UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Participación de los sistemas de muerte post-segregacional en la estabilidad de la resistencia a carbapenémicos en Enterobacterias

María Paz Moscoso Romo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
2019

Participación de los sistemas de muerte post-segregacional en la estabilidad de la resistencia a carbapenémicos en Enterobacterias

María Paz Moscoso Romo

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Microbiología

Director:

Ph.D. Ricaurte Alejandro Márquez Ortiz

Co-director:

Ph.D. Jaime Eduardo Castellanos Parra

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2019

A mis ángeles en el cielo, quiénes con su ejemplo de vida me enseñaron a dar lo mejor de mí.

A mis padres Freddy y Deisi, por su motivación, apoyo incondicional, palabras de aliento y sabios consejos.

A mis hermanos Andrés y Juan Francisco, por ser mis compañeros de risas y aventuras, mi fortaleza, por creer en mí y apoyarme siempre.

A Roberto, por su amor, apoyo, paciencia, comprensión y por brindarme el tiempo para cumplir uno de mis sueños.

Agradecimientos

A Dios, a mis padres, hermanos y esposo, por ser el motivo para mirar siempre más allá, por soñar conmigo los sueños más sorprendentes y creer que los puedo lograr, por guiarme y motivarme todos los días de mi vida.

A cada uno de los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) de la Universidad El Bosque, de manera especial a Alejandro Márquez por su apoyo, motivación, conocimientos brindados y por haberme dado la oportunidad de formar parte de este proyecto. A Javier Escobar por sus enseñanzas y guía para el cumplimiento de mis objetivos. A Zayda Corredor por su dedicación, compañía, orientación y disposición en solucionar cada una de mis dudas. A Deisy Abril por su guía y enseñanza en los análisis bioinformáticos. A todo LGMB Javier, Alejandro, Zaydis, Dey, Carlos, Santi, Johana y Lorena, gracias por su cariño incondicional, por abrirme las puertas de su corazón y familia; y por enseñarme que lo más importante en la vida no es lo que logras, sino con quien lo logras. Aprendí mucho de cada uno de ustedes, me ayudaron a formarme como persona y profesional, los llevaré en mi corazón eternamente. ***LGMB por siempre***

Al Doctor Jaime Castellanos, un especial agradecimiento por la codirección brindada en este proyecto.

Al programa de Maestría Ciencias Microbiología, en especial a la Doctora Marta Fontanilla, Doctor Daniel Uribe y Socorrito Prieto (†), quienes desde mi primer día en la Universidad Nacional de Colombia me recibieron con cariño, me apoyaron y dieron una cálida bienvenida a Colombia.

A mis amigos y familiares, por hacer de la estadía en Colombia una de las experiencias más divertidas e inolvidables de mi vida.

El presente trabajo se realizó gracias a la financiación de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque (proyecto PCI-2017-9603) y del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS (proyecto de investigación con código 13087125081).

Resumen

La circulación de NDM entre enterobacterias representa un serio problema para los sistemas de salud debido a las limitadas opciones terapéuticas disponibles. En la actualidad se sabe que el gen que codifica NDM se originó en *Acinetobacter spp*., y posteriormente migró a los plásmidos conjugativos pNDM-BJ01-like frecuentes en el género bacteriano. Interesantemente, las enterobacterias transportan plásmidos NDM-positivos diversos, con poca relación con los pNDM-BJ01-like. No obstante, en *Providencia rettgeri*, un patógeno clínicamente significativo, aunque poco estudiado que está emergiendo como un nuevo organismo oportunista con alta resistencia a los antibióticos, fue identificado un plásmido pNDM-BJ01-like (p06-1619-NDM), con una modificación importante asociada a la adquisición de un transposón con dos sistemas de muerte post-segregacional, ParDE y RelEB. Los sistemas de muerte post-segregacional o denominados toxina-antitoxina, están compuestos por una toxina estable y una antitoxina inestable, por lo que la pérdida del plásmido genera la muerte de la bacteria por acción de la toxina estable. Teniendo en cuenta lo anterior, en este estudio se realizó un abordaje microbiológico y molecular para evaluar el impacto de estos sistemas en la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM, para lo cual se diseñó y produjo un plásmido recombinante que expresara las dos antitoxinas (ParD y RelB) y se transformó en *P. rettgeri* nativa portadora del plásmido NDM-positivo, y posteriormente se evaluó la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM por curvas de crecimiento continuo. Los resultados mostraron que el plásmido p06-1619-NDM presenta gran estabilidad en el microorganismo que lo transporta (*P. rettgeri*) permaneciendo por 30 días de crecimiento continuo aún en presencia del plásmido recombinante productor de las antitoxinas. Sin embargo, eventos genéticos espontáneos determinados después de la secuenciación de genoma completo, desencadenaron la curación del plásmido NDM positivo en la cepa nativa a partir del día 20 de crecimiento continuo debido a la formación de una estructura secundaria, una unidad translocativa TU*6368* que incorporó los sistemas toxina-antitoxina, por tanto, se sugiere la participación de los sistemas de muerte post-segregacional en la estabilidad de plásmidos con resistencia a antibióticos β-lactámicos.

Palabras clave: NDM, *Enterobacteriaceae*, *Providencia rettgeri*, muerte post-segregacional, sistemas toxina-antitoxina, estabilidad plasmídica, unidad translocativa.

Abstract

NDM circularization among enterobacterias represents a serious problem for health systems due to the limited therapeutic options available. It is known that the gene encoding NDM originated in *Acinetobacter spp*., and subsequently migrated to the conjugative plasmids pNDM-BJ01-like, where it is frequently found in this bacterial genus. Interestingly, enterobacterias carry diverse NDM-positive plasmids, with little relation to the pNDM-BJ01-like. However, in *Providencia rettgeri*, a clinically significant pathogen, although little studied that is emerging as a new opportunistic organism with high resistance to antibiotics, a pNDM-BJ01-like plasmid (p06-1619-NDM) was identified, with an important modification associated with the acquisition of a transposon with two post-segregational killing systems (PSK), ParDE and RelEB. PSK or also called toxin-antitoxin systems, are composed of a stable toxin and an unstable antitoxin, so that the loss of the plasmid generates the death of the bacteria by the action of the stable toxin. Considering the above, in this study a microbiological and molecular approach was carried out to evaluate the impact of these systems on the stability of plasmid p06-1619-NDM for which a recombinant plasmid that expressed the two antitoxins was designed and produced (ParD and RelB) and was transformed into wild type *P. rettgeri* carrier of NDM-positive plasmid, and subsequently the stability of plasmid p06-1619-NDM was evaluated by continuous growth curves. The results showed that plasmid p06-1619-NDM has great stability in the microorganism that carries it (*P. rettgeri*), remaining for 30 days of continuous growth even in presence of recombinant plasmid producing antitoxins. However, spontaneous genetic events determined after complete genome sequencing triggered the healing of NDM-positive plasmid in wild type strain from day 20 of continuous growth, due to the formation of a secondary structure, a translocatable unit *TU6368 that* incorporated the toxin-antitoxin systems, therefore, it suggested the participation of PSK in the stability of plasmids with β-lactam antibiotics resistance.

Keywords: NDM, *Enteobacteriaceae, Providencia rettgeri*, post-segregational killing, toxin-antitoxin systems, plasmid stability, translocatable unit.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XV**

Lista de tablas ..... **XXI**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XXII**

Introducción **1**

1. Marco teórico **7**

1.1 Antibióticos carbapenémicos 7

1.1.1 Mecanismos de resistencia a carbapenémicos 9

1.2 Generalidades de *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos 10

1.2.1 *Providencia rettgeri* resistente a carbapenémicos 11

1.3 Elementos genéticos de diseminación de resistencia 13

1.3.1 Plásmidos 13

1.4 Sistemas de muerte post-segregacional 15

1.4.1 Clasificación 15

1.4.2 Sistemas toxina-antitoxina tipo II 17

1.4.3 Regulación de la expresión de los sistemas toxina-antitoxina tipo II 18

1.4.4 Módulo ParDE 20

1.4.5 Módulo RelEB 20

1.5 Métodos de detección de proteínas 21

2. Diseño y producción de un plásmido recombinante que exprese las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas de muerte post-segregacional del plásmido p06-1619-NDM **23**

2.1 Materiales y métodos 23

2.1.1 Fase *in silico* 23

2.1.2 Fase *in vitro* 27

2.2 Resultados 33
2.2.1 Diseño *in silico* del plásmido recombinante para la expresión de las antitoxinas ParD y RelB 33
2.2.2 Obtención *in vitro* del plásmido recombinante para la expresión de las antitoxinas ParD y RelB 39
3. Transformación del plásmido recombinante pBC SK-AT en *Providencia rettgeri* B221 47
3.1 Materiales y métodos 47
3.1.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima 47
3.1.2 Preparación de células electrocompetentes 47
3.1.3 Electroporación del plásmido recombinante pBC SK-AT 47
3.1.4 Evaluación de la expresión de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG 48
3.2 Resultados 48
3.2.1 Obtención de *Providencia rettgeri* B221 recombinante 48
3.3 Discusión 53
4. Estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en *Providencia rettgeri* B221-AT 59
4.1 Materiales y métodos 59
4.1.1 Cepas bacterianas usadas para el análisis de la estabilidad plasmídica 59
4.1.2 Condiciones de cultivo para la determinación de la estabilidad plasmídica 59
4.1.3 PCR para cuantificación de la estabilidad plasmídica 61
4.1.4 Recuperación de aislamientos sensibles a ceftazidime derivadas de la cepa *Providencia rettgeri* B221 61
4.1.5 Secuenciación, ensamblaje y anotación de genomas 64
4.2 Resultados 66
4.2.1 Estabilidad del plásmido p06-1619-NDM 66
4.2.2 *Providencia rettgeri* B221 sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos 69
4.2.3 Genómica comparativa de *Providencia rettgeri* B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* con *Providencia rettgeri* B221 75
4.2.4 Movilización de la secuencia de inserción IS*6368* a cromosoma en la cepa *Providencia rettgeri* B221::Tn*6368* 78
4.2.5 Unidad translocativa TU*6368* 79
4.3 Discusión 82

5. Conclusiones y recomendaciones 89
5.1 Conclusiones 89
5.2 Recomendaciones 90

Lista de figuras

Pág.

Figura I. Incorporación del elemento genético móvil putativo Tn*6368* en el plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri*. La incorporación del Tn*6368* en el plásmido p06-1619-NDM adicionó dos sistemas toxina-antitoxina tipo II, truncó el transposón Tn*125* sin afectar el gen de resistencia bla_{NDM-1} y generó la deleción de los genes *parB*, *parS* y *res* implicados en el sistema de segregación tipo Ia y en el de resolución de multímetros respectivamente para plásmidos pNDM-BJ01 [35]. 3

Figura II. Evaluación de la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM. La estabilidad del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri* (A) *y E. coli* J53 (B) se evaluó por comparación de ADN plasmídico y cromosomal por PCR durante 28 días de crecimiento continuo en medio sin presión selectiva. Los genes *dnaA* y *uidA* son genes cromosomales de única copia de *P. rettgeri* y *E. coli*, respectivamente. El ADN plasmídico se detectó con oligonucleótidos específicos para el plásmido p06-1619-NDM [35]. 5

Figura 1-1. Mecanismo de acción de los antibióticos β-lactámicos. Inicialmente se da una competencia estructural entre el pentapéptido y el anillo β-lactámico por unión con las PBPs, seguido de una unión covalente estable entre ellas que inhibe la formación del peptidoglucano y activa endolisinas que desencadenan muerte celular. Figura tomada de [46]..... 8

Figura 1-2. Distribución global de carbapenemasas en enterobacterias, por país y región. Abreviaturas: IMP, β-lactamasa con capacidad de hidrolizar imipenem; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; NDM, metalo-β-lactamasa de Nueva Delhi; OXA, β-lactamasa hidrolizante de carbapenem tipo oxacilinasa; VIM, metalo-β-lactamasa codificada por integrones de Verona. Figura tomada de [19]. 11

Figura 1-3. Clasificación de los sistemas toxina-antitoxina. Las toxinas se muestran en naranja y las antitoxinas en azul; las actividades que no son tóxicas están en letra negra, mientras que las que son tóxicas están en gris. Figura tomada de [78]..... 16

Figura 1-4. Esquema de los dominios conservados en la toxina ParE y antitoxina ParD del sistema putativo *parDE* del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri*. (Número de acceso GenBank: KX832928.1).....20
Figura 1-5. Esquema de los dominios conservados en la toxina RelE y antitoxina RelB del sistema putativo *relEB* del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri*. (Número de acceso GenBank: KX832928.1).....21
Figura 2-1. Esquema de los genes de las antitoxinas *parD* y *relB* de los sistemas toxina-antitoxina en el plásmido p06-1619-NDM. A. Ubicación de los operones putativos *parDE* y *relEB* en el Tn*6368* del plásmido p06-1619-NDM. Se observa que la secuencia codificante de cada antitoxina está regulada bajo su propio promotor. B. Secuencia de ADN híbrida diseñada para la codificación de las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas TA putativos *parDE* y *relEB* del plásmido p06-1619-NDM que incluye un promotor bajo el cual están regulados los genes de las antitoxinas, mismas que adicionan una etiqueta de fusión diferente y sitios de reconocimiento para tres enzimas de restricción.....24
Figura 2-2. Esquema de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las antitoxinas *parD* y *relB* de los sistemas TA del plásmido p06-1619-NDM. A. En el gen *parD*, parD_F incorpora un sitio de reconocimiento para SacI en el extremo 5', parD_R incorpora la secuencia codificante para la etiqueta His-Tag, el codón de parada (Stop) y un sitio de reconocimiento para XbaI en el extremo 3'. B. El gen *relB*, relB_F incorpora un sitio de reconocimiento para el gen *parD* recombinante que incluye la etiqueta His-Tag, el codón de parada y el sitio de reconocimiento para XbaI en el extremo 5'; y relB_R incorpora la secuencia codificante para la etiqueta FLAG-Tag y un sitio de reconocimiento para EcoRI en el extremo 3'.....26
Figura 2-3. Vector de expresión pBC SK(+). Figura tomada de SnapGene®.....34
Figura 2-4. Predicción de los genes recombinantes *parD-his, relB-flag* y del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag*, obtenido con SnapGene®. A. Antitoxina *parD-his,* incorpora un sitio de reconocimiento para SacI y XbaI y la etiqueta His-Tag. B. Antitoxina *relB-flag,* incorpora un sitio de complementariedad con *parD-his,* la etiqueta FLAG-Tag y el sitio de reconocimiento para EcoRI. C. Híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* resultado de OE-PCR entre los genes de las antitoxinas recombinantes gracias a un solapamiento de 27 nucleótidos entre las dos secuencias (His-Tag, códon de parada de *parD* y XbaI). 36
Figura 2-5. Plásmido recombinante pBC SK-AT, obtenido con SnapGene®. En rojo la clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en el plásmido pBC SK(+) y en

flechas verdes los ORF de las antitoxinas recombinantes bajo la regulación del promotor *lac*… 38

Figura 2-6. Marco abierto de lectura de las antitoxinas *parD-his* y *relB-flag* y secuencia proteica de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG, obtenido con SnapGene®. En verde la secuencia proteica de las antitoxinas recombinantes con la adición de las etiquetas, His-Tag para ParD y FLAG-Tag para RelB. 39

Figura 2-7. Estandarización de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las antitoxinas recombinantes *parD-his* y *relB-flag* por PCR. (-) Control negativo: *P. rettgeri* B253. (R) Control de reactivos. 40

Figura 2-8. Estandarización de la temperatura de hibridación para la amplificación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* por PCR de solapamiento. (R) Control de reactivos. 41

Figura 2-9. Clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en pGEM-T® Easy. A. Esquema del plásmido pGEM-T® Easy y posición de los oligonucleótidos de los promotores T7 y SP6 (plásmido no recombinante 180 pb, plásmido recombinante 720 pb). B. Confirmación de la clonación del híbrido *parD-his – relB-FLAG* en el plásmido pGEM-T® Easy (pGEM-T-AT) para diez colonias recombinantes TOP10-AT. (R) Control de reactivos. 41

Figura 2-10. Clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en pBC SK(+). A. Esquema del plásmido pBC SK(+) y posición de los oligonucleótidos de los promotores T7 y T3 (plásmido no recombinante 166 pb, plásmido recombinante 646 pb). B. Digestión de pGEM-T–AT y pBC SK(+), se evidencia la liberación de un fragmento (flecha roja) correspondiente al híbrido *parD-his – relB-flag*. C. Confirmación de la clonación del híbrido *parD-his – relB-FLAG* en el plásmido pBC SK(+) para cinco colonias recombinantes de *E. coli* BL21-AT. D. Confirmación de transformación de *E. coli* BL21 con el plásmido pBC SK(+) para doce colonias recombinantes *E. coli* BL21-BC. (+) Control positivo: pBC SK(+). (-) Control negativo: *E. coli* BL21 (DE3). (R) Control de reactivos. 43

Figura 2-11. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG. SDS-PAGE de extractos totales de proteínas de *E. coli* BL21-AT en distintos tiempos de inducción. Expresión de una proteína (flecha roja) que podría corresponder al cloranfenicol acetiltransferasa (25.6 kDa). 44

Figura 2-12. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag E. coli* BL21-AT. A. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* B. Transcripción del gen

cromosomal *uidA* de *E. coli*. 1. *E. coli* BL21-BC, 2. *E. coli* BL21-AT. (R) Control de reactivos.....45

Figura 3-1. Transformación del plásmido pBC SK-AT y pBC SK(+) en *P. rettgeri* B221. A. Confirmación de transformación de *P. rettgeri* B221 con el plásmido pBC SK-AT para diez colonias recombinantes B221-AT. (+) Control positivo: *E. coli* BL21-AT (-) Control negativo: *P. rettgeri* B221. (R) Control de reactivos. B. Confirmación de la transformación de *P. rettgeri* B221 con el plásmido pBC SK(+) para diez colonias recombinantes B221-BC. (+) Control positivo: *E. coli* BL21-BC. (-) Control negativo: *P. rettgeri* B221. (R) Control de reactivos.....49

Figura 3-2. Confirmación de especie (A), plásmido p06-1619-NDM (B), resistencia a antibióticos β-lactámicos (C) y plásmidos pBC SK(+) y pBC SK-AT (D) para las cepas *P. rettgeri* B221, B221-BC y B221-AT. 1. Cepa B221. 2. Cepa B221-BC. 3. Cepa B221-AT (+) Control positivo: *P. rettgeri* B221, **E. coli* BL21-BC, ***E. coli* BL21-AT. (-) Control negativo: *E. coli* BL21 (DE3). (R) Control de reactivos.....50

Figura 3-3. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG. SDS-PAGE de extractos totales de proteínas de *P. rettgeri* B221-AT en distintos tiempos sin inducción. Expresión de una proteína (flecha roja) que podría corresponder al cloranfenicol acetiltransferasa (25.6 kDa).....51

Figura 3-4. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en *P. rettgeri* B221-AT. A. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag.* B. Transcripción del gen cromosomal *dnaA* de *P. rettgeri*. 1. *P. rettgeri* B221-BC, 2 *P. rettgeri* B221-AT. (R) Control de reactivos. 52

Figura 4-1. Estrategia usada para la determinación de la estabilidad plasmídica. En el día cero las bacterias fueron cultivadas en caldo con presión selectiva (antibiótico), posteriormente la presión selectiva fue removida para el plásmido NDM positivo y se mantuvo un crecimiento continuo realizando diluciones 1:1000 cada 12 horas por 30 días.....60

Figura 4-2. Estrategia usada para la recuperación de cepas sin fenotipo de resistencia. El cultivo bacteriano correspondiente al día 30 de la curva de estabilidad plasmídica fue sometido a diluciones decimales seriadas que fueron sembradas en placas de agar con y sin presión selectiva (antibiótico). Un total de 100 colonias de la menor dilución fueron monitoreadas por técnicas moleculares para establecer las características fenotípicas y la ausencia de la resistencia. 62

Figura 4-3. Sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos en el transposón Tn*6368*. El seguimiento del transposón Tn*6368* se realizó usando los oligonucleótidos que se marcan como triángulos rojos en la secuencia (*repA*: 445 pb, *tnpM*: 592 pb, IS*5*: 720 pb). 63
Figura 4-4. Determinación de ADN plasmídico y cromosomal por PCR para las muestras A. B221-AT, B. B221-BC y C. B221. Después de 30 días de crecimiento continuo en medio sin presión selectiva para el plásmido p06-1619-NDM y con presión selectiva para los plásmidos pBC SK-AT y pBC SK(+). Para todos los ensayos de PCR se utilizó la misma cantidad de ADN total (20 ng). 67
Figura 4-5. Determinación de ADN plasmídico y cromosomal por PCR para la muestra B221. Después de 30 días de crecimiento continuo en medio sin presión selectiva. Para todos los ensayos de PCR se utilizó la misma cantidad de ADN total (20 ng). 69
Figura 4-6. Recuperación de cepas B221 sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos. Confirmación de *dnaA*, p06-1619-NDM y *parD* para 100 colonias aisladas de la cepa B221 correspondiente al día 30 de la curva de estabilidad plasmídica, en grupos bacterianos de 10 muestras cada uno. 71
Figura 4-7. Recuperación de cepas B221 sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos. Confirmación de *dnaA*, p06-1619-NDM, *parD* y *relB* para 10 colonias aisladas de la cepa B221 correspondiente al día 30 de la curva de estabilidad plasmídica y de bla_{NDM-1} para cuatro colonias aisladas de la cepa B221 después de la confirmación de especie, plásmido NDM positivo y antitoxinas. 72
Figura 4-8. Detección del elemento genético móvil Tn*6368*. A. Estandarización de la temperatura de hibridación (T_H) de los oligonucleótidos usados para detección del transposón Tn*6368*. (R) Control de reactivos. B. Evaluación de la presencia del transposón Tn*6368* en las muestras curadas del plásmido p06-1619-NDM y sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos B221::Tn*6368* y B221ΔTn*6368*. (-) Control negativo: *E. coli* BL21. 74
Figura 4-9. Comparación pareada del ensamblaje del genoma de las cepas de *Providencia rettgeri* B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* contra los plásmidos A. p06-1616-NDM y B. p06-1619-2 de la cepa *P. rettgeri* B221. El circulo negro corresponde al plásmido de referencia respectivo incluido como control interno..... 77
Figura 4-10. Inserción cromosomal en la cepa *Providencia rettgeri* B221::Tn*6368* de la secuencia de inserción IS*6368*. La IS*6368* (morado) se movilizó a cromosoma sin truncar ningún gen de interés en la cepa *P. rettgeri* B221::Tn*6368.* La secuencia de inserción corresponde a la movilizada en el plásmido p06-1619-NDM que contiene todos los genes

implicados en la transposición (*tnpA, tnpR, tnpM*). Las barras grises y rojas (secuencias invertidas) entre cada secuencia corresponden a regiones con >98% de identidad nucleotídica. 78

Figura 4-11. Zona de "circularización" la unidad translocativa TU*6368* de *Providencia rettgeri* B221::Tn6368. Se ilustra la visualización en Artemis Comparison Tool (ACT) del alineamiento pareado por BLASTn en los extremos del contig seis correspondiente a la unidad translocativa TU*6368* del genoma de *P. rettgeri* B221::Tn*6368*. El recuadro amarillo representa la zona repetida, la zona naranja muestra la región de ADN que fue removida posterior al procedimiento y la línea punteada es la zona de corte seleccionada para la respectiva circularización manual. 79

Figura 4-12. Mapeo de la unidad translocativa TU*6368* con distintos puntos de inicio. Se muestran los marcos abiertos de lectura de los genes de la unidad translocativa TU*6368* con distintos puntos de inicio A. gen *repA*, B. secuencia de inserción IS*26* truncada y C. gen *parD* y el mapeo de las lecturas con respecto a cada punto de inicio. 80

Figura 4-13. Estructura de la unidad translocativa TU*6368*. Se muestran los marcos abiertos de lectura de los genes de la unidad translocativa. Las secuencias de inserción IS*26* (lacre) e IS*6368* (morado) se observan truncadas. Los operones de los sistemas TA, *parDE* y *relEB* se corresponden a los del plásmido p06-1619-NDM. Las barras grises y rojas (secuencias invertidas) entre cada secuencia corresponden a regiones con >94% de identidad nucleotídica. 81

Figura 4-14. Posible explicación de la formación de la unidad translocativa TU*6368*. Inicialmente se dio una transposición intramolecular de la secuencia de inserción IS*26* (1) que generó una orientación directa de las secuencias de inserción IS*6368*, a partir de las cuales se dio la formación de la formación de la unidad translocativa TU*6368* con la presencia del gen repa y los operones *parDE* y *relEB*, (2) seguido de un proceso de resolución basada en la IS*6368* para el remanente del plásmido p06-1619-NDM que conserva en gen de resistencia bla_{NDM-1}. 84

Figura 4-15. Posibles eventos genéticos para la obtención de cepas sin fenotipo de resistencia a carbapenémicos. En una etapa inicial posiblemente se dio la formación de la unidad translocativa TU*6368* en la población bacteriana (A, B) y seguidamente la movilización de la secuencia de inserción IS*6368* a cromosoma en una fracción de la población bacteriana (B). La presencia de la unidad translocativa con los operones de los sistemas TA (*parDE, relEB*) posiblemente desencadenó la pérdida del plásmido p06-1619-NDM, y con ello del gen de resistencia a antibióticos β-lactámicos (bla_{NDM-1}) (A,B). Una baja

estabilidad de la unidad translocativa, posiblemente permitió su eliminación (A, B), dando lugar a cepas libres del plásmido NDM positivo y de la unidad translocativa. Una fracción de la población bacteriana posiblemente permaneció sin cambios genéticos espontáneos, conservando las características de la cepa original (resistencia a β-lactámicos) y el plásmido p06-1619-NDM (C). 87

Figura Anexo A. Secuencia nucleotídica y traducción a aminoácidos de los genes de las antitoxinas recombinantes *parD* y *relB* clonadas en el plásmido pBC SK (+). Las posiciones de los primers empleados para de la identificación de la secuencia de los genes se observan resaltadas con gris, los sitios de reconocimiento para las enzimas SacI, XbaI y EcoRI se observan marcadas de colores específicos. El promotor *lac* y el operador *lac* se observan resaltados en amarillo y celeste respectivamente. El codón de inicio (ATG) del gen *parD* y *relB* se observan en un círculo verde y naranja, respectivamente. La secuencia para las etiquetas de fusión His-Tag y FLAG-Tag están resaltadas en verde y oliva, respectivamente..... 91

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1. Oligonucleótidos usados en este estudio. 25
Tabla 2-2. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio. 28
Tabla 2-3. Enzimas de restricción del sitio de clonación múltiple del vector pBC SK(+). .35
Tabla 2-4. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes recombinantes *parD-his* y *relB-flag.* 35
Tabla 4-1. Recuento de UFC para la muestra B221 en el día 30 curva de estabilidad plasmídica. 70

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
bla	β-lactamasa
CAZ	Ceftazidima
CRE	Enterobacterias resistentes a carbapenémicos
GES	β-lactamasa de espectro extendido de Guyana
GIM	Imipenemasa alemana
IMP	β-lactamasa con capacidad de hidrolizar imipenem
IS	Secuencia de inserción
KPC	Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*
MDR	Resistentes a múltiples fármacos
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NDM	Metalo-β-lactamasa de Nueva Delhi
NmcA	No metaloenzima carbapenemasa A
OXA	β-lactamasa con capacidad de hidrolizar oxacilina
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas de unión a penicilina
PSK	Sistema de muerte post-segregacional (Post-segregational Killing System)
SBL	Serina β-lactamasa
SIM	Imipenemasa de Seúl
SMART	Estudio para el seguimiento de tendencias de resistencia antimicrobiana
SME	Enzima de *Serratia marcescens*
TA	Toxina-Antitoxina
Tn	Transposón
TU	Unidad translocativa
TSD	Duplicación del Sitio Blanco
VIM	Metalo-ß-lactamasa de Verona codificada por integrón

Introducción

El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema crítico de salud pública mundial [1]. En los últimos años, las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos se asocian con altas tazas de morbilidad y mortalidad, particularmente en aquellas producidas por organismos Gram negativos como lo son las enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE, *Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae*) [2]. Para la Organización Mundial de la Salud, estos organismos se consideran "patógenos prioritarios" resistentes a múltiples antibióticos (MDR, *Multidrug-resistant*) que están emergiendo rápidamente [3]; ya que, se han convertido en una causa importante de infecciones hospitalarias y en la comunidad, siendo una grave amenaza para la salud pública [4-6].

En la familia *Enterobacteriaceae* así como en otros Gram negativos (*Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*) las opciones terapéuticas para tratar sus infecciones son cada vez más limitadas [2, 7, 8] debido a que la efectividad de los carbapenémicos, antibióticos potentes de amplio espectro usados como agentes de última línea [6] se ha visto gravemente comprometida por la resistencia conferida por las β-lactamasas [9], enzimas cuyo rango de actividad hidrolítica incluye carbapenémicos e inhibidores de β-lactamasas [10]. Una de estas enzimas, la metalo-β-lactamasa de Nueva Delhi (NDM, *New Delhi metallo-β-lactamase*) era desconocida antes de 2008 [11] y desde entonces NDM-1 y sus variantes se han convertido en un punto de atención mundial debido a su alta circulación entre diferentes clones y especies bacterianas hospedadoras, lo que ha llevado a que prácticamente todos los países realicen vigilancia epidemiológica para detectar cepas NDM positivas y el estado de diseminación en diferentes regiones [12-15].

Las cepas NDM positivas que mayoritariamente se reportan a nivel mundial incluyen las enterobacterias, entre las cuales, *Klebsiella pneumoniae* es la especie más común, seguida de *Escherichia coli* y *Enterobacter spp*., de ahí que la familia *Enterobacteriaceae* se considera como el principal hospedero del gen bla_{NDM}; sin embargo, este gen también

se reporta en otros géneros bacterianos como los es *Acinetobacter spp.* [15]. En *Acinetobacter spp*. el gen *bla*$_{NDM}$ está asociado a plásmidos altamente conservados que no pertenecen a ninguno de los grupos de incompatibilidad reportados hasta la fecha, los plásmidos pNDM-BJ01-like que tienen la estructura típica de un transposón Tn*125* (elemento genético móvil responsable de la transposición del gen *bla*$_{NDM-1}$ desde plásmidos pNDM-BJ01-like a otros plásmidos) flanqueado por dos secuencias de inserción IS*Aba125* [16, 17]. Varios hechos sugieren que el gen circulante más común en las enterobacterias (*bla*$_{NDM}$) evolucionó a partir de *Acinetobacter spp.* como producto de la fusión entre un gen de resistencia a aminoglucósidos y un gen para una metalo-β-lactamasa preexistente [18], y que posteriormente este producto quimérico fue transferido a algún plásmido pNDM-BJ01-like en *Acinetobacter baumannii* de donde migró a las enterobacterias, en las que, el elemento genético móvil portador de *bla*$_{NDM}$, el transposón Tn*125* se ha interrumpido o truncado para generar una variedad de contextos genéticos complejos para *bla*$_{NDM}$; lo que resulta que este gen no esté asociado a cepas clonales dominantes, sino que esté mediado por diversos tipos de plásmidos conjugativos que pueden variar de tamaño, contenido de genes y grupos de incompatibilidad [14, 15, 19, 20]. Aunque se sugiere que *Acinetobacter spp.* ha sido un reservorio de *bla*$_{NDM}$ antes de apuntar a las especies de enterobacterias [21, 22], aún no está claro este nexo epidemiológico de transmisión de NDM entre bacterias no fermentadoras (*Acinetobacter spp.*) y fermentadoras (*Enterobacteriaceae*). Sin embargo, dentro de esta evolución epidemiológica, *Providencia spp.* parece jugar un papel importante en la diseminación de *bla*$_{NDM-1}$, dado que los reportes de este tipo de bacteria transportando este gen de resistencia han incrementado en los últimos años en el mundo tanto a nivel hospitalario como comunitario [23-31]. Adicional a esto, en una *Providencia rettgeri* proveniente de un brote reportado en Monterrey, México [25] se identificó un plásmido pNDM-BJ01-like, cuya variante se denominó p06-1619-NDM [17]. Este hallazgo es interesante, puesto que este tipo de plásmido no es frecuente en enterobacterias (solo existen dos reportes en el mundo de enterobacterias con plásmidos pNDM-BJ01-like [17, 32]); sin embargo, se cree que su adquisición es indispensable para la generación de los diversos plásmidos NDM positivos encontrados en las bacterias no-*Acinetobacter* en las etapas tempranas de diseminación de *bla*$_{NDM-1}$ cuando este gen es adquirido desde *Acinetobacter spp.* [17].

El plásmido p06-1619-NDM a pesar de compartir un alto porcentaje de identidad con los plásmidos pNDM-BJ01-like (>99% de identidad nucleotídica sobre 74% de la secuencia de

pNDM-BJ01), presenta una diferencia con estos y es la inserción de un transposón novedoso, el Tn*6368* que hasta la fecha solo ha sido reportado en *P. rettgeri*. La incorporación de este transposón putativo afectó dos mecanismos de mantenimiento de los plásmidos, el primero, el sistema de segregación tipo Ia por la deleción de los genes de partición *parB* y *parS*; y el segundo, el sistema de resolución de multímeros por la deleción del gen de la resolvasa *res*; pero incorporó dos sistemas de muerte post-segregacional (PSK, *Post-Segregational Killing*) o sistemas toxina-antitoxina (TA) tipo II, los operones putativos ParDE y RelEB (Figura I) que codifican una toxina estable y una antitoxina lábil [17]. En estos operones, los genes *parE* y *relE* codifican dos toxinas estables (tóxicas para la bacteria hospedadora) y los genes *parD* y *relB* codifican dos antitoxinas lábiles que se degradan fácilmente y bloquean la acción tóxica de las proteínas ParE y RelE [33, 34].

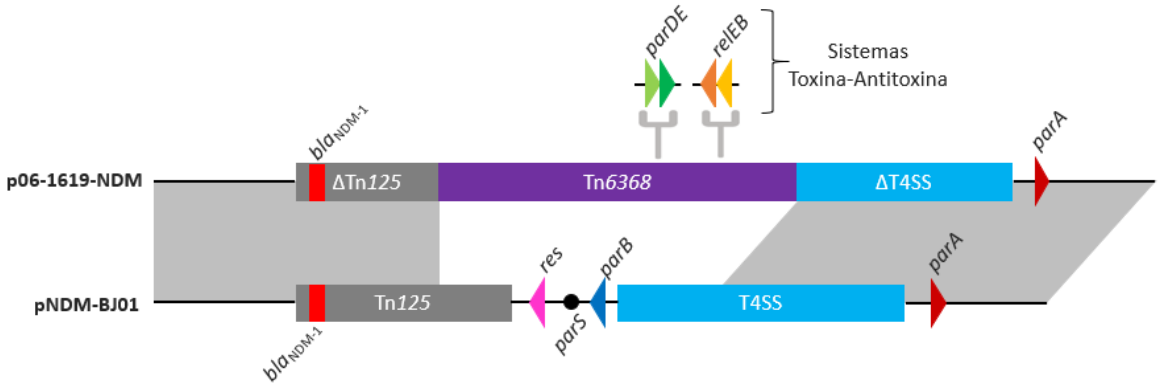


Figura I. Incorporación del elemento genético móvil putativo Tn*6368* en el plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri*. La incorporación del Tn*6368* en el plásmido p06-1619-NDM adicionó dos sistemas toxina-antitoxina tipo II, truncó el transposón Tn*125* sin afectar el gen de resistencia *bla*$_{NDM-1}$ y generó la deleción de los genes *parB*, *parS* y *res* implicados en el sistema de segregación tipo Ia y en el de resolución de multímetros respectivamente para plásmidos pNDM-BJ01. Figura tomada de [35].

Los sistemas TA son importantes para promover la persistencia de plásmidos y otros elementos genéticos móviles en la bacteria que los alberga [36, 37]. Si el plásmido que lleva un sistema TA no se transmite a la progenie (transferencia vertical), la antitoxina inestable se degrada, mientras que la toxina estable permanece y actúa sobre sus dianas celulares para matar o inhibir el crecimiento de las células libres de plásmidos. Este efecto se denomina muerte post-segregacional [38]. Aunque los plásmidos ayudan a las bacterias a adaptarse a una gran variedad de entornos, estrés y condiciones hostiles, como la

resistencia a antibióticos de amplio espectro que favorece la supervivencia de la bacteria en entornos clínicos; la expresión de genes y la replicación del plásmido imponen un gran costo biosintético sobre la bacteria hospedadora [39], por lo que en ausencia de selección, un plásmido podría ser rápidamente eliminado de la población bacteriana. Sin embargo, factores como los sistemas TA o PSK pueden favorecer la persistencia de los plásmidos con resistencia a antibióticos de amplio espectro, inclusive en ambientes que no son hostiles para la bacteria que los alberga [37]. Para el caso del plásmido p06-1619-NDM, es probable que la incorporación del Tn*6368* con los dos sistemas TA pueda tener un efecto en la persistencia de este plásmido y, por tanto, en la resistencia a carbapenémicos (por el gen $bla_{\text{NDM-1}}$), inclusive en ambientes que no son hostiles para la bacteria; es decir, ambientes sin selección como es el caso de la comunidad donde *P. rettgeri* circula con frecuencia.

Estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana por Márquez-Ortiz A. y colaboradores en 2017 señalan que el plásmido p06-1619-NDM presenta una gran estabilidad en *P. rettgeri* (Figura II A), en donde no fue posible lograr su eliminación cuando esta bacteria fue cultivada sin presión selectiva (ausencia de antibiótico) por 28 días. Sin embargo, cuando este plásmido (p06-1619-NDM) fue transferido a *E. coli* (cepa J53, derivada de la cepa K-12), presentó una baja estabilidad perdiéndose después de los primeros siete días de crecimiento continuo sin presión selectiva (Figura II B). Indagando sobre el genoma de la cepa receptora *E. coli* J53, se pudo establecer que dicha cepa a nivel cromosomal codifica una antitoxina putativa RelB con 99% de identidad a nivel de proteína con la antitoxina RelB de uno de los sistemas TA codificado en el Tn*6368* del plásmido p06-1619-NDM, lo que sugiere que la *E. coli* transconjugante no requiere la presencia del plásmido para producir la antitoxina, puesto que tiene un gen cromosomal que podría suplir esta actividad, lo cual explicaría la menor estabilidad de dicho plásmido en este hospedero [35]. Sin embargo, no se ha demostrado experimentalmente la participación de los sistemas TA putativos ParDE y RelEB en la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM transportado por *P. rettgeri*; por tanto, es necesario saber si la expresión exógena de las antitoxinas putativas ParD y RelB afectan la estabilidad de dicho plásmido en *P. rettgeri* tal como sucedió en *E. coli*.

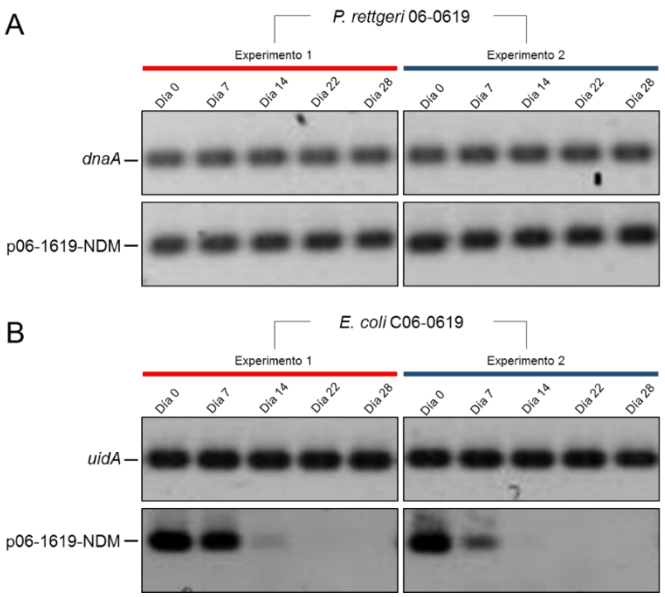


Figura II. Evaluación de la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM. La estabilidad del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri* (A) *y E. coli* J53 (B) se evaluó por comparación de ADN plasmídico y cromosomal por PCR durante 28 días de crecimiento continuo en medio sin presión selectiva. Los genes *dnaA* y *uidA* son genes cromosomales de única copia de *P. rettgeri* y *E. coli*, respectivamente. El ADN plasmídico se detectó con oligonucleótidos específicos para el plásmido p06-1619-NDM. Figura tomada de [35].

A pesar de que los sistemas TA tipo II son abundantes en genomas bacterianos, tanto a nivel cromosomal como plasmídico [38, 40] y existe gran cantidad de literatura que los describe, el estudio de las antitoxinas sigue siendo un reto técnico a nivel de laboratorio debido a su baja estabilidad [41]. Adicionalmente, los ensayos de estabilidad plasmídica mediada por sistemas TA en cepas multirresistentes provenientes de aislamientos clínicos son nulos, como en el caso de *P. rettgeri*, un patógeno que usualmente no es considerado como principal objetivo de los sistemas de vigilancia de salud pública; sin embargo, puede tener un papel importante en la diseminación y almacenamiento de mecanismos de resistencia. Teniendo en cuenta que la diseminación de la resistencia se favorece enormemente por los mecanismos involucrados en la estabilidad plasmídica mediada por elementos genéticos móviles que adicionan sistemas TA o PSK, resulta indispensable determinar la estabilidad y los mecanismos moleculares asociados a este proceso en el plásmido p06-1619-NDM en *P. rettgeri* para establecer el papel de esta especie bacteriana como reservorio de la resistencia, puesto que los análisis sugieren que las modificaciones encontradas en el plásmido p06-1619-NDM pueden estar afectando la estabilidad de la

resistencia a carbapenémicos en esta bacteria y por ende en la familia *Enterobacteriaceae*. El aporte en conocimiento que permita establecer los mecanismos moleculares que favorecen la diseminación de la resistencia antimicrobiana, puede a mediano y largo plazo, brindar herramientas para el desarrollo racional de terapias novedosas, que pueden usar como dianas dichas estrategias moleculares.

Objetivos

Objetivo General

Establecer la asociación del sistema de muerte post-segregacional en la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM de *Providencia rettgeri.*

Objetivos Específicos

- Diseñar y producir un plásmido recombinante que exprese las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas de muerte post-segregacional del plásmido p06-1619-NDM.

- Transformar el plásmido recombinante productor de las antitoxinas ParD y RelB en una cepa de *Providencia rettgeri* transportadora del plásmido p06-1619-NDM.

- Evaluar el efecto en la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en la cepa de *Providencia rettgeri* que transporte los dos plásmidos productores de antitoxinas por cuantificación de ADN plasmídico.

1. Marco teórico

1.1 Antibióticos carbapenémicos

Los carbapenémicos son antibióticos β-lactámicos junto con las penicilinas y cefalosporinas, pero difieren de estas en su estructura química exacta que se caracteriza por la condensación de un anillo β-lactámico y otro pirrolidínico de cinco miembros e insaturado que contiene un átomo de carbono en vez de un átomo de azufre [42, 43] y cuya combinación confiere una estabilidad excepcional contra la mayoría de las β-lactamasas [44].

Los carbapenémicos, al igual que todos los β-lactámicos producen un efecto bactericida parcial [45] principalmente a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana al interferir en la formación de una estructura esencial, el peptidoglicano, mediante un bloqueo en la última etapa de su producción, la transpeptidación (Figura 1-1). La transpeptidación consiste en el entrecruzamiento de tetrapéptidos de ácido N-acetilmurámico a partir de pentapéptidos, para lo que se necesita la acción de unas enzimas denominadas transpeptidasas o proteínas de unión a la penicilina (PBPs, *penicilin-binding proteins*). El anillo β-lactámico al presentar una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, es capaz de unirse a las PBPs de forma covalente causando la activación de endolisinas que promueven la destrucción enzimática del peptidoglicano, lo que impide la formación de la pared celular que finalmente desencadena la muerte celular bacteriana por su exposición al medio y generación de cambios en la presión osmótica [45, 46].

En general, los carbapenémicos son similares en cuanto a su espectro de acción que incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas y anaerobios [47]; sin embargo, pequeñas diferencias en su actividad antimicrobiana, determina las indicaciones terapéuticas de cada uno [43], así el imipenem, panipenem y doripenem son potentes

antibióticos contra las bacterias Gram positivas; en tanto que, el meropenem, biapenem, ertapenem y doripenem son ligeramente más efectivos contra Gram negativas [6]. El amplio espectro de acción, la actividad antimicrobiana, la menor vulnerabilidad a los determinantes de resistencia y los bajos efectos adversos, hace que los carbapenémicos sean considerados como el último recurso más confiable en el tratamiento empírico, en monoterapia o en combinación con otros antibióticos, de numerosas infecciones nosocomiales graves, incluso algunas de origen comunitario; y en la terapéutica dirigida de las producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes [43, 44]. Adicionalmente, los carbapenémicos se prefieren a otros tipos de antimicrobianos en el tratamiento de infecciones invasivas o potencialmente mortales debido a su efecto de destrucción independiente de la concentración en las bacterias infectantes; sin embargo, la aparición y propagación de la resistencia a estos antibióticos constituyen una preocupación importante para la salud pública [47].

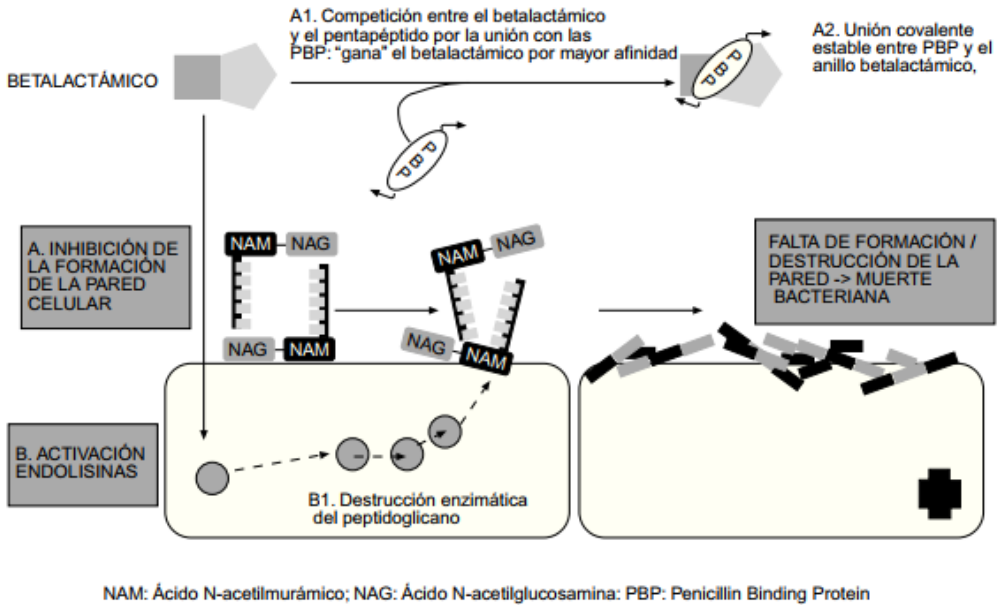


Figura 1-1. Mecanismo de acción de los antibióticos β-lactámicos. Inicialmente se da una competencia estructural entre el pentapéptido y el anillo β-lactámico por unión con las PBPs, seguido de una unión covalente estable entre ellas que inhibe la formación del peptidoglucano y activa endolisinas que desencadenan muerte celular. Figura tomada de [46].

1.1.1 Mecanismos de resistencia a carbapenémicos

La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día aparecen y se propagan nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Uno de estos problemas es la creciente resistencia a carbapenémicos, antibióticos de último recurso que se usan para el tratamiento de numerosas infecciones. Dentro de los mecanismos asociados a la resistencia a este tipo de antibióticos se destaca la expresión de bombas de eflujo que expulsan de manera activa los carbapenémicos del espacio periplásmico después de su entrada, la disminución de la permeabilidad de la membrana externa que impide que el carbapenémico alcance sus PBPs, los cambios o mutaciones en las PBPs que disminuyen la afinidad por el carbapenémico y la producción de carbapenemasas que inactivan los carbapenémicos y otros antibióticos β-lactámicos, siendo este último mecanismo el más relevante, debido a que está codificado por genes que son transferibles vertical y horizontalmente por plásmidos o transposones [44, 47].

Las carbapenemasas son β-lactamasas que se han reportado principalmente en la familia *Enterobacteriaceae*, en *A. baumannii* y *P. aeruginosa* [48], siendo las que más alarma y preocupación han causado en los últimos años, ya que constituyen la familia más versátil de las β-lactamasas por su capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros β-lactámicos [43, 49]. Se conocen tres tipos moleculares de carbapenemasas denominados A, B y D con base al esquema de clasificación de Ambler (dentro del grupo C no se han reportado carbapenemasas) [50]. Las carbapenemasas de las clases A y D son serina β-lactamasas (SBLs) que contienen una serina en el sitio activo y pueden inactivarse por los inhibidores de β-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam); mientras que las de clase B, son metalo β-lactamasas (MBLs) que requieren uno o más átomos de zinc en el sitio activo, para hidrolizar el anillo β-lactámico bicíclico [48, 49].

Las carbapenemasas de clase A incluyen las enzimas SME, NmcA/IMI generalmente codificadas cromosómicamente, mientras que las enzimas KPC y GES están codificadas por plásmidos con capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y aztreonam. También se han encontrado carbapenemasas clase B como IMP , VIM, GIM, SIM y NDM, cuyos genes se encuentran principalmente en plásmidos transferibles en la

familia *Enterobacteriaceae*, pero también en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, e hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos; no se une a los inhibidores y son inactivas frente a monobactámicos (aztreonam). De manera similar, las carbapenemasas clase D tipo OXA se encuentran tanto en plásmidos como en cromosoma y tienen baja actividad sobre cefalosporinas de amplio espectro [44, 48, 51, 52].

1.2 Generalidades de *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos

Enterobacteriaceae es una familia de diversas Gamma proteobacterias que incluyen patógenos humanos frecuentes (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella entérica, Enterobacter cloacae*) y poco frecuentes (*Proteus mirabilis*, *P. rettgeri*, *Citrobacter freundii*) con resistencia antibiótica creciente. Debido al uso indiscriminado de los antibióticos y a la falta de control de infecciones en las instalaciones sanitarias [44], las enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE, *Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae*) son un problema urgente de salud pública mundial ya que exhiben resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles actualmente, lo que desencadena una alta mortalidad y un tratamiento limitado [53, 54].

La resistencia a carbapenémicos en las CRE se debe principalmente a la expresión de enzimas tipo carbapenemasas que degradan los antibióticos β-lactámicos incluidos los carbapenémicos, antibióticos de última línea para el tratamiento de infecciones nosocomiales. Actualmente, tres tipos de carbapenemasas se consideran como las β-lactamasas de mayor importancia epidemiológica y clínica según datos del SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*): KPC, NDM y OXA-48 [55, 56] y cuya distribución es global (Figura 1-2) [19], debido a su presencia en entornos hospitalarios y comunitarios. A nivel hospitalario, una serie de factores predisponen a las personas a las infecciones por CRE, siendo la neumonía asociada a ventilador, bacteriemia, infecciones del tracto urinario y del sitio quirúrgico los más relevantes [47], en tanto que las infecciones en la comunidad parecen estar asociadas a portadores CRE asintomáticos, lo que representa un reservorio potencial de la resistencia [57].

Hasta la fecha, las especies más comunes de enterobacterias que albergan genes de carbapenemasas transmisibles son *K. pneumoniae* y *E. coli* [19]; sin embargo, especies

del género *Providencia* resistentes a carbapenémicos son cada vez más reportadas en los sistemas de salud [58].

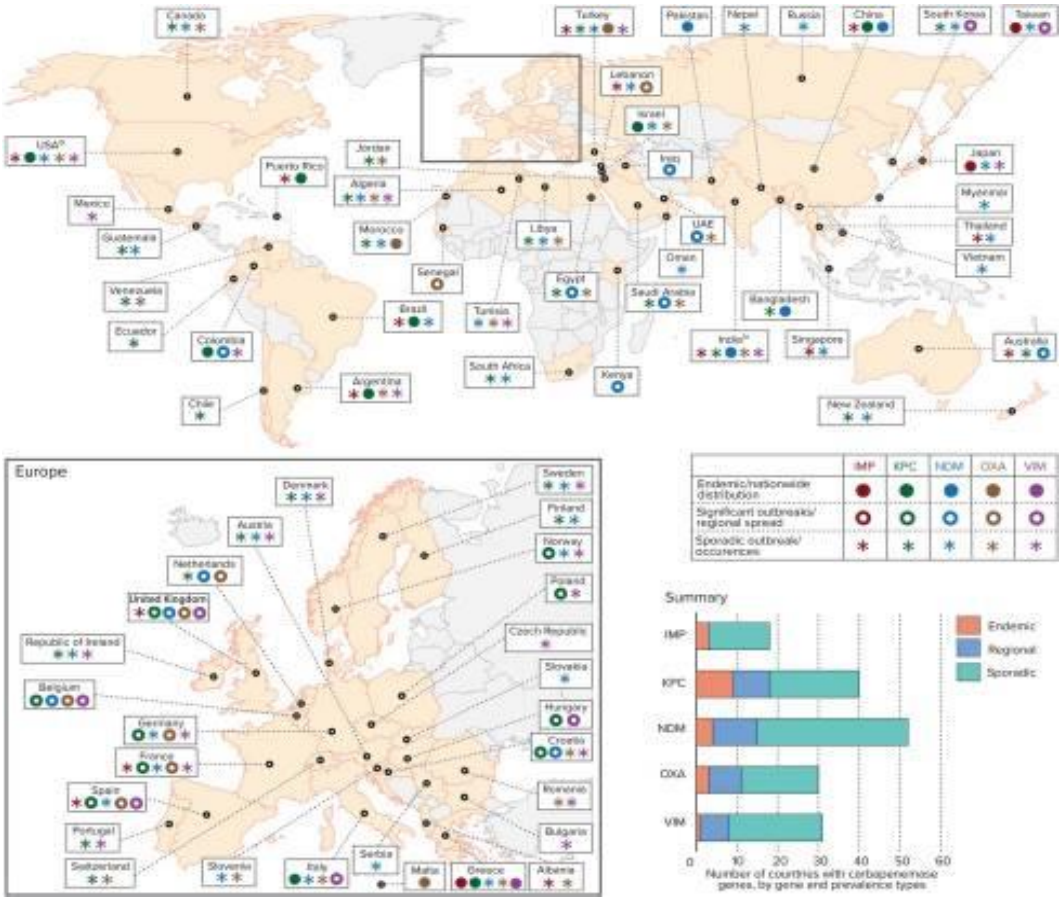


Figura 1-2. Distribución global de carbapenemasas en enterobacterias, por país y región. Abreviaturas: IMP, β-lactamasa con capacidad de hidrolizar imipenem; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; NDM, metalo-β-lactamasa de Nueva Delhi; OXA, β-lactamasa hidrolizante de carbapenem tipo oxacilinasa; VIM, metalo-β-lactamasa codificada por integrones de Verona. Figura tomada de [19].

1.2.1 *Providencia rettgeri* resistente a carbapenémicos

El género *Providencia* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, que junto *Proteus* y *Morganella* forman la tribu *Proteeae* y es parte de la flora intestinal humana [31]. Entre las especies de *Providencia*, *P. stuartii* y *P. rettgeri* son las causas más comunes de infecciones del tracto urinario y de la piel, bacteriemia, gastroenteritis (diarrea del viajero), meningitis y endocarditis, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y con

catéteres urinarios permanentes, por lo que tienen un impacto significativo en la morbilidad, la mortalidad y el tratamiento de los pacientes [31, 58-60].

Providencia rettgeri es un bacilo gramnegativo no fermentador de lactosa, aerobio o anaerobio facultativo y móvil que se diferencia de otros géneros de la tribu *Proteeae* en función de reacciones bioquímicas específicas, principalmente por la desaminación oxidativa de aminoácidos aromáticos (triptófano y fenilalanina) a su correspondiente cetoácido y amoníaco [58-61]. *P. rettgeri* fue descubierto por Rettger en 1904 a partir de una epidemia similar al cólera en pollos, y desde entonces se ha aislado de aves de corral, heces de reptiles y anfibios y aguas superficiales; y rara vez de las heces humanas y del tracto urinario sin infección [60].

Providencia rettgeri es un patógeno clínicamente significativo, aunque poco estudiado que está emergiendo como un nuevo patógeno oportunista con alta resistencia a los antibióticos [62]. Las infecciones causadas por *P. rettgeri* son raras, siendo las infecciones del tracto urinario y la bacteriemia las más reportadas [58, 60] debido a la producción de ureasa bacteriana, un importante factor de virulencia asociado con la formación de cálculos en el tracto urinario, obstrucción de los catéteres urinarios a largo plazo o desarrollo de pielonefritis aguda que puede conducir a una infección sistémica [60, 61]. El tratamiento de las infecciones producidas por *P. rettgeri* es un reto y una preocupación particular a nivel hospitalario, porque en los últimos años, las cepas productoras de carbapenemasas han incrementado paulatinamente, lo que ha disminuido las alternativas para la terapia antimicrobiana, sumado a esto, estas cepas presentan resistencia intrínseca frente a polimixinas y tigeciclina, lo que dificulta aún más el tratamiento de las cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR) de este patógeno oportunista de importancia clínica [31, 58, 62]

El mecanismo de resistencia más común a los carbapenémicos en *P. rettgeri* está mediado por la metalo β-lactamasa-1 de Nueva Delhi (NDM-1), siendo este organismo clave para la diseminación de esta carbapenemasa [58]. La primera aparición de productores de NDM-1 en aislamientos clínicos de *P. rettgeri* se informó en Israel en 2013 y desde entonces, se han notificado otros casos en varios países del mundo [23-31]; sin embargo, otras carbapenemasas tipo OXA-72 e IMI-1 también se han reportado en éste microorganismo, de ahí que la alta prevalencia de *P. rettgeri* resistente a carbapenémicos hace que se requieran medidas para controlar oportunamente su propagación [58].

1.3 Elementos genéticos de diseminación de resistencia

Existen dos tipos de resistencia bacteriana a los antibióticos: la resistencia intrínseca y la adquirida. La primera, la presentan de forma natural las bacterias y está asociada a genes cromosomales tales como los codificantes de ciertos sistemas de expulsión activos. Por otro lado, la resistencia adquirida es la que presentan de forma no natural como consecuencia de mutaciones en genes propios de la bacteria o por adquisición de material genético procedente de otra bacteria (bien sea del mismo género bacteriano u otro) [63].

La localización de los genes de resistencia específicos en elementos genéticos móviles o movilizables (plásmidos, transposones o casetes génicos en integrones) hace posible esta transmisión, conocida con el nombre de transferencia horizontal. Los elementos genéticos móviles son segmentos de ADN que codifican las proteínas necesarias para mediar el movimiento de ADN entre genomas, desempeñando así un papel muy importante en la evolución de las especies [64]. Los principales procesos por los que se produce este intercambio de resistencia son tres: conjugación (plásmidos y transposones conjugativos), transformación (ADN cromosomal desnudo o plásmidos) o transducción (bacteriófagos) [63]. Los elementos genéticos móviles más prevalentes entre las especies bacterianas son los plásmidos, elementos genéticos transponibles y casetes génicos en integrones. Para nuestro estudio, es importante conocer acerca de los plásmidos, por tanto, se describen a continuación.

1.3.1 Plásmidos

Un plásmido puede definirse como una molécula de ADN extracromosomal de doble cadena, circular covalentemente cerrada y capaz de replicarse de forma autónoma en la bacteria hospedadora. No codifica funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria que lo transporta, pero sí le da ventajas a esta, ya que puede proporcionarle genes de resistencia a antibióticos, de resistencia a metales pesados, o incluso, genes de virulencia [65]. Los plásmidos se pueden encontrar en casi todas las especies bacterianas y su tamaño varía desde 2000 pb a cientos de miles de pares de bases (400 kb). Algunos plásmidos son transferibles por conjugación (plásmidos conjugativos) y otros necesitan la acción de un plásmido conjugativo coexistente en la misma bacteria (plásmidos no-conjugativos móviles) [66].

Los plásmidos están típicamente presentes en múltiples copias, y el número de copias es relativamente estable. El número de copias del plásmido varía ampliamente dependiendo del plásmido, variando desde tan sólo una o dos copias por célula hasta 200 copias por célula para derivados plasmídicos utilizados para la expresión génica recombinante [67]. Los plásmidos representan una importante carga metabólica para sus huéspedes. La carga metabólica asociada con un plásmido particular se determina tanto por la expresión de productos transportados por los plásmidos como por el número de copias de plásmidos dentro de una célula. Los plásmidos de número de copias elevadas se pierden típicamente de poblaciones a una velocidad elevada en ausencia de selección, probablemente debido a que estas construcciones ejercen una gran carga metabólica y carecen de factores de mantenimiento de plásmido encontrados en plásmidos naturales. La pérdida de plásmido se ha identificado como un factor clave que limita el rendimiento de la expresión génica recombinante a gran escala, lo que conduce a esfuerzos sustanciales dirigidos a la comprensión de los mecanismos implicados en la regulación del número de copias del plásmido y pérdida de plásmidos [67].

Dado que la expresión de genes transmitidos por plásmidos sólo confiere una ventaja selectiva en ambientes específicos con el fin de prevenir la pérdida cuando las condiciones cambian, los plásmidos necesitan mecanismos para asegurar su transmisión a las células hijas. Los mecanismos para la propagación vertical del plásmido entre los anfitriones bacterianos caen en las tres categorías siguientes:

- Sistemas de partición: en plásmidos con bajo número de copias albergan genes que permiten la distribución física de los plásmidos, para que cada célula hija reciba al menos un plásmido tras la división celular.
- Segregación aleatoria: en plásmidos con alto número de copias (> 15 copias/célula), cada célula hija recibe al menos un plásmido como resultado de la difusión aleatoria y segregación activa.
- Muerte post-segregacional: mecanismos de matanza selectiva a aquellas células hijas libres de plásmidos, con esto se asegura el mantenimiento de plásmidos en la población.

Además de los mecanismos dedicados a asegurar la transmisión vertical, la transferencia conjugada se puede considerar como un mecanismo que promueve la estabilidad plasmídica, ya que permite que algunos plásmidos se restablezcan en células sin plásmido [67].

1.4 Sistemas de muerte post-segregacional

Los sistemas de muerte post-segregacional (PSK, *post segregational killing*), corresponden a sistemas toxina-antitoxina codificados en plásmidos y otros elementos móviles que afectan la viabilidad de las células hijas libres de plásmidos, garantizando así la persistencia del plásmido en la población bacteriana. Los sistemas PSK también se conocen como sistemas de adicción porque son difíciles de perder una vez que se adquieren, por lo que son esenciales [68, 69].

Los sistemas toxina-antitoxina (TA) son pequeños módulos genéticos que están involucrados en varios procesos, como la formación de células persistentes, la estabilización de plásmidos y la resistencia a bacteriófagos y antibióticos [70-73]. La mayoría de las bacterias y arqueas contienen módulos TA en sus genomas, a menudo en múltiples copias, presentes tanto en plásmidos como en cromosoma [71, 74]. Los sistemas TA típicamente se organizan en operones bicistrónicos con dos genes que codifican una toxina estable que mata la célula bacteriana o interrumpe un proceso celular, y una antitoxina inestable que impide su toxicidad [74-76]. Las toxinas y las antitoxinas forman un complejo estable que inhibe la actividad de la toxina en condiciones normales de crecimiento. En caso de daño celular o condiciones de estrés, las antitoxinas se degradan permitiendo que la toxina libre se una a su objetivo o diana celular [70, 71].

1.4.1 Clasificación

Desde el descubrimiento inicial de los sistemas TA, se han identificado seis tipos de sistemas diferentes (I-VI) que están codificados en genomas bacterianos, en los que, el producto del gen de la toxina es típicamente una proteína y la del gen de la antitoxina es un ARN no codificante (en los sistemas de TA I y III) o una proteína de bajo peso molecular (en los sistemas de TA II, IV, V y VI). Estos sistemas se han clasificado de acuerdo con la naturaleza de la antitoxina y los mecanismos utilizados por las antitoxinas para neutralizar

la actividad de las toxinas [71, 77, 78]. En la Figura 1-3 se esquematizan las clases de sistemas TA.

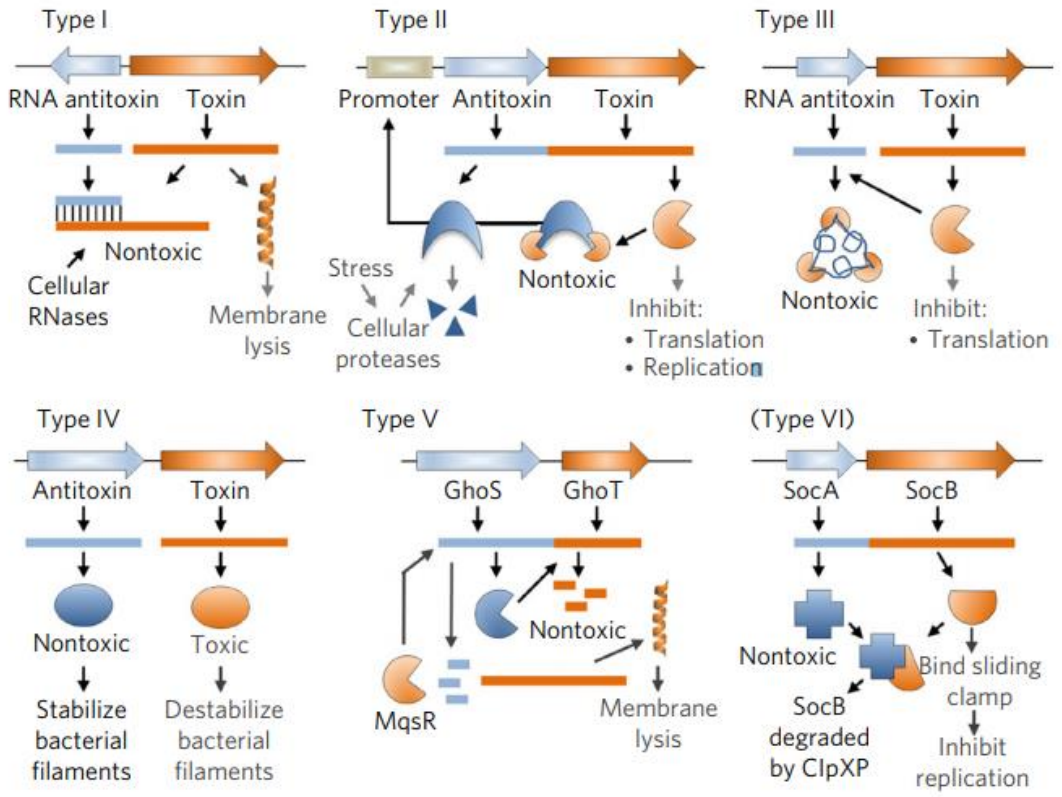


Figura 1-3. Clasificación de los sistemas toxina-antitoxina. Las toxinas se muestran en naranja y las antitoxinas en azul; las actividades que no son tóxicas están en letra negra, mientras que las que son tóxicas están en gris. Figura tomada de [78].

En el sistema tipo I, la expresión del gen de la toxina se regula mediante un ARN anti sentido (ARN-antitoxina) transcrito a partir de un gen adyacente al gen de la toxina, pero en orientación inversa. El reconocimiento del ARN anti sentido al ARNm de la toxina impide la traducción de la toxina. En el sistema tipo II, la toxina y la antitoxina son proteínas pequeñas codificadas por dos genes que se organizan en un operón y se regulan a nivel transcripcional. La antitoxina forma un complejo proteína-proteína con la toxina resultando en su neutralización, al inhibir sus efectos nocivos. En condiciones de estrés, se activan proteasas celulares tipo Lon y Clp que escinden preferentemente las antitoxinas, liberando las toxinas para inhibir el crecimiento mediante la inhibición de la traducción o la replicación. Este sistema se describe en detalle más adelante. En el sistema tipo III, el ARN

de la antitoxina es procesado por la toxina endoribonucleasa (RNasa), lo que resulta en la formación de complejos de ARN-proteína que inhiben la actividad de la toxina. En el sistema tipo IV, la antitoxina neutraliza la toxina al estabilizar los filamentos bacterianos, mientras que la toxina los desestabiliza, por lo que no hay interacción directa de estas. En ausencia de la antitoxina, esta desestabilización mediada por toxinas inhibe la división celular. En el sistema tipo V, la antitoxina actúa como una endoribonucleasa que degrada el ARNm que codifica la toxina, por tanto, hay inhibición de la traducción. En el sistema tipo VI, la antitoxina es una proteína adaptadora que se une a la toxina para promover su degradación por Clp. Cuando no se degrada, la toxina se une a la hebra deslizante para inhibir la replicación del ADN [38, 70, 71, 78].

1.4.2 Sistemas toxina-antitoxina tipo II

De todos los sistemas antes mencionados, los sistemas TA tipo II son los mayoritariamente distribuidos y los mejor caracterizados en procariotas, especialmente en bacterias patógenas [79, 80]. Al igual que los otros sistemas, comprenden dos genes, con el gen antitoxina que precede al gen de la toxina, aunque no necesariamente en este orden y con ambos genes co-transcritos a partir de un solo promotor localizado corriente arriba del gen para la antitoxina (Figura 1-3, Type II); en general, los dos genes se superponen en unos pocos nucleótidos, lo que indica su traducción acoplada [81]. En este sistema, la antitoxina forma un complejo proteína-proteína con la toxina, lo que resulta en su neutralización al inhibir sus efectos nocivos y en condiciones sin estrés, el complejo permanece inactivo en el citoplasma del organismo productor [38, 70, 82]. Debido a que la proteína antitoxina está parcialmente plegada, es más frágil y susceptible a la degradación por las proteasas del huésped (por ejemplo, Lon o Clp), esta degradación o escisión de la antitoxina, liberara la toxina más estable para actuar sobre su diana celular [81], por tanto, mediante este mecanismo simple, los sistemas de TA de tipo II codificados por plásmidos conducen a la muerte celular post-segregacional en la progenie bacteriana desprovista del plásmido, y por ende de los sistemas TA [83]. Es por esta razón, que la antitoxina necesita reponerse constantemente para evitar un exceso de toxinas [81]. Entonces, la concentración celular de la toxina y antitoxina están reguladas por la autorregulación de la transcripción por el complejo toxina-antitoxina, ya que la antitoxina es un represor débil incapaz de impedir completamente la transcripción del operón [83].

Las antitoxinas poseen en general dos dominios claramente diferenciados: un dominio N-terminal de interacción con ADN y una región C-terminal de interacción y neutralización de la toxina. En ausencia de toxina, la antitoxina interacciona con secuencias nucleotídicas discretas en la región promotora del operón TA. Sin embargo, esta unión proteína-ADN es lábil. La interacción antitoxina-toxina permite la formación de un complejo represor completamente funcional, reduciéndose así la transcripción de ambos genes. Este efecto permite mantener unos niveles de toxina en la célula lo suficientemente bajos como para no interferir con el crecimiento normal de la célula, pero lo suficientemente altos como para responder rápidamente ante situaciones en las que el sistema debe activarse [79].

Hasta el momento, los sistemas TA tipo II se pueden dividir en dos grupos según sea la diana de acción de la toxina. En el primero, se da una inhibición de la traducción, dado que las toxinas actúan como endoribonucleasas al segmentar ARNm libre de una manera dependiente de la secuencia o al dirigirse al ARNm asociado con ribosomas. En el segundo, se da una inhibición de la replicación, en donde, las toxinas inhiben de manera directa la actividad de las ADN girasa, que se requiere para aliviar el superenrollamiento que se produce antes de la bifurcación de replicación [81].

Con base a las características estructurales y funcionales de la toxina, los módulos de TA bacterianos de tipo II se pueden categorizar aproximadamente en diez superfamilias: RelEB, MazEF, VapBC, CcdAB, ParDE, HigAB, HipBA, Phd-Doc, HicAB y ωƐζ [79]. De estas, ParDE y RelEB, son las de interés en el estudio.

1.4.3 Regulación de la expresión de los sistemas toxina-antitoxina tipo II

Los sistemas TA de tipo II se inducen bajo condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento celular que incluyen: exposición a antibióticos, falta de nutrientes, estrés oxidativo o por calor, ataque de bacteriófagos o la respuesta inmune del huésped [84]; por lo que su regulación a nivel transcripcional y traduccional debe estar controlada de forma eficiente, dado que, la antitoxina se degrada rápidamente por proteasas celulares y la toxina estable interfiere con procesos celulares vitales [81]. Para garantizar una producción equilibrada de toxinas y antitoxinas, la regulación se da en diferentes niveles.

- **Regulación transcripcional.** La regulación está mediada por la antitoxina que, mediante su dominio N-terminal se une a un sitio del operador que se solapa con el promotor del operón reprimiendo parcialmente su transcripción. Aunque la antitoxina por sí sola es capaz de unirse al operador, su interacción con la toxina (co-represor), la reestructura y estabiliza, permitiendo que el complejo inactivo TA se una de manera más efectiva al operador y se dé la represión total [85].
- **Cooperatividad condicional.** En este mecanismo, la regulación de la expresión del sistema TA depende de la relación entre los niveles de antitoxina y toxina [85]. Cuando la proporción antitoxina > toxina, la antitoxina sola actúa como un represor transcripcional débil; en tanto que cuando la proporción antitoxina < toxina bajo condiciones que promueven la degradación de la antitoxina, se da una represión de la transcripción del operón [86]. Este mecanismo se describió para el sistema RelEB en *E. coli* bajo condiciones favorables y no favorables de crecimiento [87]. En condiciones favorables, los niveles de antitoxina RelB exceden los de toxina RelE, dando lugar a la formación de diferentes complejos TA inactivos: heterotriméricos $RelB_2$:RelE y/o heterotetraméricos $RelB_2$:$RelE_2$, de los cuales, sólo el trímero $RelB_2$-RelE se une de forma efectiva a su operador en el ADN y promueve la unión de un segundo trímero a un sitio adyacente del ADN formando un heterohexámero RelE:$RelB_2$-$RelB_2$:RelE que bloquea la transcripción. En condiciones no favorables, los niveles de antitoxina RelB disminuyen debido a su degradación y a la reducción de la síntesis de proteínas. En estas condiciones aumenta la proporción de moléculas libres de toxina RelE que se unirán a las antitoxinas RelB que forman parte del complejo heterotrimérico o heterohexamérico unido al operador. La interacción de RelE con las antitoxinas provoca un cambio conformacional en RelB que promueve su liberación del ADN y permite la transcripción del operón [85, 87].
- **Regulación traduccional.** Este mecanismo de regulación se debe a que los sistemas TA presentan un acoplamiento traduccional; es decir, el codón de terminación de la antitoxina solapa los primeros codones de la toxina. Este solapamiento pequeño (9-18 nucleótidos) implica que la traducción de la toxina depende de la traducción previa de la antitoxina [88].
- **Regulación postraduccional.** Debido a la diferencia en la inestabilidad de la antitoxina con respecto a la toxina, la primera es más susceptible de degradación

por proteasas celulares, como proteasas dependientes de ATP de tipo Lon y Clp. La degradación de la antitoxina permite la activación del sistema al aumentar la presencia de moléculas de toxina libre [89].

1.4.4 Módulo ParDE

Los sistemas ParDE están muy extendidos dentro de las bacterias y son abundantes en las Gamma proteobacterias y en varias especies de Alfa proteobacterias [90]. ParE es la toxina cargada positivamente que bloquea la replicación del ADN al inhibir la actividad de la ADN girasa [79], mientras que ParD constituye la antitoxina cargada negativamente capaz de neutralizar ParE formando un complejo hermético que también es efectivo en la autorepresión del operón *parDE*. A diferencia de otros sistemas TA que requieren el complejo para una regulación totalmente negativa del operón, ParD solo es suficiente para la autorepresión [91]. El plásmido p06-1619-NDM movilizado en *P. rettgeri* incorporó un sistema putativo ParDE, en el cual, ParE es una proteína de 97 aminoácidos y ParD de 80 aminoácidos (Figura 1-4).

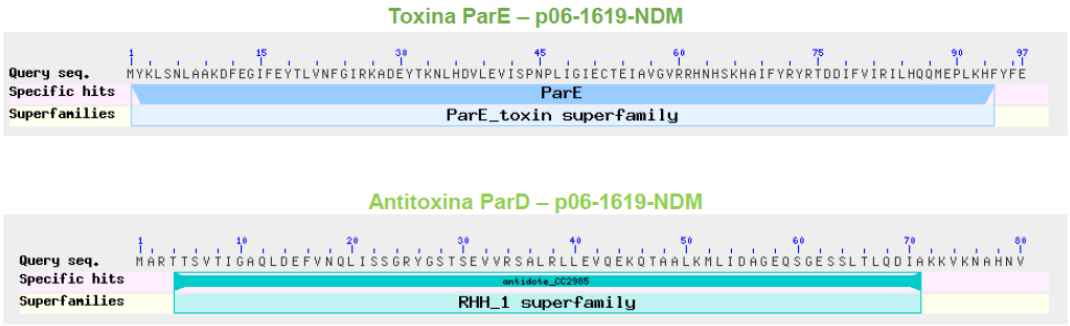


Figura 1-4. Esquema de los dominios conservados en la toxina ParE y antitoxina ParD del sistema putativo *parDE* del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri*. (Número de acceso GenBank: KX832928.1).

1.4.5 Módulo RelEB

Los sistemas RelEB TA están ampliamente distribuidos, con operones anotados en las arqueas y en bacterias Gram positivas y Gram negativas [90]. RelE es la toxina y es una ribonucleasa dependiente de ribosomas que se une al sitio A del ribosoma y luego escinde el ARNm naciente, mientras que RelB constituye la antitoxina que se envuelve alrededor de la toxina, formando una gran estructura compleja que inhibe la entrada de la toxina en

el sitio A ribosómico [79]. El plásmido p06-1619-NDM movilizado en *P. rettgeri* incorporó un sistema putativo RelEB, en el cual, RelE es una proteína de 95 aminoácidos y RelB de 79 aminoácidos (Figura 1-5).

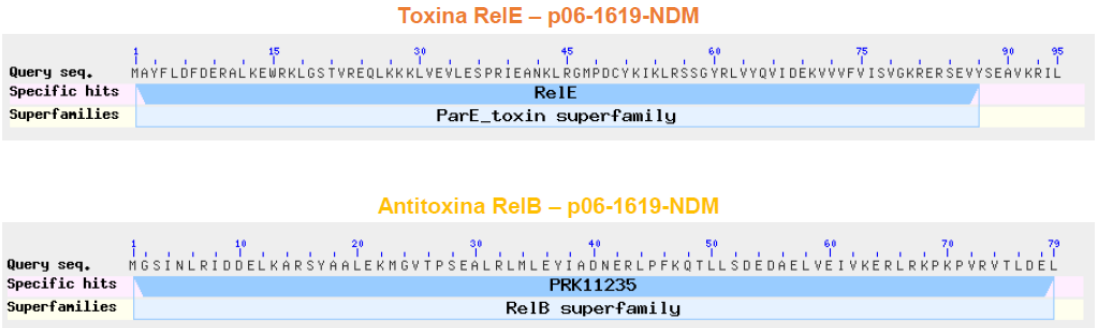


Figura 1-5. Esquema de los dominios conservados en la toxina RelE y antitoxina RelB del sistema putativo *relEB* del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri*. (Número de acceso GenBank: KX832928.1).

1.5 Métodos de detección de proteínas

La identificación y cuantificación de proteínas presentes en una célula, tejido u organismo es importante para definir la identidad de las proteínas, conocer su estructura y funciones. La proteómica es una de las ciencias "ómicas" que en los últimos años ha tenido un crecimiento exponencial con la aplicación de diversos métodos para identificar las proteínas; sin embargo, al existir varias tecnologías diferentes para la detección de proteínas, resulta indispensable la selección del método más adecuado que responda la pregunta biológica, se aproxime a los resultados que se esperan en investigación, se adapte al tipo de muestra y sea de fácil acceso para el laboratorio [92, 93]. Los métodos específicos que se pueden emplear para detectar la proteína de interés incluyen métodos cromatográficos como la cromatografía de intercambio iónico, de exclusión de tamaño y de afinidad; y técnicas basadas en anticuerpos o inmunológicas como el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*), el Western blot (WB) y la inmunoprecipitación (IP) [93]. Como se mencionó anteriormente, la selección del método adecuado va a depender de la pregunta de investigación, por lo cual, en la presente revisión nos centraremos a los métodos inmunológicos.

ELISA es un método utilizado para detectar la presencia de un antígeno en una muestra y determinar las concentraciones relativas inmediatas y la concentración absoluta mediante el uso de una curva estándar. Está basado en la inmovilización de un antígeno en un pocillo

de microplaca directamente o por un anticuerpo específico conocido como anticuerpo de captura. Se agrega un anticuerpo de detección primario, formando un complejo antígeno-anticuerpo. El anticuerpo de detección primario está marcado directamente con una enzima o está unido a un anticuerpo secundario conjugado para la detección colorimétrica (anticuerpo de detección secundario). Las ventajas de ELISA son que es un método rápido, sensible y específico que permite el procesamiento de gran cantidad de muestras; es fácil y seguro, y existen múltiples variaciones disponibles (directo, indirecto, sándwich, acoplado); y las desventajas son que se puede presentar la amplificación de una mínima señal y hay probabilidad de reacción cruzada con anticuerpos secundarios [93, 94].

Western blot es una técnica importante y poderosa para la detección de proteínas específicas de baja abundancia de una mezcla compleja de proteínas extraídas de la célula y para determinar el tamaño aproximado de la proteína diana. Está basado en la separación de proteínas mediante electroforesis, seguido de una transferencia a un soporte sólido, una membra de nitrocelulosa o PVDF y la detección de la proteína de interés empleando un anticuerpo primario y secundario acoplado a un marcador quimioluminiscente o fluorescente que permite la visualización. Las ventajas de WB es que es una técnica altamente sensible y puede detectar cantidades muy pequeñas (nano a pico molar) de la proteína diana; y las desventajas son que se requieren numerosos pasos por lo que se podría cometer un error, que puede existir dificultad en la transferencia de proteínas muy grandes (>200 kDa) o muy pequeñas (<10 kDa) [93, 95]

La inmunoprecipitación (IP) conocida también como ensayos de "pull down" (tirar para abajo), es un método utilizado para precipitar y así enriquecer o purificar una proteína deseada de la muestra de interés y también permite estudiar las interacciones proteína-proteína. Está basada la incubación del anticuerpo para la proteína de interés con el extracto celular que permite la unión del anticuerpo a la proteína en solución seguido de un proceso de precipitación que es facilitado por diferentes tipos de esferas (magnéticas, agarosa, sefarosa) que se unen la región Fc del anticuerpo, lo cual a su vez permite separar los complejos antígeno-anticuerpo del lisado total mediante centrifugación. La ventaja de la IP es que permite la purificación o enriquecimiento de proteínas de interés; y la desventaja es que el anticuerpo empleado permanece en la muestra, por lo que la validez de la interacción proteína-proteína necesita ser confirmada por otros métodos [93, 96].

2. Diseño y producción de un plásmido recombinante que exprese las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas de muerte post-segregacional del plásmido p06-1619-NDM

2.1 Materiales y métodos

El cumplimiento de este objetivo se realizó en dos fases, la primera *in silico* y la segunda *in vitro*.

2.1.1 Fase *in silico*

La fase *in silico* consistió en diseñar un plásmido recombinante para la expresión de las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas de muerte post-segregacional del plásmido p06-1616-NDM. Para esto lo primero que se determinó fue la secuencia codificante o marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) de los genes *parD* y *relB* accediendo a la secuencia completa del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri* reportado en el NCBI (número de acceso GenBank: KX832928.1) y se descargó en formato .fasta. En este plásmido se identificó que el gen de la antitoxina ParD esta codificado bajo un promotor distinto al de RelB y se encuentran en anti sentido dentro la secuencia del plásmido (Figura 2-1 A). Lo que se buscó fue obtener una secuencia de ADN que incluyera la secuencia codificante de las dos antitoxinas y que ambas estuvieran reguladas bajo un mismo promotor; además que cada antitoxina estuviera marcada por una etiqueta de fusión específica que sea reconocida por el respectivo anticuerpo y sitios de reconocimiento para tres enzimas de restricción para facilitar la clonación: la primera en el extremo 5´ del gen *parD*, la segunda, una enzima compartida tanto para el gen *parD* en su extremo 3´como para el gen *relB* en su extremo 5´y la tercera en el extremo 3´ del gen *relB (*Figura 2-1 B). Sin embargo, previo a realizar el diseño del plásmido se llevaron a cabo los siguientes pasos:

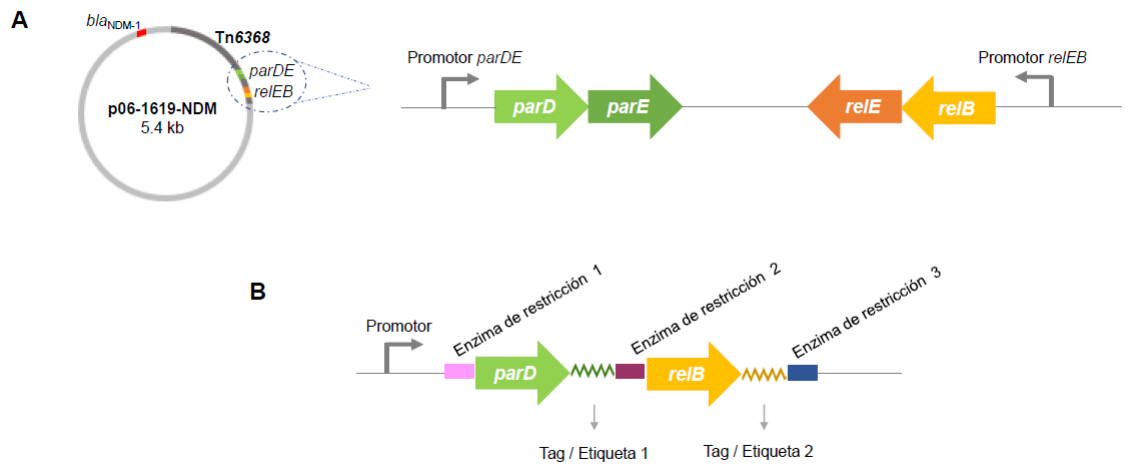


Figura 2-1. Esquema de los genes de las antitoxinas *parD* y *relB* de los sistemas toxina-antitoxina en el plásmido p06-1619-NDM. A. Ubicación de los operones putativos *parDE* y *relEB* en el Tn*6368* del plásmido p06-1619-NDM. Se observa que la secuencia codificante de cada antitoxina está regulada bajo su propio promotor. B. Secuencia de ADN híbrida diseñada para la codificación de las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas TA putativos *parDE* y *relEB* del plásmido p06-1619-NDM que incluye un promotor bajo el cual están regulados los genes de las antitoxinas, mismas que adicionan una etiqueta de fusión diferente y sitios de reconocimiento para tres enzimas de restricción.

- **Búsqueda de vectores de expresión usados en el género *Providencia*.**

La búsqueda de artículos científicos que indicaran en su metodología procesos de mutagénesis, específicamente procesos de complementación en los que un plásmido de expresión con la secuencia de un gen de interés fuese transformado en una cepa del género *Providencia*, se realizó empleando operadores booleanos en el buscador de Google de la siguiente manera: Providencia AND bacteria AND mutant AND deletion AND complement AND plasmid. En el vector de expresión seleccionado fue considerada la resistencia conferida, debido a que la cepa con la que se trabajó (*P. rettgeri* B221) es multirresistente.

- **Selección de las etiquetas de fusión (Tag).**

Las etiquetas de fusión se seleccionaron con base a su bajo tamaño, entre 18 – 24 nucleótidos, de modo que no interfirieran con la estructura o función de las proteínas diana y que los anticuerpos empleados para su detección fueran comerciales [97].

- **Análisis de enzimas de restricción.**

El análisis de las enzimas de restricción que escindían la secuencia de los genes *parD* y *relB* se realizó a través de NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter). Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo entre las enzimas de restricción que escindían los genes *parD* y *relB* y los sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción del sitio de clonación múltiple (SCM) del vector de expresión seleccionado.

- **Diseño de oligonucleótidos específicos.**

El diseño de oligonucleótidos específicos para obtener la secuencia de ADN que codificara las antitoxinas *parD* y *relB* del plásmido p06-1619-NDM se realizó en el programa SnapGene® siguiendo las recomendaciones sugeridas por Nelson y colaboradores para la construcción de transgenes por PCR de solapamiento [98]. Según esto, los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada antitoxina debían tener 23 nucleótidos de la secuencia de la cadena de sentido y de la cadena de anti sentido de cada gen, adicionalmente el oligonucleótido sentido para el gen *parD* recombinante (*parD-his*) debía incorporar un sitio de reconocimiento para la enzima SacI, y el oligonucleótido anti sentido, la secuencia codificante para la etiqueta His-Tag, el codón de parada (Stop) y un sitio de reconocimiento para la enzima XbaI; en tanto que el oligonucleótido sentido para el gen *relB* recombinante (*relB-flag*) debía incorporar un sitio de reconocimiento para el gen *parD-his* que incluyera la etiqueta His-Tag, el codón de parada y el sitio de reconocimiento para la enzima XbaI, y el oligonucleótido anti sentido, la secuencia codificante para la etiqueta FLAG-Tag y un sitio de reconocimiento para la enzima EcoRI (Figura 2-2). Los oligonucleótidos diseñados se denominaron parD_F (GN665), parD_R (GN666) para *parD-his* y relB_F (GN667), relB_R (GN666) para *relB-flag* (Tabla 2-1) y su temperatura de fusión óptima (T_m) se determinó en Thermo Fisher Tm Calculator (https://www.thermofisher.com).

Tabla 2-1. Oligonucleótidos usados en este estudio.

Código LGMB	Secuencia 5'→3'	Secuencia objetivo	Referencia
GN665	GAGCTCATGGCTCGTACAACAAGTGTAAC	Antitoxina *parD*	Este estudio
GN666	TCTAGATTAGTGGTGATGGTGATGATGTACATTATG AGCGTTCTTCACTT		Este estudio
GN667	CATCATCACCATCACCACTAATCTAGATGGGTAGCA TTAACCTGCGTAT	Antitoxina *relB*	Este estudio

GN668	GAATTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGAGTTC ATCCAGCGTCACACGTA		Este estudio
GP309	ATTTAGGTGACACTATAG	Promotor SP6	LGMB
GP438	TAATACGACTCACTATAGGG	Promotor T7	LGMB
GN669	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Promotor T3	Este estudio
GN569	GCCCCCTTCAAGCTGAATTA	*dnaA* *P. rettgeri*	[35]
GN570	GCGTCAGTTCCACAAAAGTCA		[35]
GN573	TACCGACGAAAACGGCAAGA	*uidA* *E. coli*	[35]
GN574	CGGTGATATCGTCCACCCAG		[35]
GN575	GGCTCTTGCCCTCCAGATAGA	Plásmido p06-1619-NDM	[35]
GN576	TGGCTGCGTAAATACCCCA		[35]
GN438	TTGGCCTTGCTGTCCTTG	bla_{NDM-1}	LGMB
GN485	ACACCATTAGAGAAATTTGC		LGMB
GN704	GCGACTGGGAACAAGCCAAC	*repA* Tn*6368*	Este estudio
GN705	TGCGTCACCTTCCAGGCTTC		Este estudio
GN706	ATCGGGCATTCCTTCGCCAC	*tnpM* Tn*6368*	Este estudio
GN707	GGGGCGAACCCTTTGTCGT		Este estudio
GN708	TAACCGGGCAAACAGACGCA	IS*5* Tn*6368*	Este estudio
GN709	CTGTTTACGCAGCCACAGGG		Este estudio

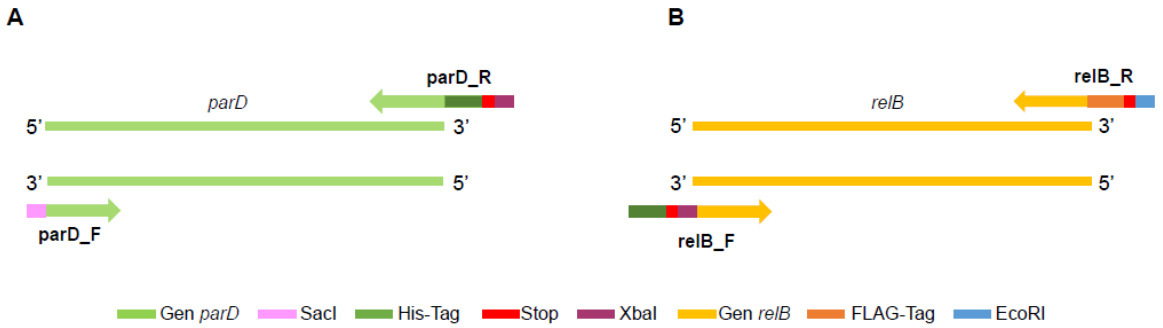


Figura 2-2. Esquema de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las antitoxinas *parD* y *relB* de los sistemas TA del plásmido p06-1619-NDM. A. En el gen *parD*, parD_F incorpora un sitio de reconocimiento para SacI en el extremo 5', parD_R incorpora la secuencia codificante para la etiqueta His-Tag, el codón de parada (Stop) y un sitio de reconocimiento para XbaI en el extremo 3'. B. El gen *relB*, relB_F incorpora un sitio de reconocimiento para el gen *parD* recombinante que incluye la etiqueta His-Tag, el codón de parada y el sitio de reconocimiento para XbaI en el extremo 5'; y relB_R incorpora la secuencia codificante para la etiqueta FLAG-Tag y un sitio de reconocimiento para EcoRI en el extremo 3'.

- **Predicción de la amplificación de los genes recombinantes, del híbrido recombinante y de la clonación en el vector de expresión.**

La predicción de la amplificación de los genes de las antitoxinas recombinantes *parD-his* y *relB-flag* y del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag*, así como de la clonación y direccionalidad en el vector de expresión se realizó en el programa SnapGene®.

- **Predicción de las proteínas recombinantes.**

La predicción de la secuencia de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG, así como su tamaño en aminoácidos y su peso en kDa se realizó en el programa SnapGene®.

2.1.2 Fase *in vitro*

La fase *in vitro* consistió en obtener el plásmido recombinante para la expresión de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG clonado en *Escherichia coli* BL21 (DE3). Sin embargo, previo a obtener el plásmido recombinante se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- **Cepas bacterianas y plásmidos.**

La cepa bacteriana que se utilizó en este estudio fue *P. rettgeri* B221 que transporta el plásmido p06-1619-NDM y que provino de un brote epidemiológico previamente reportado en Monterrey, México [25] y cuyo genoma fue completamente secuenciado utilizando la plataforma PacBio RSII (Pacific Biosciences, USA) [17]. Adicionalmente se utilizaron cepas de *E. coli* TOP 10 para el almacenamiento y propagación de los plásmidos y *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión de las proteínas. Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en este estudio son descritos en la Tabla 2-2.

- **Extracción de ADN total.**

Para la extracción del ADN total de las cepas utilizadas se utilizó el Kit Wizard® Genomic DNA Purfication (Promega®) de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante para bacterias Gram negativas, considerando o no el uso de antibióticos en el cultivo inicial (ceftazidime 30 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 30 o 200 µg/mL). La cuantificación y pureza del ADN fue determinada mediante la relación de la absorbancia a 260nm, 280nm, 230 nm en el equipo NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific™). El ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Tabla 2-2. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.

Plásmidos y cepas bacterianas				
Plásmidos				
Plásmido	**Características**		**Resistencia**	**Referencia**
pGEM®-T Easy	Vector de clonación.		*amp*^{r}	Promega®
pBC SK(+)	Vector de expresión.		*cm*^{r}	Aligent®
pGEM-T-AT	Derivado de pGEM®-T Easy clonado con el híbrido recombinante p*arD-his – relB-flag.*		*amp*^{r}	Este estudio
pBC SK-AT	Derivado de pBC SK(+) clonado con el híbrido recombinante *parD-his – relB-flag*.		*cm*^{r}	Este estudio
Cepas bacterianas				
Cepa	**Especie**	**Características**	**Plásmido(s)**	**Referencia**
TOP10	*E. coli*	Cepa de clonación.	No tiene	Invitrogen™
BL21 (DE3)	*E. coli*	Cepa de expresión.	No tiene	Invitrogen™
TOP-AT	*E. coli*	Derivada de TOP10, *parD-his – relB-flag* positivo.	pGEM-T-AT	Este estudio
BL21-BC	*E. coli*	Derivada de BL21 (DE3), *parD-his – relB-flag* negativo.	pBC SK(+)	Este estudio
BL21-AT	*E. coli*	Derivada de BL21 (DE3), *parD-his – relB-flag* positivo.	pBC SK-AT	Este estudio
B221	*P. rettgeri*	Aislamiento clínico NDM-positivo aislado en Monterrey, México.	p06-1619-NDM p06-1619-2	[25]
B221-BC	*P. rettgeri*	Derivada de B221, *parD-his – relB-flag* negativo.	p06-1619-NDM p06-1619-2 pBC SK(+)	Este estudio
B221-AT	*P. rettgeri*	Derivada de B221, *parD-his – relB-flag* positivo.	p06-1619-NDM p06-1619-2 pBC SK-AT	Este estudio
B221ΔTn*6368*	*P. rettgeri*	Derivada de B221, con confirmación por secuenciación de depuración del gen bla_{NDM-1} y del plásmido p06-1619-NDM.	p06-1619-2	Este estudio
B221::Tn*6368*	*P. rettgeri*	Derivada de B221, con confirmación por secuenciación de depuración del gen bla_{NDM-1} y del plásmido p06-1619-NDM.	p06-1619-2	Este estudio

- **Estandarización de la temperatura de hibridación para la amplificación de los genes recombinantes *parD-his* y *relB-flag*.**

La estandarización de la temperatura de amplificación de los genes *parD-his* y *relB-flag* se realizó por PCR evaluando diferentes temperaturas de hibridación para cada pareja de oligonucleótidos diseñados (Tabla 2-1) en el equipo T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) usando el siguiente perfil de análisis: 95°C de denaturación inicial por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que comprendieron un paso de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridación a un rango entre 55-70 °C por 30 segundos y extensión a 72°C por un minuto; finalmente el proceso terminó con un paso de elongación a 72°C por cinco minutos. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1.5% p/v durante 60 minutos a 100 V, teñidos con solución de bromuro de etidio 0.1% y foto documentados en el equipo Gel Doc XR System (BIO-RAD). Los fragmentos correspondientes a los genes recombinantes fueron purificados a partir de gel usando el Kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen®) de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante. Los fragmentos purificados fueron cuantificados y almacenados a -20°C. La concentración de cada fragmento en ng/µL fue convertida a pmol/µL empleando el programa BioMath Calculators-Promega (https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/).

- **Estandarización de la temperatura de hibridación para la amplificación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag*.**

La estandarización de la temperatura de amplificación para el híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* se realizó mediante PCR de solapamiento (OE-PCR, *Overlap Extension PCR*) [98] usando adicionalmente los oligonucleótidos parD_F y relB_R, para esto una cantidad equimolar de cada fragmento purificado fue combinada en la mezcla de reacción para un valor total de 0.1 pmol por fragmento (el volumen de solución de cada fragmento fue calculada como 0.1/µL). Según esto, se realizó la estandarización de la temperatura de hibridación en el equipo T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) usando el siguiente perfil de análisis: 95°C de denaturación inicial por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que comprendieron un paso de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridación a un rango entre 55-65 °C por 30 segundos y extensión a 72°C por un minuto; finalmente el proceso terminó con un paso de elongación a 72°C por cinco minutos. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1.5% p/v durante 60 minutos a 100 V, teñidos con solución de bromuro de etidio 0.1%, foto documentados y purificados a

partir de gel. El fragmento correspondiente al híbrido recombinante fue cuantificado y almacenado a -20°C.

- **Clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en el vector pGEM®-T Easy y transformación en *E. coli* TOP10.**

La clonación del híbrido recombinante purificado *parD-his – relB-flag* en el vector pGEM®-T Easy (Promega®) se realizó de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante en una relación molar inserto:vector de 3:1 usando T4 DNA ligasa. El producto total de la ligación fue transformado en células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 mediante choque térmico (42°C, 50 segundos). La recuperación de la suspensión bacteriana se realizó en caldo LB (Luria Bertani) a 37°C, 60 minutos, 200 rpm. La selección de las bacterias transformantes se realizó en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), IPTG (0.5 mM) y X-Gal (80 µg/mL) después de una incubación a 37°C, 16 horas. Luego, las colonias transformantes se recuperaron en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche a 37°C y seguidamente se realizó una extracción de ADN por ebullición [99]. El plásmido recombinante pGEM-T-AT (Tabla 2-2) se confirmó por PCR usando los oligonucleótidos específicos para los promotores T7 y SP6 (Tabla 2-1). Para la extracción del plásmido recombinante pGEM-T-AT se utilizó el Kit Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System (Promega®) de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante a partir de la cepa recombinante *E. coli* TOP10-AT (Tabla 2-2). La cepa *E. coli* TOP10-AT fue almacenada a -80°C en caldo Tripticasa Soya (TSB) con glicerol 15% y ampicilina (100 µg/mL) hasta su uso.

- **Clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en el vector pBC SK(+) y transformación en *E. coli* BL21 (DE3).**

Para la clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en el vector pBC SK(+), el plásmido pGEM-T-AT y el vector se sometieron a doble digestión con enzimas de restricción SacI y EcoRI (New England BioLabs®) de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante a través de NEBcloner® (https://nebcloner.neb.com/#!/). Los productos digeridos fueron separados en gel de agarosa al 1.5% p/v durante 80 minutos a 100 V, teñidos con solución de bromuro de etidio 0.1%, foto documentados y purificados a partir de gel. Para la clonación se utilizó la enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen™) de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante en una relación molar

inserto:vector de 3:1, para esto el producto total de la ligación fue transformado en células químicamente competentes de *E. coli* BL21 (DE3) mediante choque térmico. La recuperación de la suspensión bacteriana se realizó en de caldo LB a 37°C, 60 minutos, 200 rpm. La selección de las bacterias transformantes se realizó en placas de agar LB suplementado con cloranfenicol (30 µg/mL), IPTG (0.5 mM) y X-Gal (80 µg/mL) después de una incubación a 37°C, 16 horas. Luego las colonias transformantes se recuperaron en placas de agar LB suplementado con cloranfenicol (30 µg/mL) durante toda la noche a 37°C y seguidamente se realizó una extracción de ADN por ebullición. El plásmido recombinante pBC SK-AT (Tabla 2-2) se confirmó por PCR usando los oligonucleótidos específicos para los promotores T7 y T3 (Tabla 2-1) y por secuenciación convencional de Sanger. El plásmido recombinante pBC SK-AT se extrajo con el kit antes mencionado a partir de la cepa recombinante *E. coli* BL21-AT (Tabla 2-2). Adicionalmente se realizó la transformación del plásmido pBC SK(+) en *E. coli* BL21 (DE3) (BL21-BC) de acuerdo con la metodología antes indicada. Las cepas *E. coli* BL21-AT y BL21-BC fueron almacenadas a -80°C en caldo TSB con glicerol 15% y cloranfenicol (30 µg/mL) hasta su uso.

- **Evaluación de la expresión de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG.**

La cepa *E. coli* BL21-AT fue cultivada en placas de agar LB suplementado con cloranfenicol (30 µg/mL) e incubada a 37 °C por 24 horas. Una colonia de este cultivo fue inoculada en cinco mL de caldo LB suplementado con cloranfenicol (30 µg/mL) e incubada a 37°C, ON, 200 rpm. A partir de este cultivo, se realizó una dilución 1:100 en caldo LB suplementado con cloranfenicol (30 µg/mL) y se incubó a 37°C, 200 rpm hasta una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0.6 – 0.7. Una vez alcanzada la OD, se tomó una alícuota (tiempo 0) y se adicionó IPTG 1 mM al cultivo restante, a continuación se tomaron alícuotas a los minutos 10, 20, 40, 60, 120 y 180 post-inducción según lo sugerido por Dubiel y colaboradores [100]. El botón bacteriano de cada tiempo se recuperó por centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos y se resuspendió en buffer lisis para proteínas con inhibidores de proteasas (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific™), se incubó a 37 °C, una hora y se lisó por sonicación en hielo por cuatro minutos con pulsos de 30 segundos con descansos de 15 segundos. Los extractos fueron cuantificados en mg de proteína por mL de extracto. Como control del proceso, se usaron extractos proteicos de las cepas *E. coli* BL21 (DE3) y BL21-BC. La evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG se realizó mediante SDS-PAGE usando el sistema

de electroforesis MiniPROTEAN® tetra cell (BIO-RAD). El montaje del sistema se realizó de acuerdo con las condiciones previamente estandarizadas en el laboratorio. Los geles de poliacrilamida, concentrador y separador fueron preparados a una concentración de 5% y 15% respectivamente. Las muestras se prepararon con la misma cantidad de proteína de acuerdo con el volumen total de la mezcla que contenía Buffer Laemmli 1X, SDS 1% y H_2O. Posteriormente, las muestras se calentaron por 10 minutos a 95°C y se sembraron en el gel usando el marcador de peso Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Scientific™). Los corridos se llevaron a cabo a 100 Voltios por dos horas y 45 minutos. El gel se tiñó con Azul de Coomassie R-250 (BIO-RAD) durante una hora y se decoloro con una solución de ácido acético-isopropanol. El gel fue visualizado en el equipo Gel Doc XR System (BIO-RAD).

La identificación de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG se realizó por Western blot de acuerdo con las condiciones ya estandarizadas en el laboratorio, brevemente las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida al 15% fueron transferidas a una membrana de PVDF 0.45µm (Thermo Scientific™) a 200 mA por dos horas, inmediatamente se inició el proceso de bloqueo de la membrana con una solución al 5% de leche descremada en buffer TBST (tris-HCl pH 7,5 10mM, NaCl 150mM, tween-20 0,1%) durante 16 horas, después se retiró la solución de bloqueo, se añadió el anticuerpo primario monoclonal Anti-His 1:4000 (Thermo Scientific™) o Anti-FLAG 1:1000 (Sigma-Aldrich®) y se incubó 16 horas a 8°C con agitación suave. La membrana fue lavada con buffer TBST (3x10 minutos). Luego, se añadió el anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG-HRP 1:1000 (Amersham™) y se incubó una hora a temperatura ambiente con agitación suave; la membrana fue lavada nuevamente (3x10 minutos). El revelado se hizo mediante detección quimioluminiscente con Luminol/Enhancer Solution:Peroxidase Solution (1:1). El gel fue visualizado en el equipo Gel Doc XR System (BIO-RAD).

Considerando los resultados obtenidos para la detección de las antitoxinas recombinantes, se decidió evaluar su transcripción. Para esto, se realizó una extracción de ARN por el método TRIzol™ (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones sugeridas por el fabricante a partir de un cultivo de las cepas *E. coli* BL21-AT y BL21-BC después de 180 minutos de inducción con IPTG 1 mM. El ARN fue cuantificado y almacenado a -80°C. Posteriormente, el ARN fue tratado con DNasa usando el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega®) seguido

de una transcripción inversa usando el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®). El ADNc fue almacenado a – 20°C hasta su uso. Los transcritos correspondientes a los genes recombinantes fueron evaluados por PCR usando los oligonucleótidos de los promotores T7 y T3 correspondientes al plásmido pBC SK(+). La amplificación del gen cromosomal *uidA* de única copia de *E. coli* (Tabla 2-1) se usó como control de la transcripción.

2.2 Resultados

2.2.1 Diseño *in silico* del plásmido recombinante para la expresión de las antitoxinas ParD y RelB

La fase *in silico* consistió en diseñar un plásmido recombinante para la expresión de las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas de muerte post-segregacional del plásmido p06-1616-NDM. Para esto lo primero que se determinó fue el vector a ser empleado para la expresión de las proteínas. Según esto, al realizar la búsqueda de vectores empleados en ensayos de complementación en *Providencia* (ensayos en los que una cepa de *Providencia* mutante de un gen específico, fuese transformada con un vector de expresión clonado con el gen de interés), los resultados arrojados fueron varios; sin embargo, ninguno específico para *P. rettgeri*, ya que la información existente para esta especie bacteriana es escasa en comparación con otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*; de ahí que los artículos consultados fueron de *Providencia stuartii*.

El artículo consultado de mayor interés fue Rhomboids of Mycobacteria: Characterization Using an *aarA* Mutant of *Providencia stuartii* and Gene Deletion in *Mycobacterium smegmatis* [101]. En este artículo utilizaron el plásmido pBC SK(+) clonado con genes de proteínas romboidales micobacterianas bajo la regulación del promotor *lac* para complementar fenotipos pleiotrópicos en *P. stuartii*. Entonces, al revisar el artículo anteriormente indicado, se evidenció que el vector empleado en procesos de complementación en el género *Providencia* fuel el vector pBC SK(+), mismo que fue utilizado para el diseño de la expresión de las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas de los sistemas PSK del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri* bajo la regulación del promotor *lac*.

El pBC SK(+) es un vector que tiene características de plásmido y de fagémido, debido a que presenta un origen de replicación derivado del fago F1 y otro derivado del plásmido pUC. Como plásmido, tiene un tamaño de 3400 pb, promotores T7, T3 y *lac*, un gen de resistencia al cloranfenicol (*cm*^{r}), una secuencia de codificación de la subunidad α de la β-galactosidasa (*lacZ'*), un SCM extenso con más de 20 sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción y una orientación SK, en donde, el sitio SacI es el sitio de restricción más cercano al promotor *lac* y KpnI es el más alejado [102] (Figura 2-3).

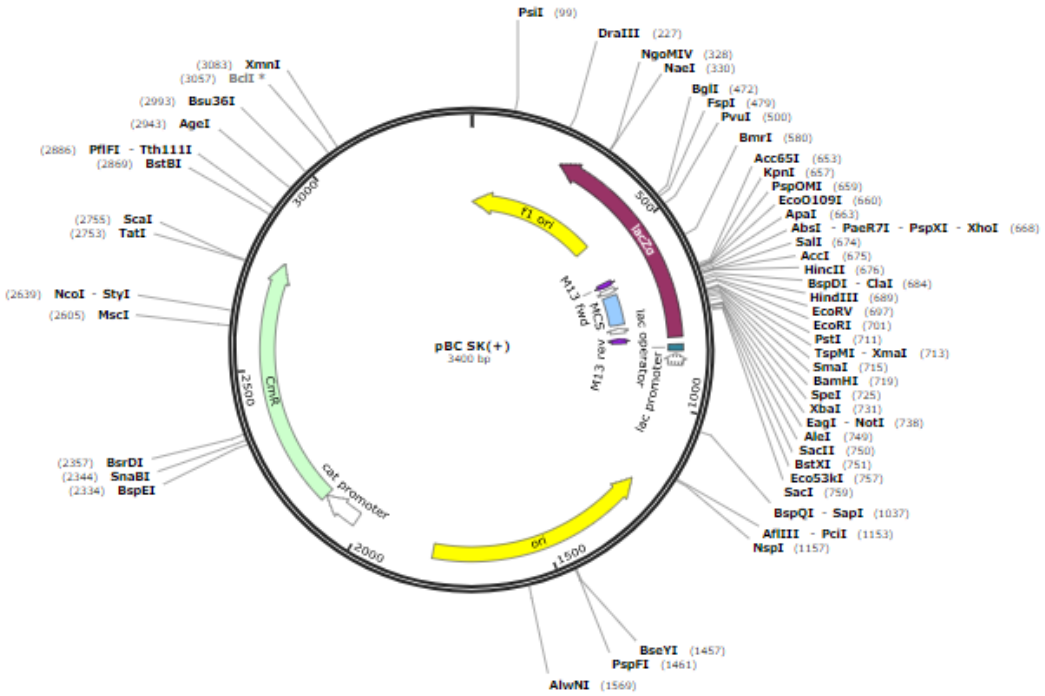


Figura 2-3. Vector de expresión pBC SK(+). Figura tomada de SnapGene®

Una vez que el plásmido pBC SK(+) fue escogido como el vector de expresión para las antitoxinas recombinantes, se definió que la secuencia codificante para la etiqueta His-Tag fuese adicionada al gen *parD* y FLAG-Tag a *relB*, debido a su pequeño tamaño que raramente interfiriere con la estructura o función de las proteínas. Adicionalmente, se precisó que las enzimas de restricción SacI, XbaI y EcoRI fuesen adicionadas a los oligonucleótidos diseñados, debido a que el análisis comparativo entre las enzimas de restricción que escinden los genes de las antitoxinas *parD*, *relB* y el SCM del pBC SK(+) (Tabla 2-3) mostró que estas enzimas no cortan los genes y constituyen los sitios más cercanos al promotor *lac* bajo el cual se realizó la regulación de los genes recombinantes de las antitoxinas.

Tabla 2-3. Enzimas de restricción del sitio de clonación múltiple del vector pBC SK(+).

Enzimas de restricción (SCM) de pBC SK(+)				
SacI	EagI	TspMI	BspDI	PaeR7I[2]
Eco53kI	XbaI	PstI	HincII[1]	AbsI[2]
BstXI	SpeI	EcoRI	AccI	ApaI
SacII	BamHI	EcoRV[1]	SalI	EcoO109I
AleI	SmaI	HindIII	XhoI[2]	PspOMI
NotI	XmaI	ClaI	PspXI[2]	KpnI
				Acc65I

Rojo: [1]Enzimas que escinden *parD*. [2]Enzimas que escinden *relB*.

El diseño de los oligonucleótidos en el programa SnapGene® constituyó un paso crucial para adicionar todas las características antes mencionadas a los genes de las antitoxinas, así como para obtener el híbrido recombinante que fusionara los dos genes. Si bien, en biología molecular se manejan ciertas condiciones para el diseño de los oligonucleótidos como lo son la longitud (15 – 30 nucleótidos), el contenido de GC (40 – 60%), la presencia de una G o C en el extremo 3' y una T_m final para ambos oligonucleótidos no mayor a 5 °C [103], estas recomendaciones no fueron consideradas para este diseño, debido a las modificaciones adicionales que debía llevar cada oligonucleótido para obtener la secuencia de ADN que codificara las antitoxinas *parD* y *relB* por PCR de solapamiento. Con base a eso, fue necesario establecer las características de los oligonucleótidos como su longitud, %GC y T_m (Tabla 2-4) para los procesos de estandarización de los productos deseados.

Tabla 2-4. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes recombinantes *parD-his* y *relB-flag.*

Gen	Secuencia 5' → 3'	Longitud (nt)	%GC	T_m* (°C)	Tamaño producto (pb)
parD-his	GAGCTCATGGCTCGTACAACAAGTGTAAC	29	48	66.7	273
	TCTAGATTAGTGGTGATGGTGATGATGTACATTA TGAGCGTTCTTCACTT	50	38	71.9	
relB-flag	CATCATCACCATCACCACTAATCTAGATGGGTAG CATTAACCTGCGTAT	49	42	73.3	294
	GAATTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGAG TTCATCCAGCGTCACACGTA	54	44	75.2	

*Tm estimado según Tm Calculator – Thermo Scientific™.

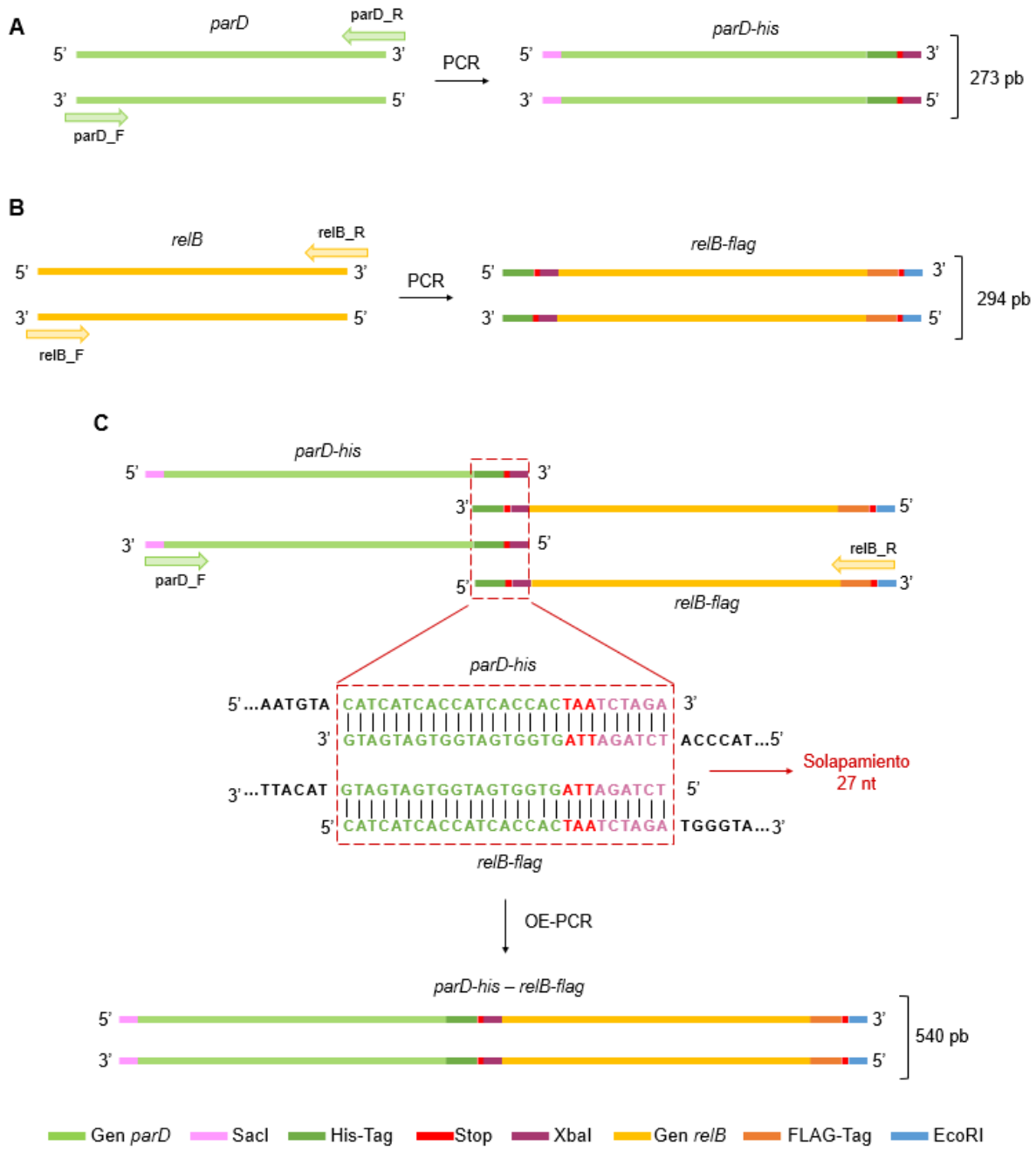


Figura 2-4. Predicción de los genes recombinantes *parD-his*, *relB-flag* y del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag*, obtenido con SnapGene®. A. Antitoxina *parD-his,* incorpora un sitio de reconocimiento para SacI y XbaI y la etiqueta His-Tag. B. Antitoxina *relB-flag,* incorpora un sitio de complementariedad con *parD-his,* la etiqueta FLAG-Tag y el sitio de reconocimiento para EcoRI. C. Híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* resultado de OE-PCR entre los genes de las antitoxinas recombinantes gracias a un solapamiento de 27 nucleótidos entre las dos secuencias (His-Tag, códon de parada de *parD* y XbaI).

Establecidas las características de los oligonucleótidos diseñados, se procedió con la amplificación de los genes recombinantes en el programa SnapGene®. Los resultados mostraron que para el gen *parD-his* se obtuvo un producto de 273 pb que incluía los sitios de reconocimiento para SacI y XbaI, el marco abierto de lectura del gen nativo *parD* (243 pb) y la secuencia codificante para His-Tag (Figura 2-4 A). En tanto que, para el gen *relB-flag* se obtuvo un producto de 294 pb que incluía la secuencia complementaria con el gen *parD-his* (His-Tag, codón de parada, XbaI), el marco abierto de lectura del gen nativo *relB* (243 pb), la secuencia codificante para FLAG-Tag y el sitio de reconocimiento para EcoRI (Figura 2-4 B). Adicionalmente, se predijo la amplificación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* por PCR de solapamiento utilizando los dos genes recombinantes predichos. Los resultados mostraron que se obtuvo un producto de 540 pb que integraba los dos genes recombinantes con el sitio de reconocimiento para SacI, el ORF del gen *parD-his*, el sitio de reconocimiento para XbaI, el ORF del gen *relB-flag* y el sitio de reconocimiento para EcoRI. El híbrido recombinante se obtuvo gracias a un solapamiento de 27 nucleótidos entre las secuencias de las antitoxinas recombinantes que incluyó la etiqueta His-Tag, el códon de parada de *parD-his* y la enzima XbaI (Figura 2-4 C).

Una vez predicho el híbrido recombinante *parD-his – relB-flag*, se realizó su clonación *in silico* en el vector pBC SK(+) en el programa SnapGene®. Primero se efectuó una doble digestión con las enzimas de restricción SacI y EcoRI al híbrido recombinante y al vector; posteriormente una ligación. Los resultados mostraron que el híbrido recombinante fue clonado correctamente en el vector y estaba regulado por el promotor *lac* debido a la incorporación del sitio de reconocimiento para SacI que corresponde a la primera enzima del SCM del vector y, por tanto, la más cercana a dicho promotor. El plásmido recombinante pBC SK-AT tuvo un tamaño de 3880 pb (Figura 2-5).

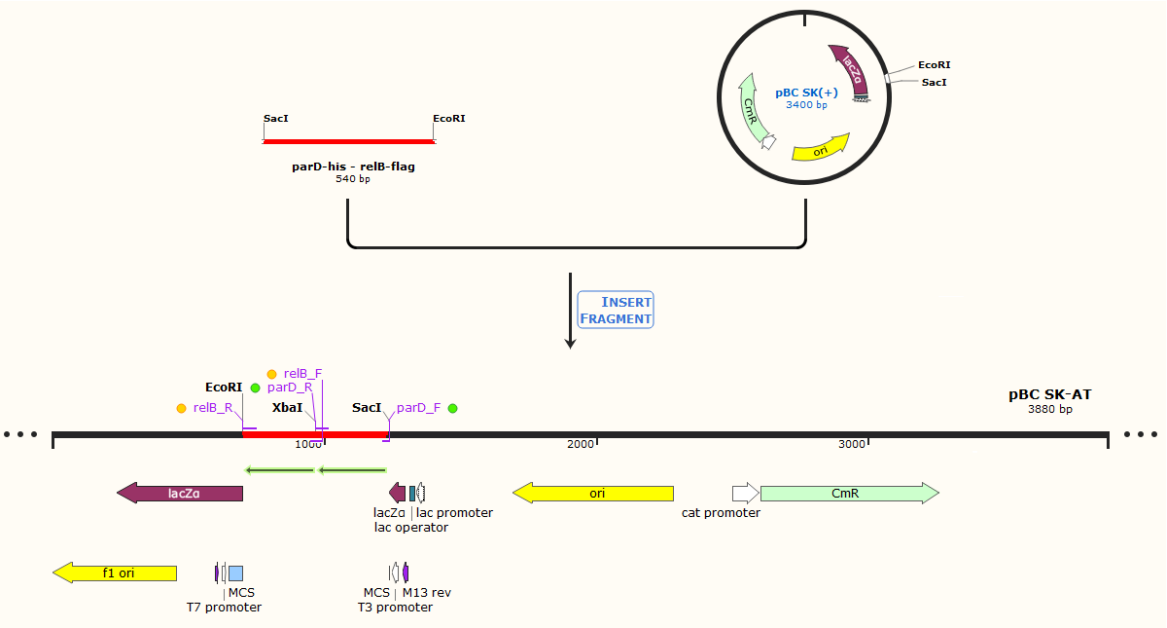


Figura 2-5. Plásmido recombinante pBC SK-AT, obtenido con SnapGene®. En rojo la clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en el plásmido pBC SK(+) y en flechas verdes los ORF de las antitoxinas recombinantes bajo la regulación del promotor *lac*.

En el plásmido recombinante pBC SK-AT se evidenció que los marcos abiertos de lectura correspondientes a los genes recombinantes *parD-his* y *relB-flag* estaban en sentido 3' – 5' (sentido en el que se encuentra el promotor *lac* en el vector) y se traducían de manera independiente dado que cada uno incorporó su codón de inicio y parada; de igual manera se verificó la presencia de las etiquetas de fusión, para el caso de la antitoxina recombinante ParD-His se observó que seguidamente de la secuencia proteica correspondiente a la antitoxina ParD, fueron adicionados los aminoácidos de la etiqueta His-Tag (-HHHHHH-); en tanto que para la antitoxina recombinante RelB-FLAG se observó que seguidamente de la secuencia proteica correspondiente a la antitoxina RelB, fueron adicionados los aminoácidos de la etiqueta FLAG-Tag (-DYKDDDDK-) (Figura 2-6). El programa también permitió predecir el tamaño de las proteínas recombinantes, en este caso para ParD-His el tamaño fue de 86 aminoácidos (9.5 kDa) y para RelB-FLAG de 87 aminoácidos (10.1 kDa).

Figura 2-6. Marco abierto de lectura de las antitoxinas *parD-his* y *relB-flag* y secuencia proteica de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG, obtenido con SnapGene®. En verde la secuencia proteica de las antitoxinas recombinantes con la adición de las etiquetas, His-Tag para ParD y FLAG-Tag para RelB.

2.2.2 Obtención *in vitro* del plásmido recombinante para la expresión de las antitoxinas ParD y RelB

La fase *in vitro* consistió en obtener el plásmido recombinante pBC SK-AT para la expresión de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG clonado en *E. coli* BL21

(DE3). Inicialmente se estandarizó la temperatura de hibridación (T_H) para cada pareja de oligonucleótidos diseñados considerando su temperatura de fusión descrita en la Tabla 2-4; así se probaron temperaturas entre 55 – 70°C (Figura 2-7). En este ensayo se encontró que, para todas las temperaturas, excepto 68°C y 70°C para el gen *parD-his* y de 55°C para *relB-flag* fue evidente la amplificación de los productos esperados, con formación de dímeros de los oligonucleótidos debido a su gran tamaño, pero sin generación de bandas inespecíficas cercanas a los productos. Teniendo en cuenta que los valores más altos de temperatura favorecen la especificidad y disminuyen la formación de productos secundarios, se decidió utilizar una T_H de 65°C para *parD-his* y de 70°C para *relB-flag*.

Una vez establecidas las condiciones para la amplificación de las antitoxinas recombinantes, se estandarizó la temperatura de hibridación para la obtención del híbrido recombinante *parD-his – relB- flag* por PCR de solapamiento [98] utilizando los productos purificados correspondientes a las antitoxinas *parD-his* y *relB-flag* que sirvieron como plantilla y los oligonucleótidos >parD_F y >relB_R que garantizaron que solo se amplifique el producto de fusión deseado probando temperaturas entre 55 – 65°C ya que en ese rango de temperatura se evidenció amplificación de los productos plantilla (Figura 2-8). En este ensayo se encontró que, para todas las reacciones fue evidente la amplificación del producto esperado y se decidió utilizar una T_H de 65°C.

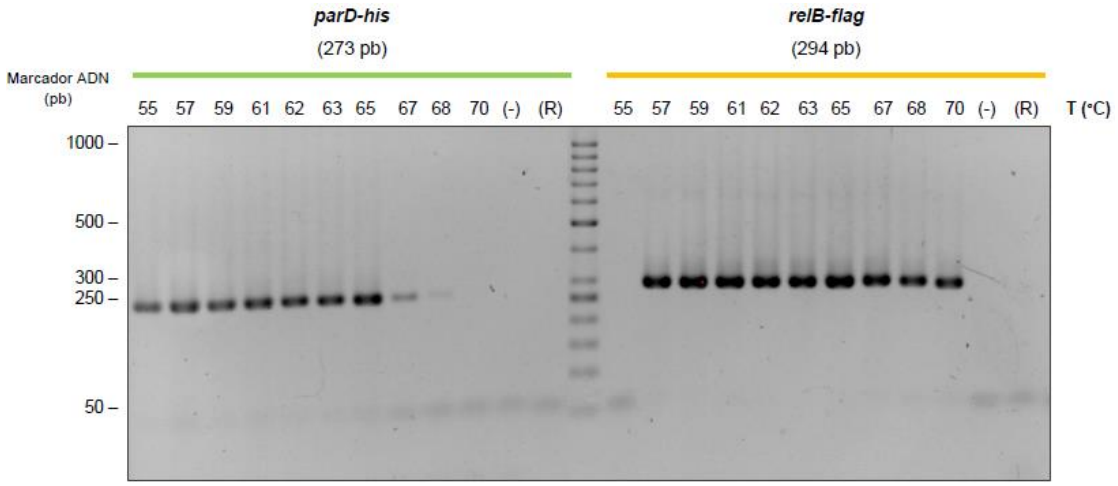


Figura 2-7. Estandarización de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las antitoxinas recombinantes *parD-his* y *relB-flag* por PCR. (-) Control negativo: *P. rettgeri* B253. (R) Control de reactivos.

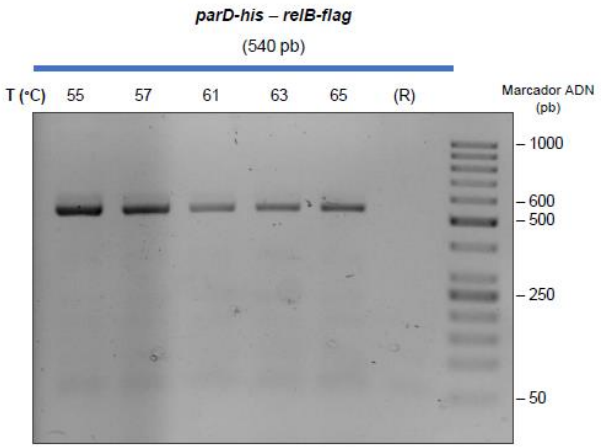


Figura 2-8. Estandarización de la temperatura de hibridación para la amplificación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* por PCR de solapamiento. (R) Control de reactivos.

En vista de que se obtuvo el híbrido recombinante por fusión de los genes recombinantes, se realizó la clonación del producto purificado en el plásmido pGEM-T® Easy y se transformó en *E. coli* TOP10. La selección de las colonias transformantes se realizó por su resistencia a ampicilina y coloración blanca. En este ensayo se obtuvo el vector recombinante pGEM-T-AT por amplificación de un producto de 720 pb correspondiente a 540 pb del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* y 180 pb del SCM del plásmido pGEM-T® Easy para las colonias analizadas (carril 1-10) (Figura 2-9). Este resultado indicó que se obtuvo la cepa recombinante *E. coli* TOP10-AT portadora del plásmido pGEM-T-AT.

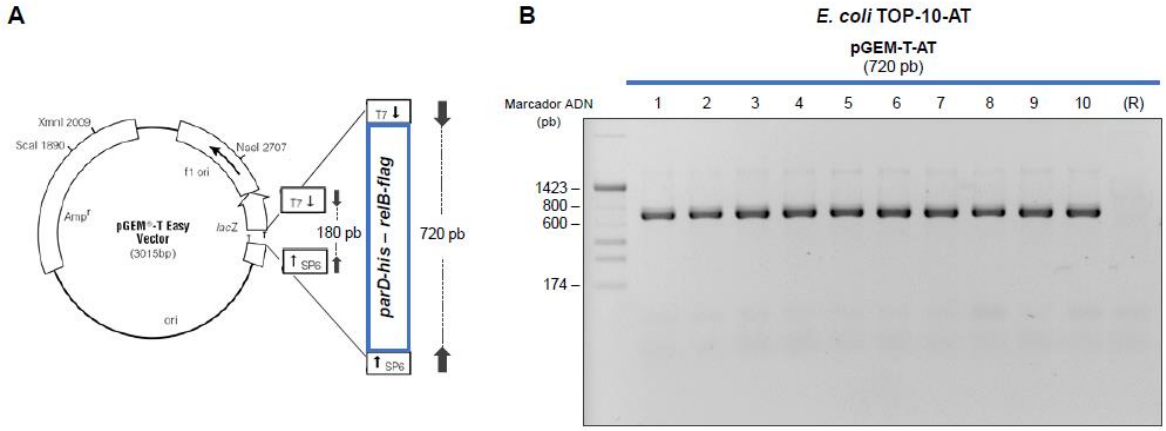


Figura 2-9. Clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en pGEM-T® Easy. A. Esquema del plásmido pGEM-T® Easy y posición de los oligonucleótidos de los promotores T7 y SP6 (plásmido no recombinante 180 pb, plásmido recombinante 720 pb). B. Confirmación de la clonación del híbrido *parD-his – relB-FLAG* en el plásmido pGEM-T® Easy (pGEM-T-AT) para diez colonias recombinantes TOP10-AT. (R) Control de reactivos.

Posteriormente, el plásmido recombinante pGEM-T-AT y el plásmido pBC SK(+) fueron sometidos a una doble digestión enzimática con SacI y EcoRI. En este ensayo se obtuvo la liberación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* y la linealización del plásmido pBC SK(+) (Figura 2-10 B). A continuación, se realizó la purificación del inserto y del vector; y se procedió con la clonación y transformación en *E. coli* BL21 (DE3). La selección de las colonias transformantes se realizó por su resistencia a cloranfenicol y coloración blanca.

La producción del plásmido recombinante pBC SK-AT se confirmó por amplificación de un producto de 646 pb correspondiente al inserto y plásmido después de la digestión para las colonias analizadas (carril 1-4) (Figura 2-10 C). En el carril 5 no se observó clonación del híbrido sino únicamente amplificación del SCM del vector pBC SK(+). La secuenciación del híbrido recombinante dentro del plásmido recombinante no mostró mutaciones respecto a los genes *parD-his* y *relB-flag* de referencia después de la secuenciación convencional (Anexo A).Como control de transformación, se obtuvo la cepa *E. coli* BL21-BC transformada con el vector pBC SK(+) que fue seleccionada por su resistencia al cloranfenicol y coloración azul; su confirmación se realizó por amplificación de un producto de 166 pb correspondiente al SCM del vector para las colonias analizadas (carril 1-12) (Figura 2-10 D). Estos resultados indicaron que se obtuvieron las cepas recombinantes *E. coli* BL21-AT y BL21-BC portadoras de los plásmidos pBC SK-AT (vector recombinante) y pBC SK(+) (vector vacío), respectivamente.

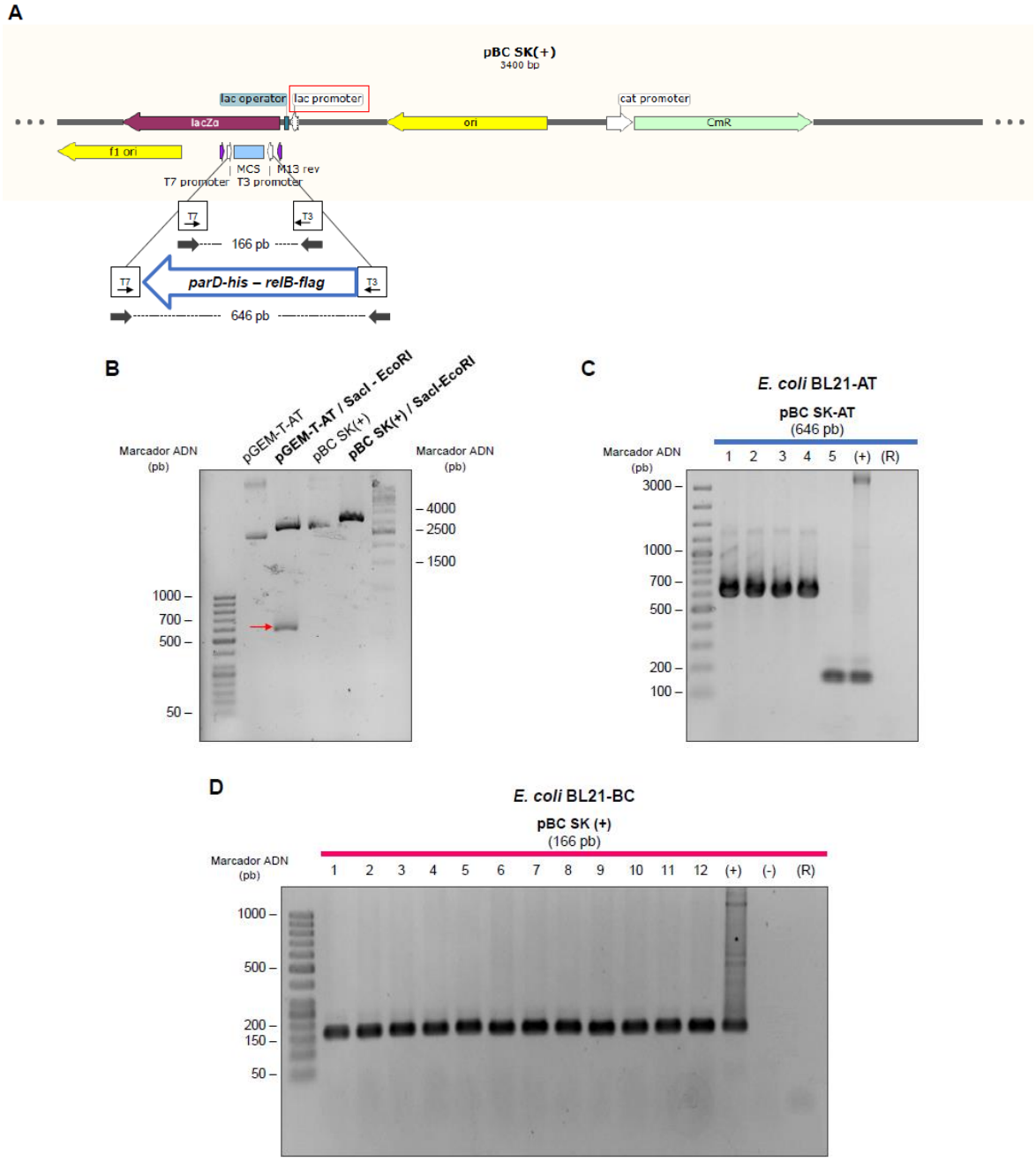


Figura 2-10. Clonación del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en pBC SK(+). A. Esquema del plásmido pBC SK(+) y posición de los oligonucleótidos de los promotores T7 y T3 (plásmido no recombinante 166 pb, plásmido recombinante 646 pb). B. Digestión de pGEM-T–AT y pBC SK(+), se evidencia la liberación de un fragmento (flecha roja) correspondiente al híbrido *parD-his – relB-flag*. C. Confirmación de la clonación del híbrido *parD-his – relB-FLAG* en el plásmido pBC SK(+) para cinco colonias recombinantes *E. coli* BL21-AT. D. Confirmación de transformación de *E. coli* BL21 con el plásmido pBC SK(+) para doce colonias recombinantes *E. coli* BL21-BC. (+) Control positivo: pBC SK(+). (-) Control negativo: *E. coli* BL21 (DE3). (R) Control de reactivos.

Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG en *E. coli* BL21-AT, se realizaron los ensayos de inducción de las proteínas recombinantes y se evaluaron los extractos totales bajo condiciones denaturantes. De acuerdo con el programa SnapGene®, ParD-His tenía un peso de aproximadamente 9.5 kDa y RelB-FLAG de 10.1 kDa. Este ensayo no permitió demostrar la expresión de las antitoxinas recombinantes debido a ausencia de bandas en el tamaño esperado para los tiempos evaluados; sin embargo, se observó la expresión de una proteína de peso molecular aproximado entre 17 – 26 kDa que podría corresponder al cloranfenicol acetiltransferasa (25.6 kDa) que confiere resistencia a cloranfenicol y que solo se encontró en las cepas portadoras de los plásmidos pBC SK (Figura 2-11). Sabiendo que la técnica de inmunoblot es más sensible a bajas concentraciones de proteínas que no pueden ser visualizadas por SDS-PAGE, se procedió con la detección inmunológica tanto para la proteína recombinante ParD-His como para RelB-FLAG; a pesar de esto, en este ensayo no hubo detección de ninguna de las dos proteínas recombinantes al emplear anticuerpos frente a sus etiquetas de fusión.

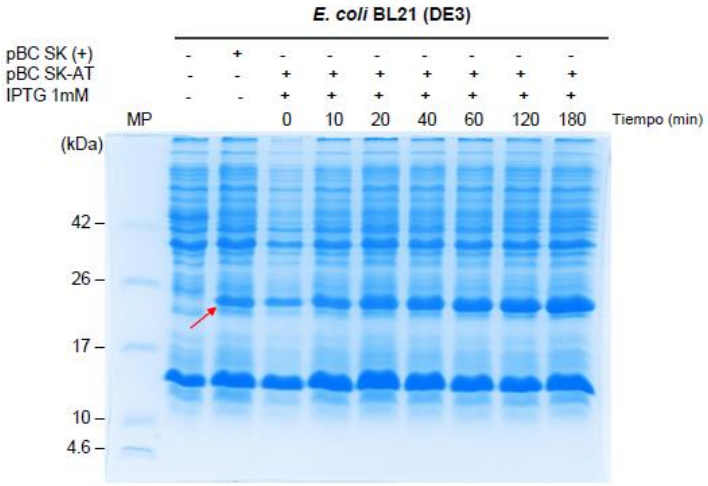


Figura 2-11. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG. SDS-PAGE de extractos totales de proteínas de E. coli BL21-AT en distintos tiempos de inducción. Expresión de una proteína (flecha roja) que podría corresponder al cloranfenicol acetiltransferasa (25.6 kDa).

Teniendo en cuenta que no fue posible evidenciar la expresión de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG por ninguno de los dos métodos empleados (SDS-PAGE y/o Western blot), se realizó el proceso de transcripción inversa a partir del ARN extraído de la cepa recombinante BL21-AT y empleando como control la cepa BL21-BC, dado que esta técnica permite detectar los transcritos de un gen. Los resultados de RT-PCR usando ADNc mostraron la amplificación de un fragmento específico de 646 pb que corresponde al plásmido clonado con los genes híbridos recombinantes *parD-his – relB-flag* y que no se obtuvo en los controles de ARN ni en la cepa únicamente transformada con el vector de expresión pBC SK(+) (Figura 2-12 A). Como control de la transcripción (RT-PCR) se usó la amplificación del gen cromosomal *uidA* de *E. coli*, en los cuales se evidencia la amplificación de un fragmento de 119 pb usando ADNc y la ausencia usando ARN (Figura 2-12 B). La evidencia de la transcripción de los genes híbridos en *E. coli* sugiere que el constructo quimérico o híbrido recombinante está siendo transcrito activamente y posiblemente traducido a proteína; sin embargo, los resultados observados por SDS-PAGE y Western blot sugieren una baja producción de las proteínas o una rápida degradación debido a la baja estabilidad de las antitoxinas de los sistemas TA tipo II [81].

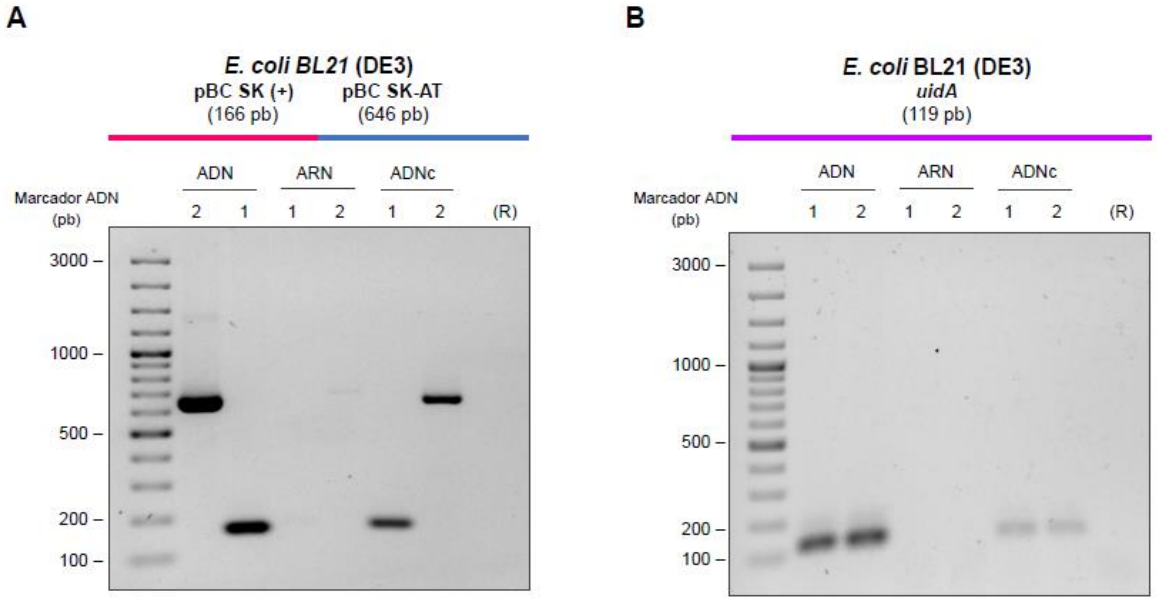


Figura 2-12. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag E. coli* BL21-AT. A. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* B. Transcripción del gen cromosomal *uidA* de *E. coli*. 1. *E. coli* BL21-BC, 2. *E. coli* BL21-AT. (R) Control de reactivos.

3. Transformación del plásmido recombinante pBC SK-AT en *Providencia rettgeri* B221

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) frente a cloranfenicol se realizó por medio del método de microdilución en caldo siguiendo los criterios y recomendaciones del CLSI 2018 [104].

3.1.2 Preparación de células electrocompetentes

Se prepararon células electrocompetentes de *P. rettgeri* B221, para lo cual se realizó un cultivo de la cepa en placas de agar LB suplementado con ceftazidime (30 µg/mL). Luego se inoculó una colonia del cultivo en cinco mL de caldo LB y se incubó a 37°C durante seis horas a 200 rpm. Posteriormente se realizó una dilución 1:50 en 250 mL de caldo LB y se incubó a 37ºC, 200 rpm hasta una densidad óptica OD_{600} de 0.5 – 0.6. Una vez alcanzada la OD, el cultivo se enfrió durante 15 minutos, y luego se colectaron las células por centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos. El botón se resuspendió en 1/10 del volumen inicial en glicerol al 10% estéril y frío, luego se colectaron las células por centrifugación y se hicieron dos lavados con 1/10 del volumen de glicerol al 10% con agua destilada desionizada estéril (DDE) fría, y finalmente se resuspendió en el 1/100 del volumen inicial de cultivo en glicerol al 10%. Con las células así obtenidas se prepararon alícuotas de 50 µL que fueron almacenadas a -80ºC.

3.1.3 Electroporación del plásmido recombinante pBC SK-AT

El plásmido recombinante pBC SK-AT fue incorporado a células competentes de *P. rettgeri* B221 mediante electroporación empleando el equipo MicroPulser™ (BIO-RAD) y

manejando las siguientes condiciones: temperatura 4 °C, voltaje 2.5 kV/cm, capacitancia 25 µF, resistencia 200 Ω y duración del pulso 5 ms. Una vez terminado el proceso, la recuperación de la suspensión bacteriana se hizo en caldo LB, 60 minutos, 200 rpm. La selección de las bacterias transformantes se realizó en placas de agar LB suplementado con ceftazidime (30 µg/mL) y cloranfenicol (200 µg/mL) después de una incubación a 37°C, 16 horas. Las colonias transformantes se recuperaron en placas de agar LB suplementado con ceftazidime (30 µg/mL) y cloranfenicol (200 µg/mL) durante toda la noche a 37°C y seguidamente se realizó una extracción de ADN por ebullición. La cepa recombinante B221-AT con el plásmido pBC SK-AT se confirmó por PCR usando los oligonucleótidos específicos para los promotores T3 y T7 (Tabla 2-1). Adicionalmente se realizó la transformación del plásmido pBC SK(+) en *P. rettgeri* B221 (B221-BC) de acuerdo con la metodología antes indicada. En las cepas *P. rettgeri* B221, B221-BC y B221-AT, se realizó la confirmación adicional del gen cromosomal *dnaA* específico de *P. rettgeri*, del plásmido p06-1619-NDM y de la resistencia por el gen bla_{NDM-1} por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para cada reacción (Tabla 2-1). Las cepas confirmadas fueron almacenadas a -80°C en caldo TSB con glicerol 15%, ceftazidime (30 µg/mL) y cloranfenicol (200 µg/mL) hasta su uso.

3.1.4 Evaluación de la expresión de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG

La evaluación de la expresión de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG en la cepa *P. rettgeri* B221-AT se realizó según la metodología indicada en el capítulo 2 con variaciones en cuanto al uso de las cepas B221, B221-BC y B221-AT (Tabla 2-2), la ausencia de inducción con IPTG 1mM y el uso de cloranfenicol a una concentración de 200 µg/mL.

3.2 Resultados

3.2.1 Obtención de *Providencia rettgeri* B221 recombinante

Inicialmente se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC, *minimum inhibitory concentration*) de la cepa *P. rettgeri* B221 frente al cloranfenicol con la finalidad de establecer la concentración de antibiótico que se necesitaba para la selección de las

colonias transformantes con el plásmido pBC SK-AT o pBC SK(+). En este ensayo se obtuvo que la MIC para el cloranfenicol de la cepa *P. rettgeri* B221 fue de 64 µg/mL, según esto se determinó que la concentración óptima para la selección de las transformantes fue de 200 µg/mL porque corresponde a una concentración de antibiótico superior a la MIC de la cepa B221, pero subinhibitoria para las cepas recombinantes de *P. rettgeri* B221, ya que el plásmido pBC SK(+) expresa una acetiltransferasa que confiere resistencia a cloranfenicol. Una vez determinada la MIC, se procedió con la transformación de la cepa *P. rettgeri* B221 con el plásmido recombinante pBC SK-AT. La selección de las colonias transformantes se realizó por un aumento de la resistencia a cloranfenicol y persistencia de la resistencia a β-lactámicos (ceftazidime), pero no por coloración. En este ensayo se obtuvo la cepa recombinante *P. rettgeri* B221-AT que fue confirmada por amplificación del plásmido recombinante pBC SK-AT (646 pb) para las colonias analizadas (carril 1-10) (Figura 3-1A). Como control de transformación, se obtuvo la cepa recombinante *P. rettgeri* B221-BC con el vector pBC SK(+) que fue confirmada por amplificación del plásmido pBC SK(+) (166 pb) para las colonias analizadas (carril 1-10) (Figura 3-2B).

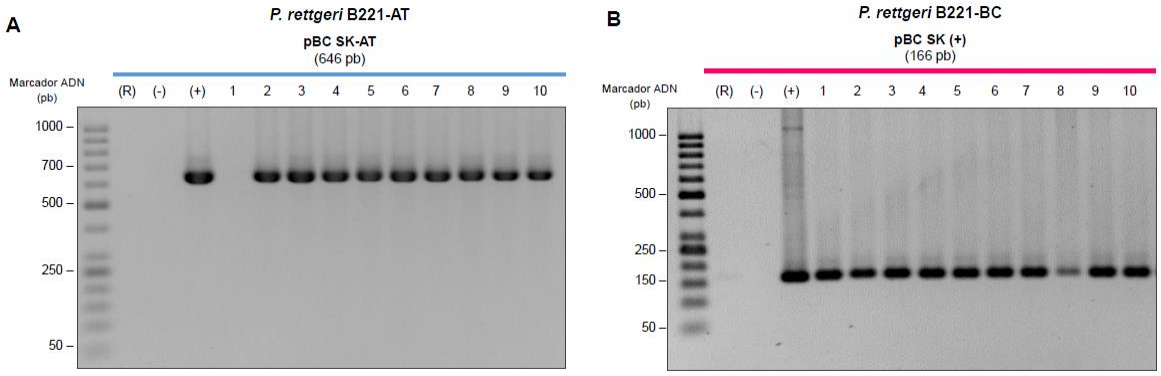
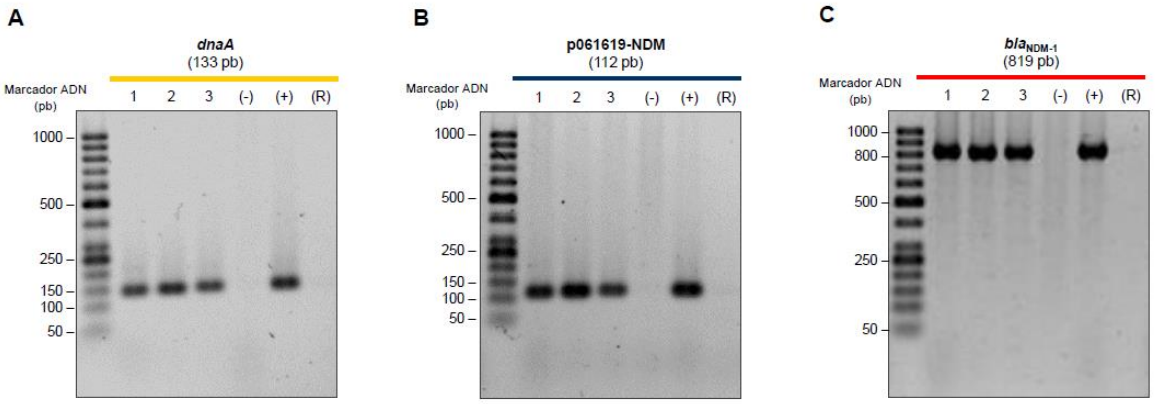


Figura 3-1. Transformación del plásmido pBC SK-AT y pBC SK(+) en *P. rettgeri* B221. A. Confirmación de transformación de *P. rettgeri* B221 con el plásmido pBC SK-AT para diez colonias recombinantes B221-AT. (+) Control positivo: *E. coli* BL21-AT (-) Control negativo: *P. rettgeri* B221. (R) Control de reactivos. B. Confirmación de la transformación de *P. rettgeri* B221 con el plásmido pBC SK(+) para diez colonias recombinantes B221-BC. (+) Control positivo: *E. coli* BL21-BC. (-) Control negativo: *P. rettgeri* B221. (R) Control de reactivos.

Teniendo en cuenta la importancia de que las cepas recombinantes B221-BC y B221-AT se trataran de una *P. rettgeri* transportadora del plásmido p06-1619-NDM y pBC SK-AT o pBC SK(+), respectivamente y que fueran resistentes a β-lactámicos (por el gen bla_{NDM-1}); y que la cepa B221 no transportara ninguno de los plásmidos recombinantes, fue necesaria

la confirmación de especie, plásmido NDM positivo, resistencia a β-lactámicos y plásmidos recombinantes. Los resultados mostraron que las cepas B221, B221-BC y B221-AT eran *P. rettgeri* por la amplificación de un producto de 133 pb correspondientes al gen *dnaA* específico de esta especie bacteriana (Figura 3-2 A), adicionalmente que todas las cepas transportaban el plásmido p06-1619-NDM por la amplificación de un producto de 112 pb correspondiente al plásmido NDM positivo (Figura 3-2 B) y que todas las cepas eran resistentes a antibióticos β-lactámicos por la amplificación de un producto de 819 pb correspondiente al gen $bla_{\text{NDM-1}}$ (Figura 3-2 C). Adicionalmente se evidenció que las cepas recombinantes transportaban los plásmidos pBC SK-AT o pBC SK(+) por la amplificación de un producto de 646 pb y de 166 pb respectivamente; y que la cepa B221 (*P. rettgeri* sin transformar) no transportaba ninguno de los dos plásmidos por ausencia de amplificación en comparación con el tamaño de los productos antes mencionados (Figura 3-2 D). Los resultados fueron indicativos de que las cepas recombinantes transportaban los plásmidos pBC SK-AT o pBC SK(+), respectivamente y que todas las cepas eran *P. rettgeri*, portadoras del plásmido p06-16-19-NDM y del gen $bla_{\text{NDM-1}}$.



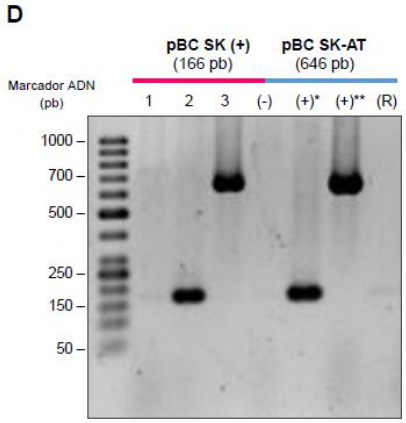


Figura 3-2. Confirmación de especie (A), plásmido p06-1619-NDM (B), resistencia a antibióticos β-lactámicos (C) y plásmidos pBC SK(+) y pBC SK-AT (D) para las cepas *P. rettgeri* B221, B221-BC y B221-AT. 1. Cepa B221. 2. Cepa B221-BC. 3. Cepa B221-AT (+) Control positivo: *P. rettgeri* B221, **E. coli* BL21-BC, ***E. coli* BL21-AT. (-) Control negativo: *E. coli* BL21 (DE3). (R) Control de reactivos.

Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG en *P. rettgeri* B221-AT, se evaluaron los extractos proteicos totales sin inducción bajo condiciones denaturantes. La no inducción en la cepa recombinante B221-AT se debió a que en *P. rettgeri* B221 se evidenció la ausencia del gen represor *lacI* después del análisis bioinformático entre su genoma completo y el gen *lacI* de *E. coli* K12 (número de acceso GenBank: NC_000913.3), lo que sugiere que, al no haber represor, se da la transcripción una vez reconocido el promotor *lac* incorporado en el plásmido recombinante pBC SK-AT, y que habría una auto inducción. Considerando lo anterior, el ensayo de SDS-PAGE no mostró la expresión de las antitoxinas recombinantes debido a ausencia de bandas en el peso molecular esperado (9.1 kDa para ParD-His y 10.1 kDa para RelB-FLAG) para los tiempos evaluados; sin embargo, se observó la expresión de la misma proteína visualizada en la cepa de *E. coli* BL21-AT cuyo peso molecular aproximado esta entre 17 – 26 kDa y que solo se encontró en las cepas portadoras de los plásmidos pBC SK (Figura 3-3). Seguidamente se procedió con la detección inmunológica para las proteínas recombinantes; sin embargo, al igual que en la cepa de *E. coli* BL21-AT, no hubo detección de ninguna de las dos proteínas.

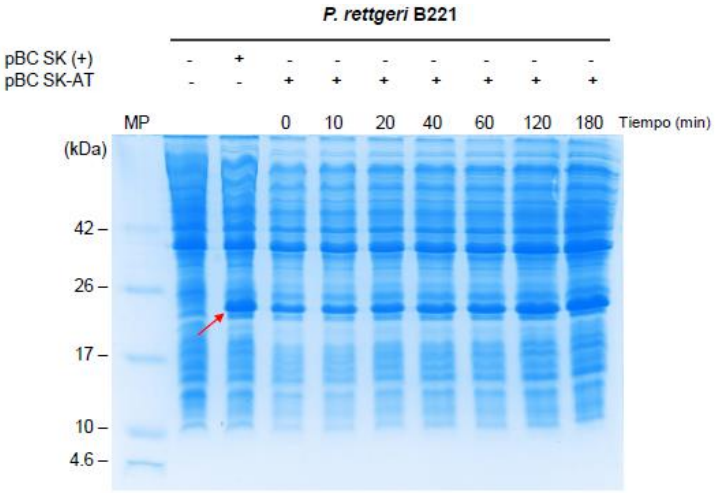


Figura 3-3. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG. SDS-PAGE de extractos totales de proteínas de *P. rettgeri* B221-AT en distintos tiempos sin inducción. Expresión de una proteína (flecha roja) que podría corresponder al cloranfenicol acetiltransferasa (25.6 kDa).

Los resultados anteriores fueron indicativos de que las proteínas recombinantes no se están produciendo; sin embargo, no son concluyentes debido a que las proteínas se

pueden estar produciendo en bajas cantidades o degradándose rápidamente debido a su baja estabilidad, por lo que se justificó detectar la transcripción de los genes, técnica que permite determinar la transcripción activa de los genes, que no es una evidencia definitiva de la producción de las proteínas pero que sugiere su producción. Los resultados de RT-PCR usando ADNc mostraron la amplificación de un fragmento específico de 646 pb que corresponde al plásmido clonado con los genes híbridos recombinantes *parD-his – relB-flag*; no obstante, se obtuvo una ligera amplificación del mismo producto en el control de ARN después del tratamiento con DNAsa (Figura 3-4 A); sin embargo, evaluando el control de la transcripción que correspondió al gen cromosomal *dnaA* de *P. rettgeri*, se observó la amplificación de un producto de 119 pb para la muestra de ADNc y que no se obtuvo en los controles de ARN (Figura 3-4 B); lo que sugiere una posible contaminación con ADN en el momento de realizar la PCR; a pesar de ello, el resultado está en proceso de validación. La evidencia de la transcripción de los genes híbridos en *P. rettgeri* sugiere que el constructo quimérico o híbrido recombinante está siendo transcrito activamente y posiblemente traducido a proteína; no obstante, los resultados observados por SDS-PAGE y Western blot sugieren una baja producción de las proteínas o una rápida degradación debido a la baja estabilidad de las antitoxinas de los sistemas TA tipo II [81].

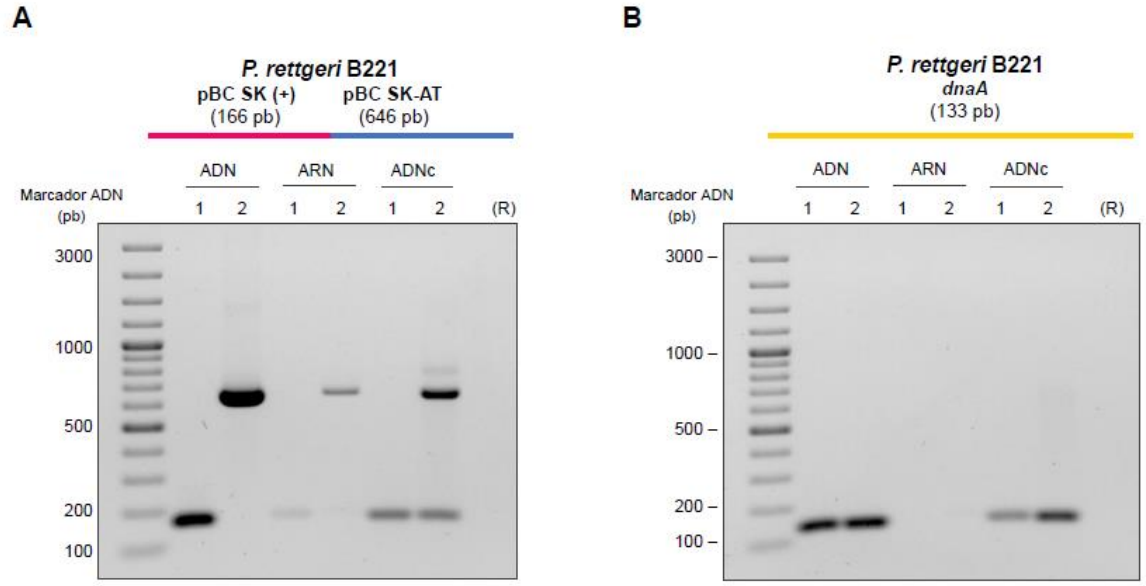


Figura 3-4. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag* en *P. rettgeri* B221-AT. A. Transcripción del híbrido recombinante *parD-his – relB-flag.* **B.** Transcripción del gen cromosomal *dnaA* de *P. rettgeri*. 1. *P. rettgeri* B221-BC, 2 *P. rettgeri* B221-AT. (R) Control de reactivos.

3.3 Discusión

El diseño *in silico* de plásmidos de expresión o constructos genéticos, es una herramienta versátil que permite realizar cambios en las secuencias nucleotídicas para mejorar significativamente la expresión de uno o varios genes que se van a introducir dentro del genoma [105]; sin embargo, es necesario considerar varios puntos antes de expresar las proteínas de interés, como lo es la elección del vector de expresión, el organismo en el que se va a realizar la expresión y las condiciones bajo las cuales se va a dar dicha expresión [106]. En el presente trabajo, el organismo final para la expresión de las antitoxinas (ParD y RelB) de los sistemas TA del plásmido p06-1619-NDM, fue un aislamiento clínico de *Providencia rettgeri*, por lo que la búsqueda de vectores de expresión fue encaminada hacia este género bacteriano, encontrándose al plásmido pBC SK (+), que se utilizó como vector para la expresión de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG. En el diseño *in silico* del plásmido de expresión se apreció la regulación de los genes de las antitoxinas *parD* y *relB* bajo el promotor *lac* y la traducción a proteínas con la adición de las respectivas etiquetas de fusión, por lo que se procedió con la obtención *in vitro* del plásmido recombinante.

El plásmido recombinante pBC SK-AT productor de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG de los sistemas TA del plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri* se obtuvo de acuerdo con lo diseñado *in silico* después de la verificación por secuenciación convencional, la misma que no mostró deleciones o inserciones de nucleótidos que pudiesen afectar el marco abierto de lectura de los genes de interés. La evaluación de la producción de las antitoxinas recombinantes inicialmente se realizó en *E. coli* BL21 (DE3), cepa hospedera que fue transformada con el vector de expresión, debido a que este organismo carece de sistemas TA a nivel cromosomal, a diferencia de cepas *E. coli* derivadas de la cepa K-12 (TOP10, J53, XL1-Blue) después de haber realizado un alineamiento pareado entre los genes de las antitoxinas frente a los genomas reportados en el NCBI. Adicionalmente, *E. coli* BL21 (DE3) es deficiente en la proteasa Lon [106], que degrada proteínas extrañas, como lo son las antitoxinas ParD y RelB [107], por lo que era probable que las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG fueran más estables en *E. coli* BL21 (DE3). Sin embargo, al realizar la evaluación de la expresión de las antitoxinas recombinantes en *E. coli* BL21 (DE3) por medio de técnicas inmunológicas, no fue posible observar su detección, de manera similar ocurrió en la cepa nativa *P. rettgeri*.

Una de las posibles razones de la no detección de las proteínas recombinantes en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y *P.* rettgeri son las modificaciones postraduccionales. La transformación del plásmido recombinante se dio en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), que, si bien es una cepa de referencia, existe la posibilidad de que se den cambios postraduccionales de las proteínas; adicionalmente también se transformó en una *P. rettgeri* proveniente de un aislamiento clínico, en la cual los sistemas de regulación son desconocidos y es posible que sucedan cambios proteicos. Las modificaciones postraduccionales de proteínas se consideraban restringidas a eucariotas; sin embargo, también ocurren en un número bajo de proteínas procariotas, siendo *E. coli* el microrganismo de referencia en el cual se han realizado los estudios; sin embargo, al pertenecer *P. rettgeri* a la familia *Enterobacteriaceae* junto con *E. coli*, es posible suponer cambios en el género *Providencia* [108]. Con base a datos de proteómica, se han identificado posibles modificaciones que ocurren preferiblemente en los extremos N-terminal y C-terminal de las proteínas. En el N-terminal ocurren dos tipos de modificaciones: la primera son modificaciones raras que ocurren en un pequeño número de posiciones a alta frecuencia como lo es la formilación y acetilación; y la segunda corresponde a modificaciones comunes que ocurren a baja frecuencia en un mayor número de posiciones, como lo es la oxidación y protonación. En tanto que en el C-terminal ocurre glutamilación, oxidación y fosforilación [109], de estás; la fosforilación es la modificación postraduccional que puede ocurrir con más frecuencia debido a la presencia de enzimas tipo quinasa y fosfatasa en la célula bacteriana. En las bacterias, la fosforilación se ha detectado en residuos de serina (S), treonina (T), tirosina (Y), histidina (H), arginina (R), lisina (K), ácido aspártico (D) y cisteína (C) [106]. Indagando los aminoácidos presentes en el extremo C-terminal de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG, la antitoxina recombinante ParD acopla una etiqueta de fusión de histidinas (-HHHHHH-) y RelB una etiqueta FLAG (-DYKDDDDK-), adicionalmente, las dos antitoxinas en su extremo C-terminal presentan algunos aminoácidos que son susceptibles de fosforilación como arginina, lisina y aspartato, con base a esto, es probable que las antitoxinas recombinantes después de su traducción en los sistemas bacterianos (*E. coli y P. rettgeri*) hayan sufrido esta modificación postraduccional, principalmente en la etiquetas y residuos de aminoácidos presentes en el extremo C-terminal de la proteína que no permitieron su detección por técnicas inmunológicas. Se sabe que las modificaciones postraduccionales que se presentan en proteínas bacterianas se dan en bajas proporciones, por lo que no

están presentes en todas las moléculas de una proteína determinada [108]; por tanto, es posible que no toda la proteína recombinante traducida haya sufrido modificación y la proteína sin cambios haya sido degradada por proteasas celulares debido a la baja estabilidad de las antitoxinas.

Otro factor que posiblemente no permitió la detección de las proteínas recombinantes fue la inestabilidad de las antitoxinas. Las antitoxinas de los sistemas TA tipo II, se caracterizan por ser proteínas inestables con tiempos de vida cortos debido a un extremo C-terminal no estructurado que desencadena un plegamiento parcial de la proteína y la hace más susceptible al ataque por proteasas celulares, de ahí que para su caracterización se requieren grandes niveles de expresión [78, 91, 110]. En el presente estudio se pretendió expresar las proteínas de interés (antitoxinas ParD y RelB) en cepas provenientes de aislamientos clínicos (*Providencia rettgeri*) que expresan proteínas a niveles fisiológicos, entre ellas, las proteasas celulares que posiblemente degradaron las antitoxinas recombinantes, lo que no permitió la detección. No obstante, las antitoxinas ParD y RelB han sido caracterizadas a partir de *E. coli* BL21 (DE3) bajo la regulación de promotores como T7, *tac* o $araP_{BAD}$ [100, 111-114]. Los promotores T7, *tac* o $araP_{BAD}$ se caracterizan por ser promotores altamente utilizados para la expresión de proteínas recombinantes a nivel de laboratorio utilizando cepas de referencia (como los es *E. coli* BL21) que poseen maquinaria adicional que permite la trascripción de genes, como lo es la expresión de la T7 ARN polimerasa u otras enzimas exógenas que permiten la expresión en grandes cantidades de proteínas recombinantes; adicionalmente, estas cepas suelen ser carentes de proteasas celulares (Lon y/o Clp), por lo que la detección y purificación de las proteínas recombinantes resulta ser fácil y eficiente. Sin embargo, en este estudio, la expresión de las antitoxinas se realizó en *P. rettgeri* (aislamiento clínico) que no poseen dicha maquinaria y que expresa las proteínas a niveles fisiológicos. En el género *Providencia,* el promotor utilizado en la regulación para la expresión de proteínas, ha sido el promotor *lac* [101]; por lo que se decidió utilizar este promotor para la regulación de la expresión de las antitoxinas del sistema de muerte post-segregacional del plásmido p06-1619-NDM; sin embargo, el promotor *lac* y su derivado *lac*UV5 a pesar de ser altamente utilizados, son bastante débiles y, por lo tanto, no son muy útiles para la producción de proteínas recombinantes en grandes cantidades [106]. La debilidad del promotor *lac* en comparación con los promotores más utilizados para la expresión de proteínas recombinantes (T7, *tac*, $araP_{BAD}$) puede sugerir la baja producción de las proteínas (ParD-His y RelB-FLAG) tanto

en *E. coli* como en *P. rettgeri*, que no permitió su detección mediante técnicas sensibles (Western Blot), esto sumado a la inestabilidad de las antitoxinas y a sus posibles cambios postraduccionales, lo que configura una limitante técnica y un reto adicional a nivel de laboratorio para el desarrollo de este proyecto.

Los factores anteriormente enfocados hacia la no detección de las proteínas recombinantes están relacionados con posibles cambios postraduccionales, inestabilidad proteica y baja expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* y *P. rettgeri* bajo regulación del promotor *lac*; sin embargo, se deben considerar posibles factores durante la detección de las antitoxinas recombinantes usando Western blot (WB), ya que una de las principales preocupaciones en esta técnica es la transferencia de las proteínas, principalmente cuando se deben detectar proteínas poco abundantes, de bajo peso molecular o con modificaciones postraduccionales debido al requerimiento de cantidades de muestra relativamente grandes [115]. Es posible que este sea una de las limitantes para la detección de las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG, ya que como se sabe, el tamaño de las antitoxinas recombinantes es pequeño (9.5 kDa y 10.1 kDa, respectivamente) y debido a su inestabilidad es posible que se encuentren en bajas cantidades, de ahí que resulta necesario estandarizar muy bien la técnica para la detección de estas proteínas, principalmente con los tiempos de transferencia a la membrana y el uso de membranas de PVDF de menor tamaño de poro, de modo que se retenga la mayor cantidad de proteínas recombinantes para su posterior detección inmunológica por WB. Sin embargo, otra técnica que podría acompañar a la detección por WB sería la detección inmunológica por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando anticuerpos frente a las antitoxinas y no únicamente frente a la etiqueta de fusión de cada antitoxina (Anti-6xHis y/o Anti-FLAG) como sucede en el WB. El tipo de ELISA que se podría aplicar sería tipo sándwich, en el cual el anticuerpo Anti-ParD o Anti-RelB se inmovilizaría sobre la placa, seguidamente se adicionaría los extractos proteicos provenientes de las cepas recombinantes *E. coli* BL21 (DE3) o *P. rettgeri*, posteriormente el anticuerpo primario frente a las etiquetas de fusión de cada antitoxina recombinante (Anti-6xHis y/o Anti-FLAG) y finalmente, el anticuerpo secundario de detección (Anti-Mouse IgG) que podría estar acoplado a biotina. De este modo, se podrían detectar las antitoxinas recombinantes probando varios extractos proteicos provenientes de diferentes tiempos de inducción en las cepas recombinantes; sin embargo, ELISA debe ir

acompañado de WB para determinar el tamaño de las proteínas recombinantes. Este tipo de alternativa para poder detectar las proteínas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG se podría aplicar a corto plazo para confirmar la traducción de las proteínas recombinantes.

4. Estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en *Providencia rettgeri* B221-AT

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Cepas bacterianas usadas para el análisis de la estabilidad plasmídica

Se analizó la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en presencia del plásmido recombinante pBC SK-AT que codifica para las antitoxinas ParD-His y RelB-FLAG, por lo que fue analizada la cepa B221-AT (que transporta los dos plásmidos) con el fin de determinar si se producen diferencias en la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM cuando coexiste con el plásmido pBC SK-AT con capacidad para producir las antitoxinas en *P. rettgeri* B221-AT. Adicionalmente, como controles fueron analizadas las cepas B221-BC (cepa con plásmido pBC SK(+) vacío) y B221 (cepa nativa) con el fin de determinar si la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM es dependiente de la producción de las antitoxinas recombinantes y no del material genético del plásmido pBC SK(+) (plásmido vacío). Las características generales de las cepas incluidas en el estudio de estabilidad plasmídica fueron resumidas en la Tabla 2-2.

4.1.2 Condiciones de cultivo para la determinación de la estabilidad plasmídica

Para la determinación de la estabilidad plasmídica en diferentes bacterias hospedadoras se utilizó el protocolo descrito por Márquez-Ortiz A. [35] con algunas modificaciones. Básicamente, se partió de una única colonia que fue cultivada en cinco mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con ceftazidime 30 µg/mL para la cepa B221 y con ceftazidime 30 µg/mL y cloranfenicol 200 µg/mL para las cepas B221-BC y B221-AT generando una presión selectiva para garantizar como punto de partida que el 100% de la población bacteriana presentará el/los plásmido/s. Después de 12 horas de incubación a

37°C, con agitación constante a 200 rpm, este cultivo bacteriano fue centrifugado a 4000 rpm durante siete minutos, y posteriormente el medio con antibiótico fue removido. Las bacterias recuperadas fueron lavadas dos veces con solución salina (NaCl 0.89% p/v) y resuspendidas en el mismo volumen inicial de caldo BHI sin antibiótico para la cepa B221 y de caldo BHI suplementado con cloranfenicol 200 µg/mL para las cepas B221-BC y B221-AT con el fin de garantizar la permanencia de los plásmidos pBC SK(+) y pBC SK-AT, respectivamente. Se tomó una alícuota de este cultivo bacteriano para la cuantificación relativa de ADN plasmídico en el tiempo cero. Adicionalmente, a partir de este cultivo (tiempo cero) se realizó una dilución 1:1000 en caldo BHI bajo las condiciones de antibióticos anteriores y se incubo nuevamente por 12 horas a 37°C con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se realizó una nueva dilución 1:1000 y se incubó nuevamente. Después de 12 horas de incubación se tomó otra alícuota y se realizó una nueva dilución para garantizar un crecimiento continuo.

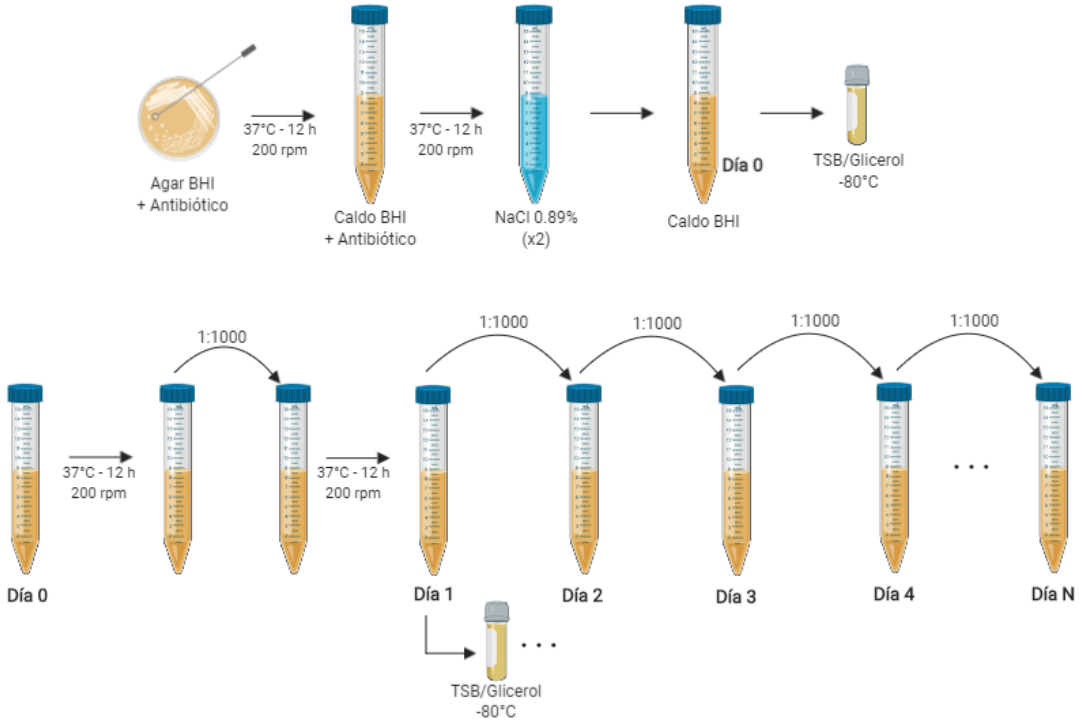


Figura 4-1. Estrategia usada para la determinación de la estabilidad plasmídica. En el día cero las bacterias fueron cultivadas en caldo con presión selectiva (antibiótico), posteriormente la presión selectiva fue removida para el plásmido NDM positivo y se mantuvo un crecimiento continuo realizando diluciones 1:1000 cada 12 horas por 30 días.

Este proceso se realizó cada 12 horas durante 30 días para cada cepa y fueron tomadas alícuotas diarias del cultivo y almacenadas en caldo TSB con glicerol 15% a -80°C para determinar la estabilidad plasmídica en cada punto (Figura 4-1). La presencia de los plásmidos p06-1619-NDM, pBC SK (+) y pBC SK-AT fue confirmada en las cepas por técnicas moleculares (ver capítulo 3). Se realizaron mínimo dos replicas por experimento.

4.1.3 PCR para cuantificación de la estabilidad plasmídica

La estabilidad plasmídica fue cuantificada por medio de PCR, para tal fin se siguió la estrategia de cuantificación relativa del ADN plasmídico (ADNp) con respecto al ADN cromosomal (ADNcr) diseñada por Márquez-Ortiz A. [35], la cual asume que la cantidad de ADNcr es constante, mientras que la de ADNp varia durante el desarrollo del crecimiento continuo dependiendo del número de copias y la estabilidad de cada plásmido. Para la cuantificación de ADNcr se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes al gen de única copia *dnaA* de *P. rettgeri*, y para el ADNp los oligonucleótidos para los plásmidos p06-1619-NDM, pBC SK(+) y pBC SK-AT (oligonucleótidos correspondientes a los promotores T3 y T7). Los oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 2-1.

Para la extracción del ADN total de los cultivos bacterianos se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante para bacterias Gram negativas. Después del proceso de purificación el ADN fue resuspendido en agua y cuantificado por triplicado espectrofotométricamente usando el equipo NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific™). Con el promedio de las concentraciones para cada día se prepararon diluciones a una concentración final de 20 ng/µL, las cuales fueron usadas posteriormente en las reacciones de PCR. El ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

4.1.4 Recuperación de aislamientos sensibles a ceftazidime derivadas de la cepa *Providencia rettgeri* B221

Durante los experimentos de estabilidad plasmídica se realizó la recuperación de aislamientos derivados de la cepa *P. rettgeri* B221 sensibles a ceftazidime sin fenotipo de resistencia por ausencia del gen bla_{NDM-1}. Estos aislamientos fueron caracterizados microbiológica y molecularmente de la siguiente manera: una alícuota del cultivo bacteriano correspondiente al día 30 de la curva de estabilidad de la cepa B221 fue tomada

y centrifugada a 7000 rpm durante siete minutos, posteriormente el medio con glicerol fue removido. Las bacterias recuperadas fueron resuspendidas en el mismo volumen inicial de caldo BHI y a partir de esta suspensión se prepararon diluciones decimales seriadas con solución salina. Un volumen de cada dilución fue sembrado por superficie en placas de agar BHI sin y con antibiótico (ceftazidime 30 µg/mL) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de ese tiempo, se procedió a realizar el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) y de la placa de agar BHI sin antibiótico correspondiente a la dilución decimal más baja (10^{-4}), se recuperaron 100 colonias en placas de agar BHI sin antibiótico durante toda la noche a 37°C y seguidamente se realizó una extracción de ADN por ebullición.

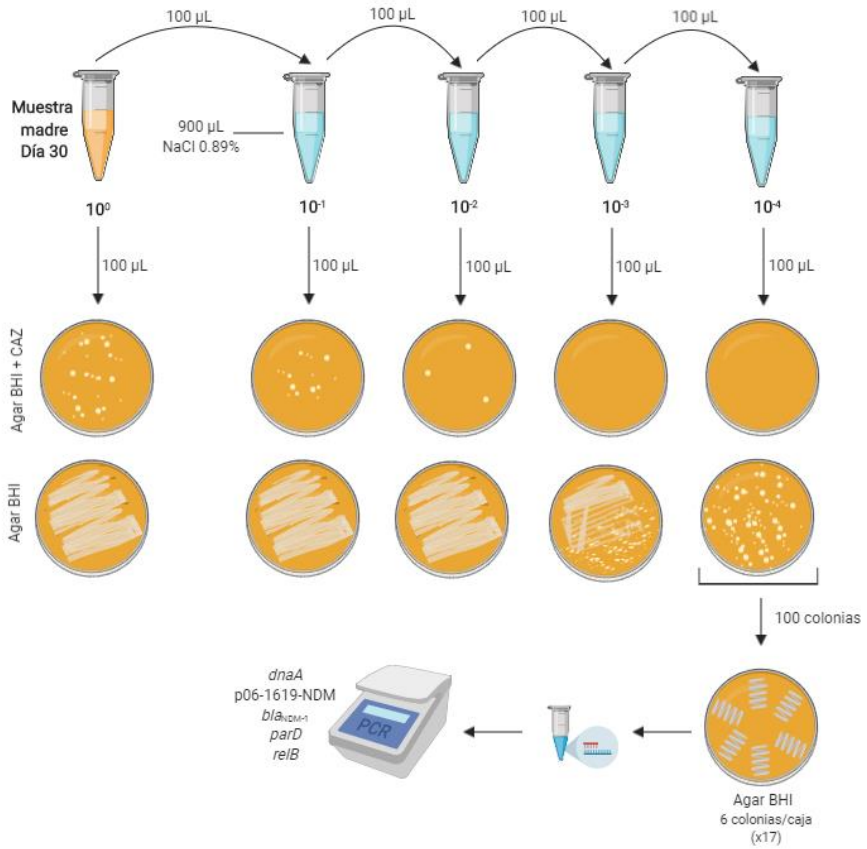


Figura 4-2. Estrategia usada para la recuperación de aislamientos sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos. El cultivo bacteriano correspondiente al día 30 de la curva de estabilidad plasmídica fue sometido a diluciones decimales seriadas que fueron sembradas en placas de agar sin y con presión selectiva (antibiótico). Un total de 100 colonias de la menor dilución fueron monitoreadas por técnicas moleculares para establecer las características fenotípicas y la ausencia de la resistencia a antibióticos β-lactámicos.

Posteriormente, se prepararon 10 grupos de bacterias cada uno con diez muestras de ADN extraído y se realizó la confirmación del gen cromosomal *dnaA* de *P. rettgeri*, del plásmido p06-1619-NDM y de la antitoxina *parD* por PCR usando oligonucleótidos específicos (Tabla 2-1). Con base a los resultados obtenidos, se seleccionó un grupo de bacterias y a las diez muestras de ADN se les realizó la confirmación del gen cromosomal *dnaA*, del plásmido p06-1619-NDM, de las antitoxinas *parD* y *relB* por PCR, y posteriormente a las muestras que fueran *P. rettgeri* con ausencia del plásmido p06-1619-NDM, pero con las antitoxinas, se les realizó la confirmación de gen bla_{NDM-1} (Figura 4-2).

Considerando los resultados obtenidos para los aislamientos B221 sin fenotipo de resistencia, fueron diseñados oligonucleótidos específicos para la detección del transposón Tn*6368* usando la herramienta Primer-BLAST [116]. Se consideraron tres sitios de reconocimiento para darle seguimiento al transposón que fueron los genes *tnpM* y *repA* y la secuencia de inserción IS*5* (Figura 4-3). Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron: tamaño del oligonucleótido (18-22 pb), temperatura de fusión de los oligonucleótidos (~63°C) y tamaño de los amplicones entre 400-750 pb con diferencias de 100-150 pb entre ellos para una PCR múltiple [117]. La especificidad de los oligonucleótidos diseñados fue verificada por comparaciones pareadas de su secuencia frente a las secuencias de los plásmidos p06-1619-NDM (número de acceso GenBank: KX832928.1), p06-1619-2 (número de acceso GenBank: KX832929.1) y cromosoma (secuencia en base de datos de LGMB) de la cepa B221 usando la herramienta BLASTn [118].

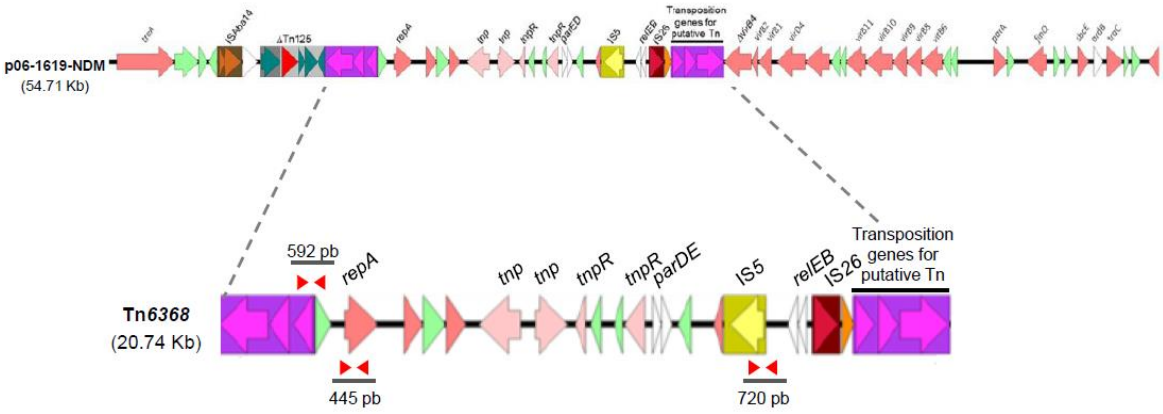


Figura 4-3. Sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos en el transposón Tn*6368*. El seguimiento del transposón Tn*6368* se realizó usando los oligonucleótidos que se marcan como triángulos rojos en la secuencia (*repA*: 445 pb, *tnpM*: 592 pb, IS*5*: 720 pb).

Finalmente, se procedió a realizar la estandarización de las condiciones de temperatura en la reacción de PCR múltiple, evaluando diferentes temperaturas de anillamiento para todos los oligonucleótidos en el equipo T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) usando el siguiente perfil de análisis: 95°C de denaturación inicial por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que comprendieron un paso de denaturación a 95°C por 45 segundos, hibridación a un rango entre 60-65 °C por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos; finalmente el proceso terminó con un paso de elongación a 72°C por cinco minutos. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1.5% p/v durante 60 minutos a 100 V, teñidos con solución de bromuro de etidio 0.1% y foto documentados.

4.1.5 Secuenciación, ensamblaje y anotación de genomas

Con base a los resultados obtenidos de recuperación de aislamientos sin fenotipo de resistencia, se tomaron las muestras de *P. rettgeri* sensibles (cepas B221::Tn*6368* y B221ΔTn*6368*) para la secuenciación y ensamblaje de sus genomas. Para la extracción de ADN total con calidad de secuenciación, se partió de cultivos bacterianos en caldo LB en fase exponencial (~4.5 horas de cultivo) usando el kit comercial UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.) de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante. La integridad del ADN fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 0.6%, la cuantificación y pureza mediante la relación de la absorbancia a 260nm, 280nm, 230 nm en el equipo NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific™). Se tuvo en cuenta que el ADN debía cumplir unos criterios de calidad como pureza con una relación A260/280 superior o igual a 1.8 y A260/230 igual a 2.0.

Debido a las diferencias moleculares entre los aislamientos sin fenotipo de resistencia, se escogieron dos tecnologías para su secuenciación. Para la muestra B221ΔTn*6368* se preparó una librería de ADN usando el kit TruSeq® DNA Nano (Illumina®). La librería fue secuenciada usando la plataforma NovaSeq™ 6000 de Illumina®. Las lecturas obtenidas fueron sometidas a un control de calidad por medio del programa FastQC v0.11.8 [119] y posterior a este control, las lecturas obtenidas fueron depuradas removiendo los extremos y lecturas de baja calidad (extremos con calidad por base y lecturas con calidad promedio menor a Q20) y restos de secuencias de adaptadores por medio del programa Trimmomatic [120]. Después de la limpieza de datos, se verificó nuevamente la calidad con FastQC v0.11.8 [119] y seguidamente, las librerías fueron ensambladas *de novo*

usando SPAdes v3.10.1 [121] de acuerdo con los parámetros definidos por el programa; la calidad del ensamblaje del genoma fue evaluado por medio del programa QUAST v4.0 [122]. A continuación, se realizó un mapeo de referencia de las lecturas obtenidas frente al genoma de referencia de *P. rettgeri* B221 (secuencia del cromosoma obtenida de las bases de datos de LGMB; plásmido p06-1619-NDM, número de acceso GenBank: KX832928.1; plásmido p06-1619-2, número de acceso GenBank: KX832929.1) por medio del software BWA-MEM v7.12 [123]. En tanto que, para la muestra B221::Tn*6368* se preparó una librería SMRTbell™ de ADN, haciendo una selección por tamaño de 20 Kb con el sistema BluePippin™ (Sage Science), para garantizar fragmentos de alto peso molecular. La librería fue secuenciada usando la plataforma PacBio RSII (Pacific Biosciences, USA) con el paquete de reactivos P6-C4. Las lecturas obtenidas fueron ensambladas *de novo* usando el programa HGAP3 por medio del SMRT Analysis v2.3 [124] y seguidamente para validar el ensamblaje, se hizo un mapeo de las lecturas obtenidas con la técnica PacBio con cada *contig* ensamblado por medio del software BWA-MEM v7.12 [123] y se inspeccionó visualmente el ensamblaje usando el programa Tablet v1.16.09.06 [125]. Posterior a la obtención del ensamblaje, se realizó un alineamiento pareado de cada uno de los *contigs* obtenidos frente al genoma de referencia de *P. rettgeri* B221 (secuencia del cromosoma obtenida de las bases de datos de LGMB; plásmido p06-1619-NDM, número de acceso GenBank: KX832928.1; plásmido p06-1619-2, número de acceso GenBank: KX832929.1) con la herramienta de BLASTn v2.4.0 [118], determinando que *contigs* pertenecían a cromosoma, plásmidos u otras estructuras. Debido a la naturaleza circular de cromosoma, plásmidos o unidades translocativas, la presencia de extremos repetidos fue visualizado por medio de Artemis Comparison Tool (ACT) v16.0 [126] para la unidad translocativa. Por tal motivo se realizó su circularización manual, y posteriormente, los puntos de origen (*repA*, IS*26*, *parD*) de la unidad translocativa fueron cambiados por medio de la herramienta Circlator v1.3.0 [127], y se visualizaron usando ACT y Tablet.

Los genomas de las cepas B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* fueron anotados usando Prokka v1.12 [128]. La zona cercana a la inserción de la IS*6368* y la unidad translocativa TU*6368* en la cepa B221::Tn*6368* fueron curados manualmente usando como referencia el plásmido p06-1619-NDM (número de acceso GenBank: KX832928.1) BLASTn, BLASTp y BLASTtx [118] y visualizados en Artemis [129]. El análisis genómico de inserciones y deleciones se realizó por medio de alineamientos pareados usando BLASTn [118] y el

resultado se visualizó mediante BRIG [130]. Luego de la identificación de la secuencia de inserción IS*6368* y de la unidad translocativa TU*6368*, se realizó un alineamiento pareado de estas regiones de la secuencia con el cromosoma y plásmido p06-1619-NDM de la cepa *P.* rettgeri B221, para visualizar las regiones codificantes e invertidos repetidos por medio de EasyFig [131].

4.2 Resultados

4.2.1 Estabilidad del plásmido p06-1619-NDM

Como se mencionó anteriormente, en este estudio se analizó la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM (pNDM-BJ01-like) de *P. rettgeri* B221 en presencia del plásmido recombinante pBC SK-AT productor de los transcritos de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG, con el fin de determinar si existen diferencias en su estabilidad cuando *P. rettgeri* transporta los dos plásmidos productores de antitoxinas (nativas y recombinantes). Para determinar la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM, se partió de cultivos continuos sin presión selectiva y diariamente fueron tomadas alícuotas de cada cultivo para extracción de ADN total. En los extractos de ADN total fue determinada la cantidad de ADNcr y ADNp por PCR.

Los análisis de PCR mostraron que el plásmido p06-1619-NDM fue estable en *P. rettgeri* B221-AT donde permaneció por los 30 días de crecimiento continuo, aún en presencia del plásmido recombinante pBC SK-AT productor de los transcritos de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG, que también permaneció estable debido a la presión selectiva (cloranfenicol 200 µg/mL) que se manejaba para asegurar su permanencia. Un resultado idéntico se encontró en la réplica experimental (Figura 4-4 A). Este resultado fue interesante, ya que sé planteo como hipótesis que la incorporación de un plásmido que expresará las antitoxinas de los sistemas putativos ParDE y RelEB, disminuiría la estabilidad del plásmido NDM positivo, y con ello la resistencia a los carbapenémicos; sin embargo; se evidenció que a pesar de estar presente el plásmido recombinante pBC SK-AT productor de los transcritos de las antitoxinas recombinantes, el plásmido p06-16-19-NDM presenta gran estabilidad. Es probable que estos resultados en la estabilidad del plásmido NDM positivo a pesar de estar presente el plásmido recombinante, se deba a que el plásmido recombinante pBC SK-AT no produzca

eficientemente las antitoxinas, aunque nuestros resultados indican que se están transcribiendo activamente, tal vez su traducción sea muy baja o se deba a la inestabilidad de las antitoxinas o cambios postraduccionales que no permiten la interacción de la antitoxina recombinante con la toxina nativa.

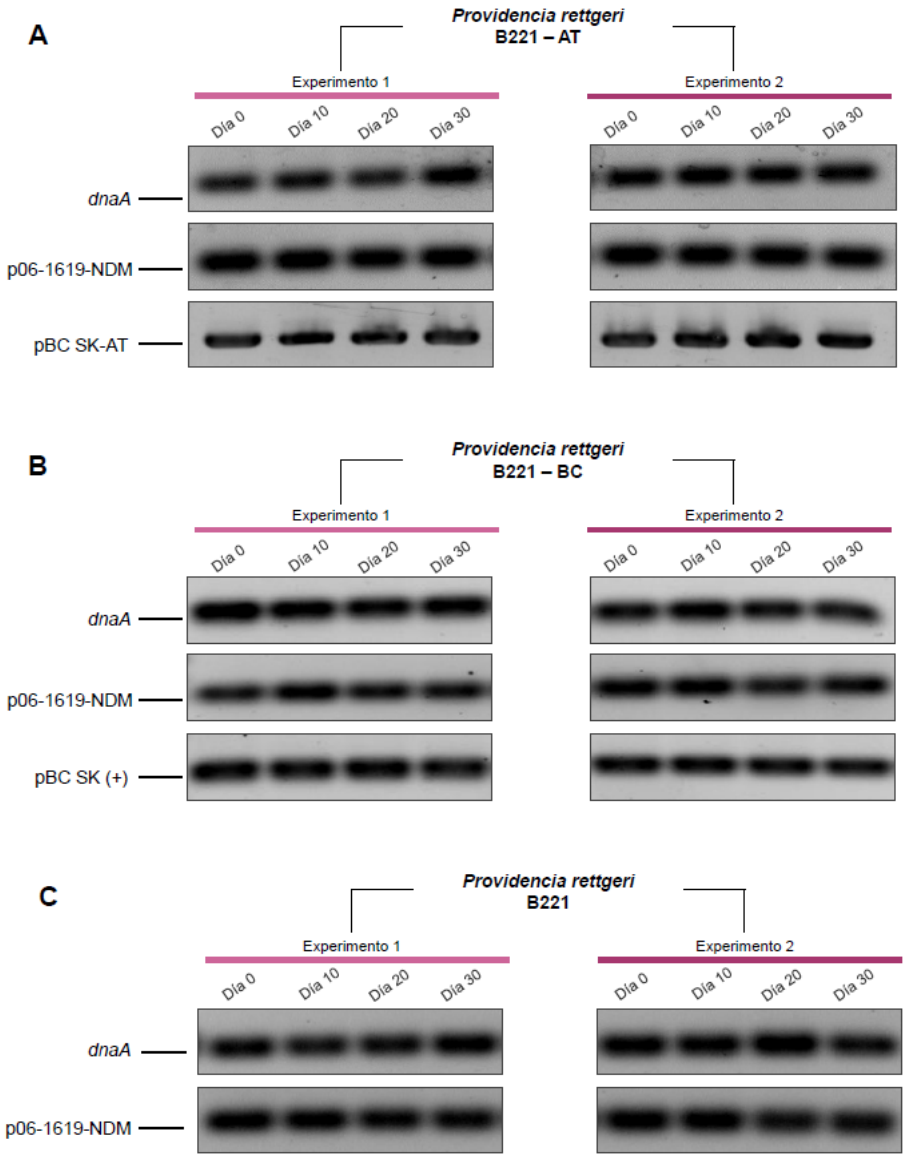


Figura 4-4. Determinación de ADN plasmídico y cromosomal por PCR para las muestras A. B221-AT, B. B221-BC y C. B221. Después de 30 días de crecimiento continuo en medio sin presión selectiva para el plásmido p06-1619-NDM y con presión selectiva para los plásmidos pBC SK-AT y pBC SK(+). Para todos los ensayos de PCR se utilizó la misma cantidad de ADN total (20 ng).

Los controles presentaron un comportamiento similar. Para el caso de *P. rettgeri* B221-BC, de igual manera se evidenció la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM por los 30 días de crecimiento continuo en presencia del plásmido pBC SK(+) que no presentaba los genes de las antitoxinas recombinantes y que también permaneció estable debido a la presión selectiva (cloranfenicol 200 µg/mL) (Figura 4-4 B). Para el caso de *P. rettgeri* B221 también se evidenció la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM por los 30 días de crecimiento continuo (Figura 4-4 C). Estos resultados en la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en las muestras analizadas de *P. rettgeri* (B221-AT, B221-BC y B221) confirman lo reportado por Márquez-Ortiz A [35] sobre la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en *P. rettgeri*, que indica que en *P. rettgeri* este plásmido es estable por incluso 28 días en un ensayo de estabilidad plasmídica sin presión selectiva (ausencia de ceftazidime). Para todos los casos se evidencio la amplificación del gen cromosomal *dnaA* específico de *Providencia rettgeri* (Figura 4-4) para los 30 días de crecimiento continuo.

Aunque en los experimentos mostrados en la Figura 4-4, *P. rettgeri* B221 (cepa nativa) mantuvo el plásmido, en dos réplicas experimentales de estabilidad plasmídica adicionales, esta cepa mostró una menor estabilidad del plásmido p06-1619-NDM (pérdida del plásmido) desde el día 20 de crecimiento continuo (Figura 4-5). El análisis de PCR sugiere que una menor población bacteriana es portadora del plásmido. Este resultado fue interesante, debido a que la población bacteriana de cada ensayo de *P. rettgeri* B221 se comportó de manera distinta a pesar de haber estado sometida a las mismas condiciones (crecimiento continuo por 30 días sin presión selectiva), quizás debido a un proceso al azar que favoreció que en estas replicas experimentales se haya dado la pérdida del plásmido que no se da con frecuencia en las condiciones de laboratorio, puesto que de seis replicas experimentales (cuatro mostradas en este estudio y dos reportadas por Márquez-Ortiz A [35]), cuatro mostraron un comportamiento similar con permanencia del plásmido por los días de cultivo y únicamente dos mostraron la pérdida del plásmido después del día 20 de estabilidad plasmídica. Sin embargo, los resultados entre las réplicas experimentales fueron consistentes y mostraron el mismo comportamiento de la estabilidad plasmídica partiendo de cultivos independientes y en ensayos diferentes.

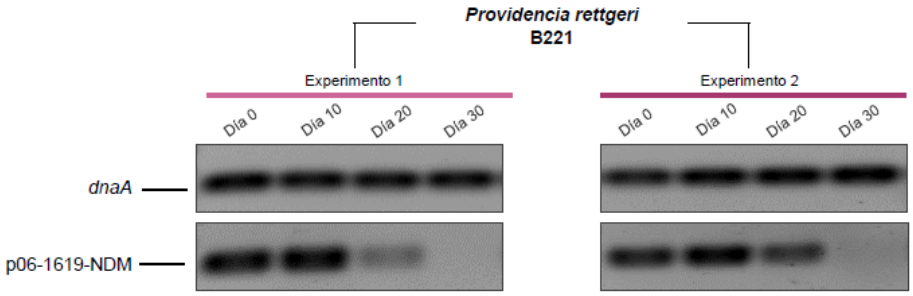


Figura 4-5. Determinación de ADN plasmídico y cromosomal por PCR para la muestra B221. Después de 30 días de crecimiento continuo en medio sin presión selectiva. Para todos los ensayos de PCR se utilizó la misma cantidad de ADN total (20 ng).

Los resultados de estabilidad plasmídica en general mostraron que el plásmido p06-1619-NDM presentó una gran estabilidad en la población bacteriana, independientemente de la presencia de otro plásmido (pBC SK-AT) productor de antitoxinas. Sin embargo, el resultado más interesante fue la menor estabilidad del plásmido NDM positivo en una de las réplicas de la muestra B221 después del día 20 de crecimiento continuo, lo que sugiere que hubo pérdida de este plásmido en la población bacteriana y que posiblemente ocurrieron procesos genéticos espontáneos que desencadenaron la pérdida. Con base en esto, se decidió caracterizar los aislamientos sensibles para determinar cuáles fueron las posibles razones genéticas que desencadenaron la pérdida espontánea del plásmido p06-1619-NDM portador del gen bla_{NDM-1}. Para esto, inicialmente se realizó un análisis poblacional que permitiera recuperar aislamientos sensibles (ausencia de bla_{NDM-1}); posteriormente se realizó la secuenciación del genoma completo de cepas sensibles y finalmente, se realizó un análisis genómico comparativo de dos aislamientos sensibles representativos.

4.2.2 *Providencia rettgeri* B221 sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos

Después de evaluar la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM y evidenciar su menor estabilidad a partir del día 20 de crecimiento continuo en una de las réplicas de la cepa B221, se realizó la recuperación de aislamientos sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos (ausencia del gen bla_{NDM-1}). Para tal fin, se realizó un abordaje microbiológico y molecular que permitió determinar las características fenotípicas y genotípicas de las cepas sensibles. Inicialmente, se determinó el número de UFC para la muestra analizada

correspondiente al día 30 del crecimiento continuo, así como para sus diluciones seriadas. Los resultados mostraron que en medio con presión selectiva (ceftazidime 30 µg/mL), el número de colonias con resistencia fue bajo en comparación con el crecimiento en medio sin presión selectiva, siendo de 286 UFC en la muestra madre (sin dilución), de 27 y 3 UFC para las diluciones 1:10 y 1:100, respectivamente y ausencia de crecimiento en las diluciones siguientes (Tabla 4-1). Este resultado de crecimiento en medio con presión selectiva sugiere aún la presencia de colonias con fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos (por el gen bla_{NDM-1}), y por tanto la presencia del plásmido p06-1619-NDM a pesar de no haber sido detectado por PCR en las muestras poblacionales a partir del día 20 de la curva de estabilidad plasmídica, esto debido a que se trata de un análisis poblacional en el cual la cantidad de colonias que presentan el plásmido NDM positivo se encuentra en una baja proporción en comparación a las colonias que no tienen el plásmido. No obstante, en medio sin presión selectiva, no fue posible contar el número de UFC para las diluciones evaluadas (rango de sensibilidad 25 – 300 UFC); sin embargo, en la menor dilución evaluada (1:10000) se obtuvieron colonias aisladas a pesar de no poder establecer el número de UFC, lo que sugiere que la mayor parte de la población bacteriana no presentaba fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos.

Tabla 4-1. Recuento de UFC para la muestra B221 en el día 30 curva de estabilidad plasmídica.

UFC muestra B221, día 30.					
Medio cultivo	**Dilución**				
	10^0	**10^{-1}**	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**
Agar BHI	>300	>300	>300	>300	>300
Agar BHI + CAZ	286	27	3	<1	<1

CAZ: ceftazidime

Con base en los resultados del conteo en placa y evidenciando el crecimiento de colonias en placas sin presión selectiva en comparación con las de presión selectiva, se recuperaron 100 colonias de la placa correspondiente a la menor dilución (1:10000) del cultivo en medio sin presión selectiva y se realizó la confirmación del gen cromosomal *dnaA* específico de *P. rettgeri*, del plásmido p06-1619-NDM y de la antitoxina *parD* por PCR para las 100 colonias recuperadas en grupos bacterianos de 10 colonias cada uno. Los resultados mostraron que el 100% de los grupos bacterianos eran *P. rettgeri* por amplificación de un producto de 133 pb correspondiente al gen cromosomal *dnaA*

especifico de esta especie bacteriana y que el 0% de los grupos bacterianos tenían el plásmido p06-1619-NDM por ausencia de amplificación del producto de 112 pb correspondiente al plásmido NDM positivo (Figura 4-6). Sin embargo, cuando se realizó la amplificación del gen *parD*, el 60% de los grupos bacterianos amplificaron la antitoxina por la presencia de un producto de 273 pb (Figura 4-6); este resultado fue interesante, ya que el gen de la antitoxina *parD* presente en el operón *parDE* es exclusiva del plásmido p06-1619-NDM al ser movilizado por el transposón Tn*6368*, pero no hubo amplificación para el plásmido NDM positivo, lo que sugiere la presencia del operón *parDE* y, por tanto, de la antitoxina *parD* en una estructura genómica que no es el plásmido p06-1619-NDM, pero que podría ser el cromosoma o el plásmido p06-1619-2 presente en *P. rettgeri* B221.

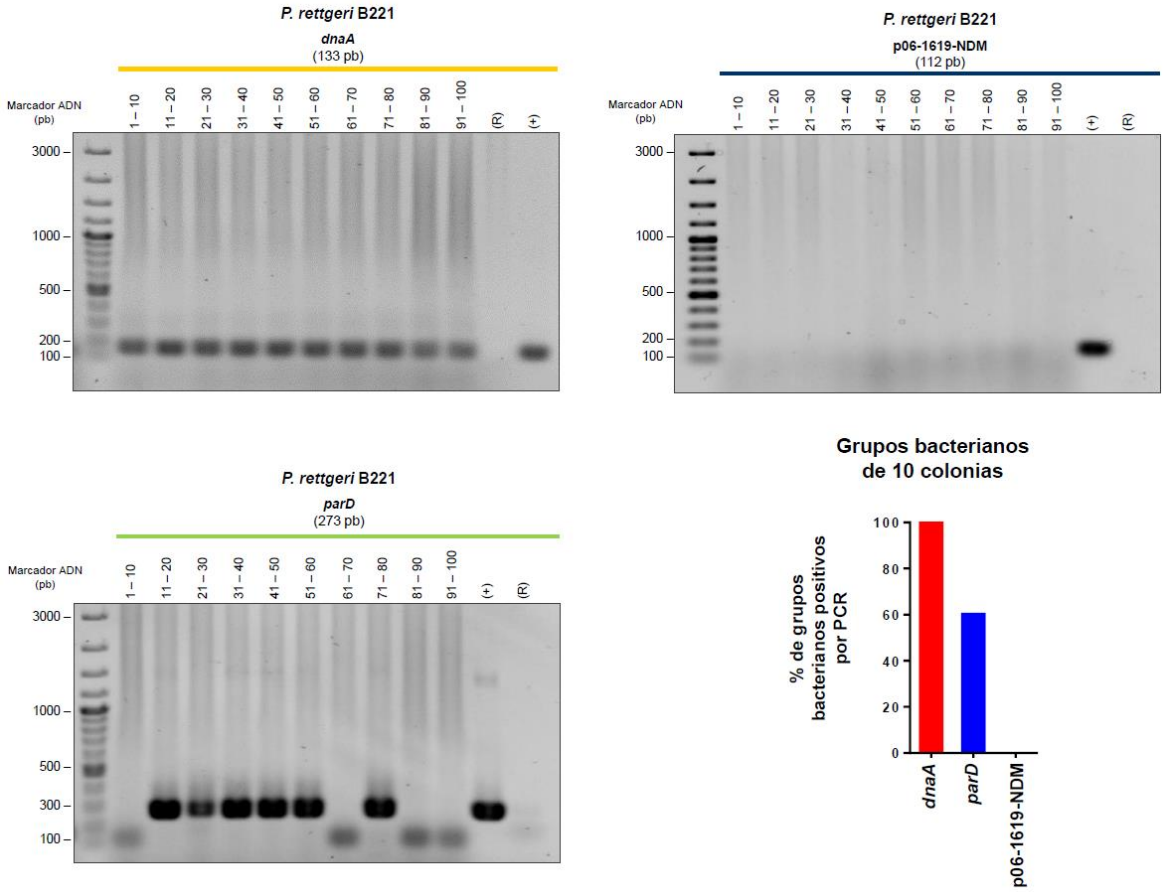


Figura 4-6. Recuperación de aislamientos de *P.* rettgeri B221 sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos. Confirmación de *dnaA*, p06-1619-NDM y *parD* para 100 colonias aisladas de la cepa B221 correspondiente al día 30 de la curva de estabilidad plasmídica, en grupos bacterianos de 10 colonias cada uno. En el histograma se indica el porcentaje de cada resultado.

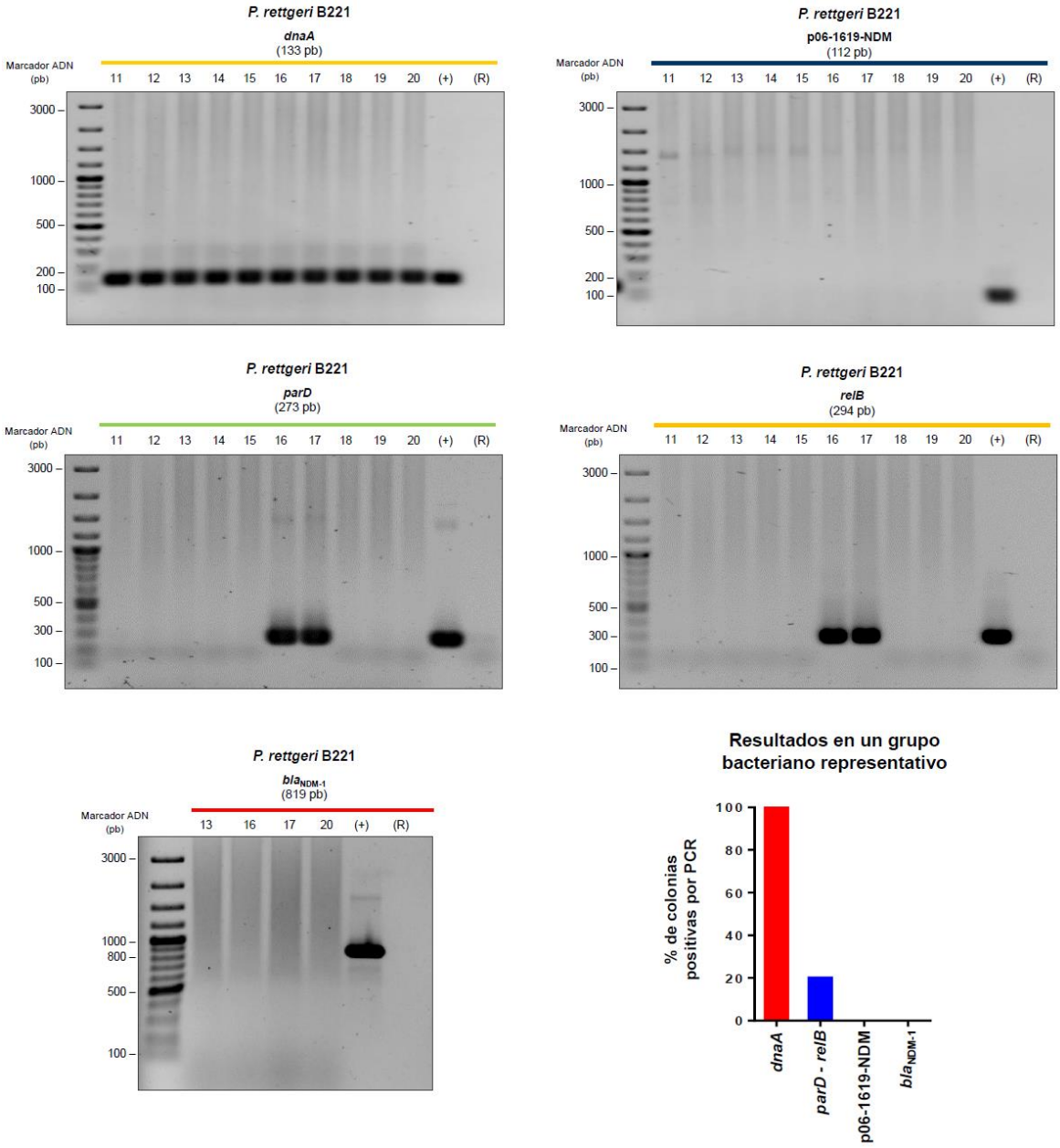


Figura 4-7. Recuperación de aislamientos de *P. rettgeri* B221 sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos. Confirmación de *dnaA*, p06-1619-NDM, *parD* y *relB* para 10 colonias aisladas de la cepa B221 correspondiente al día 30 de la curva de estabilidad plasmídica y de bla_{NDM-1} para cuatro colonias aisladas de la cepa B221 después de la confirmación de especie, plásmido NDM positivo y antitoxinas. En el histograma se indica el porcentaje de cada resultado.

Indagando al respecto acerca de la amplificación del gen de la antitoxina *parD*, se seleccionó un grupo de bacterias al azar que hubiera amplificado para los genes *dnaA* y

parD, pero no para el plásmido p06-1619-NDM, según esto, se seleccionó el grupo correspondiente a las colonias 11 – 20. A estas muestras se les realizó nuevamente la confirmación del gen cromosomal *dnaA*, del plásmido p06-1619-NDM y de las antitoxinas *parD* y *relB* por PCR. Los resultados mostraron que el 100% de las muestras eran *P. rettgeri* por amplificación de un producto de 133 pb correspondiente al gen cromosomal *dnaA* especifico de esta especie bacteriana, que el 0% de las muestras tenían el plásmido p06-1619-NDM por ausencia de amplificación del producto de 112 pb correspondiente al plásmido NDM positivo (Figura 4-7), y que únicamente el 20% de las muestras amplificaba para las antitoxinas *parD* y *relB* por la presencia de un producto de 273 pb y 294 pb respectivamente correspondientes a las antitoxinas (Figura 4-7). Una vez obtenidos estos resultados, se seleccionaron cuatro muestras del grupo analizado, dos muestras al azar sin amplificación de las antitoxinas *parD* y *relB* (colonias 13 y 20), y las dos únicas muestras que amplificaron las antitoxinas (colonias 16 y 17) y se les realizó la confirmación del gen bla_{NDM-1} por PCR. Los resultados mostraron que el 0% de las colonias tenía el gen de resistencia bla_{NDM-1} por ausencia de amplificación del producto de 819 pb correspondiente a este gen (Figura 4-7).

Los resultados antes mencionados, indican que se obtuvieron dos aislamientos de *P. rettgeri* curados del plásmido p06-1619-NDM y sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos (ausencia del gen bla_{NDM-1}) pero con diferencias moleculares entre ellas; la primera con los genes de las antitoxinas *parD* y *relB*, la cual se denominó B221::Tn*6368*; y la segunda libre los genes de las antitoxinas, la cual se denominó B221ΔTn*6368*.

Los genes de las antitoxinas *parD* y *relB* son exclusivos de los sistemas TA *parDE* y *relEB*, respectivamente, que están presentes en el elemento genético móvil Tn*6368* que fue insertado en el plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri* B221 y que lo diferencia del resto de plásmidos de la familia pNDM-BJ01-like frecuentes en *Acinetobacter spp.;* sin embargo, la confirmación de la curación del plásmido NDM positivo pero la amplificación de las antitoxinas sugiere la presencia del transposón Tn*6368* en la cepa B221::Tn*6368* y su ausencia en la cepa B221ΔTn*6368*, por lo que se diseñó una estrategia para la detección del transposón, que incluyó su seguimiento por técnicas moleculares al amplificar tres zonas del transposón: el gen modulador de la transposición *tnpM* exclusivo de la secuencia de inserción IS*6368*, el gen de replicación *repA* y la secuencia de inserción IS*5*. La

especificidad de los oligonucleótidos para el transposón Tn*6368* fue comprobada por BLASTn contra el cromosoma de *P. rettgeri* B221 y los plásmidos que ésta transporta.

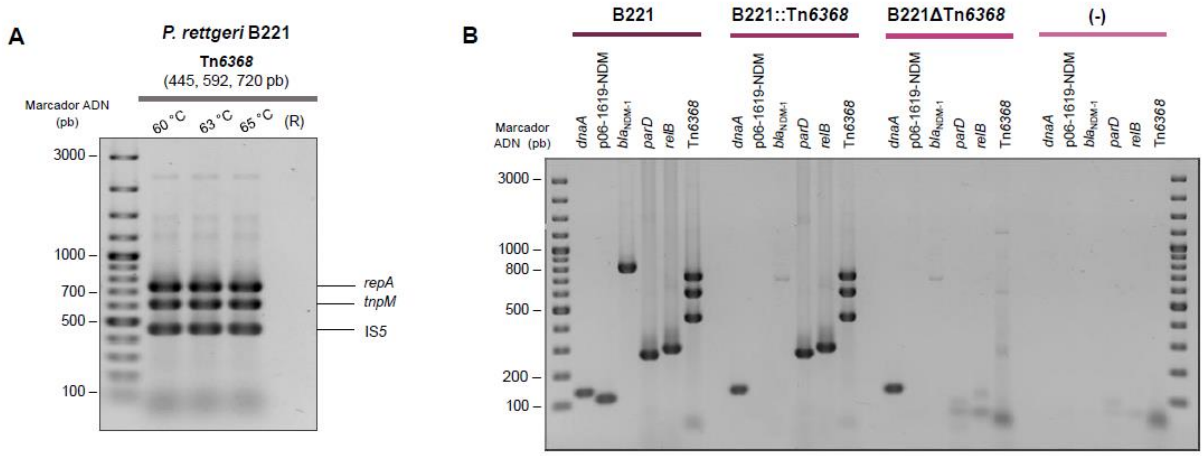


Figura 4-8. Detección del elemento genético móvil Tn*6368*. A. Estandarización de la temperatura de hibridación (T_H) de los oligonucleótidos usados para detección del transposón Tn*6368*. (R) Control de reactivos. B. Evaluación de la presencia del transposón Tn*6368* en las muestras curadas del plásmido p06-1619-NDM y sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos B221::Tn*6368* y B221ΔTn*6368*. (-) Control negativo: *E. coli* BL21.

Inicialmente se estandarizó la temperatura de hibridación (T_H) para cada pareja de oligonucleótidos descritos en la Tabla 2-4 para una PCR múltiple; así se probaron temperaturas entre 60 – 65°C (Figura 4-8A). En este ensayo se encontró que, para todas las reacciones fue evidente la amplificación de los productos esperados: 445 pb para la secuencia de inserción IS*5*, 592 pb para el gen *tnpM* y 720 pb para el gen *repA*, sin generación de bandas inespecíficas cercanas a los productos esperados. Teniendo en cuenta que los valores más altos de temperatura favorecen la especificidad y disminuyen la formación de productos secundarios, se decidió utilizar una T_H de 65°C. Una vez estandarizada la temperatura de hibridación, se procedió a realizar la detección del transposón Tn*6368* en las cepas B221::Tn*6368* y B221ΔTn*6368*. En este ensayó se confirmó la presencia del transposón en la cepa B221::Tn*6368* por amplificación de las tres zonas del transposón (*tnpM*, *repA*, IS*5*) y su ausencia en la cepa B221ΔTn*6368* en comparación con la cepa control B221 (Figura 4-8B). Adicionalmente, a cada cepa se le realizó nuevamente la confirmación de especie, plásmido p06-1619-NDM, gen de

resistencia *bla*$_{NDM-1}$ y genes de las antitoxinas *parD* y *relB*. Los resultados mostraron que las cepas evaluadas presentaron las características antes mencionadas en cuanto a especie, plásmido y fenotipo de resistencia por la amplificación de los productos esperados.

4.2.3 Genómica comparativa de *Providencia rettgeri* B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* con *Providencia rettgeri* B221

La recuperación de dos cepas sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos y curadas del plásmido p06-1619-NDM, pero con diferencias moleculares entre ellas que indicaban en una la presencia del transposón Tn*6368* (B221::Tn*6368*) y en otra su ausencia (B221ΔTn*6368*), determinó la importancia de analizar su genoma completo con el fin de determinar los cambios genéticos que presentaban y que podían estar asociados a la menor estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en la cepa *P. rettgeri* B221. Con base en esto, se realizó un alineamiento pareado del plásmido p06-1619-NDM y p06-1619-2 con el ensamblaje completo correspondiente a las cepas B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* y fueron ilustrados por medio de BRIG. Los análisis de los ensamblajes de las cepas *P. rettgeri* B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* contra el plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri* B221 mostraron que ambas cepas (B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368*) efectivamente carecían del gen de resistencia a antibióticos β-lactámicos (*bla*$_{NDM-1}$) y por tanto, de los remanentes del elemento genético móvil que lo transporta, el transposón ΔTn*125*, resultado que se valida con los ensayos moleculares (Figura 4-8). Adicionalmente, se evidenció el bajo porcentaje de mapeo de las dos cepas frente al plásmido NDM positivo, lo que permitió comprobar el resultado de curación del plásmido en las dos cepas analizadas (Figura 4-9 A). Sin embargo, la cepa B221ΔTn*6368* presentó un mapeo de 12% con una identidad de 100% contra el plásmido p06-1619-NDM. Esta pequeña porción que mapeo contra el plásmido p06-1619-NDM en la cepa B221ΔTn*6368* (Figura 4-9 A) estaba asociada a *P. rettgeri* B221 (cepa nativa), debido a que esta cepa presenta dos plásmidos, el plásmido p06-1619-NDM responsable del transporte del gen *bla*$_{NDM-1}$ y el plásmido p06-1619-2 (plásmido pPrY-like de circulación exclusiva en *P. rettgeri*). El 12% de mapeo sobre el plásmido que transporta NDM (p06-1619-NDM), se debió a una segunda copia de las secuencias de inserción IS*6368* e IS*5* en el segundo plásmido (p06-1619-2) que hacen parte de la secuencia nativa de este plásmido; es decir, no hacen parte de un nuevo evento de movilización de estas dos secuencias de inserción. En tanto que, la cepa B221::Tn*6368*

presentó una cobertura de 40% con una identidad de 99.8% contra el plásmido p06-1619-NDM. Esta porción de p06-1619-NDM que mapeo en la cepa B221::Tn*6368* estaba asociada a la secuencia nucleotídica del elemento genético móvil, el transposón Tn*6368* (Figura 4-9 A), ya que se evidenció la presencia de todas las estructuras de interés como lo son las secuencias de inserción IS*6368*, IS*5*, IS*26*, así como los módulos de los sistemas TA, los operones *parDE* y *relEB*.

Adicionalmente, los análisis de los ensamblajes de las cepas *P. rettgeri* B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* contra el plásmido p06-1619-2 (plásmido perteneciente a la familia pPrY-like [35]) de *P. rettgeri* B221 mostraron que ambas cepas (B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368*) presentaron una cobertura e identidad de 100% con el plásmido analizado y que mantenían la región conservada que codifica la maquinaria de conjugación Tra-Pre [35] de *P. rettgeri* (Figura 4-9 B). Estos resultados sugieren que ambas cepas transportan el plásmido p06-1619-2 a pesar del crecimiento continuo al que la cepa B221 fue sometida por 30 días sin presión selectiva, lo que expone la gran estabilidad de este plásmido a pesar de no transportar genes de resistencia. La estabilidad de este plásmido en las dos cepas recuperadas, valida la estabilidad de este tipo de plásmidos en *P. rettgeri* y su posible papel en la diseminación de la resistencia, como fue reportado por Márquez Ortiz A [35].

Indagando al respecto sobre la localización de la secuencia nucleotídica que mapeo con el plásmido p06-1619-NDM, se evidenció que dicha secuencia estaba presente en un único *contig* (se generaron siete *contigs*). Teniendo en cuenta que la técnica de secuenciación utilizada (PacBio) parte de fragmentos de alto peso molecular (>10 Kbp) y qué basados en la experiencia previa en el laboratorio, no es frecuente encontrar en los ensamblajes derivados de esta técnica, *contigs* de bajo peso molecular (22283 pb), se evaluó una posible duplicación de una secuencia preensamblada en otra estructura, encontrando que no pertenecía ni a ADN cromosomal o plasmídico al realizar la genómica comparativa entre el cromosoma y los plásmidos de *P. rettgeri* B221 (p06-1619-NDM y p06-1619-2). Este resultado fue interesante, dado que la hipótesis de la que se partió es que el transposón Tn*6368* se movilizó a cromosoma o al plásmido p06-1619-2; sin embargo, al realizar el mapeo de las secuencias, no fue así. Este resultado sugiere que dicho *contig* corresponde a una estructura independiente, y que podría tratarse de un elemento genético móvil que

no está asociado ni a cromosoma ni al plásmido p06-1619-2 en la cepa *P. rettgeri* B221::Tn*6368*.

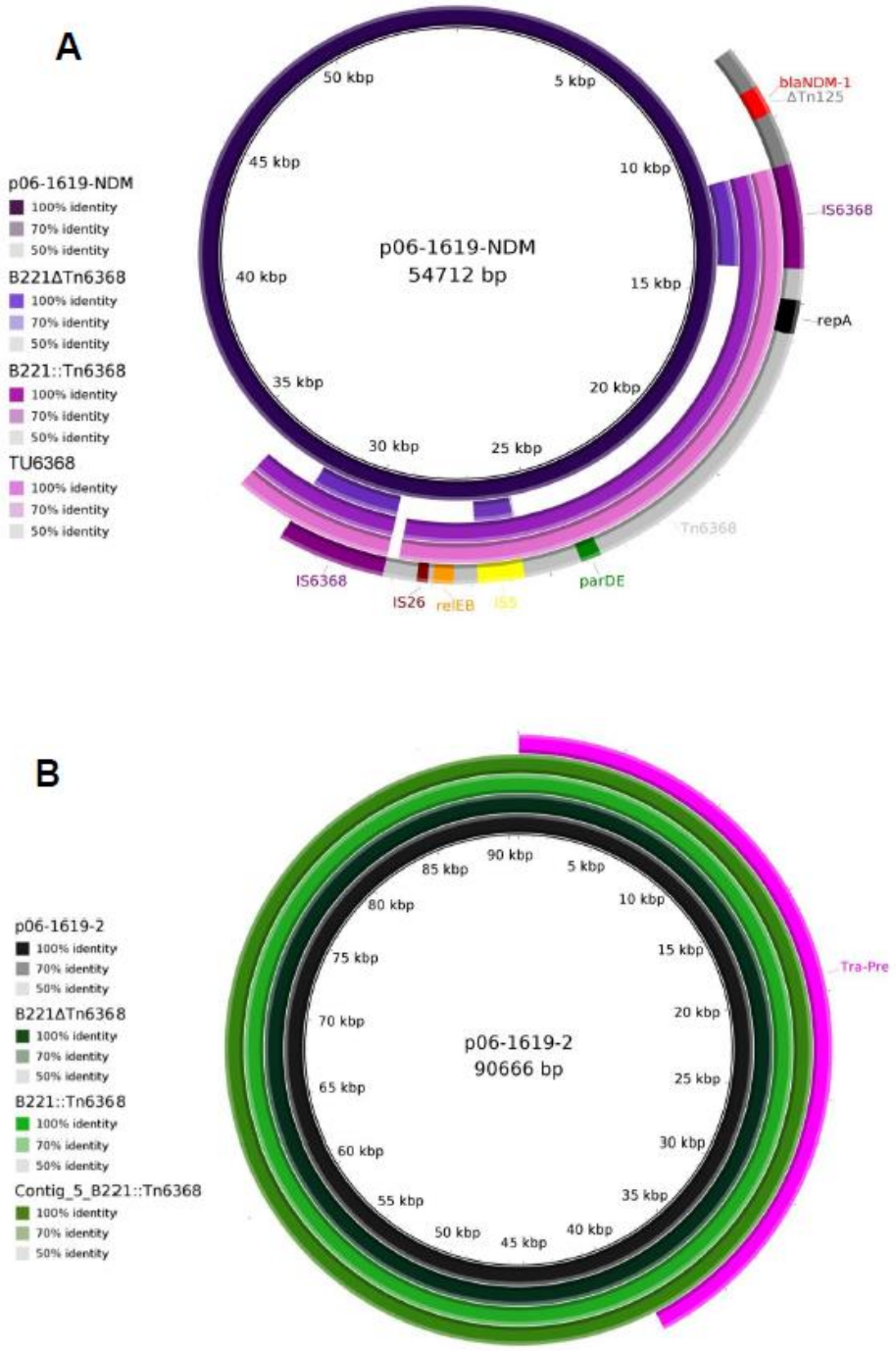


Figura 4-9. Comparación pareada del ensamblaje del genoma de las cepas de *Providencia rettgeri* B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368* contra los plásmidos A. p06-1616-NDM y B. p06-1619-2 de la cepa *P. rettgeri* B221. El circulo negro corresponde al plásmido de referencia respectivo incluido como control interno.

4.2.4 Movilización de la secuencia de inserción IS*6368* a cromosoma en la cepa *Providencia rettgeri* B221::Tn*6368*

La secuencia de inserción IS*6368* putativa corresponde a un elemento que se presenta como dos copias idénticas flanqueando el transposón compuesto Tn*6368* en el plásmido p06-1619-NDM, como una única copia en el plásmido p06-1619-2 y como una secuencia ausente en el cromosoma de *P. rettgeri* B221 (cepa nativa). Sin embargo, el análisis por genómica comparativa de los cromosomas de la cepa nativa (B221) y de una de las cepas sin fenotipo de resistencia (B221::Tn*6368*) mostró la movilización de la secuencia de inserción IS*6368* al cromosoma de esta última cepa. Los resultados muestran que la secuencia de inserción IS*6368* se movilizó de manera completa (identidad nucleotídica 100%), con todos los genes implicados en la transposición (genes *tnpM*, t*npR*, *tnpA*) al cromosoma de la cepa B221::Tn*6368* en una región no esencial del cromosoma, debido a que no truncó ningún gen de interés (Figura 4-10); adicionalmente, corriente arriba y abajo de la inserción de la secuencia de inserción IS*6368* se observó la duplicación de una secuencia de nueve pb (5'-CTTATACGT-3'), que corresponde a las huellas genéticas que muestran el evento de transposición. Finalmente, la evidencia de la movilización de la secuencia de inserción a cromosoma muestra que la IS*6368* es una elemento genético móvil (EGM) funcional y ya no putativo como se indicó anteriormente [35].

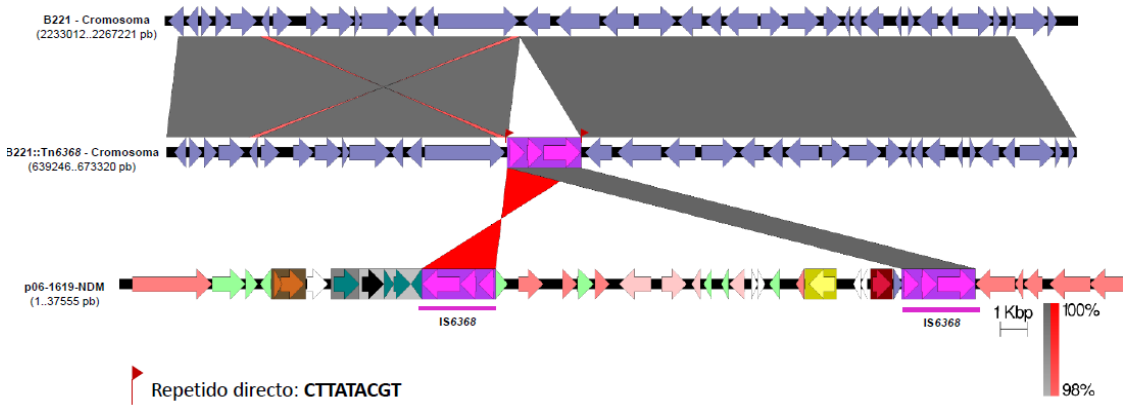


Figura 4-10. Inserción cromosomal en la cepa *Providencia rettgeri* B221::Tn*6368* de la secuencia de inserción IS*6368*. La IS*6368* (morado) se movilizó a cromosoma sin truncar ningún gen de interés en la cepa *P. rettgeri* B221::Tn*6368.* La secuencia de inserción se corresponde a la movilizada en el plásmido p06-1619-NDM que contiene todos los genes implicados en la transposición (*tnpA, tnpR, tnpM*). Las barras grises y rojas (secuencias invertidas) entre cada secuencia corresponden a regiones con >98% de identidad nucleotídica.

4.2.5 Unidad translocativa TU*6368*

El análisis de genómica comparativa entre el genoma completo de la cepa *P. rettgeri* B221::Tn*6368* contra la cepa *P. rettgeri* B221 (cepa nativa), permitió identificar una secuencia presente en un único *contig* (se generaron siete *contigs*) que no pertenecía ni a cromosoma ni al plásmido p06-1619-2 transportado por la cepa B221::Tn*6368*. Este único *contig* (*contig* seis) con un tamaño de 22283 pb presentó extremos repetidos (característica distintiva de estructuras circulares completamente secuenciadas [124, 127]), lo que permitió realizar su circularización (Figura 4-11) eliminando una porción de cada extremo repetido, de tal manera que se minimizara la cantidad de falsos marcos de lectura truncados, obteniéndose así una estructura de 19301 pb.

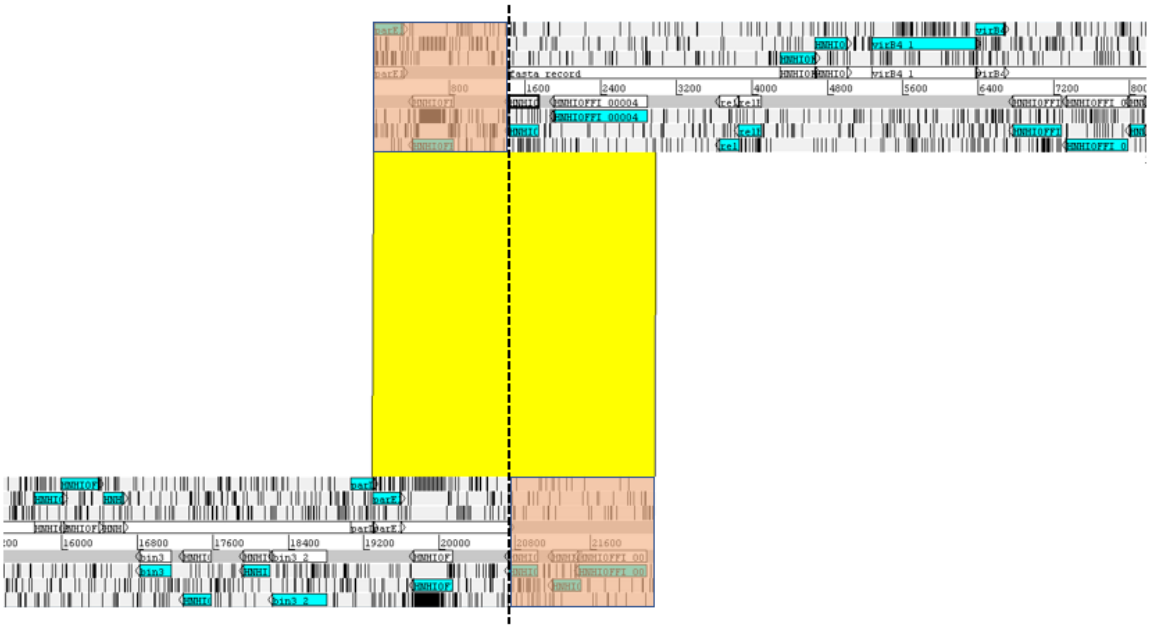


Figura 4-11. Zona de "circularización" la unidad translocativa TU*6368* de *Providencia rettgeri* B221::Tn6368. Se ilustra la visualización en Artemis Comparison Tool (ACT) del alineamiento pareado por BLASTn en los extremos del contig seis correspondiente a la unidad translocativa TU*6368* del genoma de *P. rettgeri* B221::Tn*6368*. El recuadro amarillo representa la zona repetida, la zona naranja muestra la región de ADN que fue removida posterior al procedimiento y la línea punteada es la zona de corte seleccionada para la respectiva circularización manual.

Debido a que los puntos de inicio de las secuencias son arbitrariamente asignados en el proceso de ensamblaje, la posición de inicio de la secuencia fue reacomodada usando tres puntos de origen diferentes, el gen *repA*, la secuencia de inserción IS*26* truncada y el gen

parD (Figura 4-12). Estos resultados mostraron que al realizar la circularización de este único *contig* (*contig* seis), no hay cambios en el patrón de mapeo, en la profundidad ni cobertura de las lecturas, lo que valida la característica circular del *contig* obtenido. El punto de inicio que se decidió dejar para este *contig* circularizado fue el gen *repA*, para facilitar los análisis de genómica comparativa, dado que este gen corresponde al primer gen corriente abajo de la secuencia de inserción IS*6368* del transposón compuesto Tn*6368* en el plásmido p06-1619-NDM.

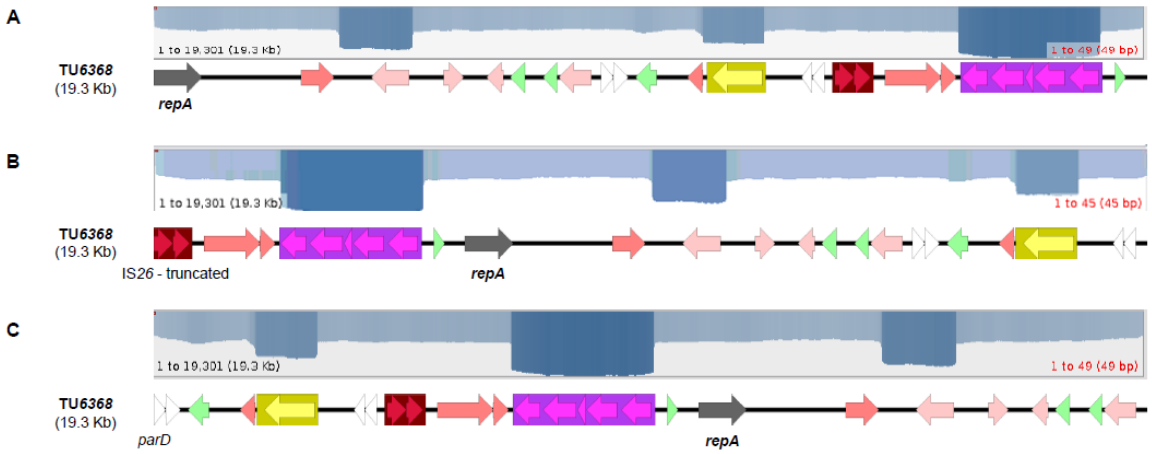


Figura 4-12. Mapeo de la unidad translocativa TU*6368* con distintos puntos de inicio. Se muestran los marcos abiertos de lectura de los genes de la unidad translocativa TU*6368* con distintos puntos de inicio A. gen *repA*, B. secuencia de inserción IS*26* truncada y C. gen *parD* y el mapeo de las lecturas con respecto a cada punto de inicio.

Una vez decidido el punto de inicio del *contig* seis, los resultados de la circularización mostraron que se obtuvo una estructura de 19301 pb (Figura 4-13) con una identidad nucleotídica >94% sobre la secuencia del plásmido p06-1619-NDM. La estructura nucleotídica correspondiente al *contig* seis conserva los sistemas toxina-antitoxina, los operones *parDE* y *relEB*, el gen *repA* y las secuencias de inserción IS*5*, IS*26* y una única copia de la secuencia de inserción IS*6368*; sin embargo, las secuencias de inserción IS*26* e IS*6368* están truncadas en comparación con las del plásmido p06-1619-NDM. Adicionalmente, presenta el gen *virB4* (que hace parte del sistema de secreción tipo IV) truncado y en una posición diferente a la original (corriente abajo de la IS*6368* en el plásmido p06-1619-NDM). En el plásmido p06-1619-NDM, el gen *virB4* no forma parte del transposón compuesto Tn*6368*, sino que se localiza corriente abajo de este elemento

genético móvil; sin embargo, en el *contig* seis, el gen *virB4* está localizado entre la secuencia de inserción IS*26* e IS*6368* (Figura 4-13), resultado que llama la atención y que posiblemente podría deberse a algún evento genético que generó la estructura circular del *contig* seis a partir el transposón compuesto Tn*6368.*

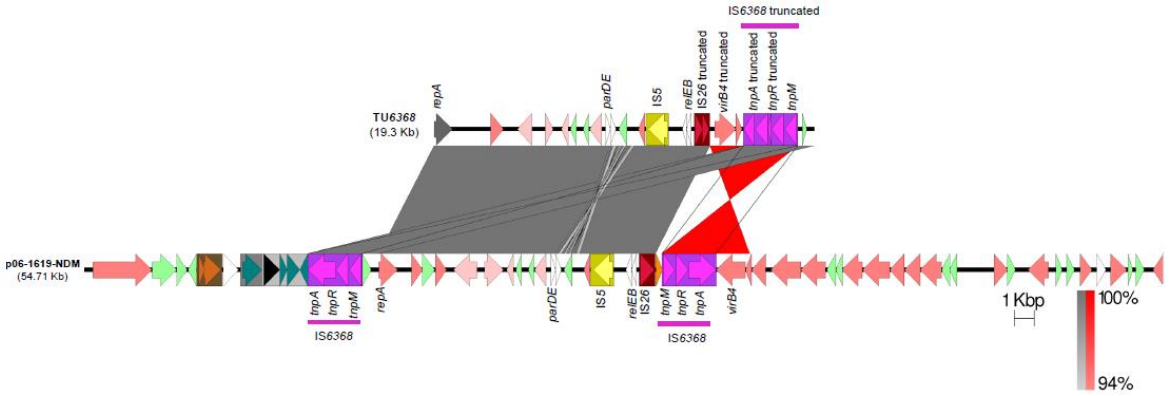


Figura 4-13. Estructura de la unidad translocativa TU*6368*. Se muestran los marcos abiertos de lectura de los genes de la unidad translocativa. Las secuencias de inserción IS*26* (lacre) e IS*6368* (morado) se observan truncadas. Los operones de los sistemas TA, *parDE* y *relEB* se corresponden a los del plásmido p06-1619-NDM. Las barras grises y rojas (secuencias invertidas) entre cada secuencia corresponden a regiones con >94% de identidad nucleotídica.

La característica circular del *contig* seis, la presencia de una única copia de la secuencia de inserción IS*6368*, la presencia del gen *virB4* y la posible formación de esta estructura a partir del transposón compuesto Tn*6368*, llevó a que se realicé una búsqueda de posibles elementos genéticos móviles que presenten alguna de las características mencionadas. Indagando a qué tipo de estructura circular pertenece este *contig*, se encontró información reciente acerca de nueva familia de elementos genéticos móviles denominados unidades translocativas (TU, *translocatable units*) [132]. La unidad translocativa es un segmento de ADN circular que lleva una sola copia de una secuencia de inserción (IS) junto con un segmento de ADN flanqueante formado a partir un transposón compuesto, con capacidad de cointegrarse al genoma y sin capacidad de replicación [132, 133]. Considerando está información y comparando con las características antes mencionadas del segmento de ADN correspondiente al *contig* seis, se estableció que se trataba de una unidad translocativa, la cual se denominó TU*6368*, misma que mantiene los dos sistemas TA, *parDE* y *relEB*. Este resultado confirma lo obtenido anteriormente por técnicas

moleculares, en la que se daba la amplificación de los genes de las antitoxinas *parD* y *relB,* pero no del transposón Tn*6368*.

4.3 Discusión

La estabilidad plasmídica asociada al transporte de plásmidos con mecanismos de resistencia es un factor importante para la diseminación y adaptación de patógenos oportunistas clínicamente significativos que están emergiendo rápidamente, como los es *Providencia rettgeri*, un patógeno poco estudiado con alta resistencia a los antibióticos [62]. En este capítulo se exploró la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM (plásmido de la familia pNDM-BJ01-like) de *P. rettgeri* B221 en presencia del plásmido recombinante pBC SK-AT productor de los transcritos de las antitoxinas recombinantes ParD-His y RelB-FLAG. Los resultados mostraron que el plásmido p06-1619-NDM fue altamente estable en *P. rettgeri* aún en presencia del plásmido recombinante (pBC SK-AT), resultado que confirma lo reportado por Márquez-Ortiz A [35] sobre la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en *P. rettgeri*.

A pesar de la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en *P. rettgeri* (cepa B221-AT), uno de los resultados más interesantes fue la menor estabilidad de este plásmido en una de las réplicas de la muestra B221 (cepa nativa). En el presente estudio se recuperaron dos cepas sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos (eliminación del gen bla_{NDM-1}), B221ΔTn*6368* y B221::Tn*6368*, las cuales fueron curadas del plásmido NDM positivo, pero transportaban el plásmido p06-1619-2 (pPrY-like), el cual presentó gran estabilidad en las cepas recuperadas. La pérdida del plásmido p06-1619-NDM en las cepas anteriormente mencionadas es posible que se haya dado por eventos genéticos al azar que ocurrieron en el laboratorio y que no pudieron controlarse a pesar de trabajar bajo las mismas condiciones. Si bien hay seis réplicas experimentales de la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM (cuatro mostradas en el presente trabajo y dos provenientes de los ensayos realizados por Márquez Ortiz A [35]), cuatro de ellas exhiben alta estabilidad y dos baja estabilidad; las dos réplicas experimentales que mostraron baja estabilidad se desarrollaron de manera paralela. Teniendo en cuenta que en todas las réplicas experimentales se buscó mantener al máximo las mismas condiciones, es posible que la pérdida del plásmido se haya favorecido por factores ambientales como la temperatura o

las épocas del año en las que se desarrollaron los experimentos. La temperatura juega un papel crucial en estos estudios, y aunque las cepas se mantenían constantemente a 37 °C, en los periodos cortos de tiempo en los que se realizaban los pases continuos, los cultivos permanecían a temperatura ambiente. Es posible que esos cambios de temperatura hayan desencadenado cambios genéticos al azar que concluyeron en la pérdida del plásmido.

En la cepa B221::Tn*6368*, la menor estabilidad del plásmido p06-1619-NDM es posible que esté asociada con los sistemas de muerte post-segregacional o sistemas TA, debido a la formación un elemento genético móvil nuevo, la unidad translocativa TU*6368* que conservó los dos sistemas TA (*parDE* y *relEB*) que anteriormente estaban en el transposón compuesto Tn*6368* movilizado por el plásmido p06-1619-NDM. La presencia de estos dos sistemas en una nueva estructura genética con capacidad de replicación autónoma (por la presencia del gen *repA*), posiblemente desencadenó la menor estabilidad del plásmido NDM positivo (p06-1619-NDM) en la cepa estudiada (B221::Tn*6368*), ya que estructuras genéticas grandes pueden generar un costo o una carga metabólica alta a la bacteria hospedadora que los moviliza, por lo que sin presión selectiva (ausencia de antibiótico) o con su regulación presente en otra estructura más pequeña, es posible que se diera la pérdida del plásmido.

Como se indicó anteriormente, la unidad translocativa es un segmento de ADN circular que presenta una sola copia de una secuencia de inserción y que se forma a partir de un transposón compuesto [132, 133], por tanto, es posible que la unidad translocativa TU*6368* en la cepa B221::Tn*6368* se haya formado a partir del transposón compuesto Tn*6368*. Sin embargo, Harmer y colaboradores [132, 133] indican que para la formación de una unidad translocativa a partir de un transposón compuesto, las dos secuencias de inserción deben estar en orientación directa. Si observamos la orientación de las secuencias de inserción IS*6368* en el transposón compuesto Tn*6368* presente en el plásmido p06-1619-NDM (Figura 4-13), se aprecia que las secuencias de inserción IS*6368* están en orientación indirecta, por lo que, necesariamente previa a la formación de la unidad translocativa se debió dar una transposición que generará la orientación directa de las secuencias de inserción IS*6368*. Entonces para la formación de la unidad translocativa TU*6368*, es posible que primero se haya dado un mecanismo de transposición intramolecular en *trans* por parte de la secuencia de inserción IS*26* hacia un sitio de reconocimiento corriente abajo

de la IS*6368* (Figura 4-14) ya que el ADN entre la secuencia de inserción y el sitio objetivo se invierte, y adicionalmente puede causar la eliminación de la secuencia inmediatamente adyacente a uno de sus extremos [134, 135], lo que se relaciona con lo ocurrido en la unidad translocativa TU*6368*, en la cual, se dio la transposición de la IS*26* hacia un gen corriente abajo de la IS*6368*, lo que generó una reorientación del segmento de ADN comprendido entre las dos secuencias de inserción IS*26*, específicamente de la secuencia de inserción IS*6368* y del gen *virB4* que anteriormente no formaba parte del transposón compuesto Tn*6368* con la pérdida de una proteína hipotética que formaba parte del transposón compuesto Tn*6368* (Figura 4-13).

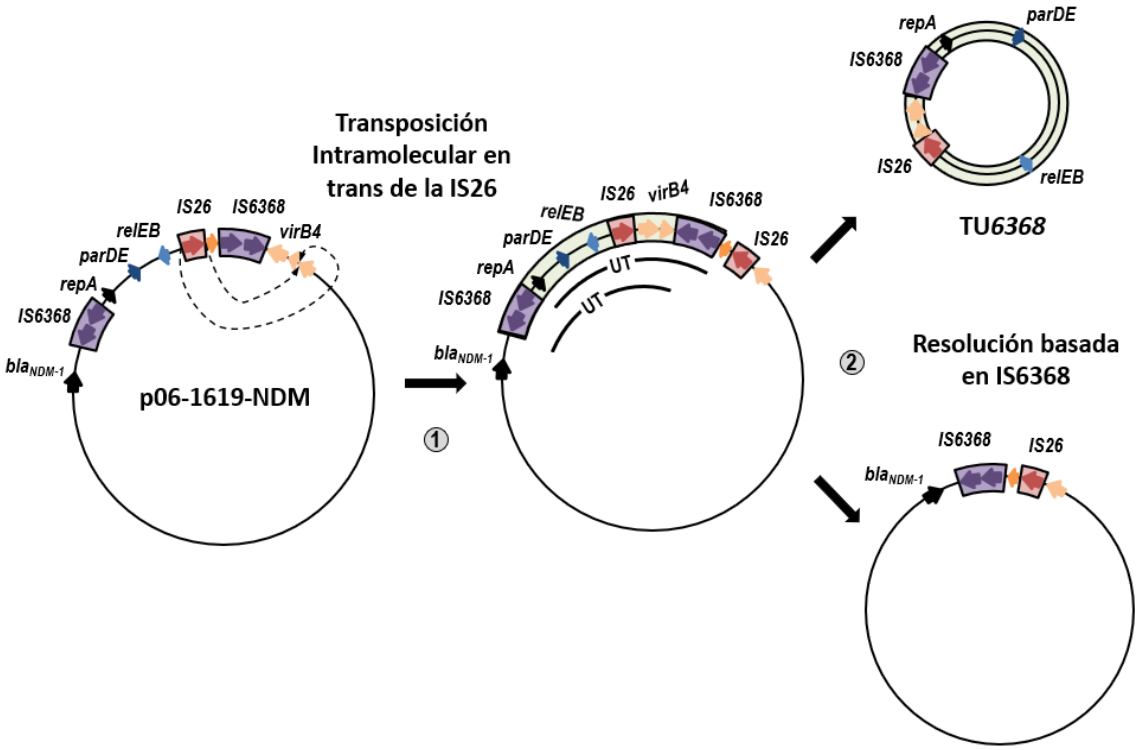


Figura 4-14. Posible explicación de la formación de la unidad translocativa TU*6368*. Inicialmente se dio una transposición intramolecular de la secuencia de inserción IS*26* (1) que generó una orientación directa de las secuencias de inserción IS*6368*, a partir de las cuales se dio la formación de la formación de la unidad translocativa TU*6368* con la presencia del gen repa y los operones *parDE* y *relEB*, (2) seguido de un proceso de resolución basada en la IS*6368* para el remanente del plásmido p06-1619-NDM que conserva en gen de resistencia *bla*$_{NDM-1}$.

La transposición intramolecular de la secuencia de inserción IS*26* permitió que las dos secuencias de inserción IS*6368* estuvieran en orientación directa, y a partir de la cual

seguidamente se dio la formación de la unidad translocativa TU*6368* conservando el gen *repA* y los operones *parDE* y *relEB* (Figura 4-14). Tras la formación de la TU*6368,* el remanente plasmídico correspondiente al plásmido p06-1619-NDM sin transposón Tn*6368*, es posible que haya sufrido un proceso de resolución basada en la única copia de la secuencia de inserción IS*6368* (Figura 4-14) que quedo después de la formación de la TU*6368* y, en medio sin presión selectiva, como fue el caso de las condiciones que se manejaron en la curva de estabilidad, es posible que la bacteria lo haya eliminado debido a la posible carga metabólica que genera; lo cual, corroboraría los resultados microbiológicos, moleculares y de secuenciación, en los que no hay detección del plásmido p06-1619-NDM y por tanto, del gen de resistencia $bla_{\text{NDM-1}}$.

Las unidades translocativas puede co-integrarse de manera específica adyacente a una secuencia de inserción existente por medio de la transposasa que cataliza el movimiento de la secuencia de inserción a un nuevo sitio [134]; sin embargo, en la TU*6368* los genes correspondiente a la transposasa Tnp6368 y Tnp26 están truncados, lo que posiblemente no permitió la integración de la unidad translocativa al cromosoma o al plásmido p06-1619-2 que presentan secuencias de inserción IS*6368* y/o IS*26*. La información con respecto a la estabilidad de las unidades translocativas sugiere que estos elementos genéticos móviles son segmentos intermedios que con el paso del tiempo pueden ser eliminadas por su incapacidad de replicación de no arrastrar un replicón en el proceso [134]; sin embargo, la TU*6368* es posible que constituya un segmento más estable debido a la presencia del gen de replicación *repA* que codifica para la proteína iniciadora de replicación RepA [136], lo que posiblemente permitió su identificación, siendo este el primer reporte de una unidad translocativa asociada a IS*6368* obtenida experimentalmente en un aislamiento clínico; ya que hasta la fecha, la generación de TU se han dado en cepas de referencia y han sido creadas bajo técnicas de biología molecular [134].

Adicionalmente, en la cepa B221::Tn*6368* se dio la incorporación de la secuencia de inserción IS*6368* a nivel cromosomal, lo que demuestra que esta secuencia de inserción ya no es una secuencia putativa, sino funcional. Es posible que la transposición de la IS*6368* a cromosoma haya sido por un mecanismo replicativo, ya que se generó una duplicación del sitio blanco de inserción (TSD, *target site duplication*) de nueve pares de bases 5’-CTTATACGT-3’, que en el cromosoma de la cepa B221::Tn*6368* se encuentra duplicada antes y después de la IS*6368*.

En este estudio también se pudo obtener una cepa (B221ΔTn*6368*) curada del plásmido p06-1619-NDM, pero sin la presencia de la unidad translocativa TU*6368* y sin la incorporación de la secuencia de inserción IS*6368* a nivel cromosomal; sin embargo, en el análisis de recuperación de las cepas sin fenotipo de resistencia, este tipo de cepa fue la más predominante, se recuperó en 80% de las cepas evaluadas con respecto a la cepa B221::Tn*6368* (cepa con inserción de IS*6368* a nivel cromosomal y presencia de la unidad translocativa TU*6368*). Estos resultados sugieren que en una misma población bacteriana sucedieron varios eventos genéticos espontáneos que desencadenaron una baja estabilidad del plásmido p06-1619-NDM en *P. rettgeri*. En el presente estudio, se sugiere que inicialmente en una población bacteriana de *P. rettgeri* B221 se dio la formación de la unidad translocativa TU*6368* y seguidamente la movilización de la secuencia de inserción IS*6368* a cromosoma en una fracción de la población bacteriana. La presencia de la unidad translocativa con los operones de los sistemas TA *parDE* y *relEB* parece haber jugado un papel clave en la pérdida de la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM por la presencia de dichos sistemas en una estructura de menor tamaño que de manera nativa y fisiológica podían contrarrestar los efectos tóxicos de la toxina por la presencia y regulación de los operones *parDE* y *relEB*. Aunque se desconoce la estabilidad de la unidad translocativa TU*6368* en *P. rettgeri*, es posible que no sea muy estable, debido a que se recuperó en tan solo un 20% de las cepas evaluadas y que se pueda perder bajo condiciones de cultivo continuo, dando lugar a cepas con ausencia de esta unidad como la cepa B221ΔTn*6368*. Adicionalmente, es posible que una pequeña fracción de la población bacteriana haya conservado las características de la cepa original; es decir, la presencia del plásmido p06-1619-NDM y con esto, la presencia del gen bla_{NDM-1}, ya que se recuperaron cepas resistentes a ceftazidime, lo que sugiere que en una misma población bacteriana se encontraban cepas sensibles y resistentes a antibióticos β-lactámicos (Figura 4-15).

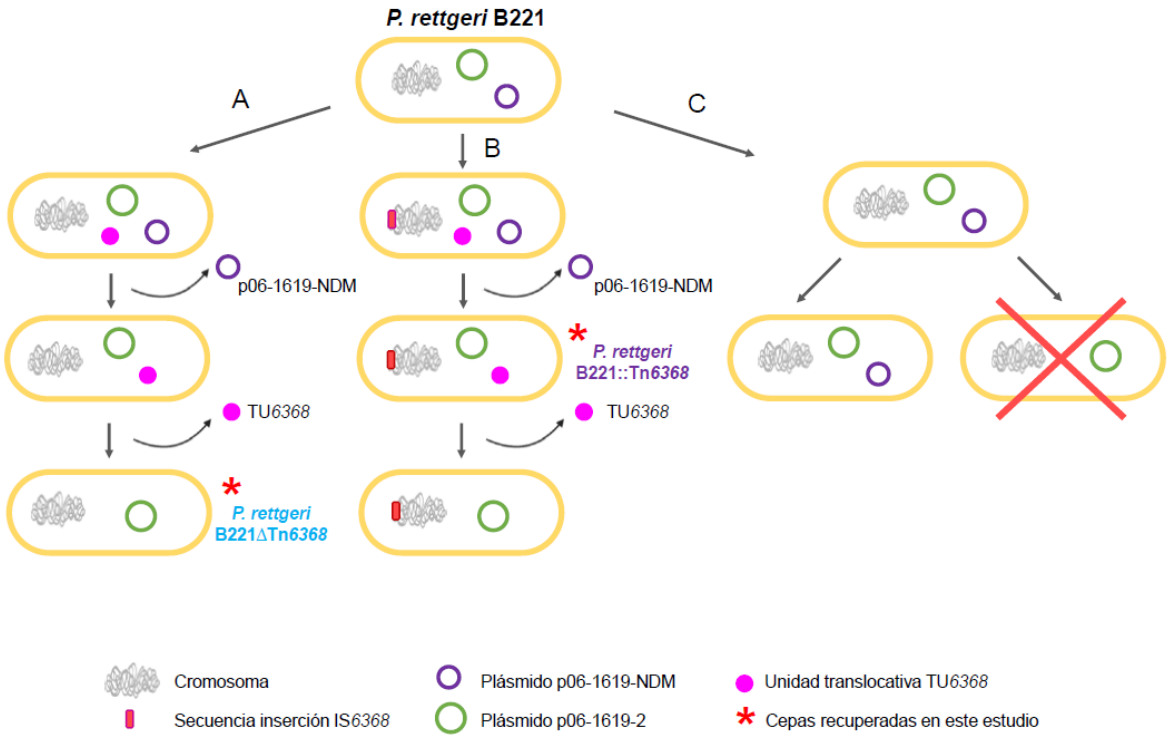


Figura 4-15. Posibles eventos genéticos para la obtención de cepas sin fenotipo de resistencia a carbapenémicos. En una etapa inicial posiblemente se dio la formación de la unidad translocativa TU*6368* en la población bacteriana (A, B) y seguidamente la movilización de la secuencia de inserción IS*6368* a cromosoma en una fracción de la población bacteriana (B). La presencia de la unidad translocativa con los operones de los sistemas TA (*parDE, relEB*) posiblemente desencadenó la pérdida del plásmido p06-1619-NDM, y con ello del gen de resistencia a antibióticos β-lactámicos (bla_{NDM-1}) (A,B). Una baja estabilidad de la unidad translocativa, posiblemente permitió su eliminación (A, B), dando lugar a cepas libres del plásmido NDM positivo y de la unidad translocativa. Una fracción de la población bacteriana posiblemente permaneció sin cambios genéticos espontáneos, conservando las características de la cepa original (resistencia a β-lactámicos) y el plásmido p06-1619-NDM (C).

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Fue posible diseñar un plásmido con los genes de las antitoxinas *parD* y *relB* y se pudo demostrar la transcripción del constructo; sin embargo, no fue posible demostrar la producción de las proteínas quiméricas recombinantes, lo que sugiere una baja estabilidad, o baja producción de estas proteínas en enterobacterias.

El plásmido p06-1619 NDM presentó una gran estabilidad en la población bacteriana, independientemente de la presencia de otro plásmido (pBC SK-AT) productor de los transcritos de las antitoxinas ParD y RelB de los sistemas de muerte post-segregacional del plásmido p06-1619-NDM. Es posible que la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM, no dependa únicamente de los sistemas TA.

Fue posible curar la cepa de *P. rettgeri* del plásmido p06-1619-NDM y, por tanto, obtener cepas sin fenotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos (ausencia del gen $bla_{\text{NDM-1}}$). Las diferencias entre cepas curadas del plásmido NDM positivo, posiblemente corresponden a eventos genéticos espontáneos asociados a elementos genéticos móviles (secuencias de inserción).

Aunque no se pudo demostrar de manera directa la participación de los sistemas de muerte post-segregacional o sistemas TA en la estabilidad del plásmido p06-1619-NDM transportador del gen de resistencia $bla_{\text{NDM-1}}$ por la expresión exógena de las antitoxinas ParD y RelB, la presencia de la unidad translocativa TU*6368* transportando los operones *parDE* y *relEB* en una de las cepas recuperadas sin fenotipo de resistencia, sugirió su participación de manera indirecta en la estabilidad del plásmido NDM positivo en *P. rettgeri*.

La secuencia de inserción IS*6368* que forma parte del transposón compuesto Tn*6368* movilizado en el plásmido p06-1619-NDM, es una secuencia funcional, dado que se dio su transposición a nivel cromosomal mediante un mecanismo replicativo por la generación de duplicados en el sitio blanco de inserción.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar un análisis poblacional de *P. rettgeri* B221 (cepa nativa) que presentó menor estabilidad del plásmido p06-1619-NDM, con el fin de determinar en qué día se dieron los eventos genéticos espontáneos que desencadenaron la pérdida del plásmido NDM positivo, puesto que la evidencia encontrada sugiere que se perdió entre el día 20 del crecimiento continuo; sin embargo, en el presente trabajo, únicamente se evalúo el día 30 de la curva de estabilidad plasmídica. Confirmar experimentalmente la presencia de la unidad translocativa TU*6368* en la población bacteriana que presentó menor estabilidad del plásmido p06-1619-NDM y evaluar su estabilidad. Adicionalmente, evaluar por curvas de crecimiento el impacto asociado al trasporte del plásmido p06-1619-NDM en otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Proteus spp., Providencia spp., Morganella spp., Klebsiella spp., Citrobacter spp*.) puede dar luces para entender el costo metabólico asociado al transporte de este plásmido y el entendimiento de su baja frecuencia de circulación en esta familia bacteriana.

Es importante recalcar que en este trabajo se obtuvieron dos cepas valiosas que no tienen el plásmido p06-1619-NDM, y que quedan disponibles para futuros trabajos en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana.

A. Anexo: Secuenciación convencional de Sanger: plásmido pBC SK-AT

Promotor *lac* Operador *lac*

5'…aggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatt

Primer T3

tcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcgcgc**aattaaccctcactaaagg**gaa

SacI

caaaagctg**gagctc**atggctcgtacaacaagtgtaacaatcggggctcaattggatgagttt

M A R T T S V T I G A Q L D E F

gtcaatcaactcatttcgtcaggaagatatggctcaacaagtgaagtcgttcgctctgctcta

V N Q L I S S G R Y G S T S R V V R S A L

cgtttacttgaggtccaagaaaagcaaacagcagcattgaagatgttaattgatgcaggtgag

R L L E V Q E K Q T A A L K M L I D A G E

caaagtggtgagtcgtcgttaacactccaagatatcgctaagaaagtgaagaacgctcataat

Q S G E S S L T L Q D I A K K V K N A H N

His-Tag XbaI

gtacatcatcaccatcaccactaa**tctaga**tgggtagcattaacctgcgtattgacgatgaa

V H H H H H H Stop **M** G S I N L R I D D E

cttaaagcgcgttcttacgccgcgcttgaaaaaatgggcgtaactccttctgaagcgcttcgt

L K A R S Y A A L E K M G V T P S E A L R

ctcatgctcgagtatatcgctgacaatgaacgcttgccgttcaaacagacactcctgagtgat

L M L E Y I A D N E R L P F K Q T L L S D

gaagatgctgaacttgtggagatagtgaaagaacggcttcgtaagcctaagccagtacgtgtg

E D A E L V E I V K E R L R K P K P V R V

FLAG-Tag EcoRI

acgctggatgaactcgattacaaggatgacgacgataagt**gaattc**gatatcaagcttatcga

T L D E L D Y K D D D D K Stop

Primer T7

taccgtcgacctcgagggggggcccggtacccaattcgc**cctatagtgagtcgtatta**cgcgcg

ctcactggc…3'

Figura Anexo A. Secuencia nucleotídica y traducción a aminoácidos de los genes de las antitoxinas recombinantes *parD* y *relB* clonadas en el plásmido pBC SK (+). Las posiciones de los primers empleados para de la identificación de la secuencia de los genes se observan resaltadas con gris, los sitios de reconocimiento para las enzimas SacI, XbaI y EcoRI se observan marcadas de colores específicos. El promotor *lac* y el operador *lac* se observan resaltados en amarillo y celeste respectivamente. El codón de inicio (ATG) del gen *parD* y *relB* se observan en un círculo verde y naranja, respectivamente. La secuencia para las etiquetas de fusión His-Tag y FLAG-Tag están resaltadas en verde y oliva, respectivamente.

B. Anexo: Certificados de presentación de resultados en congresos nacionales

La Asociación Colombiana de Infectología, ACIN

Certifica que:

MARIA PAZ MOSCOSO ROMO

Asistió en calidad de: PONENTE

XI ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

I Encuentro Andino de Investigación en Enfermedades Infecciosas

Realizado del 2 al 4 de agosto de 2018

Sede: Movich Hotel de Pereira, Pereira - Colombia

Intensidad horaria: 28 horas

ALFONSO J. RODRÍGUEZ-MORALES
Presidente XI Encuentro

PIO LÓPEZ
Presidente ACIN

III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular

SOCIEDAD COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Los organizadores del III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2

Certifican que el trabajo titulado: "Determinación del costo metabólico y estabilidad de plásmidos pNDM-BJ01-like en diferentes especies bacterianas" fue presentado por Moscoso-Romo M, Márquez-Ortiz R, Castro-Cardozo B, Corredor-Rozo Z, Abril-Riaño D, Vanegas-Gómez N, Escobar-Pérez J

En modalidad póster en el área temática de Biotecnología & Microorganismos durante el III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 llevado a cabo en la ciudad de Bogotá, Colombia del 1 al 3 de Noviembre de 2018.

Harold Duban Ardila
Presidente Comité Organizador C2B2
Presidente SCCQ

Patricia del Portillo
Presidenta Comité Científico C2B2

Bibliografía

1. Aslam, B., et al., *Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis.* Infect Drug Resist, 2018. **11**: p. 1645-1658.
2. Sheu, C.C., et al., *Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options.* Front Microbiol, 2019. **10**: p. 80.
3. Organization, W.H., *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. 2017, Tübingen University, WHO: New Zealand. p. 7.
4. Lavagnoli, L.S., et al., *Factors associated with acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.* Rev Lat Am Enfermagem, 2017. **25**: p. e2935.
5. Morrill, H.J., et al., *Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections.* Open Forum Infect Dis, 2015. **2**(2): p. ofv050.
6. Papp-Wallace, K.M., et al., *Carbapenems: past, present, and future.* Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(11): p. 4943-60.
7. Asif, M., I.A. Alvi, and S.U. Rehman, *Insight into Acinetobacter baumannii: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities.* Infect Drug Resist, 2018. **11**: p. 1249-1260.
8. Bassetti, M., et al., *How to manage Pseudomonas aeruginosa infections.* Drugs Context, 2018. **7**: p. 212527.
9. Ye, Y., et al., *Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates.* Exp Ther Med, 2018. **15**(1): p. 1143-1149.
10. Palzkill, T., *Metallo-beta-lactamase structure and function.* Ann N Y Acad Sci, 2013. **1277**: p. 91-104.
11. Yong, D., et al., *Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(12): p. 5046-54.
12. Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann, *Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 249856.

13. Johnson, A.P. and N. Woodford, *Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance.* J Med Microbiol, 2013. **62**(Pt 4): p. 499-513.
14. Khan, A.U., L. Maryam, and R. Zarrilli, *Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health.* BMC Microbiol, 2017. **17**(1): p. 101.
15. Wu, W., et al., *NDM Metallo-beta-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings.* Clin Microbiol Rev, 2019. **32**(2).
16. Hu, H., et al., *Novel plasmid and its variant harboring both a blaNDM-1 gene and type IV secretion system in clinical isolates of Acinetobacter lwoffii.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2012. **56**(4): p. 1698-1702.
17. Marquez-Ortiz, R.A., et al., *Genomic Epidemiology of NDM-1-Encoding Plasmids in Latin American Clinical Isolates Reveals Insights into the Evolution of Multidrug Resistance.* Genome Biol Evol, 2017. **9**(6): p. 1725-1741.
18. Toleman, M.A., et al., *blaNDM-1 is a chimera likely constructed in Acinetobacter baumannii.* Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2773-6.
19. Logan, L.K. and R.A. Weinstein, *The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace.* J Infect Dis, 2017. **215**(suppl_1): p. S28-S36.
20. Khong, W.X., et al., *Local transmission and global dissemination of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM): a whole genome analysis.* BMC Genomics, 2016. **17**: p. 452.
21. Bonnin, R.A., L. Poirel, and P. Nordmann, *New Delhi metallo-beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes.* Future Microbiol, 2014. **9**(1): p. 33-41.
22. Adler, A., et al., *Does Acinetobacter baumannii Serve as a Source for blaNDM Dissemination into Enterobacteriaceae in Hospitalized Patients?* Microb Drug Resist, 2018. **24**(2): p. 150-153.
23. Gefen-Halevi, S., et al., *Isolation of genetically unrelated bla(NDM-1)-positive Providencia rettgeri strains in Israel.* J Clin Microbiol, 2013. **51**(5): p. 1642-3.
24. Carvalho-Assef, A.P., et al., *Isolation of NDM-producing Providencia rettgeri in Brazil.* J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(12): p. 2956-7.
25. Barrios, H., et al., *Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive Providencia rettgeri in Mexico.* J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(8): p. 1934-6.

26. Tada, T., et al., *NDM-1 Metallo-beta-Lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing Providencia rettgeri clinical isolates in Nepal.* BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 56.
27. Mataseje, L.F., et al., *Complete sequences of a novel blaNDM-1-harbouring plasmid from Providencia rettgeri and an FII-type plasmid from Klebsiella pneumoniae identified in Canada.* J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(3): p. 637-42.
28. Pasteran, F., et al., *Emergence of genetically related NDM-1-producing Providencia rettgeri strains in Argentina.* J Glob Antimicrob Resist, 2014. **2**(4): p. 344-345.
29. Zurita, J., et al., *First case of NDM-1-producing Providencia rettgeri in Ecuador.* J Glob Antimicrob Resist, 2015. **3**(4): p. 302-303.
30. Saavedra-Rojas, S.Y., et al., *Emergence of Providencia rettgeri NDM-1 in two departments of Colombia, 2012-2013.* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2017. **35**(6): p. 354-358.
31. Shin, S., et al., *Emergence of multidrug-resistant Providencia rettgeri isolates co-producing NDM-1 carbapenemase and PER-1 extended-spectrum beta-lactamase causing a first outbreak in Korea.* Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2018. **17**(1): p. 20.
32. Chen, Z., et al., *NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical Enterobacter aerogenes.* Front Microbiol, 2015. **6**: p. 294.
33. Jiang, Y., et al., *ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of Escherichia coli gyrase.* Molecular microbiology, 2002. **44**(4): p. 971-979.
34. Christensen, S.K. and K. Gerdes, *RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA.* Molecular microbiology, 2003. **48**(5): p. 1389-1400.
35. Márquez-Ortiz, R.A., *Análisis de los elementos genéticos involucrados en la movilización del gen blaNDM-1 en bacterias multirresistentes colombianas*, in *Facultad de Ciencias*. 2017, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá D.C. p. 142.
36. Bustamante, P. and J.R. Iredell, *Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids.* Plasmid, 2017. **91**: p. 19-27.
37. Loftie-Eaton, W., et al., *Evolutionary Paths That Expand Plasmid Host-Range: Implications for Spread of Antibiotic Resistance.* Mol Biol Evol, 2016. **33**(4): p. 885-97.
38. Unterholzner, S.J., B. Poppenberger, and W. Rozhon, *Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application.* Mob Genet Elements, 2013. **3**(5): p. e26219.

39. Carroll, A.C. and A. Wong, *Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox.* Can J Microbiol, 2018. **64**(5): p. 293-304.
40. Harms, A., et al., *Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology.* Mol Cell, 2018. **70**(5): p. 768-784.
41. Ronneau, S. and S. Helaine, *Clarifying the Link between Toxin-Antitoxin Modules and Bacterial Persistence.* J Mol Biol, 2019.
42. Gilman, L.S.G.A., *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la TERAPÉUTICA*. 12 ed. 2012, Ciudad de México: McGraw-Hill Education.
43. Martínez, M.J.F., et al., *Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias.* Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2010. **28**: p. 53-64.
44. Meletis, G., *Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives.* Ther Adv Infect Dis, 2016. **3**(1): p. 15-21.
45. Gómez, J., E. García-Vázquez, and A. Hernández-Torres, *Los betalactámicos en la práctica clínica.* Rev Esp Quimioter, 2015. **28**(1): p. 1-9.
46. Suárez, C. and F. Gudiol, *Antibióticos betalactámicos.* Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2009. **27**(2): p. 116-129.
47. Codjoe, F.S. and E.S. Donkor, *Carbapenem Resistance: A Review.* Med Sci (Basel), 2017. **6**(1).
48. Diene, S.M. and J.M. Rolain, *Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species.* Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(9): p. 831-8.
49. Cercenado, E., *Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio.* Rev Esp Quimioter, 2015. **28**(1): p. 8-11.
50. Ambler, R.P., *The structure of beta-lactamases.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980. **289**(1036): p. 321-31.
51. Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel, *Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!* Trends Mol Med, 2012. **18**(5): p. 263-72.
52. Patel, G. and R.A. Bonomo, *"Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases.* Front Microbiol, 2013. **4**: p. 48.
53. Chotiprasitsakul, D., et al., *Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a 5-year experience at a tertiary care hospital.* Infect Drug Resist, 2019. **12**: p. 461-468.

54. Zhang, Y., et al., *Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network.* Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(2).
55. Iovleva, A. and Y. Doi, *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae.* Clin Lab Med, 2017. **37**(2): p. 303-315.
56. Karlowsky, J.A., et al., *In Vitro Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Isolates Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014.* J Clin Microbiol, 2017. **55**(6): p. 1638-1649.
57. Kelly, A.M., B. Mathema, and E.L. Larson, *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review.* Int J Antimicrob Agents, 2017. **50**(2): p. 127-134.
58. Abdallah, M. and A. Balshi, *First literature review of carbapenem-resistant Providencia.* New Microbes New Infect, 2018. **25**: p. 16-23.
59. Sagar, S., N. Narasimhaswamy, and J. D'Souza, *Providencia Rettgeri: An Emerging Nosocomial Uropathogen in an Indwelling Urinary Catheterised Patient.* J Clin Diagn Res, 2017. **11**(6): p. DD01-DD02.
60. Sharma, D., P. Sharma, and P. Soni, *First case report of Providencia Rettgeri neonatal sepsis.* BMC Research Notes, 2017. **10**(1): p. 536.
61. Wie, S.H., *Clinical significance of Providencia bacteremia or bacteriuria.* Korean J Intern Med, 2015. **30**(2): p. 167-9.
62. Oliveira, H., et al., *A Lytic Providencia rettgeri Virus of Potential Therapeutic Value Is a Deep-Branching Member of the T5virus Genus.* Appl Environ Microbiol, 2017. **83**(23).
63. van Hoek, A.H., et al., *Acquired antibiotic resistance genes: an overview.* Front Microbiol, 2011. **2**: p. 203.
64. Wagner, A., *Cooperation is fleeting in the world of transposable elements.* PLoS computational biology, 2006. **2**(12): p. e162.
65. Rodríguez, I., et al., *pUO-SeVR1 is an emergent virulence–resistance complex plasmid of Salmonella enterica serovar Enteritidis.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. **66**(1): p. 218-220.
66. Carattoli, A., *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2227-38.
67. Million-Weaver, S. and M. Camps, *Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked?* Plasmid, 2014. **75**: p. 27-36.
68. Dmowski, M. and G. Jagura-Burdzy, *Active stable maintenance functions in low copy-number plasmids of Gram-positive bacteria II. Post-segregational killing systems.* Pol J Microbiol, 2013. **62**(1): p. 17-22.

69. Coray, D.S., B. Kurenbach, and J.A. Heinemann, *Exploring the parameters of post-segregational killing using heterologous expression of secreted toxin barnase and antitoxin barstar in an Escherichia coli case study.* Microbiology, 2017. **163**(2): p. 122-130.
70. Allocati, N., et al., *Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria.* Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1609.
71. Yang, Q.E. and T.R. Walsh, *Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance.* FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(3): p. 343-353.
72. Van Melderen, L., *Toxin–antitoxin systems: why so many, what for?* Current opinion in microbiology, 2010. **13**(6): p. 781-785.
73. Van Melderen, L. and M. Saavedra De Bast, *Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities?* PLoS Genet, 2009. **5**(3): p. e1000437.
74. Yamaguchi, Y., J.H. Park, and M. Inouye, *Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea.* Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 61-79.
75. Park, S.J., W.S. Son, and B.J. Lee, *Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: a target for developing antimicrobial agents.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**(6): p. 1155-67.
76. Schuster, C.F. and R. Bertram, *Toxin–antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate.* FEMS microbiology letters, 2013. **340**(2): p. 73-85.
77. Paul, P., B.R. Sahu, and M. Suar, *Plausible role of bacterial toxin-antitoxin system in persister cell formation and elimination.* Mol Oral Microbiol, 2019. **34**(3): p. 97-107.
78. Page, R. and W. Peti, *Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence.* Nat Chem Biol, 2016. **12**(4): p. 208-14.
79. Lee, K.Y. and B.J. Lee, *Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin-Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria.* Toxins (Basel), 2016. **8**(10).
80. Kang, S.M., et al., *A Systematic Overview of Type II and III Toxin-Antitoxin Systems with a Focus on Druggability.* Toxins (Basel), 2018. **10**(12).
81. Chan, W.T., M. Espinosa, and C.C. Yeo, *Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems.* Front Mol Biosci, 2016. **3**: p. 9.
82. Kopfmann, S., S.K. Roesch, and W.R. Hess, *Type II Toxin-Antitoxin Systems in the Unicellular Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803.* Toxins (Basel), 2016. **8**(7).
83. Rocker, A. and A. Meinhart, *Type II toxin: antitoxin systems. More than small selfish entities?* Curr Genet, 2016. **62**(2): p. 287-90.

84. Coussens, N.P. and D.A. Daines, *Wake me when it's over - Bacterial toxin-antitoxin proteins and induced dormancy.* Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(12): p. 1332-42.
85. Hayes, F. and B. Kedzierska, *Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs.* Toxins (Basel), 2014. **6**(1): p. 337-58.
86. Nikolic, N., *Autoregulation of bacterial gene expression: lessons from the MazEF toxin-antitoxin system.* Curr Genet, 2019. **65**(1): p. 133-138.
87. Boggild, A., et al., *The crystal structure of the intact E. coli RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity.* Structure, 2012. **20**(10): p. 1641-8.
88. Deter, H.S., et al., *Mechanisms for Differential Protein Production in Toxin-Antitoxin Systems.* Toxins (Basel), 2017. **9**(7).
89. Muthuramalingam, M., J.C. White, and C.R. Bourne, *Toxin-Antitoxin Modules Are Pliable Switches Activated by Multiple Protease Pathways.* Toxins (Basel), 2016. **8**(7).
90. Fiebig, A., et al., *Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems.* Mol Microbiol, 2010. **77**(1): p. 236-51.
91. Oberer, M., et al., *The solution structure of ParD, the antidote of the ParDE toxin antitoxin module, provides the structural basis for DNA and toxin binding.* Protein Sci, 2007. **16**(8): p. 1676-88.
92. Westermeier, R. and R. Marouga, *Protein detection methods in proteomics research.* Biosci Rep, 2005. **25**(1-2): p. 19-32.
93. Aslam, B., et al., *Proteomics: Technologies and Their Applications.* J Chromatogr Sci, 2017. **55**(2): p. 182-196.
94. Sakamoto, S., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites.* J Nat Med, 2018. **72**(1): p. 32-42.
95. Bass, J.J., et al., *An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research.* Scand J Med Sci Sports, 2017. **27**(1): p. 4-25.
96. ThermoFisher. *Immunoprecipitation (IP) technical guide and protocols.* 2009; Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0064-Immunoprecipitation-guide.pdf.
97. Costa, S., et al., *Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system.* Front Microbiol, 2014. **5**: p. 63.

98. Nelson, M.D. and D.H. Fitch, *Overlap extension PCR: an efficient method for transgene construction.* Methods Mol Biol, 2011. **772**: p. 459-70.
99. Holmes, D.S. and M. Quigley, *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.* Anal Biochem, 1981. **114**(1): p. 193-7.
100. Dubiel, A., et al., *ClpAP protease is a universal factor that activates the parDE toxin-antitoxin system from a broad host range RK2 plasmid.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15287.
101. Kateete, D.P., et al., *Rhomboids of Mycobacteria: characterization using an aarA mutant of Providencia stuartii and gene deletion in Mycobacterium smegmatis.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45741.
102. Agilent, T., *pBC Phagemids INSTRUCTION MANUAL*. Revision A.01: 11011 North Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037
103. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies.* J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
104. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100, ed. C.a.L.S. Institute. 2018, Wayne, PA
105. Jiménez, J.P. and A. Chaparro Giraldo, *Diseño in silico y evaluación funcional de genes semisintéticos que confieran tolerancia a fosfinotricina.* Revista Colombiana de Biotecnología, 2016. **18**(2): p. 90.
106. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges.* Front Microbiol, 2014. **5**: p. 172.
107. Overgaard, M., J. Borch, and K. Gerdes, *RelB and RelE of Escherichia coli form a tight complex that represses transcription via the ribbon-helix-helix motif in RelB.* J Mol Biol, 2009. **394**(2): p. 183-96.
108. Macek, B., et al., *Protein post-translational modifications in bacteria.* Nat Rev Microbiol, 2019. **17**(11): p. 651-664.
109. Brown, C.W., et al., *Large-scale analysis of post-translational modifications in E. coli under glucose-limiting conditions.* BMC Genomics, 2017. **18**(1): p. 301.
110. Chan, W.T., M. Espinosa, and C.C. Yeo, *Keeping the wolves at bay: antitoxins of prokaryotic type II toxin-antitoxin systems.* Frontiers in molecular biosciences, 2016. **3**.
111. Diago-Navarro, E., et al., *Cleavage of the antitoxin of the parD toxin-antitoxin system is determined by the ClpAP protease and is modulated by the relative ratio of the toxin and the antitoxin.* Plasmid, 2013. **70**(1): p. 78-85.
112. Dalton, K.M. and S. Crosson, *A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex.* Biochemistry, 2010. **49**(10): p. 2205-15.

113. Li, G.Y., et al., *Inhibitory mechanism of Escherichia coli RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site.* J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 14628-36.
114. Galvani, C., J. Terry, and E.E. Ishiguro, *Purification of the RelB and RelE proteins of Escherichia coli: RelE binds to RelB and to ribosomes.* J Bacteriol, 2001. **183**(8): p. 2700-3.
115. Mishra, M., S. Tiwari, and A.V. Gomes, *Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques.* Expert Rev Proteomics, 2017. **14**(11): p. 1037-1053.
116. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.* BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
117. Markoulatos, P., N. Siafakas, and M. Moncany, *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach.* J Clin Lab Anal, 2002. **16**(1): p. 47-51.
118. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool.* J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
119. Andrews, S. *FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data*. 2010; Available from: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc.
120. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.* Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
121. Bankevich, A., et al., *SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing.* Journal of Computational Biology, 2012. **19**(5): p. 455-477.
122. Gurevich, A., et al., *QUAST: quality assessment tool for genome assemblies.* Bioinformatics, 2013. **29**(8): p. 1072-5.
123. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform.* Bioinformatics, 2010. **26**(5): p. 589-95.
124. Chin, C.-S., et al., *Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data.* Nature Methods, 2013. **10**: p. 563.
125. Milne, I., et al., *Tablet--next generation sequence assembly visualization.* Bioinformatics, 2010. **26**(3): p. 401-2.
126. Carver, T.J., et al., *ACT: the Artemis Comparison Tool.* Bioinformatics, 2005. **21**(16): p. 3422-3.
127. Hunt, M., et al., *Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads.* Genome Biology, 2015. **16**(1): p. 294.
128. Seemann, T., *Prokka: rapid prokaryotic genome annotation.* Bioinformatics, 2014. **30**(14): p. 2068-9.
129. Rutherford, K., et al., *Artemis: sequence visualization and annotation.* Bioinformatics, 2000. **16**(10): p. 944-945.

130. Alikhan, N.F., et al., *BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons.* BMC Genomics, 2011. **12**: p. 402.
131. Sullivan, M.J., N.K. Petty, and S.A. Beatson, *Easyfig: a genome comparison visualizer.* Bioinformatics, 2011. **27**(7): p. 1009-10.
132. Harmer, C.J., R.A. Moran, and R.M. Hall, *Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26.* MBio, 2014. **5**(5): p. e01801-14.
133. Harmer, C.J. and R.M. Hall, *IS26-Mediated Precise Excision of the IS26-aphA1a Translocatable Unit.* mBio, 2015. **6**(6): p. e01866-15.
134. Harmer, C.J. and R.M. Hall, *IS26-Mediated Formation of Transposons Carrying Antibiotic Resistance Genes.* mSphere, 2016. **1**(2).
135. He, S., et al., *Mechanisms of Evolution in High-Consequence Drug Resistance Plasmids.* MBio, 2016. **7**(6).
136. Betteridge, T., et al., *Role of RepA and DnaA proteins in the opening of the origin of DNA replication of an IncB plasmid.* J Bacteriol, 2004. **186**(12): p. 3785-93.