505.....	15
2.- Probable sistema Toxina-Antitoxina.....	15
3.- Participación del probable sistema TA en la estabilidad de plásmidos.....	17
4.- Sobreexpresión del <i>orf123</i> en <i>E. coli</i> .....	20
<b>III.-JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>IV.-HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>V.-OBJETIVO GENERAL</b> .....	23

<b>VI.-OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>23</b>
<b>VII.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>24</b>
<b>VIII.-MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
1.- Medios de cultivo.....	25
2.- Cepas.....	25
3.- Análisis <i>in silico</i> .....	28
4.- Cinéticas de crecimiento.....	28
5.- Prueba de estabilidad plasmídica.....	28
6.- Aislamiento de DNA plasmídico.....	29
7.- Electroforesis en geles de agarosa.....	30
<b>IX.-RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
1.- Análisis <i>in silico</i> de las proteínas codificadas por los <i>orfs</i> 123 y 124 del plásmido pUM505.....	31
2.- Análisis del perfil de hidrofobicidad.....	31
3.- Determinación de la participación de los <i>orfs</i> 123-124 en la prevalencia de plásmidos.....	34
4.- Efecto de la sobreexpresión de la proteína codificada por el <i>orf</i> 123 en el crecimiento bacteriano.....	37
<b>X.-DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>XI.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>XII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Contexto genético general de un loci TA.....	7
<b>Figura 2.</b> Tipos de Sistemas TA.....	10
<b>Figura 3.</b> Participación de los sistemas de TA en la estabilidad de plásmidos.....	13
<b>Figura 4.</b> Mapa genético del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i> .....	16
<b>Figura 5.</b> Probable sistema TA del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i> .....	18
<b>Figura 6.</b> Determinación de la estabilidad de pJET en presencia o ausencia de los <i>orfs</i> 123-124.....	19
<b>Figura 7.</b> Cinéticas de crecimiento de la transformante <i>E. coli</i> BL21 (pTrc_orf123) en presencia y ausencia de IPTG.....	21
<b>Figura 8.</b> Plásmido recombinante pJET_orf123-124.....	26
<b>Figura 9.</b> Vector de sobreexpresión pTrcHisC y plásmido recombinante pTrc_orf123.....	27
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática de la estructura secundaria de las proteínas ORF123 y 124 de pUM505.....	32
<b>Figura 11.</b> Perfil de hidrofobicidad de las proteínas codificadas por los <i>orfs</i> 123 y 124 del plásmido pUM505.....	33
<b>Figura 12.</b> Plásmidos aislados a partir de subcultivos de transformantes de <i>E. coli</i> JM101.....	36
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de <i>E.coli</i> /BL21 en presencia del <i>orf</i> 123.....	38
<b>Figura 14.</b> Cinética de crecimiento de la cepa de <i>E.coli</i> /BL21 con el vector pTrc_orf123 en presencia y ausencia de IPTG.....	39
<b>Figura 15.</b> Efecto del incremento de la expresión del producto del <i>orf</i> 123 en el crecimiento de <i>E.coli</i> /BL21.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Blancos celulares caracterizados de toxinas de Sistemas TA.....	8
---	---

## RESUMEN

El plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* contiene los *orfs*123 y 124 que codifican a un probable sistema Toxina-Antitoxina (TA). Los sistemas TA son elementos genéticos pequeños compuestos por un gen que codifica para una toxina y un gen que codifica para una antitoxina. Se ha descrito que los sistemas TA están involucrados en la estabilidad de plásmidos durante la división celular. Cuando los *orfs*123 y 124 fueron clonados en el plásmido pJET y transferidos a *Escherichia coli* la viabilidad de las bacterias fue mayor en comparación con lo observado en las transformantes de *E. coli* con el vector pJET vacío. Aunado a esto la sobreexpresión de la proteína ORF123 causó la inhibición del crecimiento de *E. coli*. Eso sugirió que los *orfs* 123 y 124 del plásmido pUM505 codifican a un sistema TA y que la proteína ORF123 podría ser una toxina que afecta la viabilidad celular. Con el propósito de determinar si los *orfs* 123 y 124 incrementan el mantenimiento plásmidos y por ende su estabilidad, se analizó la presencia del plásmido recombinante pJET\_orf123-124 de las colonias obtenidas durante resiembras consecutivas en medio sin presión selectiva. Los resultados mostraron que el plásmido pJET\_orf123-124 se mantiene hasta la resiembra seis a diferencia del vector pJET el cual se pierde a partir de la resiembra dos. Por otra parte se determinó que conforme se aumenta la expresión de la proteína ORF123 también se incrementa la inhibición del crecimiento de *E. coli*. Esto sugiere que la proteína ORF123 ejerce un efecto tóxico en las células reprimiendo el crecimiento celular y sugiere que éste corresponde al módulo toxina del probable sistema TA codificado en el plásmido pUM505.

**Palabrasclave:** Plásmido, *Pseudomonas aeruginosa*, sistema Toxina-Antitoxina, crecimiento celular, estabilidad plasmídica.

## Abstract

### Participation of the Toxin-antitoxin system of plasmid pUM505 in cell growth and plasmid stability

The pUM505 plasmid of *Pseudomonas aeruginosa* contains the *orfs* 123 and 124 that encode a probable toxin-antitoxin system (TA). TA systems are small genetic elements composed by a gene encoding a toxin and a gene encoding an antitoxin. It has been described that TA systems are involved in the stability of plasmids during cell division. When the *orfs* 123 and 124 were cloned into plasmid pJET and transferred to *Escherichia coli*, bacterial viability was higher compared to that observed in the *E. coli* transformants with pJET empty vector. Coupled with this overexpression of the ORF123 protein caused growth inhibition of *E. coli*. This suggested that the *orfs* 123 and 124 of pUM505 plasmid encode a TA system and the ORF123 protein may be a toxin which affects cell viability. In order to determine whether the *orfs* 123 and 124 increase the maintenance of plasmids and therefore its stability, the presence of recombinant plasmid pJET\_orf123-124 in colonies obtained during consecutive subcultures in medium without selective pressure was analyzed. The results showed that the plasmid pJET\_orf123-124 is maintained until six subculture, in contrast the pJET vector was lost in the subculture two. Moreover it was found that when expression of the ORF123 protein increased also growth inhibition of *E. coli* increased. This indicates that the protein ORF123 exerts a toxic effect on the cells and suppressed cell growth suggesting that this corresponds to the toxin module likely of a TA system TA encoded in the plasmid pUM505.

**Key words:** plasmid, *Pseudomonas aeruginosa*, Toxin-Antitoxin system, cell growth, plasmid stability.

# I.-INTRODUCCIÓN

## 1. Plásmidos

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

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

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

## **2. Estabilidad plasmídica**

Una de las preguntas centrales sobre la biología de los plásmidos, es el cómo pueden ser mantenidos de forma estable en poblaciones bacterianas a largo plazo (Harrison y Brockhurst., 2012). Esto resulta complicado entenderlo debido a los factores que dificultan la supervivencia del plásmido. Los plásmidos presentan un costo energético para la bacteria huésped (Baltrus, 2013), causando una desventaja competitiva además de que pueden perderse durante la división celular (aunque este proceso sea a un ritmo muy lento) (Nordstrom y Austin, 1989). Tomando en cuenta estos dos factores en conjunto, se puede predecir una constante disminución de la frecuencia de plásmidos en la población bacteriana con el paso del tiempo (Summers, 1996). Sin embargo, existen diversos factores que contrarrestan los efectos de la pérdida y contribuyen al mantenimiento del plásmido en las poblaciones bacterianas. La transferencia horizontal del plásmido entre las bacterias (principalmente por conjugación) y la autoreplicación son algunos de los factores que disminuyen el costo energético producido por el

plásmido y el equilibrio entre estos factores determina el destino de un determinado plásmido en una población bacteriana (Simonsen, 1991; Stewart y Levin, 1977; Harrison y Brockhurst, 2012). Sin embargo, la autorreplicación no asegura que el plásmido continúe en la línea celular. Para que puedan ser heredados, existe un conjunto de mecanismos que habitualmente son codificados por el propio plásmido (Actis y col., 1999):

- Sistemas de partición

La forma de evitar la pérdida del plásmido en la herencia vertical es responsabilidad de los sistemas de partición. Estos sistemas se aseguran de que al menos una copia vaya en cada célula hija por cada ciclo celular. Por el simple hecho de que una célula se divide en dos, no implica que se repartan equitativamente las copias que contenga de un plásmido determinado, sobre todo si se trata de plásmidos de bajo número de copias. Dejar al azar la repartición de copias no aseguraría la continuidad. Los sistemas de partición son sistemas activos ejemplos de estos sistemas son el gen *parA*(ATPasa) y *parB*(proteína que se une al centrómero) (Gerdesy col., 2000; Bouety col., 2007).

- Incompatibilidad plasmídica

La incompatibilidad plasmídica se define como el fracaso de dos plásmidos co-residentes para ser heredados de forma estable en ausencia de presión selectiva externa. Esto es, si la introducción de un segundo plásmido desestabiliza la herencia del primero estos dos son incompatibles. Este fenómeno es

consecuencia de compartir elementos de herencia plasmídica, como son los mecanismos de replicación o partición (Novick, 1987; Actis y col., 1999). Sólo plásmidos de diferente grupo de incompatibilidad plasmídica pueden coexistir en la misma célula.

- **Sistemas de adicción**

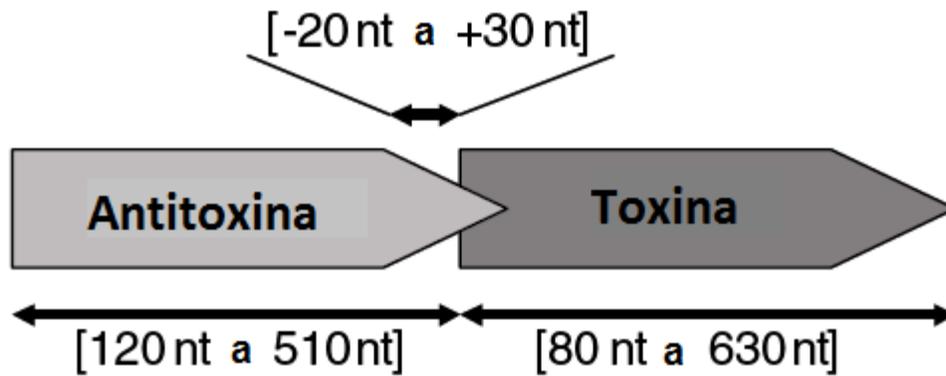
En este tipo de sistemas están conformados por una Toxina y una Antitoxina. La toxina es estable y la antitoxina (que bloquea la acción de la toxina) es inestable. Por lo tanto, la bacteria sólo sobrevive mientras lleve el plásmido, ya que tendrá presente la antitoxina para neutralizar el efecto tóxico (Unterholzner y col., 2013). Estudios anteriores argumentan que los plásmidos solo pueden mantenerse en una población bacteriana cuando son capaces de conjugarse (Bergstromy col., 2000). Sin embargo, avances recientes en la secuencia del genoma han demostrado que, paradójicamente, una gran fracción de plásmidos parece ser no transmisible por conjugación de acuerdo a su secuencia (Smilliey col.,2010). Los mecanismos de los plásmidos no transmisibles que les permite persistir en una población bacteriana durante la división celular son poco conocidos (Peña-Millery col.,2015).

### **3. Sistemas Toxina-Antitoxina (TA)**

Los sistemas toxina-antitoxina son pequeños elementos genéticos, compuestos por un gen que codifica a una toxina y un gen que codifica a su antitoxina asociada, formando un operón. Los genes TA codificados en todas las especies procariontas son pequeños. Según Pandeyy Gerdes(2005), las antitoxinas presentan de 41 a 206 aminoácidos (aa) de longitud y las toxinas de 31 a 204

aa, siendo las antitoxinas generalmente más cortas que sus toxinas asociadas. El orden de los genes está bien definido con la antitoxina río arriba (**Figura 1**). En general, la toxina es más estable que la antitoxina pero este último se expresa a un nivel superior. Si el suministro de la antitoxina se detiene, por ejemplo en condiciones de crecimiento especiales o por pérdida de plásmido, la antitoxina se degrada rápidamente y ya no puede contrarrestar los efectos de la toxina. En consecuencia, la toxina se activa y puede actuar en sus dianas celulares (Unterholzner y col., 2013). Esta toxina puede intervenir en el crecimiento celular apuntando a una molécula blanco en cualquiera de los varios procesos celulares esenciales, incluyendo la síntesis de ATP, la replicación del ADN, la síntesis de proteínas y la biosíntesis de la pared celular (Yamaguchi y col., 2011; Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009). (**Tabla 1**).

El primer sistema TA, *ccdA / ccdB*, fue descrito hace 30 años como un modelo de mejora de la estabilidad del plásmido F de *Escherichia coli* (Ogura y Hiraga, 1983). Los sistemas TA pueden jugar un papel importante en la supervivencia celular bajo condiciones de estrés tales como, falta de aminoácidos, el tratamiento con antibióticos, cambio de temperatura y el estrés oxidativo a pesar de que los sistemas TA no son esenciales para el crecimiento celular normal (Yamaguchi y col., 2011; Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009).



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

**Tabla 1. Blancos celulares caracterizados de toxinas de Sistemas TA.**

<b>Toxina/ Antitoxina</b>	<b>Actividad de la Toxina</b>	<b>Proceso celular <sup>a</sup></b>	<b>Referencia</b>
Hok/Sok	Se integra en la membrana interna de la célula	Síntesis de ATP	Gerdesy col., 1986
CcdB/CcdA	Inhibe la DNA girasa	Replicación	Mikiy col., 1992
ParE/ParD	Inhibe la DNA girasa	Replicación	Jiangy col., 2002
MazF/MazE	Corta el RNAm independiente de ribosoma y corta la RNAr 23S	Traducción	Zhang y col., 2003
RelE/RelB	Corta la unión del RNAm con el ribosoma	Traducción	Christenseny Gerdes, 2003
Kid/Kis	Corta el RNAm independiente de ribosoma	Traducción	Muñoz-Gómez y col., 2005
ymE/SymR	Corta el RNAm	Traducción	Kawanoy col., 2007
Doc/Phd	Se une a la subunidad 30S ribosomal	Traducción	Liuy col., 2008
TisB/IstR-1	Se integra en la membrana interna de la célula	Síntesis de ATP	Unosony Wagner, 2008
HicA/HicB	Corta el RNAm independiente de ribosoma	Traducción	Jørgenseny col., 2009
HipA/HipB	Fosforila a EF-Tu	Traducción	Schumacher y col., 2009
ToxN/ToxI	Corta el RNA	Traducción	Finerany col., 2009
VapC/VapB	Corta el RNAt	Traducción	WintheryGerdes, 2011
RatA/RatB	Se une a la subunidad 50S ribosomal	Traducción	Zhang ylnouye, 2011
ζ/ε	Fosforila la UDP-N-Acetilglucosamina	Síntesis de peptidoglicano	Mutschlery col., 2011

<sup>a</sup>Proceso celular en el que se encuentra cuando interviene la toxina de manera específica.

### **3.1. Clasificación de los sistemas TA**

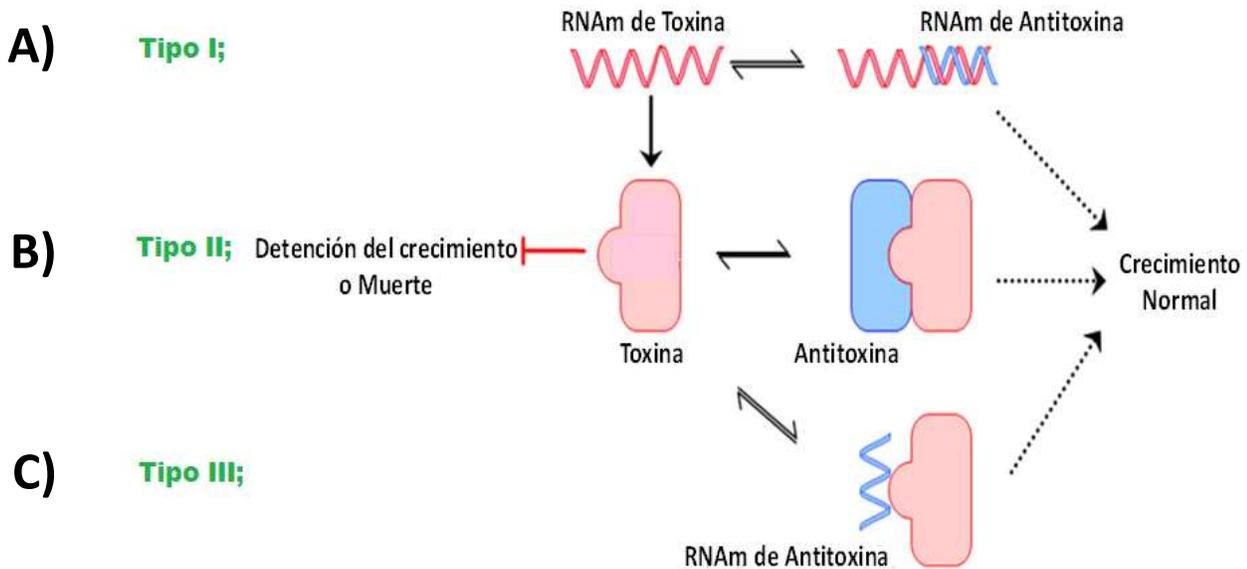
Las toxinas de todos los sistemas TA bacterianos son proteínas caracterizadas, mientras que las antitoxinas son o bien proteínas o ARNs pequeños. En general, la toxina es más estable que la antitoxina. Los sistemas TA se clasifican en tres clases (I-III) de acuerdo a su estructura y regulación genética (**Figura 2**). En el tipo I y III las antitoxinas son pequeñas RNAs no codificantes, mientras que en el tipo II la antitoxina es una pequeña proteína (Unterholzner y col., 2013).

#### **Tipo I**

En los sistemas TA de tipo I, las antitoxinas son RNAs antisentido. En este sistema, la expresión del gen de la toxina es regulada por el RNA antisentido transcrito por la misma región de la toxina en la orientación inversa. Esta interacción ha demostrado prevenir la unión al ribosoma y de este modo detener la traducción del RNAm de la toxina.

#### **Tipo II**

Los sistemas TA de tipo II son los más estudiados en la actualidad. Dentro de esta clase, tanto la toxina como la antitoxina son pequeñas proteínas. La antitoxina forma un complejo proteína-proteína con la toxina lo que da como resultado la neutralización de la toxina. El operón formado en el tipo II, comprende dos pequeños marcos de lectura abiertos donde el gen que codifica a la antitoxina se encuentra río arriba. Sin embargo, se conocen genes conservados, que son la excepción a esta organización



**Figura 2. Tipos de Sistemas TA.** **A)** Sistema de tipo I, el RNA-antitoxina hace un complejo con el RNAm de la toxina, inhibiendo la traducción de la molécula de toxina. **B)** Sistema de tipo II, la antitoxina y la toxina son proteínas, las antitoxinas se unen a las toxinas y bloquean el sitio activo de las toxinas. **C)** Sistema de tipo III, una RNA antitoxina forma un complejo con una proteína toxina. Las toxinas libres en cada sistema de TA conducen a la detención del crecimiento bacteriano y la muerte celular (Park y col., 2013).

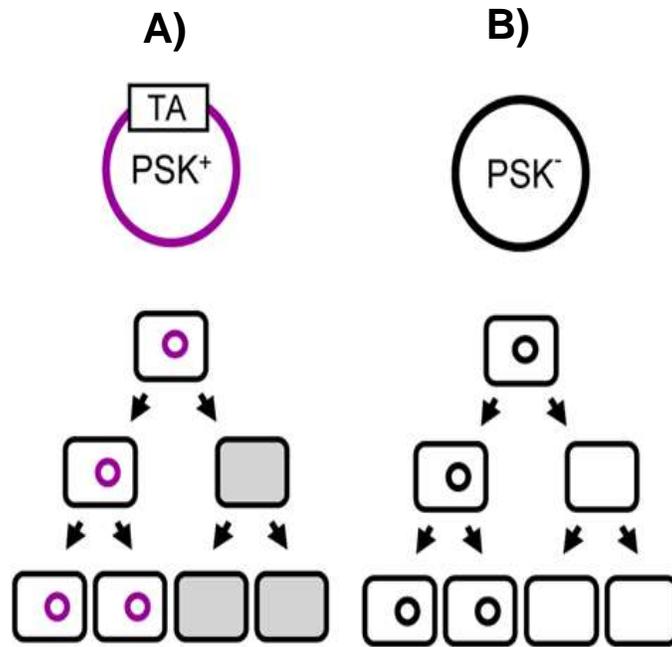
por ejemplo el módulo *higB / HigA* TA, (Tian y col., 1996), *mqsRA* (Brown y col., 2009) y *brnTA* (Heaton y col., 2012) donde el gen de la toxina está situado río arriba del gen de la antitoxina. La presencia de un exceso de la antitoxina respecto a la toxina asegura la formación de un complejo de estas dos proteínas y la inactivación de la toxina. En una situación en la que el nivel celular de la antitoxina disminuye, la toxina ya no puede ser neutralizada. En el caso de los sistemas TA de plásmidos, esto conduce a la detención del crecimiento o a la muerte celular causada por la toxina que actúa libremente en una diana celular específica. Para evitar esto, es necesario que el huésped bacteriano mantenga de forma estable el plásmido que lleva el sistema TA (Brzozowsky Zielenkiewicz, 2013).

### **Tipo III**

Al igual que en los sistemas de tipo I, la antitoxina del tipo III es un RNA antisentido (RNAs). Sin embargo, el modo de interacción es diferente. Por el momento el único miembro caracterizado de esta clase es el Toxi/toxN de *Pectobacterium carotovorum* el cual en un principio fue descrito como un sistema de protección bacteriano contra la infección de bacteriófagos. Su mecanismo de acción no implica la inhibición de la expresión de la toxina, sino que inhibe su actividad mediante el secuestro de la toxina por la formación de un complejo (Blowery col., 2011; Pecotay Wood, 1996).

### **3.2. Mecanismo de acción de los sistemas TA**

La toxina (proteína) presente en los sistemas TA, presenta mayor tiempo de vida que su antitoxina y es considerada como una molécula dañina para las células (Kuniny Ouzounis, 2003). Las moléculas de toxina tienden a ser estables mientras que, las moléculas de antitoxina son inestables lo que lleva a su degradación y continúa producción. De este modo, las moléculas de antitoxina evitan los efectos dañinos de las moléculas de toxina. Los sistemas TA son importantes para la estabilización de los plásmidos, es por ello que si durante la división celular, un sistema TA no se trasmite a una célula hija, la molécula de antitoxina ya no se producirá y al presentar inestabilidad sufrirá una rápida degradación. Esto deja a la toxina libre para atacar sobre sus blancos celulares e inhibir el crecimiento celular, proporcionando de este modo un mecanismo de selección para el mantenimiento del plásmido en la población. Este efecto es denominado muerte post-segregacional o de adicción (**Figura 3**) (Tsuchimotoy col., 1992; Van Melderenycol., 1994). Además, los sistemas TA plasmídicos también son importantes para la competencia plásmido – plásmido en donde, una célula puede contener dos plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad los cuales no pueden ser mantenidos de forma estable en el mismo huésped. Cooper y Heinemann en el 2000 mostraron que los sistemas TA codificados por plásmidos permiten a un plásmido conjugativo competir con otro plásmido conjugativo perteneciente al mismo grupo de incompatibilidad, pero desprovisto del sistema TA.



TA = Sistema Toxina-Antitoxina

PSK= Muerte post-segregacional

**Figura 3. Participación de los sistemas de TA en la estabilidad de plásmidos.**

Ventaja conferida mediante la transferencia vertical de un plásmido que codifica a un sistema TA, aumentando la prevalencia del plásmido en la población bacteriana. **A)** Se muestra en morado aquellas células hijas que heredan una copia del plásmido que codifica a un sistema TA, las cuales muestran un crecimiento normal (PSK<sup>+</sup>). Las células hijas que no heredaron una copia del plásmido, mueren ya que la proteína antitoxina no es producida y la toxina remanente de la división celular (que es estable) ocasiona toxicidad. Esto dará lugar a la muerte selectiva de células libres de plásmido como se muestra en los cuadros grises. **B)** Al ocurrir la transmisión del plásmido, los sistemas TA favorecen la prevalencia de este replicón en la población a comparación de plásmidos que carecen de sistemas TA (PSK<sup>-</sup>) (Van Melderen y Saavedra., 2009).

### **3.3. Usos y aplicaciones de los sistemas TA**

La inestabilidad del plásmido puede ser un grave problema para la producción de proteínas en microorganismos. La pérdida de plásmidos ocasiona por lo general una tasa de crecimiento significativamente mayor que aquellas células que contienen plásmidos. Sin embargo, normalmente para que los plásmidos sean mantenidos se requiere la presencia de un antibiótico durante el crecimiento bacteriano, con el fin de obtener altos rendimientos. Esta práctica es muy costosa además de necesitar el tratamiento especial de residuos para evitar el lanzamiento de antibióticos al medio ambiente (Unterholzner y col., 2013). Por otra parte, resulta difícil mantener la presión selectiva debido a que los antibióticos son rápidamente inactivados por células que han desarrollado resistencia. Como una estrategia alternativa, los sistemas TA pueden ser usados en hospederos que presenten pérdida de plásmidos, al ser complementados con un vector que contenga uno o varios sistemas TA, lo que significativamente pueda mejorar su estabilidad (Pecotay col., 1997). Además, debido a que los sistemas TA tienen un considerable potencial para reprimir el crecimiento o incluso matar a las células, han sido propuestos como posibles blancos para el desarrollo de fármacos antibacterianos (Park y col., 2013, Lioy y col., 2010., Williams y Hergenrother, 2008). Debido a la naturaleza proteica que presentan, los sistemas TA tipo II parecen ser el medio más factible para la activación artificial de compuestos tipo toxinas. El enfoque más directo para la activación de toxinas sería un medicamento que interrumpa complejos TA o impida su formación lo que activaría directamente a la toxina (Unterholzner y col., 2013).

## II.-ANTECEDENTES

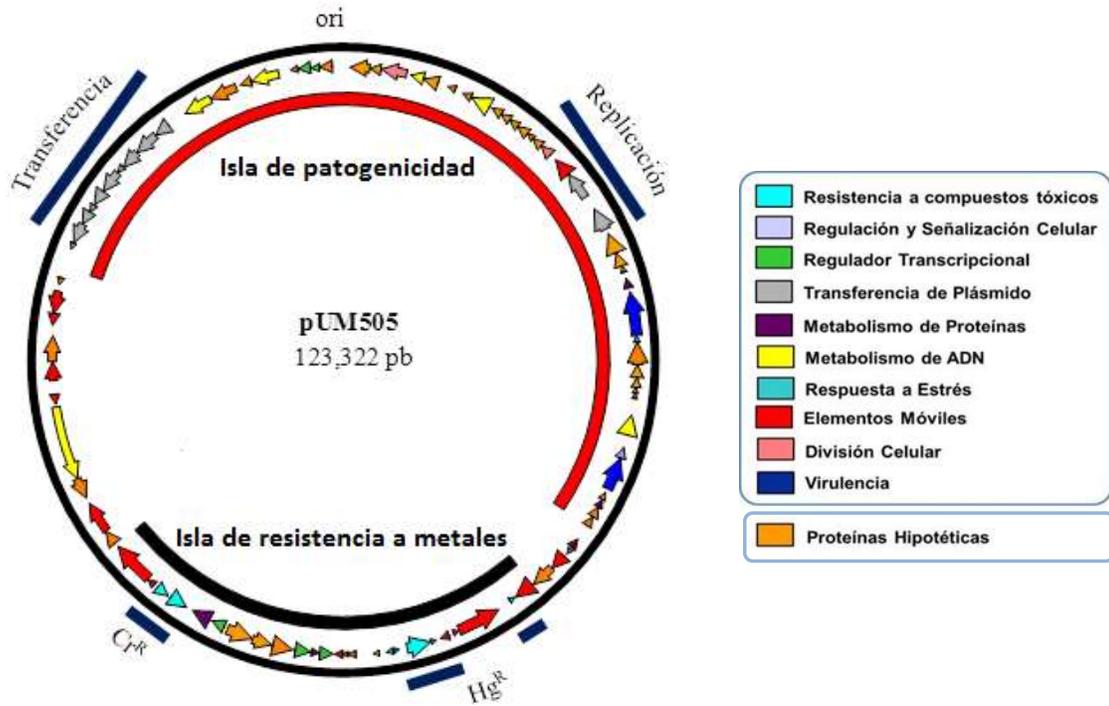
### 1. Plásmido pUM505

El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* de un paciente hospitalizado y se determinó que confiere resistencia a cromato y mercurio (Cervantes y Ohtake, 1988). El plásmido pUM505 es un replicón circular de 123,332 pares de bases (pb) en el que se identificaron 138 regiones codificantes. Cuenta con un origen de replicación (*oriV*) que abarca alrededor de 800 pb en una región de ~17 kilobases (kb) en donde además se localizaron los genes que están probablemente implicados en la conjugación y transferencia del plásmido (Ramírez-Díaz y col., 2011).

En el plásmido también fueron encontradas dos regiones bien definidas correspondientes a islas genómicas pertenecientes a 98 kilobases (kb) del total del plásmido. Una de las regiones, con un tamaño aproximado de 67 kb corresponde a una isla de patogenicidad (PAI) y la segunda región corresponde a una isla con genes de resistencia a metales con aproximadamente 31 kb (**Figura 4**). Se ha descrito que las PAIs codifican a factores de virulencia de bacterias patógenas como son adhesinas, toxinas y los sistemas de secreción de proteínas (Hacker y Kaper, 2000).

### 2. Probable sistema Toxina-Antitoxina

Mediante un análisis *in silico*, se identificó en la PAI del plásmido pUM505 que los

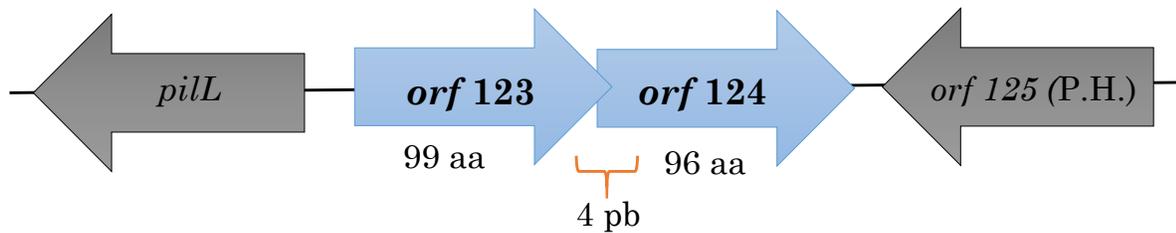


**Figura 4. Mapa genético del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.** En el mapa se muestra con flecha o punta de flecha las regiones codificantes indicando la dirección de la transcripción. En el cuadro de la derecha se muestran las barras de colores con la posible función asignada a cada proteína codificante indicando también las proteínas hipotéticas presentes en el plásmido. Se indican dos regiones, una isla de patogenicidad (barra roja), y una isla de resistencia a metales (barranegra). Se indica el origen de replicación (ori), con barras azules las regiones relacionadas con la transferencia, replicación, resistencia a mercurio ( $Hg^R$ ) y cromato ( $Cr^R$ ) (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

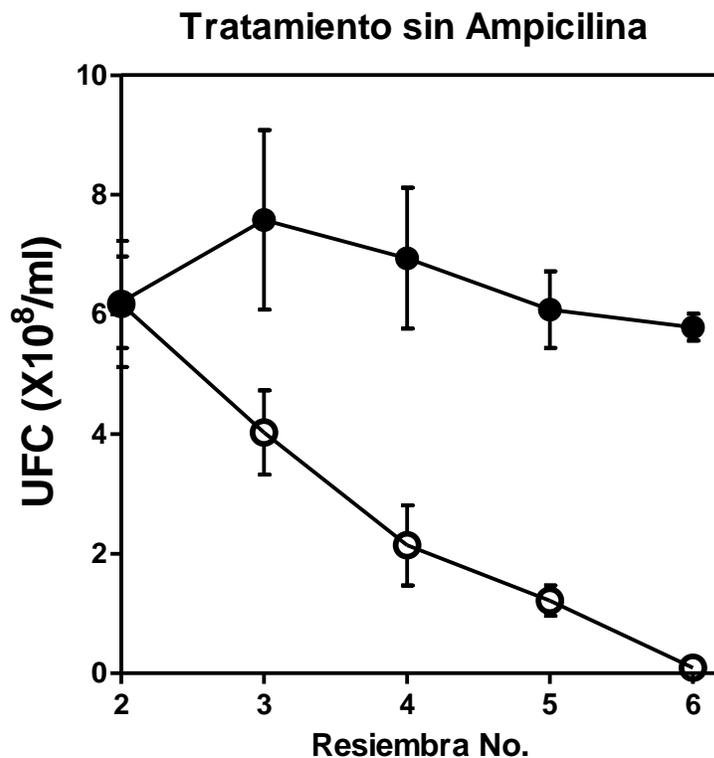
*orfs* 123 y 124 codifican para un probable sistema toxina-antitoxina. El *orf* 123 codifica a una proteína de 99 aa que tiene un 55% de identidad a la proteína RelE del sistema TA de *Klebsiellapneumoniae*(componente tóxico). El *orf*124 codifica a una proteína de 96 aa con un 82% de similitud a la proteína de la antitoxina HTH (Helix-Turn-Helix) de *Pseudomonas alcaligenes*(**Figura 5**). Se determinó que los nucleótidos que codifican a los codones de termino y de paro de los *orfs* 123 y 124, respectivamente, se encuentran traslapados y que estos *orfs* constituyen un operón, el cual es transcrito como un RNAbicistrónico probablemente a partir del promotor identificado rio arriba del *orf*123(Hernández-Ramírez, 2015).

### **3. Participación del probable sistema TA en la estabilidad de plásmidos**

La clonación y transferencia en conjunto de los *orfs*123 y 124 en el vector pJET a cepas de *Escherichia coli* JM101 demostró que estos genes favorecen la viabilidad celular en ausencia de presión selectiva (Ampicilina). Se encontró que las unidades formadoras de colonias(UFC) de las cepas que no tenían al probable sistema TA disminuían de manera significativa a partir del segundo día de resiembra, mientras que aquellas que contaban con la inserción de los *orfs*123 y 124 mantenían el número de UFC durante 6 periodos de resiembra(**Figura 6**) (Hernández-Ramírez, 2015). Esto sugirió que la viabilidad de las bacterias, en ausencia del antibiótico, se debe a que los *orfs* 123 y 124 de pUM505 codifican a un sistema TA que favorece la estabilidad del plásmido. Por lo que es importante determinar la prevalencia del plásmido que contenga los *orfs*123 y 124 en las bacterias crecidas sin presión selectiva.



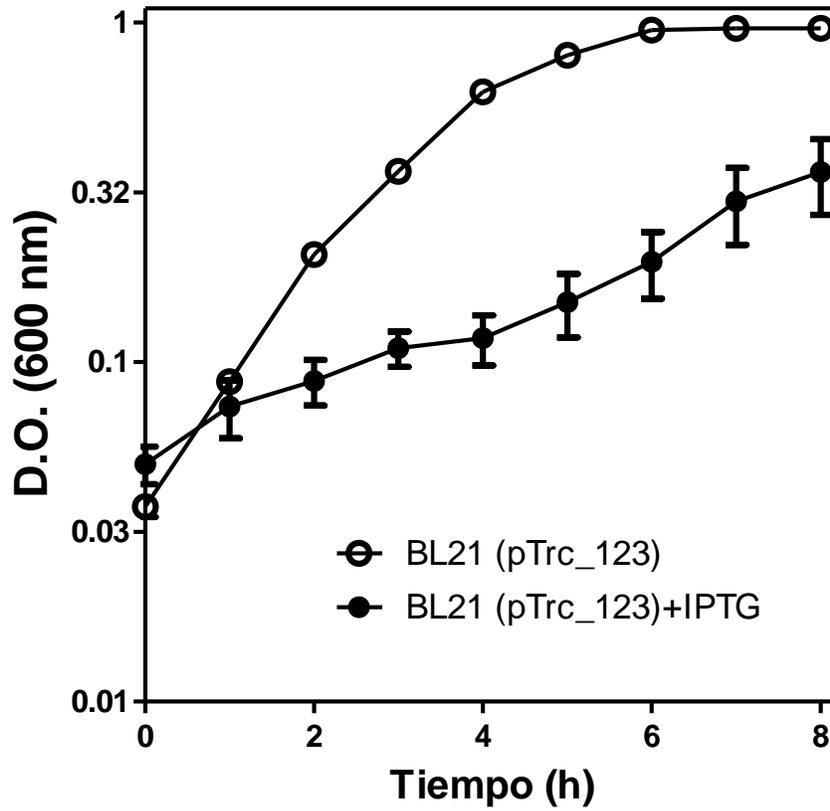
**Figura 5. Probable sistema TA del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.** Arreglo genómico del sistema TA en el plásmido pUM505. Con flechas azules se indican el *orf123* (RelE) y el *orf124* (HTH) con una región sobrepuesta de 4 pb. Se indica el tamaño predicho en aa de las proteínas toxina y antitoxina codificadas, en gris se muestran los genes aledaños (Tomada de tesis de maestría de Hernández-Ramírez, 2015).



**Figura 6. Determinación de la estabilidad de pJET en presencia o ausencia de los *orfs*123-124.** Los cultivos se resembraron durante 6 días consecutivos en 20 ml de CN, con o sin presión selectiva, incubando a 37°C con agitación constante. Se observa la determinación de las UFC obtenidas en cajas de agar nutritivo sin ampicilina y de las resiembras del día 2 al 6. *E. coli* JM101 (pJET\_orf131) (○) y *E. coli* JM101 (pJET\_orf123-124) (●). Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3 (Tomada de tesis de maestría de Hernández Ramírez, 2015).

#### 4. Sobreexpresión del *orf123* en *E. coli*

Transformantes de *E. coli* que sobreexpresan el producto del *orf123* (regulado por el inductor IPTG) mostraron tener inhibición de su crecimiento a altas concentraciones del inductor en comparación con las células que no fueron inducidas. Esto sugirió que el producto del *orf123* es tóxico para *E. coli* (Hernández-Ramírez, 2015) (**Figura 7**). Sin embargo, este efecto no fue evaluado al variar la concentración del inductor.



**Figura 7. Cinéticas de crecimiento de la transformante *E. coli* BL21 (pTrc\_orf123) en presencia y ausencia de IPTG.** Cultivos de *E. coli* BL21 (pTrcHisC) y de la transformante BL21 (pTrc\_orf123) se crecieron en CN a 37 °C con agitación constante por los tiempos señalados. Las figuras cerradas (●) corresponden a los cultivos en presencia de 0.1 mM IPTG. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 4.

### III.- JUSTIFICACIÓN

El plásmido pUM505 contiene los *orfs*123 y 124, que codifican a un probable sistema Toxina-Antitoxina. Estos *orfs* al ser transferidos a *E. coli* permiten el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias cuando se crecen en un medio sin antibiótico como presión selectiva. Aunado a esto, la sobreexpresión del *orf* 123 genera la inhibición del crecimiento de *E. coli*, sugiriendo que la proteína ORF123 genera toxicidad a las células. Con base en lo anterior, es importante determinar la participación del sistema Toxina-Antitoxina de pUM505 en el crecimiento celular y la estabilidad de plásmidos.

### IV.- HIPÓTESIS

Los *orf* 123 y 124 del plásmido pUM505 codifican a un sistema TA de estabilidad plasmídica, además de inhibirel crecimiento bacteriano al incrementar el nivel de la proteína ORF 123.

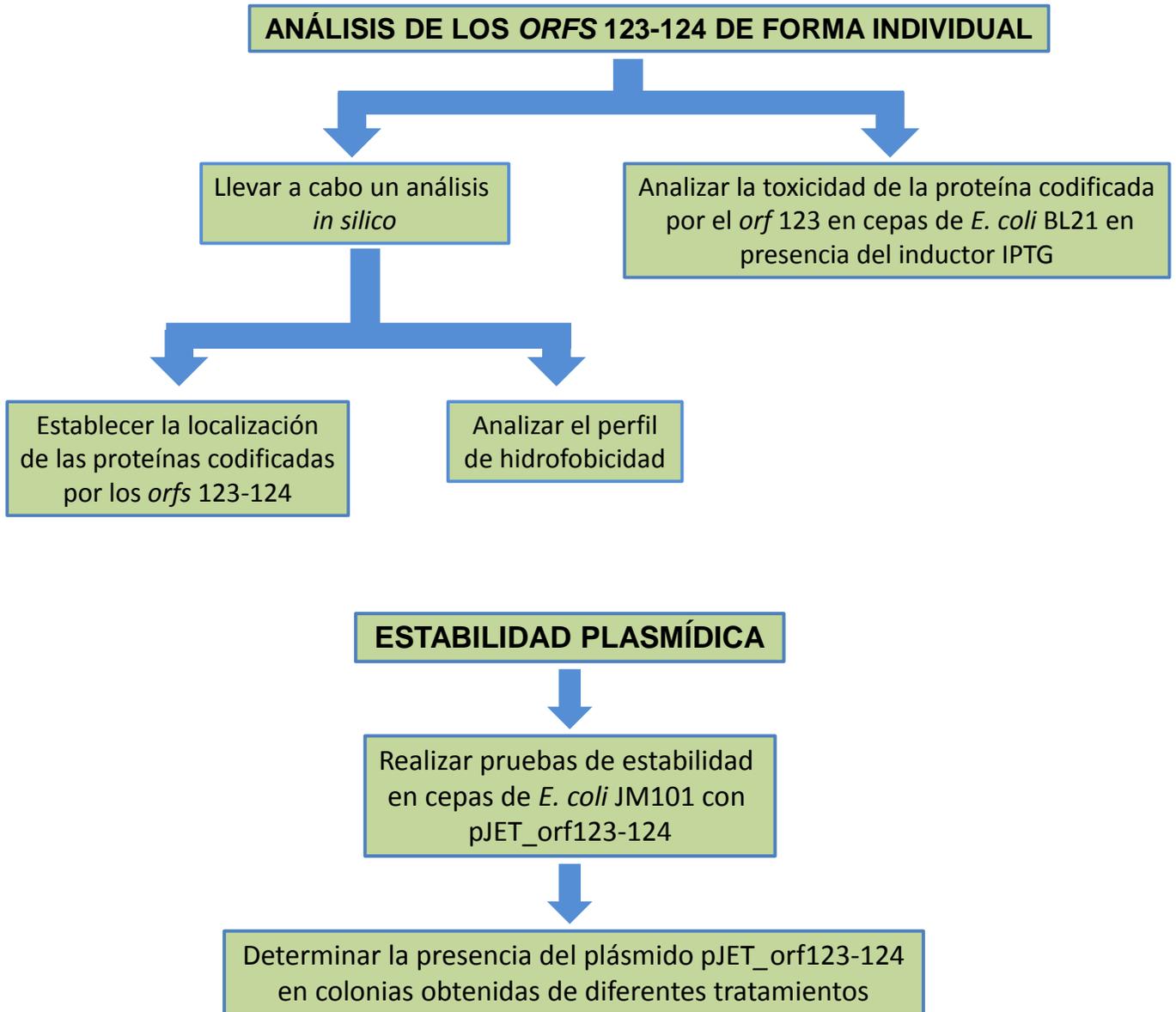
## **V.- OBJETIVO GENERAL**

Analizar la participación del sistema TA del plásmido pUM505 en la prevalencia de plásmidos y en la inhibición celular.

## **VI.- OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Establecer la participación de los *orf*123 y 124 sobre la prevalencia de plásmidos.
2. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de la proteína codificada por el *orf* 123.

## VII.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Medios de cultivo

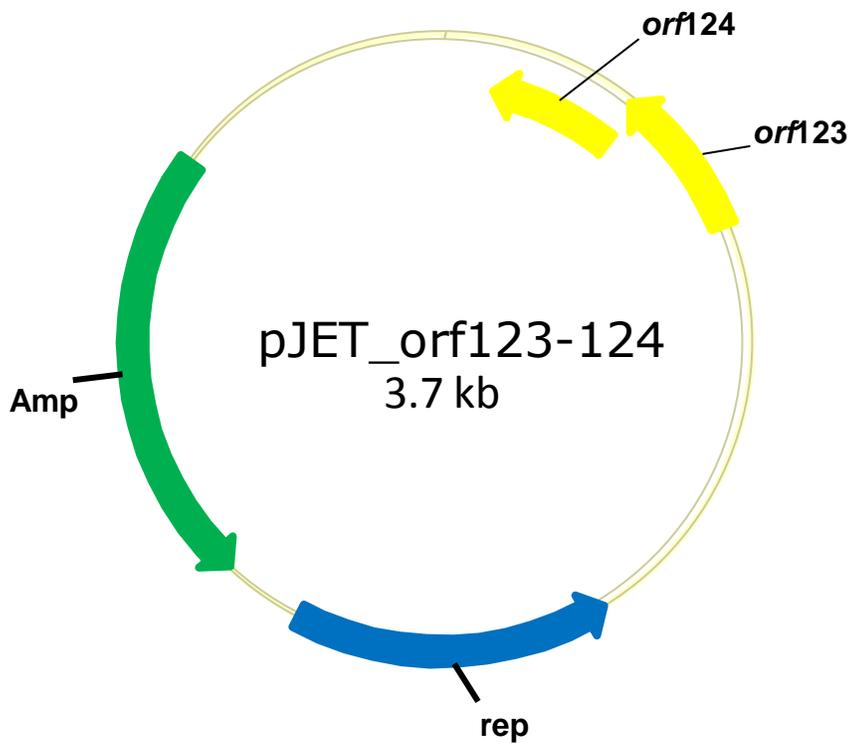
Los medios de cultivo y sus componentes empleados, provienen de los laboratorios Bioxon de México S.A., Merck-México S.A.

A) Caldo Nutritivo (CN): Para 1 litro de caldo nutritivo, pesar 8 g del medio y agregar 1 litro de agua destilada.

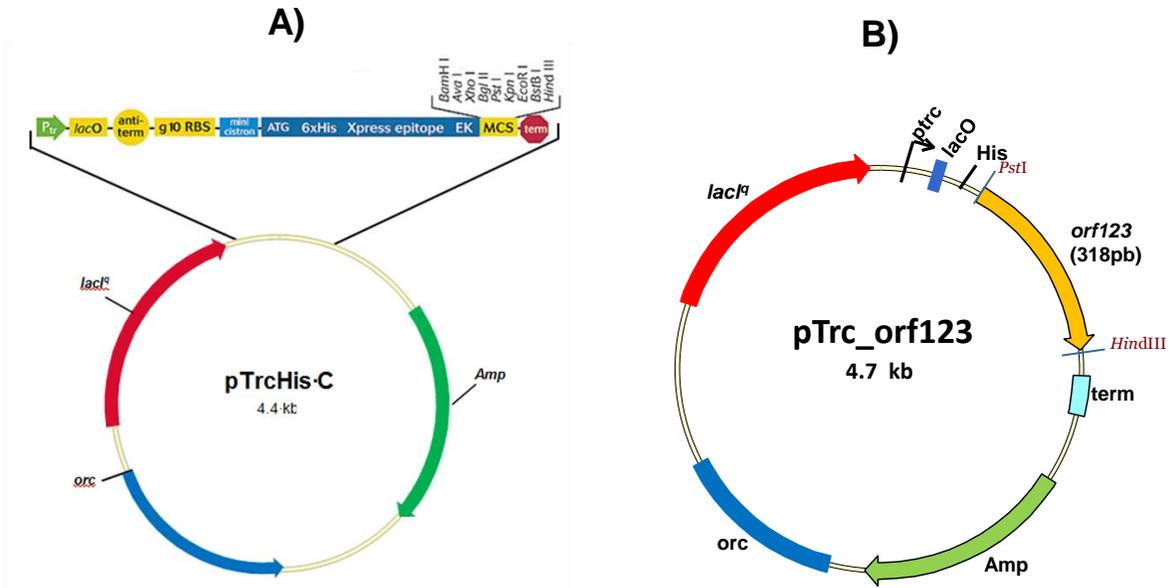
B) Agar nutritivo (AN): Para preparar 1 litro de agar nutritivo, pesar 23 g del medio y adicionar 1 litro de agua destilada.

### 2. Cepas

- *Escherichia coli* JM101 (pJET\_orf131): Cepa utilizada como control negativo en los ensayos de estabilidad, contiene el vector pJET 1.2/blunt con el *orf* 131 clonado. Este gen confiere resistencia a ciprofloxacina (Chávez-Jacobo, 2015).
- *Escherichia coli* JM101 (pJET\_orf123-124): Cepa que contiene los *orfs*123 y 124 de pUM505 clonados en el vector pJET (**Figura 8**).
- *Escherichia coli* BL21 (pTrcHisC): Cepa utilizada como control negativo en los ensayos de expresión ya que contiene el vector pTrcHisC vacío (**Figura 9**).
- *Escherichia coli* BL21 (pTrc\_orf123): Cepa que contiene al marco de lectura abierto del *orf* 123 clonado en el vector pTrcHisC. La expresión del *orf* 123 está bajo el control del promotor P<sub>trc</sub> que es inducible (**Figura 9**).



**Figura 8. Plásmido recombinante pJET\_orf123-124.** El vector de clonación pJET 1.2/Blunt que contiene los *orfs* 123 y 124 que codifican para un probable sistema toxina-antitoxina, tiene un tamaño de 3.7 kb. Posee un origen de replicación para *E.coli* (*ori*) y un gen de resistencia a ampicilina (Amp).



**Figura 9. Vector de sobreexpresión pTrcHisC y plásmido recombinante pTrc\_orf123.** **A)** El vector tiene un tamaño de 4.4 kb, con el gen *Amp* de resistencia a ampicilina, origen de replicación (*orc*) para *E. coli*; el operador *lacO* y el gen represor *lacI<sup>q</sup>* del operón *lac*, el promotor pTrc y un sitio múltiple de clonación (MCS) (Invitrogen). **B)** Plásmido recombinante pTrc\_orf123 que corresponde al vector pTrcHisC con el *orf123* (de un tamaño de 318 pb) insertado. Enzimas *HindIII* y *PstI* utilizadas para realizar la clonación.

### **3. Análisis *in silico***

Para llevar a cabo el análisis de la probable localización de las proteínas codificadas por los *orfs*123 y 124, se utilizó el programa computacional SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>). Adicionalmente se utilizó el programa computacional TopPred (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>) con el que se analizó el perfil de hidrofobicidad de las proteínas codificadas por los *orfs*123 y 124.

### **4. Cinéticas de crecimiento**

Las cepas de interés se crecieron en CN suplementado con Ampicilina (Amp) durante 24 h a 37°C con agitación constante. Los cultivos fueron diluidos en CN a una Densidad óptica (D.O.) a 600 nm (D.O.<sub>600nm</sub>) de 0.05 en ausencia o presencia de 0.01, 0.1 y 1.0 mM del inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y posteriormente se incubaron por 7 h a 37°C con agitación constante. Se tomaron muestras de 1 ml desde el tiempo inicial, durante cada hora y se midió su D.O.<sub>600nm</sub> en un espectrofotómetro Spectronic 21.

### **5. Prueba de estabilidad plasmídica**

Se pusieron preinóculos de las cepas de *E. coli* JM101 (pJET\_*orf*131) y *E. coli* JM101 (pJET\_*orf*123-124) en tubos con 4 ml de CN a 37°C durante 24 h. Los cultivos se diluyeron a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.8 con 20 ml de CN con o sin Amp y posteriormente fueron incubados a 37°C durante 24 h con agitación constante. Posterior a este tiempo, los cultivos se diluyeron nuevamente a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.8 con 20 ml de CN con o sin Ampe incubados a 37°C durante 24 h con agitación

constante. Este proceso se repitió durante un periodo de 7 días. De cada día de resiembra se tomaron cultivos los cuales fueron diluidos a  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-7}$  en solución de  $\text{MgSO}_4$ , plaqueando 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en cajas de AN con y sin Amp. Las cajas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 18 h y se cuantificó las UFC.

## **6. Aislamiento de DNA plasmídico**

El aislamiento de DNA plasmídico fue mediante el método de lisis alcalina (Adaptado de BirnboimyDoly, 1979), en base al siguiente protocolo:

Se creció un cultivo bacteriano en 4 ml de CN durante 18 h a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante de 220 rpm, se distribuyó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugo durante 2 min a 12000rpm, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de solución STE (Sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0 y EDTA 10 mM, pH 8.0) se adicionó 20  $\mu\text{l}$  de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min. Posterior a la suspensión se adicionaron 300  $\mu\text{l}$  de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (dodecil sulfato de sodio) 1% [para 1 ml: NaOH 2 N: 100  $\mu\text{l}$ ; SDS 10%: 100  $\mu\text{l}$ ; y 800  $\mu\text{l}$  de agua destilada], se agitó suavemente y se colocó en hielo durante 10 min. Se le adicionó 200  $\mu\text{l}$  de una solución de acetato de potasio 5 M (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial pH 4.8), se mezcló ligeramente y se colocó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm a temperatura ambiente, posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de una solución fenol: cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente, procediendo a centrifugar 10 min a 12000 rpm,

recuperándose la fase acuosa superior a la que se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se mantuvo durante 20 min a -80°C. Se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm, el sedimento se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugando durante 3 min entre cada lavado. Se secó la pastilla a 65°C en termoblock y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O desionizada estéril o agua HPCL. Se agregó 5 µl de RNAsa y se incubó a 37°C durante 30min, posteriormente se inactivó durante 15 min a 65°C. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20°C o sometidas a corrimiento electroforético.

## **7. Electroforesis en geles de agarosa**

Para llevar a cabo el corrimiento electroforético del DNA plasmídico, se preparó un gel de agarosa (Sigma) a la concentración de 1.0% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, ácido acético glacial al 99.90% y EDTA 0.001 M), el gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, que contenía el mismo amortiguador. Se mezclaron 5 µl de DNA plasmídico con una solución de colorante (azul de bromofenol al 0.25%; Xilencianol al 0.25%; glicerol en agua al 30%). Como marcador de peso molecular de DNA lineal se utilizó el marcador de 1 Kb (Invitrogen). Se sometió a corrimiento con un voltaje constante de 125 voltios durante ~30-40 min, empleando una fuente de poder E-C Apparatus Corporation modelo EC452. Se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min. Posteriormente se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra Violet Products. Inc.).

## IX.- RESULTADOS

### 1. Análisis *in silico* de las proteínas codificadas por los *orfs123* y *124* del plásmido pUM505

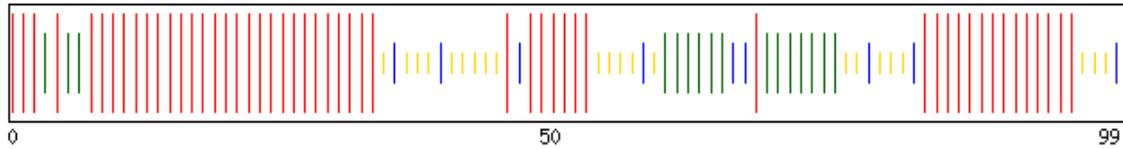
Las proteínas codificadas por los *orfs123* y *124* fueron analizadas con el programa computacional SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>), dicho programa predice la localización celular de las proteínas (Imaiy col., 2008). El análisis indica que entre el 80 y el 69% de los residuos de las proteínas ORF123 y ORF124, respectivamente, se encuentran formando una estructura secundaria de alfa hélice (**Figura 10**), y que ambas proteínas son solubles con localización en el citoplasma.

### 2. Análisis del perfil de hidrofobicidad

Se realizó un análisis de las proteínas codificadas por los *orfs123* y *124* para determinar el perfil de hidrofobicidad y ver si cuentan con segmentos transmembranales (STM). Para llevar a cabo el análisis de las proteínas, se utilizó el programa TopPred (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>) (von Heijne, 1992). Los valores de corte empleados para el análisis fueron los determinados en la escala de hidrofobicidadKyte-Doolittle (Kyte yDoolittle, 1982). Los valores de hidrofobicidad de los residuos de ambas proteínas estuvieron por debajo de los valores de corte superior (1.0) e inferior (0.6) de los aminoácidos considerados como hidrofóbicos, según la escala de hidrofobicidadKyte-Doolittle y que forman parte de un segmento transmembranal (**Figura 11**).

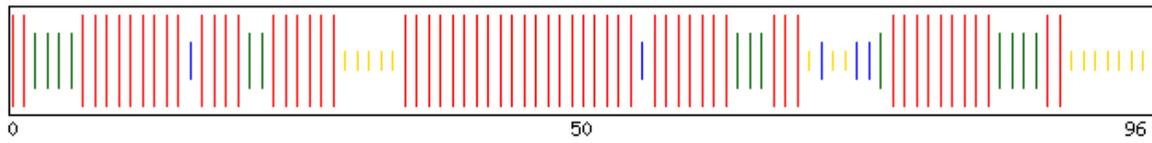
### ORF 123 (99aa)

MVEVKQTATF MAWESKLIKDR RAKAVIAARI FRLANGLPGD VSPVGQGVSE LRIHYGPGYR VYFQQRGTEI  
VILLCGGDKS SQARDIEMAK RLANEWRPQ



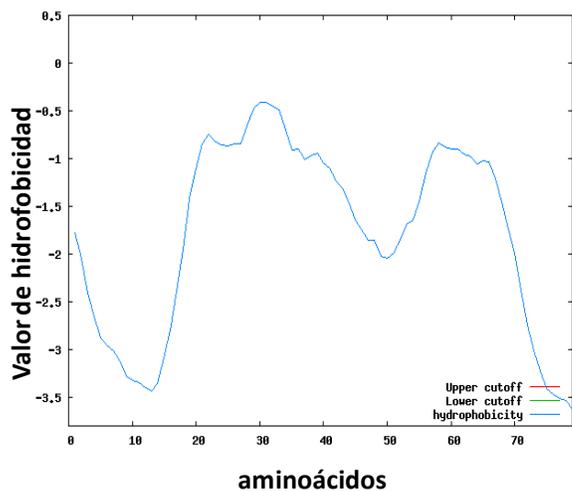
### ORF 124 (96 aa)

MTEQIYDYDP AQALDSPEAM ALFIADALDT GDTAYIAKAM GVVARAKGMT ELAKETGLAR EQLYKSFSE  
GNPTLKTMLAVMRALGVDLT ARPHAQ

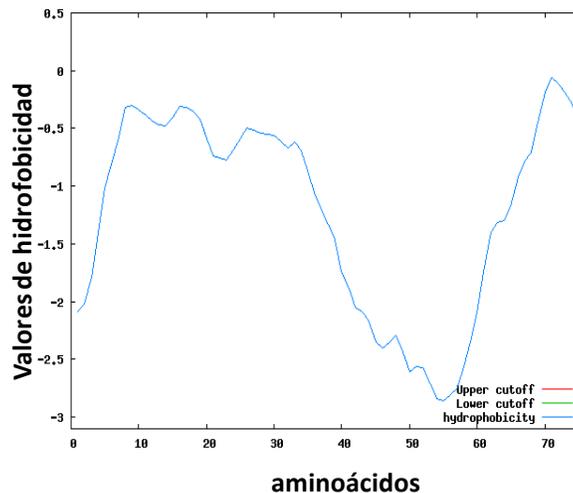


**Figura 10. Representación esquemática de la estructura secundaria de las proteínas ORF123 y 124 de pUM505.** En la parte superior de cada recuadro se indica la proteína correspondiente con el número de aminoácidos (aa) entre paréntesis así como la secuencia de la proteína. Dentro de los recuadros con líneas de colores se representan los residuos de las proteínas que participan en la formación de alfa-Hélice (rojo), lámina beta (verde), giro (azul) y enrollamientos (amarillo). En la parte inferior de los recuadros se muestra la posición de los aminoácidos.

A)



B)



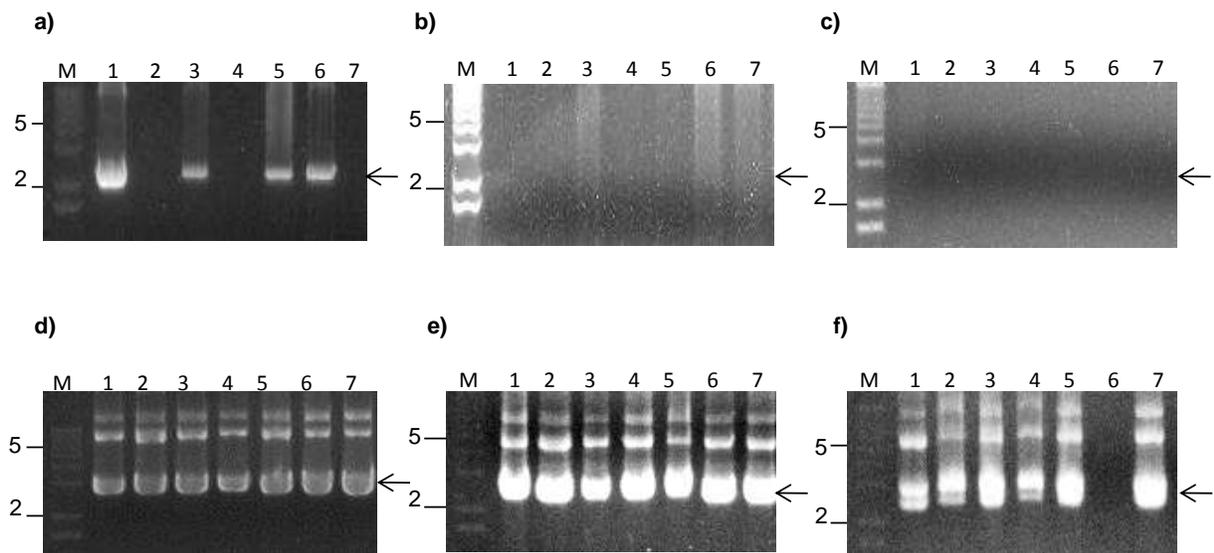
**Figura 11. Perfil de hidrofobicidad de las proteínas codificadas por los *orfs* 123 y 124 del plásmido pUM505.** Valores de hidrofobicidad de la proteína codificada por el *orf123* **(A)** y por el *orf124*, **(B)**. Los valores de hidrofobicidad se indican de acuerdo a la escala de Kyte-Doolittle (KD), la posición de los aminoácidos se muestran en el eje de las X.

Con este análisis se determinó que las proteínas ORF123 y ORF124 carecen de segmentos transmembranales, confirmando que ambas proteínas son solubles.

### **3. Determinación de la participación de los *orfs*123-124 en la prevalencia de plásmidos**

La clonación de los *orfs*123 y 124 en el vector pJET permite el mantenimiento de bacterias viables en ausencia de presión selectiva, durante resiembras consecutivas, contrario a lo que ocurre en transformantes de *E. coli* JM101 solo con el vector pJET (Hernández-Ramírez, 2015). Estos resultados sugirieron que los *orfs* 123 y 124 confieren estabilidad al plásmido. Con la finalidad de determinar si la prevalencia en el número de colonias obtenidas de las transformantes de *E. coli* con los *orfs*123-124, se debe a que conservan el plásmido recombinante, se comprobó la presencia de dicho plásmido. Para lo que se realizaron ensayos de estabilidad plasmídica como se describió en materiales y métodos y se seleccionaron colonias independientes obtenidas de cajas de AN con Amp. A las colonias se les realizó aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina y se llevó a cabo un corrimiento electroforético, para determinar la presencia del plásmido pJET\_orf123-124. En la **Figura 12** se muestran los geles del corrimiento electroforético de los DNAs plasmídicos obtenidos de las resiembras de los días 2, 4 y 6 del tratamiento sin antibiótico, en los que se observa que conforme avanza el número de las resiembras, aquellas colonias que tienen el plásmido con los *orfs*123-124 presentan una banda que corresponde al plásmido recombinante, pero aquellas que solo tienen el plásmido pJET no presentan banda. Esto indica

que el mantenimiento en la viabilidad de *E. coli* JM101 (pJET\_orf123-124) se debe  
a la

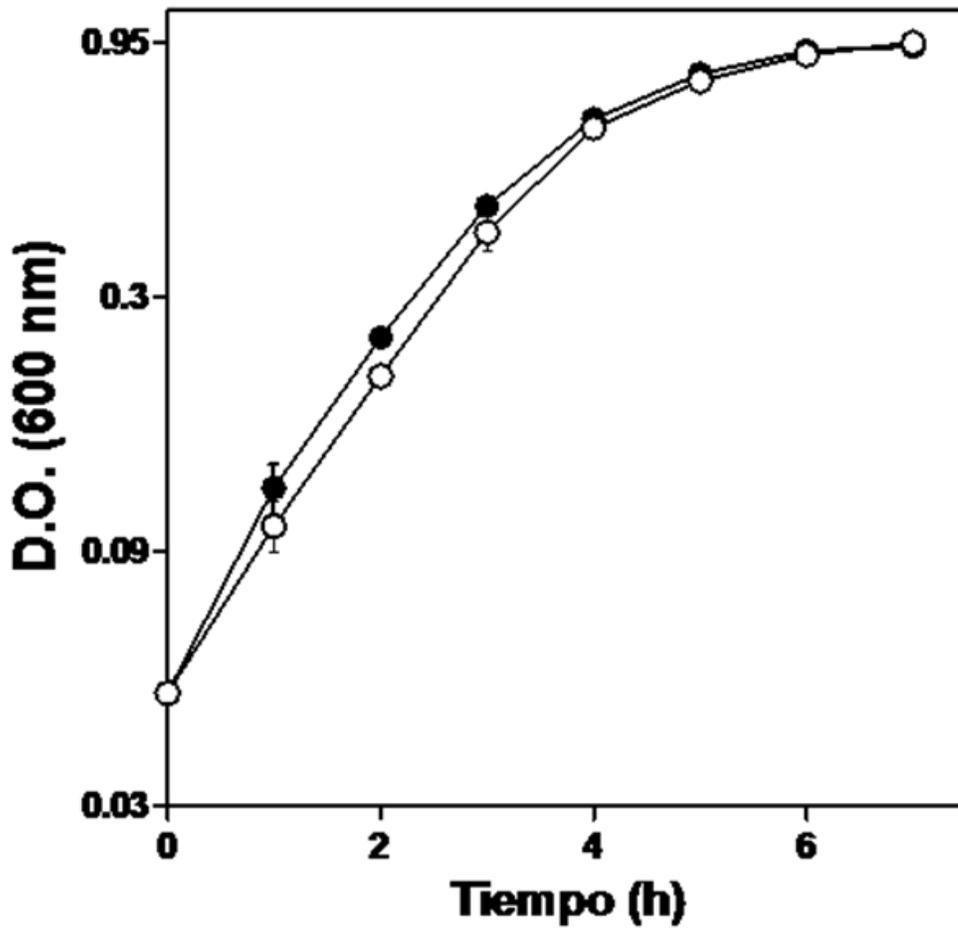


**Figura 12. Plásmidos aislados a partir de subcultivos de transformantes de *E. coli* JM101.** En los geles de agarosa muestra la presencia o ausencia de bandas del plásmido pJET (a, b, c) o pJET\_orf123-124 (d, e, f) a partir de los subcultivos. M, marcador de tamaño molecular (en kilobases); líneas 1-7, aislamiento de DNA plasmídico de muestras independientes del segundo (a, d); cuarto (b, e) y sexto (c, f) día de subcultivo. Las flechas de la derecha indican la posición de los plásmidos pJET.

participación de los *orfs*123 y 124, probablemente porque codifican a un sistema de estabilidad plasmídica tipo Toxina-antitoxina.

#### **4. Efecto de la sobreexpresión de la proteína codificada por el *orf* 123 en el crecimiento bacteriano**

El crecimiento de *E. coli* BL21 fue inhibido al sobreexpresar el producto del *orf*123, cuando se emplearon altas concentraciones del inductor IPTG (Hernández-Ramírez, 2015). Una posibilidad para este resultado es que el producto del *orf*123 es dañino para *E. coli* a través de un mecanismo de toxicidad; sin embargo, otra posibilidad es que la sobreproducción de la proteína ORF123 sea tóxico para la bacteria. Primeramente se determinó que las transformantes de *E. coli* BL21 con el vector PJET y el plásmido recombinante pTrc\_orf123 no presentan diferencia en su crecimiento en ausencia de IPTG, lo que indica que el plásmido pTrc\_orf123 no afecta el crecimiento de BL21 (**Figura 13**). Con el propósito de determinar cuál es el efecto del nivel de expresión de la proteína ORF123 en el crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21 se realizaron cinéticas de crecimiento variando la concentración del inductor IPTG en el medio de cultivo. Los resultados mostraron que con 0.01 mM de IPTG no existe diferencia en el crecimiento con respecto a los cultivos no inducidos (**Figura 14**). Sin embargo, al crecer los cultivos con una concentración de 0.1 y 1.0mM de IPTG ocurre una disminución significativa en el crecimiento con respecto al cultivo sin inducir (**Figura 15**). Adicionalmente, los resultados indican que la inhibición es ligeramente mayor cuando se incrementa la



**Figura 13. Crecimiento de *E.coli* BL21 en presencia del *orf* 123.** Los cultivos se crecieron en matraces con CN a 37°C con agitación constante durante 7 h. Se muestra la cepa control *E. coli* BL21 (pTrcHisC) (○) y *E. coli* BL21 (pTrc\_orf123) (●). Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3.

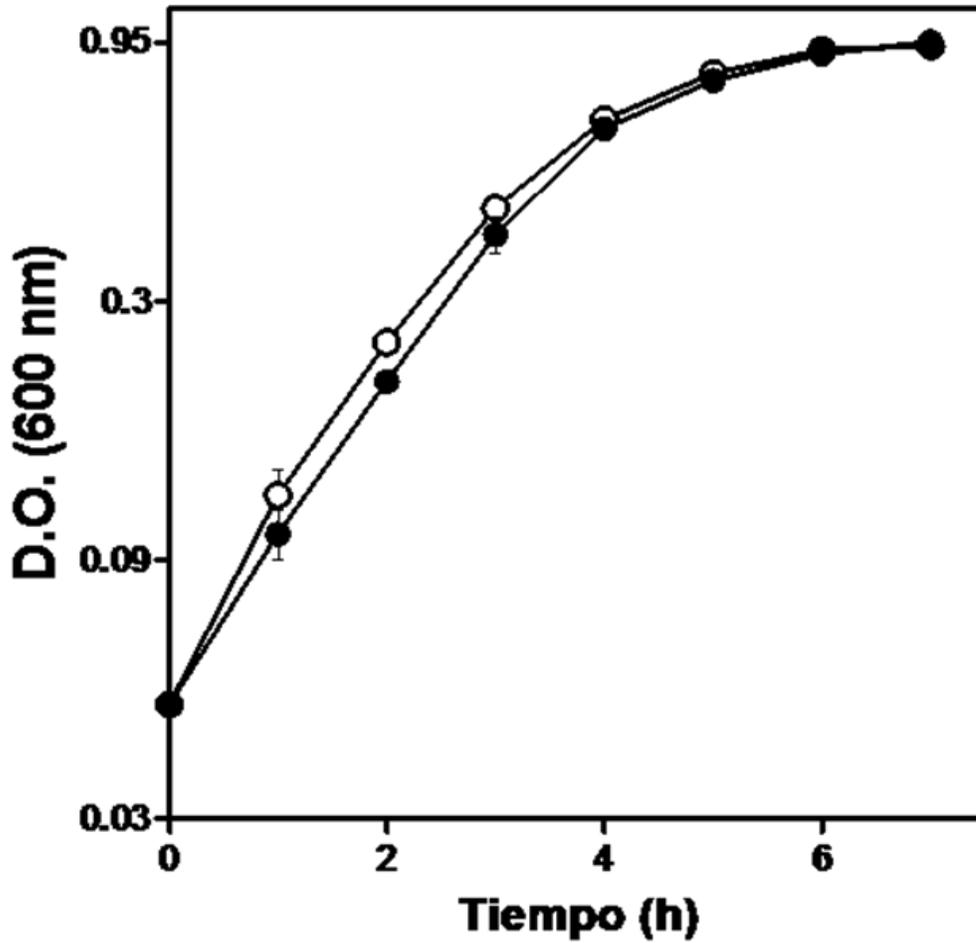


Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa de *E.coli*/BL21 con el vector pTrc\_orf123 en presencia y ausencia de IPTG. Los cultivos se crecieron en matraces con CN a 37°C con agitación constante durante un tiempo de 7 h. *E. coli* BL21 (pTrc\_orf123) con (●) y sin (○) 0.01 mM de IPTG. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3.

concentración del IPTG, sin embargo no se alcanza por completo la inhibición del crecimiento (**Figura 15**), esto sugiere que la sobreexpresión de la proteína ORF123 ejerce un efecto toxico en *E. coli* BL21.

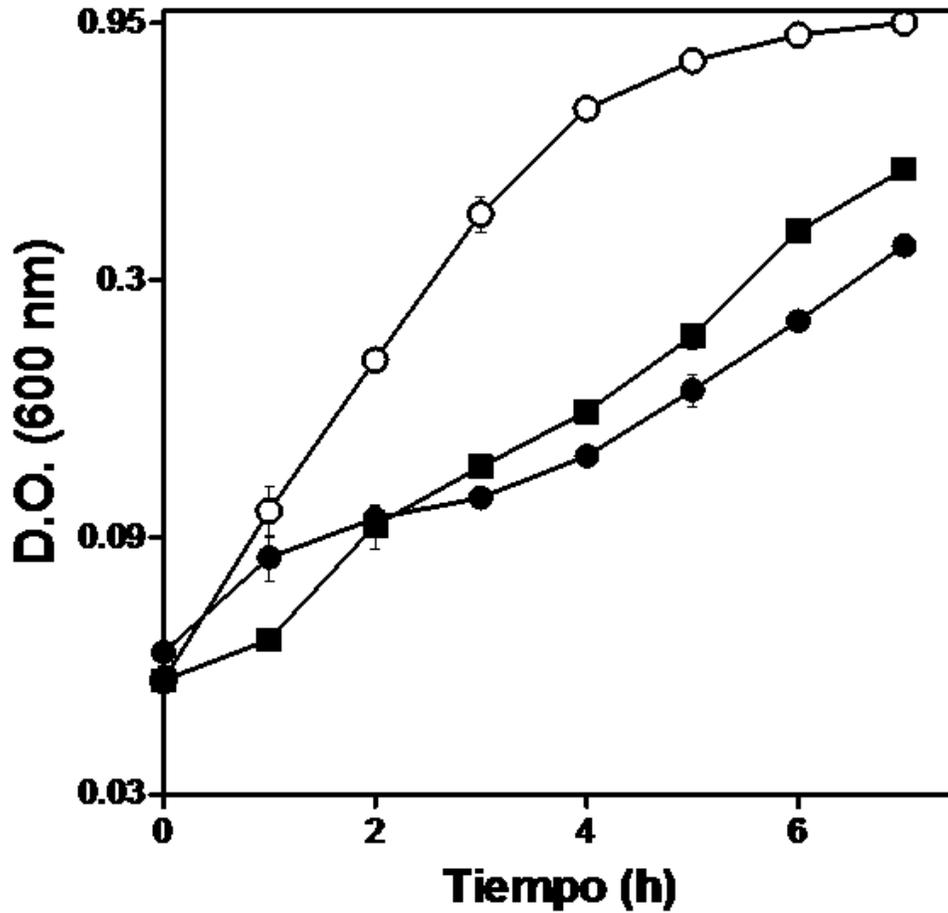


Figura 15. Efecto del incremento de la expresión del producto del *orf123* en el crecimiento de *E.coli* BL21. Los cultivos se crecieron en matraces con CN a 37°C con agitación constante durante un tiempo de 7 h. *E. coli* BL21 (pTrc\_orf123) sin (○) y con 0.1 (■) y 1.0 (●) mM de IPTG. Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 3.

## X.-DISCUSIÓN

Los plásmidos bacterianos son moléculas de DNA extracromosómico que juegan un papel importante en la adaptación bacteriana a diferentes ambientes, ya que promueven la transferencia de genes entre estos microorganismos (Loeza y col., 2004). La autorreplicación no es suficiente para asegurar la continuidad en la línea celular, por lo que existen mecanismos que aseguran la segregación de los plásmidos bacterianos a las células hijas como son: los sistemas de partición, incompatibilidad plasmídica y los sistemas de adicción, también conocidos como sistemas Toxina-Antitoxina (TA) (Actis y col., 1999). La principal característica de los sistemas TA es que están formados por dos componentes. Uno de ellos es una toxina de larga vida media y el otro una antitoxina con una vida media mucho más corta, capaz de antagonizar el efecto tóxico de la toxina (Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009). Los sistemas TA se identificaron primero en plásmidos y se caracterizan por su papel en la muerte post-segregacional (**Figura 3**) (Zielenkiewicz y Ceglowski, 2001). Después de la división celular, las células hijas que no heredan una copia de un plásmido que expresa un módulo de adicción ya no pueden producir la proteína antitoxina. Por lo tanto, después de una rápida degradación de la proteína antitoxina residual, el exceso de proteína de la toxina restante es libre para unirse e inhibir un blanco celular específico (**Tabla 1**), proporcionando un mecanismo de selección para el mantenimiento del plásmido en la población (Brown y Shaw, 2003). Los sistemas TA están ampliamente distribuidos entre muchas especies bacterianas, incluyendo patógenos humanos (Brzozowska y Zielenkiewicz, 2013).

El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado (Cervantes y Ohtake, 1988). pUM505 contiene a los *orfs* 123 y 124, localizados en una isla de patogenicidad, que probablemente codifican un sistema TA. El *orf* 123 codifica una proteína, 55% idéntica a la toxina RelE del sistema TA de tipo II de *Klebsiella pneumoniae* y el *orf* 124 codifica un probable regulador transcripcional, 82% similar a la antitoxina HTH (Helix-Turn-Helix) de un sistema TA de tipo II de *Pseudomonas alcaligenes* (**Figura 5**) (Ramírez-Díaz y col.,2011).

El análisis *in silico* de ambos *orfs*, mostró una región de 4 pb donde se sobreponen el codón de término e inicio de las regiones codificantes de los *orfs*123 y 124 así como la presencia de un probable promotor río arriba del *orf*123 (Hernández-Ramírez, 2015). Los genes que codifican a sistemas TA generalmente forman operones, en donde el gen que codifica a la antitoxina se encuentra río arriba del que codifica a la toxina (**Figura 1**) (Sevin y Barloy-Hubler, 2007). Sin embargo, también se conocen sistemas con la organización invertida de los genes; por ejemplo, *higBA* (Tian y col., 1996), *mqsRA* (Brown y col., 2009). La regulación de la expresión de genes traslapados podría resultar en un control más eficiente y reducir la necesidad de rutas regulatorias complejas (Johnson y Chriholm, 2004). Mediante ensayos de RT-PCR se determinó que los *orfs*123 y 124 se transcriben a través de un RNAm bicistrónico formando un operón cuya expresión es regulada por un probable promotor río arriba del *orf*123 (Hernández-Ramírez, 2015).

En este trabajo mediante un análisis *in silico* se determinó que los productos codificados por ambos *orfs* son proteínas solubles con un alto porcentaje de

residuos que adoptan una estructura secundaria de alfa hélice (**Figura 10**), dichas proteínas carecen de segmentos transmembranales (**Figura 11**) que permitan su unión o interacción con la membrana por lo que se predice que se encuentran localizadas en el citoplasma.

Para determinar si los *orfs*123 y 124 participan en la estabilidad de plásmidos, se clonaron ambos *orfs* con su probable promotor en el vector pJET 1.2/Blunt que confiere resistencia a ampicilina (Amp) y se realizaron ensayos de estabilidad del plásmido. Los resultados indicaron que la viabilidad, en ausencia de presión selectiva, de las bacterias que contienen el plásmido pJET disminuye drásticamente durante la duplicación celular y que las bacterias que contienen el plásmido pJET con los *orfs*123 y 124 mantienen su viabilidad (Hernández-Ramírez, 2015). Esto sugirió que los *orfs*123 y 124 codifican a un sistema de estabilidad de plásmidos tipo TA, que probablemente está formado por una toxina codificada por el *orf*123 y una antitoxina codificada por el *orf*124. Con el propósito de determinar si la viabilidad celular que mostraron las bacterias, en ausencia del antibiótico, se debe a que los *orfs* 123 y 124 de pUM505 clonados en el vector pJET participan en la prevalencia del plásmido, se analizó la presencia de los plásmidos pJET en las colonias recuperadas durante las resiembras sin presión selectiva. Los resultados mostraron que las colonias de *E. coli*(pJET) derivadas de las resiembras en ausencia del antibiótico perdieron el plásmido a partir del segundo día de resiembra(**Figura 12**). Sin embargo, las colonias derivadas de *E. coli* (pJET\_orf123-124) mostraron la presencia del plásmido aun al sexto día de resiembra (**Figura 12**). Estos resultados indican que la prevalencia de las colonias de *E. coli* (pJET\_orf123-124) en ausencia de presión selectiva se debe a que el

plásmido contiene los *orfs* 123 y 124, que participan en la prevalencia del plásmido y por lo tanto en la estabilidad. El primer sistema de TA, *ccdA/ccdB*, fue descrito hace más de 30 años como un módulo que mejoraba la estabilidad del plásmido F de *E. coli* por exterminio post-segregacional (Ogura y Hiraga, 1983), por lo tanto, a los sistemas TA encontrados en plásmidos se les atribuyó como principal función evitar la pérdida del plásmido.

Se sabe que las toxinas de los sistemas TA caracterizadas inhiben el crecimiento celular. Estas toxinas tienen blancos celulares específicos en la bacteria huésped. Por ejemplo, la toxina Hok se integra en la membrana interna de la célula deteniendo la síntesis de ATP (Gerdes y col., 1986); la toxina ParE inhibe a la DNA girasa interrumpiendo la replicación (Jiang y col., 2002) y la toxina RelE corta el RNAm unido al sitio A del ribosoma interrumpiendo la traducción de proteínas (Christensen y Gerdes, 2003). El producto codificado por el *orf123* produce inhibición del crecimiento bacteriano solo cuando se sobreexpresa (Hernández-Ramírez, 2015), sugiriendo que esto es porque se produce una proteína toxica para la bacteria. Para observar el efecto de las toxinas de los sistemas TA, De la Cruz y colaboradores en el 2013, clonaron varios sistemas TA encontrados en el cromosoma de *Salmonella* en un vector de expresión y pudieron observar la disminución del crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) causado por la sobreexpresión de las toxinas. Esto sugirió que las diferencias en el grado de inhibición generado por las diferentes toxinas se debía a la diferencia en los niveles de expresión de éstas. Para poder determinar si el nivel de expresión del producto del *orf123* modifica el crecimiento bacteriano se realizaron cinéticas de crecimiento en medio líquido de la cepa *E. coli* BL21(pTrc\_orf123) en presencia de concentraciones variables del

inductor IPTG. Se observó que el crecimiento en la cepa BL21(pTrc\_orf123) no fue inhibido en presencia de baja concentración de IPTG en comparación con el control (**Figura 12**). Sin embargo, se observó que al incrementar la concentración de IPTG se genera la inhibición del crecimiento de *E.coli*, efecto que se muestra ligeramente acentuado a la concentración más alta de IPTG empleada (**Figura 12**). Este resultado indica que el producto codificado por el *orf123* tiene el comportamiento de una proteína tóxica ya que disminuye el crecimiento de *E. coli* BL21 y sugiere que éste corresponde al módulo toxina del sistema toxina-antitoxina codificado en el plásmido pUM505.

En este trabajo se pudo demostrar que la viabilidad de *E. coli* durante las resiembras en ausencia de presión selectiva se debe a la presencia de los *orfs* 123 y 124 que codifican a un sistema de estabilidad de plásmidos. Además de confirmar que la inhibición se debe a la sobreexpresión del producto del *orf* 123.

## **XI.-CONCLUSIONES**

1. Los *orfs* 123 y 124 participan en la prevalencia de plásmidos.
2. El producto del *orf* 123 es una toxina que inhibe el crecimiento celular.

## XII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Actis, L. A., Tolmasky, M. E. y Crosa, H. S. (1999). Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci.* 4: d43-62.
2. Baltrus, D.A. (2013). Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends EcolEvol.* 28: 489-495.
3. Bergstrom, C.T., Lipsitch, M. y Levin, B.R. (2000). Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics.* 155(4): 1505-1519.
4. Blower, T. R., Pei, X. Y., Short, F. L., Fineran, P. C., Humphreys, D. P., Luisi, B. F. y Salmond, G. P. (2011). A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat StructMol Biol.* 18(2):185-190.
5. Bouet, J. Y., Nordström, K. y Lane, D. (2007). Plasmid partition and incompatibility – the focus shifts. *MolMicrobiol.* 65(6):1405-1414.
6. Brown, B.L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J.M., Davenport, A., Wood, T.K., Peti, W., y Page, R. (2009). Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoSPathog.* 5(12): e1000706.
7. Brown, J. M. y Shaw, K. J. (2003). A Novel Family of *Escherichia coli* Toxin-Antitoxin Gene Pairs. *J Bacteriol.* 185(22): 6600-6608.
8. Brzozowska, I. y Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid.* 70(1): 33-41.

9. Cervantes, C. y Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173-176.
10. Chávez-Jacobo, V. M. (2015). Identificación de genes del plasmido pUM505 implicados en la resistencia a quinolonas. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.
11. Christensen, S. K. y Gerdes, K. (2003). RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *MolMicrobiol.* 48(5):1389-400.
12. Cooper, T. F. y Heinemann, J. A. (2000). Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(23): 12643–12648.
13. De la Cruz, M. A., Zhao, W., Farenc, C., Gimenez, G., Raoult, D., Cambillau, C., Gorvel, J. y Méresse, S. (2013). A Toxin-Antitoxin Module of *Salmonella* Promotes Virulence in Mice. *PLOS Pathogens.* 9(12): e1003827.
14. Dobrindt, U. y Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *CurrOpinMicrobiol.* 4(5):550-557.
15. Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S. y Salmond, G. P. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein- RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(3):894-899.
16. Gerdes, K., Bech, F. W., Jørgensen, S. T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P. B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., y Von Meyenburg, K. (1986). Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of

- the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. *EMBO J.* 5(8): 2023-2029.
17. Gerdes, K., Moller-Jensen, J. y Jensen, R. B. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol.* 37(3): 455-466.
  18. Hacker, J. y Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
  19. Harrison E. y Brockhurst M. (2012). Plasmid mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol.* 20(6): 262-267.
  20. Heaton, B.E., Herrou, J., Blackwell, A.E., Wysocki, V. H. y Crosson, S. (2012). Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin-antitoxin system of *Brucella abortus*. *J. Biol. Chem.* 287(15): 12098–12110.
  21. Hernández-Ramírez, K. C. (2015). Análisis funcional de los genes que codifican al sistema toxina-antitoxina del plásmido pUM505. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.
  22. Imai, K., Asakawa, N., Tsuji, T., Akazawa, F., Ino, A., Sonoyama, M. y Mitaku, S. (2008). SOSUI-GramN: high performance prediction for sub-cellular localization of proteins in gram-negative bacteria. *Bioinformatics.* 2(9): 417-421.
  23. Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D. R. y Konieczny, I. (2002). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol Microbiol.* 44(4): 971-979.
  24. Johnson, Z. I. y Chisholm, S. W. (2004). Properties of overlapping genes are conserved across microbial genomes. *Genome Res.* 14(11): 2268-2272.

25. Jørgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M. y Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J Bacteriol.* 191(4):1191-1199.
26. Kawano, M., Aravind, L. y Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol. Microbiol.* 64(3):738–754.
27. Khan, S. A. (1997). Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(4): 442-455.
28. Kunin, V. y Ouzounis, C. A. (2003). The balance of driving forces during genome evolution in prokaryotes. *Genome Res.* 13(7): 1589–1594.
29. Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157 (1): 105-132.
30. Lewin, B. (2008). Genes IX. 1ª. Edición. Ed. *McGraw-Hill Interamericana*. pp. 392-393.
31. Lioy, V.S., Rey, O., Balsa, D., Pellicer, y Alonso, J. C. (2010). A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development. *Plasmid.* 63(1): 31-39.
32. Liu, M., Zhang, Y., Inouye, M. y Woychik, N. A. (2008). Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(15): 5885-5890.
33. Loeza, P. D., Valdez, J. J., Baizabal, V. M. y López J. E. (2004). Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *REB.* 23(2): 71-78.

34. López-Meza, J. E. (2001). Biología molecular de los plásmidos RC y su función en *Bacillus thuringiensis*. *Ciencia Nicolaita*.29: 23-30.
35. Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N. y Horiuchi, T. (1992). Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress *letD(ccdB)* product growth inhibition. *J Mol Biol*. 225(1):39-52.
36. Muñoz-Gómez, A. J., Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A. y Díaz-Orejas, R. (2005). RNase/anti-RNase activities of the bacterial *parD* toxin-antitoxin system. *J Bacteriol*. 187(9):3151-3157.
37. Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L. y Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol*.9 (3):e1001033.
38. Nordstrom, K. y Austin S.J. (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu Rev Genet*. 23: 37-69.
39. Novick, R. P. (1987). Plasmid Incompatibility. *Microbiol Rev*. 51(4):381-395.
40. Ogura T. y Hiraga S. (1983). Mini F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80(15):4784-4788.
41. Pandey, D. P. y Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res*. 33: 966-976.
42. Park, S. J., Son, W. S. y Lee, B. J. (2013). Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: A target for developing antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta*. 1834(6): 1155–1167.

43. Pecota, D. C. y Wood, T. K. (1996). Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *J Bacteriol.* 178(7):2044-2050.
44. Pecota, D.C., Kim, C.S., Wu, K., Gerdes, K., y Wood, T.K. (1997) Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pn* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. *Environ Microbiol.* 63(5): 1917-1924.
45. Peña-Miller, R., Rodríguez-González, R., MacLean, R. C. y San Millan, A. (2015). Evaluating the effect of horizontal transmission on the stability of plasmids under different selection regimes. *Mobile Genetic Elements.* 5(3): 29-33.
46. Ramírez-Díaz, M. I., Diaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C. y Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal genes. *Plasmid.* 66: 7-18.
47. Romero, D. y Palacios, R. (1997). Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet.* 31: 91-111.
48. Schumacher, M. A., Piro, K. M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., y Brennan, R. G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science.* 323: 396-401.
49. Sevin, E. W. y Barloy-Hubler, F. (2007). RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol.* 8: R155.
50. Simonsen, L. (1991). The existence conditions for bacterial plasmids: theory and reality. *Microbial Ecol.* 1: 187-205.
51. Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. y De la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74: 434-452.

52. Stewart, F. M. y Levin, B.R. (1977). The population biology of bacterial plasmids. A PRIORI conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics*. 87: 209-228.
53. Summers, D. K. (1996). The biology of plasmids. Oxford: Black-well science Ltd. 13(2): 82-83.
54. Tian, Q. B., Ohnishi, M., Tabuchi, A. y Terawaki, Y., (1996). A new plasmid-encoded proteic killer gene system: cloning, sequencing, and analyzing hig locus of plasmid Rts1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 280–284.
55. Tsuchimoto, S., Nishimura, Y. y Ohtsubo, E., (1992). The stable maintenance system pem of Plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *JBacteriol.* 174: 4205–4211.
56. Unoson, C. y Wagner, E. G. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *MolMicrobiol.* 70:258–70.
57. Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. y Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems. Biology, identification and application. *Mobile Genetic Elements*. 3(5): e26219.
58. Van Melderen, L. y Saavedra De Bast, M. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities?. *PLoS Genet.* 5:e1000437.
59. Van Melderen, L., Bernard, P. y Couturier, M. (1994). Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *MolMicrobiol.* 11: 1151–1157.
60. Williams, J. J. y Hergenrother, P. J. (2008). Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *CurrOpinChem Biol.* 12:389-399.

61. Winther, K. S. y Gerdes, K. (2011). Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:7403-7407.
62. Yamaguchi, Y., Park, J. H. and Inouye, M. (2011). Toxin–antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet.* 45: 61–79.
63. Zhang, Y. e Inouye, M. (2011). RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol Microbiol.* 79:1418-1429.
64. Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G. y Inouye, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell.* 12:913-923.
65. Zielenkiewicz, U. y Ceglowski, P. (2001). Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochim Pol.* 48: 1003–1023.