

Genes de adaptación localizados en el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*

Carlos Cervantes y Martha I. Ramírez Díaz

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH
(cvega1999@yahoo.com; marthaisela_ramirez@hotmail.com)

Resumen

En bacterias la transferencia horizontal de genes es mediada por elementos móviles como plásmidos y transposones. El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* y confiere resistencia a cromato y mercurio. La secuenciación y el análisis de la secuencia del plásmido pUM505 determinó que este replicón contiene 138 regiones codificantes. pUM505 presenta dos regiones bien definidas, la primera corresponde a una isla genómica (IG) de ~31 kilobases (kb), la cual posee los genes de resistencia a cromato y mercurio, y la segunda región, de ~67 kb, corresponde a una isla genómica de patogenicidad (PAI). Esta isla, además de contener los genes de replicación del DNA y de la transferencia conjugativa, posee genes probablemente involucrados en virulencia como, *virB4/virD4*, y genes homólogos a los de la PAI de *P. aeruginosa* PA14, una cepa altamente virulenta. Adicionalmente, pUM505 posee genes probablemente involucrados en la tolerancia al estrés oxidativo como *umuD*, *umuC* y *pdi*, así como genes aún no identificados de resistencia a antibióticos. Con el propósito de establecer la participación de los diversos genes de adaptación que posee pUM505, primeramente se realizó la construcción de un banco de clonas y un banco de mutantes para la identificación de genes de virulencia y de resistencia a quinolonas, respectivamente. Además, se está analizando la funcionalidad de los genes de tolerancia a estrés oxidativo por clonación y transferencia

a cepas de *P. aeruginosa* sensibles a compuestos generadores de especies reactivas de oxígeno. El propósito de este trabajo es dar una descripción de las características genéticas del plásmido pUM505, así como los avances y el enfoque actual que se emplea para el estudio de este plásmido, lo que permitirá entender el papel de los genes de adaptación que posee en la prevalencia y evolución de las bacterias que lo contienen.

Palabras clave: *Pseudomonas*, plásmidos, virulencia, quinolonas.

Abstract

In bacteria, horizontal gene transfer is mediated by mobile elements such as plasmids and transposons. The conjugative pUM505 plasmid was isolated from a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* and confers resistance to chromate and mercury. Sequencing and sequence analysis of pUM505 showed that this plasmid contains 138 coding regions. pUM505 presents two well-defined regions, the first one corresponds to a genomic island (GI) of ~31 kilobases (kb), which possesses the chromate and mercury resistance genes; the second region, of ~67 kb, corresponds to a genomic island of pathogenicity (PAI). This island, in addition to replication and conjugative transfer genes, has genes probably involved in virulence, such as *virB4/virD4* and genes homologs to the PAI from *P. aeruginosa* PA14, a highly virulent strain. Additionally, pUM505 possesses genes probably involved in tolerance to oxidative stress like *umuD*, *umuC* and *pdi*, as well as genes not yet identified for antibiotic resistance. With the aim to determine the participation of the adaptative genes of pUM505, firstly were constructed libraries of clones and mutants for virulence genes and quinolones resistance genes, respectively. Furthermore, the functionality of tolerance genes to oxidative stress is being analyzed by their cloning and transfer to *P. aeruginosa* strains sensitive to compounds which generate reactive oxygen species. The aim of this work is to give a general description about the genetic characteristics of pUM505 plasmid, as well as the advances and the current approaches employed for the study of this plasmid, which will allow us to understand the role of adaptation genes on the prevalence and evolution of bacteria that possess it.

Key words: *Pseudomonas*, plasmids, virulence, quinolones.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo suelo y agua, así como en asociación con varios tipos de organismos vivos (Battle y col., 2008). *P. aeruginosa* tiene la capacidad de crecer en condiciones aerobias y anaerobias y posee numerosos factores de virulencia que contribuyen a su patógenesis (Schurek y col., 2012). Adicionalmente, esta bacteria posee una resistencia intrín-

Genes de adaptación localizados en el plásmido pUM505...

seca a muchos antibióticos debido a la barrera que representa la membrana externa y a la presencia de transportadores de expulsión de drogas de la membrana interna (Poole, 2011). Observaciones en modelos de infección indican que la virulencia de *P. aeruginosa* varía de cepa a cepa y que los genes que participan en la virulencia están localizados en el genoma central y por lo tanto están presentes en todas las cepas. Sin embargo, los genes accesorios de *P. aeruginosa* contenidos en plásmidos e islas genómicas pueden contribuir a la heterogeneidad de la virulencia (Lee y col., 2006).

El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado, se determinó que es capaz de conferir resistencia a cromato y mercurio (Cervantes y Ohtake, 1988). El mecanismo de resistencia a cromato conferido por el gen *chrA* codificado en pUM505 fue el primer mecanismo descrito (Alvarez y col., 1999) y es el mejor caracterizado en bacterias (Ramírez-Díaz y col., 2008). La secuenciación y el análisis de los genes del plásmido pUM505 indicaron que éste es un replicón circular que po-

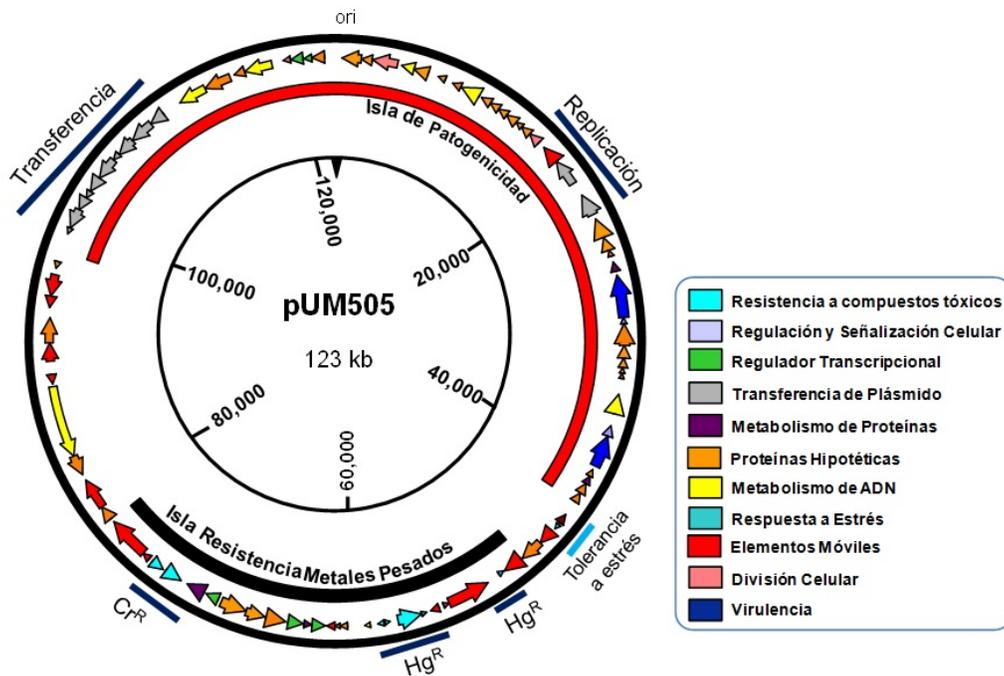


Figura 1. Mapa genético del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Las regiones codificantes se muestran por flechas o puntas de flecha indicando la dirección de la transcripción de los genes. La posible función de las proteínas se indica en colores de acuerdo al recuadro de la derecha. Las dos principales regiones del plásmido se indican: 1) Isla de patogenicidad PAI (barra roja), posee genes relacionados con transferencia conjugativa, replicación, virulencia y tolerancia a estrés; 2) Isla de resistencia a metales pesados IG (barra negra) que posee los genes que participan en la resistencia a cromato (Cr^R) y mercurio (Hg^R). Adaptado de Ramírez-Díaz y col., 2011.

see 123,322 pares de bases (pb) y que contiene 138 regiones codificantes (*orf's*) (**Fig. 1**). Del total de los *orf's* de pUM505, 64 codifican proteínas con función desconocida (proteínas hipotéticas, PH), 15 codifican a elementos móviles, 13 se relacionan con transferencia del plásmido, 13 con resistencia a metales, 13 se relacionan con el metabolismo y 5 están implicados en la regulación transcripcional, entre otros (Ramírez-Díaz y col., 2011). pUM505 presenta dos regiones bien definidas, la primera región, de ~31 kilobases (kb), corresponde a una isla genómica (IG) que contiene determinantes de resistencia a cromato y mercurio (**Fig. 1**). La segunda región, de ~67 kb, corresponde a una isla genómica de patogenicidad (PAI) (**Fig. 1**). Estas islas son segmentos de DNA que incluyen elementos móviles y poseen grupos de genes de virulencia que están presentes en organismos patógenos, pero ausentes en bacterias benignas estrechamente emparentadas. Así, pUM505 posee grupos de genes que confieren potencialmente diversas propiedades de adaptación, pero que en conjunto como parte de un plásmido representarían una ventaja evolutiva. Se ha descrito que las IGs pueden incrementar la versatilidad metabólica, mejorar la adaptabilidad, promover la interacción bacteria-hospedero e incrementar la virulencia (Klockgether y col., 2007). El propósito de este trabajo es dar una descripción general de los avances que se tienen respecto a la caracterización de los genes de adaptación identificados en pUM505, con el propósito de entender cómo este plásmido puede contribuir en el desarrollo y en la evolución de *P. aeruginosa* en los distintos ambientes que habita.

Genes de adaptación

1.1. Isla genómica con genes de resistencia a metales

Como se mencionó, los genes de pUM505 involucrados en la resistencia al ión metálico mercurio y al oxianión cromato se localizan agrupados dentro de una IG que incluye los *orf's* 59-94 (**Fig. 1**). Esta región posee un contenido de G+C de 64%, mientras que el resto del plásmido y el cromosoma tienen un contenido de G+C de 61% y 66%, respectivamente; esta pequeña variación sugiere que los genes presentes en la isla tienen un origen diferente. Adicionalmente, esta región contiene elementos comúnmente relacionados con la transferencia genética como repetidos invertidos (IR), secuencias de inserción (IS) y genes de movilidad (por ejemplo, los que codifican a integrasas, resolvasas y transposasas) (Ramírez-Díaz y col., 2011).

1.1.1. Determinantes de resistencia a cromato (Cr^R)

La IG de pUM505 posee el gen *chrA* que confiere resistencia a cromato mediante un mecanismo que ha sido descrito con gran detalle. *chrA* codifica a la proteína ChrA, la cual lleva a cabo la expulsión de los iones cromato utilizando el potencial electroquímico de la membrana como fuente de energía (Alvarez y col., 1999). Mediante un análisis filogenético se determinó que la proteína ChrA de pUM505 forma parte de la superfamilia CHR, que está constituida por cientos de homólogos (Díaz-Pérez y col., 2007). La superfamilia CHR está conformada por dos familias: la familia SCHR, con proteínas de un tamaño de ~200 aminoá-

Genes de adaptación localizados en el plásmido pUM505...

cidos (aa) y la familia LCHR, con un tamaño de ~400 aa (Díaz-Pérez y col., 2007). Diversas proteínas homólogas a ChrA de ambas familias han sido caracterizadas y se ha demostrado que son capaces de conferir resistencia a cromato (Aguilar-Barajas y col., 2008; Díaz-Magaña y col., 2009; Aguilar-Barajas y col., 2012).

El gen *chrA* de pUM505 se encuentra formando parte de un probable operón *chrBAC*, el cual está situado dentro de una posible región de transposición que está a su vez flanqueada por los genes *tnpA*, que codifica una transposasa/resolvasa, y *tnpR*, que codifica una resolvasa/integrasa (**Fig. 2A**) (Ramírez-Díaz y col., 2011). La presencia de operones con arreglo génico similar se ha identificado en el plásmido pMOL28 de la bacteria Gram-negativa *Cupriavidus metallidurans* (Juhnke y col., 2002), en un transposón de la bacteria aeróbica estricta Gram-negativa *Ochrobactrum tritici* (Branco y col., 2008) y en el megaplásmido de la bacteria aeróbica Gram-negativa *Burkholderia xenovorans* LB400 (Acosta-Navarrete y col., 2014). Se ha descrito que el gen *chrC* del plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* CH34 codifica a una proteína ChrC con función de superóxido dismutasa (Juhnke y col., 2002). Sin embargo, el análisis de la secuencia del gen *chrC* de pUM505 mostró que este codifica a una proteína quimérica de 86 aa, en donde el extremo amino muestra similitud con ChrC mientras que el extremo carboxilo muestra similitud con una pro-

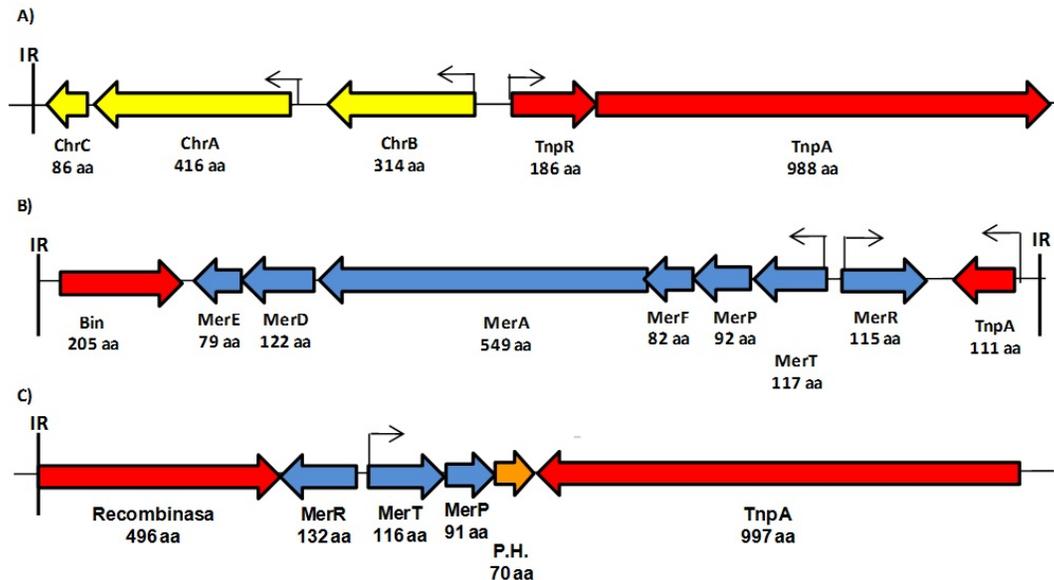


Figura 2. Transposones de resistencia a cromato (A) y mercurio (B y C) del plásmido pUM505. Se muestran los determinantes de resistencia a cromato (flechas amarillas) y mercurio (flechas azules). Con flechas rojas se indican los elementos móviles, en color naranja un gen que codifica a una proteína hipotética (PH), y con líneas verticales las secuencias repetidas invertidas (IR). Los probables promotores (P) se señalan con flechas delgadas y el tamaño en aa de las proteínas codificadas son indicados.

teína con función no conocida del transposón Tn5719 del plásmido pB4 de *Pseudomonas*, esto indica que ChrC de pUM505 no es funcional. Se ha sugerido que *chrB* de pMOL28 codifica un regulador transcripcional de la expresión del gen *chrA* (Juhnke y col., 2002). Esta hipótesis ha sido reforzada por la caracterización de la proteína ChrS, codificada por el gen *chrS* (homólogo a *chrB*) de *Bacillus subtilis* 168, la cual forma parte de la familia de los reguladores LrpC y cuya expresión disminuye la resistencia a cromato, probablemente por disminuir los niveles de expresión de los genes *chr*, la cual es incrementada en presencia del ión (Aguilar-Barajas y col., 2013).

1.1.2. Determinantes de resistencia a mercurio

La IG del plásmido pUM505 contiene dos probables operones de resistencia a mercurio (*mer*): un operón completo, constituido por los genes *merRTPFADE* (*orf*'s 68 a 74) y un operón incompleto, formado solamente por los genes *merRTP* (*orf*s 60 a 62) (**Fig. 2, panel B y C**). Se ha descrito que los genes que codifican proteínas que confieren resistencia a mercurio (Hg^{2+}) se encuentran localizados en cromosomas, plásmidos y transposones en una gran diversidad de arreglos, a menudo con la duplicación y distribución de genes *mer* entre varios replicones en una misma célula (Barkay y col., 2003).

El operón *mer* completo de pUM505 se encuentra formando parte de un probable elemento de transposición, flanqueado por los genes que codifican a la resolvasa Bin (*orf* 67) y la transposasa TnpA (*orf* 75) (**Fig. 2B**). Adicionalmente, se identificaron secuencias repetidas invertidas características del transposón Tn3 al final del gen *tnpA* y cerca del gen *binR*, lo que sugiere que esta región es un remanente de un evento de transposición (Ramírez-Díaz y col., 2011). El análisis de la secuencia mostró probables promotores río arriba de los genes *merT* y *merR* (Ramírez-Díaz y col., 2011), lo que sugiere que los genes *mer* forman parte de un operón funcional. El gen *merP* codifica a la proteína MerP que participa en la unión inicial de Hg^{2+} y los genes *merTFE* codifican las proteínas de membrana MerT, MerF y MerE, respectivamente, que participan en la captura de Hg^{2+} (Barkay y col., 2003; Kiyono y col., 2009). El gen *merA* codifica a MerA, la enzima reductasa de mercurio que cataliza la reducción de Hg^{2+} a Hg^0 volátil (Barkay y col., 2003). Finalmente, MerR y MerD están involucrados en la regulación de la expresión de los genes estructurales en respuesta a los iones de mercurio.

Por otra parte, el operón *mer* incompleto de pUM505 (**Fig. 2C**) se localiza relativamente cerca del operón *mer* completo y las proteínas RTP codificadas por estos genes tienen 47, 46 y 49% de identidad con las proteínas codificadas por sus homólogos situados en el operón completo (Ramírez-Díaz y col., 2011). Adicionalmente, este operón está flanqueado por genes que codifican a una transposasa TnpA (*orf* 64) y una recombinasa (*orf* 59). Esto indica que este operón forma parte de un transposón, pero que debido a que carece de la reductasa MerA, estos determinantes no son los responsables de la resistencia a mercurio.

El plásmido pUM505 confiere resistencia a mercurio cuando es transferido a la cepa estándar *P. aeruginosa* PAO1, lo que ha sugerido que el operón *merRTPFADE* es funcional y que éste es el responsable de la resistencia a mercurio, ya que posee el gen de la reducta-

sa *merA* que es esencial para dicho fenotipo. Sin embargo, la presencia de los genes de resistencia a mercurio y cromato flanqueados por elementos móviles y localizados en la IG de pUM505 sugiere que éstos podrían haber sido adquiridos por transferencia horizontal y que esta característica es un factor selectivo para la prevalencia y distribución del plásmido en bacterias hospederas.

Con el propósito de determinar si los probables transposones de mercurio y cromato identificados tienen la capacidad de translocarse a otra molécula de DNA, en nuestro laboratorio se transfirieron el plásmido pUM505 y el vector pUCP20 (que contiene un gen que confiere resistencia a carbenicilina) a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y se seleccionaron mutantes sensibles al antibiótico. Las mutantes presentaron resistencia a ambos iones mercurio y cromato y esta resistencia pudo ser transferida a células de *E. coli* por medio de la transformación con DNA plasmídico de las mutantes, seleccionando transformantes por la resistencia a cromato y/o mercurio (Reyes-Gallegos, 2013). Sugiriendo que la sensibilidad al antibiótico se debe a la translocación de ambos transposones en el gen que codifica a la resistencia al antibiótico localizado en pUCP20. Sin embargo, el fenotipo de resistencia a los iones no determina si la IG de resistencia fue transferida en su totalidad o si los genes de resistencia a cromato y mercurio constituyen un transposón compuesto que fue transferido, por lo que el análisis está aún en proceso.

Por lo tanto, sugerimos que la presencia de genes de resistencia a metales en pUM505 es un elemento importante para la prevalencia y distribución de este plásmido en huéspedes que habitan ambientes contaminados por cromato y mercurio.

1.2. Isla de patogenicidad

La PAI de pUM505 (**Fig. 1**) consiste de 78 *orf*'s (1-51 y 112-138) de los cuales 64 han sido encontrados en las islas de patogenicidad PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, un aislado clínico significativamente más virulento que la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (He y col., 2004). La PAI de pUM505 contiene los genes de replicación del DNA y de la transferencia conjugativa, así como 41 genes que codifican PH. La isla posee el operón *pil* compuesto por genes que codifican a proteínas involucradas en la biogénesis de un pilus tipo IV, estructura esencial para la transferencia de plásmidos (Juhas y col., 2008) y que participa en la adhesión de bacterias patógenas a células epiteliales promoviendo la relación patógeno–hospedero (He y col., 2004). Esta propiedad clasifica a pUM505 como un miembro de la familia de plásmidos tipo Incl, que se han encontrado con mayor frecuencia en cepas de *E. coli* patógenas que en cepas comensales (Johnson y col., 2007).

Adicionalmente, la PAI posee genes homólogos a los genes *virB4/virD4* de la bacteria de la rizósfera de plantas *Agrobacterium tumefaciens*, que codifican a proteínas que forman parte del sistema de secreción tipo IVA (T4SS), el cual está conformado por una docena de proteínas y que se especializa en la transferencia de macromoléculas a través de la membrana (Llosa y col., 2009). Los genes *virB4/virD4* de pUM505, a diferencia de sus homólogos de *A. tumefaciens*, no se encuentran formando parte del mismo operón, por el contrario,

cada uno forma parte de un probable operón cuyos miembros no han sido aún caracterizados (Rodríguez-Andrade, 2015). El sistema T4SS de *A. tumefaciens* media la transferencia de genes oncogénicos a células vegetales, resultando en la formación de tumores en las plantas (Juhás y col., 2008). Los genes *virB4/virD4* presentes en *Bartonella bacilliformis*, bacteria endémica de algunos países de América del Sur que produce invasión masiva de eritrocitos y consecuentemente anemia hemolítica intravascular severa, codifican a proteínas implicadas en la translocación de proteínas efectoras al interior de células epiteliales, estableciendo la infección crónica al perturbar funciones celulares críticas (Llosa y col., 2009).

La presencia de la isla de patogenicidad en pUM505 sugiere que los genes *virB4/virD4*, y probablemente otros genes localizados en esta región, puede incrementar la virulencia de *P. aeruginosa*. En concordancia con esta hipótesis, resultados preliminares en nuestro laboratorio, mediante ensayos de virulencia empleando el modelo de infección en hojas de lechuga, han mostrado que la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pUM505 es más virulenta, que la cepa sin el plásmido. Por tal razón ha sido de interés de nuestro grupo de trabajo el identificar cuáles son los genes de pUM505 que participan en el incremento de la virulencia en *P. aeruginosa*. Para esto se ha construido un banco de genes de pUM505 (Rodríguez-Andrade, 2015) y a las clonas obtenidas se les está evaluando el nivel de virulencia que son capaces de conferir.

1.3. Genes de reparación de daño al DNA y de resistencia a estrés oxidativo

Alrededor a la PAI de pUM505, se identificaron los genes *umuD* y *umuC* (*orfs 55* y *56*, respectivamente) que forman parte de un probable operón (**Fig. 3A**). Se ha descrito que, en conjunto, los genes *umuD/umuC* codifican a una DNA polimerasa tipo V propensa a error, enzima implicada en la reparación de daños al DNA en la respuesta SOS en *E. coli* (Ferentz y col., 2001). *P. aeruginosa* no contiene en su genoma genes *umuD/umuC* o genes homólogos, lo cual se ha relacionado con su significativa susceptibilidad y baja tasa de mutagénesis ante la exposición a luz ultravioleta (UV) en comparación con *E. coli*, la cual es resistente a luz UV debido a la inducción de un repertorio de sistemas de inducción que incluye a los genes *umuD/umuC* (Simonson y col., 1990). El gen *umuD* de pUM505 codifica a una proteína de 143 aa que presenta 41% de identidad con la proteína *umuD* de *E. coli*.

El gen *umuC*, por su parte, codifica a una proteína de solo 46 aa; sin embargo, las proteínas UmuC con función reportada tienen un tamaño de ~400 aa, lo que sugiere que el gen *umuC* de pUM505 codifica a una proteína truncada y por lo tanto no funcional. Río arriba del gen *umuD* se localizó una región operadora tipo caja SOS traslapada con el posible promotor identificado para *umuD* (**Fig.3A**). En *E. coli* la caja SOS es reconocida por la proteína LexA que regula negativamente la transcripción de diversos genes (Fernández de Henestrosa y col., 2003), sugiriendo que los genes *umuD* y *umuC* de pUM505 podrían estar regulados por el daño al DNA. En *B. subtilis*, la expresión de genes que pertenecen al regulón SOS, como *recA* y *lexA* que codifican a proteínas cruciales del sistema de reparación, se incrementa posterior al daño al DNA; adicionalmente, estos genes son inducidos a nivel trans-

Genes de adaptación localizados en el plásmido pUM505...

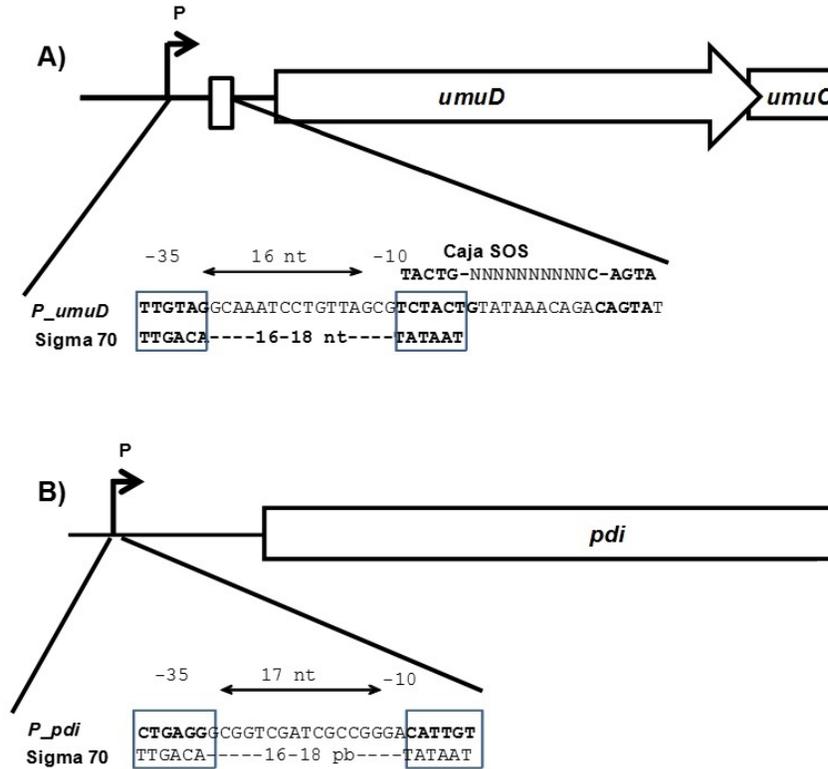


Figura 3. Arreglo estructural de operón *umuDC* (A) y del gen *pdi* (B) del plásmido pUM505. Las regiones codificantes se muestran con flechas anchas, mostrando la dirección de la transcripción. Se indican también los probables promotores (P) con flechas delgadas, la caja SOS de *umuDC* (rectángulo blanco) y el tamaño de las proteínas codificadas en aa. En la parte inferior de cada panel se muestra la comparación de la secuencia de nucleótidos del probable promotor de los genes *umuDC* y *pdi* con las secuencias consenso del promotor sigma 70, indicando las regiones -10 y -35 (recuadros azules), así como la región espaciadora. Adicionalmente, se presenta traslapado con el promotor de *umuDC* la secuencia de la caja SOS.

cripcional después de exposición a H₂O₂, indicando que este agente, que produce daño al DNA, origina la activación de proteínas de reparación (Mostertz y col., 2004). Se ha demostrado que la transferencia del gen *umuD* a cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* confiere tolerancia a agentes que generan estrés como paraquat y mitomicina C, respectivamente y que la expresión de este gen se induce por mitomicina C (Díaz-Magaña, Tesis doctoral en proceso). Esto sugiere que el gen *umuD* de pUM505 codifica a un sistema de tolerancia a agentes que ocasionan daño al DNA en *P. aeruginosa*.

pUM505 también posee el gen *pdi* (*orf 32*) el cual posee un probable promotor sigma 70 y que codifica a una disulfuro isomerasa (PDI) de 219 aa (**Fig. 3 B**), enzima que en otros

organismos cataliza la formación y ruptura de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en proteínas de secreción. Durante la formación de los enlaces disulfuro, los electrones son transferidos hasta PDI y finalmente al oxígeno molecular, cuya reducción puede resultar en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Haynes y col., 2004). La forma reducida (ditiol) de PDI cataliza la reducción de residuos del tiol de un sustrato particular, actuando como isomerasa (Tian y col., 2008). Además, PDI presenta actividad de chaperona, ayudando a las proteínas a adoptar un correcto plegamiento al catalizar el intercambio de puentes disulfuro, sugiriendo que PDI está relacionada con la protección de proteínas hacia el daño oxidativo (Missiakas y col., 1994). El gen *pdi* de pUM505 aumentó su expresión durante la fase de crecimiento estacionario (Díaz-Magaña, Tesis doctoral en proceso). En bacterias Gram-negativas se ha descrito que en la fase estacionaria se acumulan compuestos que generan estrés oxidativo y se incrementa la expresión de genes de resistencia a varias condiciones de estrés (estrés oxidativo, estrés osmótico y cambios de pH) (Navarro y col., 2010). Adicionalmente, la transferencia del gen *pdi* a *P. aeruginosa* PAO1 incrementó de manera moderada la resistencia a cromato, compuesto generador de estrés oxidativo (Díaz-Magaña, Tesis doctoral en proceso). Estos datos indican que la presencia de sistemas funcionales de tolerancia a estrés en pUM505 pueden constituir una ventaja evolutiva bajo condiciones ambientales hostiles, lo que representaría una ventaja para las bacterias que poseen este plásmido.

1.4. Resistencia a antibióticos

La transferencia del plásmido pUM505 a *P. aeruginosa* PAO1 confiere un nivel elevado de resistencia a ciprofloxacina, en comparación con la cepa sin plásmido (**Fig. 4**); sin embargo, el análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos de pUM505 no mostró ningún gen reportado de resistencia para este antibiótico. Ciprofloxacina, un antibiótico del grupo de las quinolonas, es una droga de amplio espectro que actúa sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas inhibiendo a las topoisomerasas IV y II (DNA girasa), enzimas que actúan sobre la topología del DNA enrollando y desenrollando la doble hélice durante la replicación y la transcripción (Luzzaro, 2008). En *P. aeruginosa* se ha descrito que la resistencia a quinolonas se debe principalmente a mutaciones en el gen que codifica a la DNA girasa (Cambau y col., 1995). Con el propósito de identificar los genes responsables de la resistencia se construyó en nuestro laboratorio un banco de mutantes sensibles a ciprofloxacina (Cp^s) obtenidas por transposición al azar. A la fecha se han seleccionado algunas mutantes Cp^s (Chávez-Jacobo, 2015) cuya caracterización está en proceso. Aunado a esto, se realizó la clonación y transferencia del conjunto de *orf's* 35, 36 y 37 a *E. coli* J53-2, observando en ensayos preliminares que estos genes confieren resistencia a ciprofloxacina. El análisis *in silico* de las proteínas codificadas por estos genes sugiere que pueden constituir un sistema tripartita de transporte conformado por una proteína de membrana externa, una de membrana interna y una de espacio periplásmico, respectivamente, el cual podría participar en la resistencia a quinolonas mediante la expulsión del antibiótico del citosol hacia el espacio extracelular (Rojas-Rojas, 2012).

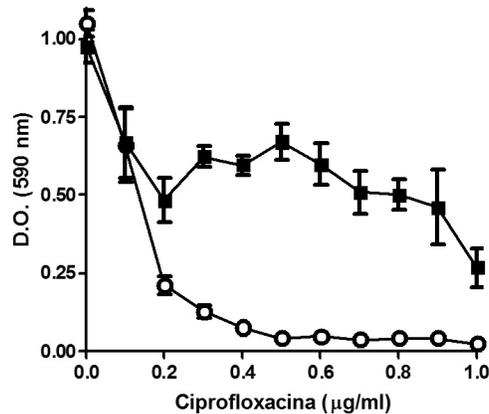


Figura 4. Susceptibilidad a ciprofloxacina de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con el plásmido pUM505. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 18 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente se midió la absorbencia a 590 nm. *P. aeruginosa* PAO1 (○) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (■). Se muestran las barras de error estándar de la media, n= 6.

Conclusión

El plásmido pUM505 es un plásmido conjugativo, capaz de ser transferido bajo ciertas condiciones a otras cepas de *Pseudomonas*, constituyendo un mecanismo para la transferencia horizontal de genes. La presencia de genes novedosos que pueden proveer a cepas de *Pseudomonas* con una amplia variedad de propiedades para la adaptación, como resistencia a metales pesados, virulencia, sistemas de tolerancia a estrés y resistencia a antibióticos, puede contribuir a la prevalencia de este plásmido en bacterias de ambiente clínico o ambiental y por lo tanto influir en la evolución de las bacterias hospederas.

Agradecimientos

Trabajo realizado con apoyos de la Coordinación de Investigación Científica (UMSNH, No. 2.6 y No. 2.35) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. 181747).

Referencias

1. Acosta-Navarrete YM, León-Márquez YL, Salinas-Herrera K, Jácome-Galarza IE, Meza-Carmen V, Ramírez-Díaz MI, Cervantes C. 2014. Expression of the six chromate ion transporter homologues of *Burkholderia xenovorans* LB400. *Microbiology*. 160:287-295.

2. Aguilar-Barajas E, Paluscio E, Cervantes C, Rensing C. 2008. Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 285:97-100.
3. Aguilar-Barajas E, Jerónimo-Rodríguez P, Ramírez-Díaz MI, Rensing C, Cervantes C. 2012. The ChrA homologue from a sulfur-regulated gene cluster in cyanobacterial plasmid pANL confers chromate resistance. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:865-869.
4. Aguilar-Barajas E, Jacobo-Arreola S, Verduzco-Rosas LA, Jiménez-Mejía R, Ramírez-Díaz MI, Julián-Sánchez A, Riveros-Rosas H, Cervantes C. 2013. An Lrp-type transcriptional regulator controls expression of the *Bacillus subtilis* chromate transporter. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 104:941-948.
5. Alvarez AH, Moreno-Sánchez R, Cervantes C. 1999. Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181:7398-7400.
6. Barkay, T, Miller, SM, Summers, AO. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 355-384.
7. Battle SE, Meyer F, Rello J, Kung VL, Hauser AR. 2008. Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J. Bacteriol.* 190:7130-7140.
8. Branco, R, Chung, AP, Johnston, T, Gurel, V, Morais, P, Zhitkovich, A 2008. The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium(VI) and superoxide. *J. Bacteriol.* 190:6996-7003.
9. Cambau E, Perani E, Dib C, Petinon C, Trias J, Jarlier V. 1995. Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2248-2252.
10. Cervantes C. y Ohtake H. 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:173-176.
11. Chávez-Jacobo VM. 2015. Identificación de los genes del plásmido pUM505 implicados en la resistencia a quinolonas. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
12. Díaz-Magaña A, Aguilar-Barajas E, Moreno-Sánchez R, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Vargas E, Cervantes C. 2009. Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191:5441-5445.
13. Díaz-Pérez C, Cervantes C, Campos-García J, Julián-Sánchez A, Riveros-Rosas H. 2007. Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 274:6215-6227.
14. Ferentz AE, Walker GC, Wagner G. 2001. Converting a DNA damage checkpoint effector (UmuD2C) into a lesion bypass polymerase (UmuD'2C). *EMBO J.* 20:4287-4298.

15. Fernández de Henestrosa AR, Cuñé J, Mazón G, Dubbels B, Bazylnski DA, Barbé J. 2003. Characterization of a new LexA binding motif in the marine magnetotactic bacterium strain MC-1. *J. Bacteriol.* 185: 4471–4482.
16. Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. 2004. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol. Cell.* 10:767-776.
17. He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM, Rahme LG. 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:2530-2535.
18. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, Nolan LK. 2007. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1976–1983.
19. Juhas M, Crook DW, Hood DW. 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol.* 10:2377-2386.
20. Juhnke, S, Peitzsch, N, Hubener, N, Groe, C, Nies, DH. 2002. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.* 179:15-25.
21. Kiyono, M, Sone, Y, Nakamura, R, Pan-Hou, H, Sakabe, K. 2009. The MerE protein encoded by transposon Tn21 is a broad mercury transporter in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 583: 1127-1131.
22. Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tümmler B. 2007. Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189:2443-2459.
23. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG, Ausubel FM. 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7:R90.
24. Llosa M, Roy C, Dehio C. 2009. Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol. Microbiol.* 73:141-151.
25. Luzzaro F. 2008. Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: antimicrobial activity and mechanisms of resistance. *Infez. Med.* 2:5-11.
26. Missiakas D, Georgopoulos C, Raina S. 1994. The *Escherichia coli dsbC (xprA)* gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.* 13:2013-2020.
27. Mostertz J, Scharf C, Hecker M, Homuth G. 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology* 150:497-512.

28. Navarro Llorens JM, Tormo A, Martínez-García E. 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:476-495.
29. Poole K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 5:65.
30. Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C. 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21:321-332.
31. Ramírez-Díaz MI, Díaz-Magaña A, Meza-Carmen V, Johnstone L, Cervantes C, Rensing C. 2011. Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid* 66:7-18.
32. Reyes-Gallegos RI. 2013. Análisis de la transposición de los determinantes de resistencia a cromo y mercurio del plásmido pUM505. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
33. Rodríguez-Andrade E. 2015. Identificación de los genes del plásmido pUM505 que participan en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
34. Rojas-Rojas FU. 2012. Identificación de genes del plásmido pUM505 involucrados en la resistencia a quinolonas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
35. Schurek KN, Breidenstein EBM, Hancock REW. 2012. *Pseudomonas aeruginosa*: a persistent pathogen in cystic fibrosis and hospital-associated infections. In: *Antibiotic Discovery and Development*. Dougherty TJ and Pucci MJ Eds. NY. p1127.
36. Simonson CS, Kokjohn TA, Miller RV. 1990. Inducible UV repair potential of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Microbiol.* 136:1241-1249.
37. Tian G, Kober FX, Lewandrowski U, Sickmann A, Lennarz WJ, Schindelin H. 2008. The catalytic activity of protein-disulfide isomerase requires a conformationally flexible molecule. *J. Biol. Chem.* 28:33630–33640.