

**PEDECIBA BIOLOGÍA**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**SISTEMA GENÉTICO MICROCINA H47:  
UNA ISLA GENÓMICA DE *ESCHERICHIA COLI*  
CON CARACTERÍSTICAS NOVEDOSAS**

**Thais Bascuas Castillo**

**Orientadora: Dra. Ma. Fernanda Azpiroz**

**Sección Fisiología y Genética Bacterianas  
Facultad de Ciencias  
Montevideo  
Uruguay  
2011**

**Tribunal:** Dra. Susana Castro (Presidente)

Dra. Teresa Camou (Vocal)

Dra. Carolina Márquez (Vocal)

Montevideo, 07 de octubre de 2011

Como orientadora de la Lic. Cs. Bs. Thais Basculas Castillo para sus estudios de Maestría en el PEDECIBA, área Biología, subárea Microbiología, dejo constancia que su trabajo de Tesis titulado “Sistema genético microcina H47: una isla genómica de *Escherichia coli* con características novedosas” cuenta con mi aval para ser sometido a la consideración de un Tribunal.

Dra. Ma. Fernanda Azpiroz  
Investigador G° 3  
PEDECIBA Biología

*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora de tesis Ma. Fernanda Azpiroz por su apoyo incondicional. Por la paciencia y dedicación brindada constantemente a lo largo del camino transitado, siendo un pilar fundamental en el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A Magela Laviña por su aporte invaluable, generando ámbitos de discusión que nutrieron en gran medida esta tesis.

A Ma. Eloisa Poey, por la información brindada acerca del análisis de las colecciones de cepas uropatógenas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

A Alicia Parente por el tiempo dedicado a la preparación del material necesario para la etapa experimental y más aún por su compañía diaria dando calidez al laboratorio.

## ABREVIATURAS

<b>GI</b>	Isla genómica, del inglés <u>G</u> enomic <u>I</u> sland
<b>PAI</b>	Isla de patogenicidad, del inglés <u>P</u> athogenicity <u>A</u> ssociated <u>I</u> sland
<b>DR</b>	Repetidos directos, del inglés <u>D</u> irect <u>R</u> epeats
<b>ICE</b>	Elementos integrativos y conjugativos, del inglés <u>I</u> ntegrative and <u>C</u> onjugative <u>E</u> lement
<b>HPI</b>	Isla de alta patogenicidad de <i>Yersinia</i> , del inglés <u>H</u> igh <u>P</u> athogenicity <u>I</u> sland
<b>IME</b>	Elementos integrativos y movilizables, del inglés <u>I</u> ntegrative and <u>M</u> obilizable <u>E</u> lement
<b>Mcc</b>	Microcina
<b>HMMM</b>	Microcinas de mayor masa molecular, del inglés <u>H</u> igh- <u>M</u> olecular <u>M</u> ass- <u>M</u> icrocin
<b>ColV</b>	Colicina V
<b>UPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> uropatógeno, del inglés <u>U</u> ropathogenic <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli

## RESUMEN

Las islas genómicas son segmentos de DNA localizados en el cromosoma que contienen información genética relacionada con el metabolismo secundario de la bacteria. Frecuentemente, poseen la capacidad de escindir desde o integrarse en replicones mediante recombinación específica de sitio. Es así que las islas genómicas están flanqueadas por secuencias repetidas directas cortas, que actúan como sustrato de la recombinación, y contienen genes codificantes para una integrasa y una escisionasa que llevan a cabo este intercambio genético. Estos eventos de movilidad hacen posible que las islas genómicas se transfieran horizontalmente de una bacteria a otra.

La microcina H47 es un antibiótico peptídico de síntesis ribosómica que pertenece a la familia de microcinas de mayor masa molecular. Su producción está determinada por un sistema genético localizado en el cromosoma de la cepa *Escherichia coli* H47. Dicho sistema antibiótico tiene una extensión de c.a. 13 kb y está flanqueado por repetidos directos extensos e imperfectos. Previamente, se determinó que el sistema genético microcina H47 se escinde tanto desde el cromosoma de *E. coli* H47 como desde plásmidos recombinantes con el sistema clonado portados por *E. coli* K12. Más aún, se corroboró que uno de los productos de escisión, plásmido sin el sistema, portaba una secuencia híbrida resultante de la recombinación específica de sitio entre los repetidos directos que lo flanquean.

En este trabajo se obtuvo la secuencia híbrida portada por el otro producto de escisión, sistema antibiótico como molécula independiente, y se dilucidó la existencia de cinco sitios de recombinación dentro de los repetidos directos. Asimismo, se llevó a cabo la búsqueda de los genes de movilidad del sistema microcina H47, determinando que los mismos no se encuentran dentro del sistema ni en las regiones adyacentes. Por lo tanto, las funciones de movilidad serían provistas por el contexto genético en que el sistema se integra, ya sea en la cepa *E. coli* H47 como en células de *E. coli* K12. Por último, se realizó un relevamiento de la movilidad del sistema antibiótico así como de la presencia de su plataforma de integración en una colección de aislamientos de *E. coli* uropatógeno. De esta forma, se dilucidó que el sistema microcina H47 es un elemento genético móvil que se encuentra integrado o tiene el potencial de hacerlo en el cromosoma de algunas cepas uropatógenas de *E. coli*.

En suma, el sistema genético microcina H47 es una pequeña isla, denominada isla genómica H47, que emplearía una estrategia “parásita” para su movilidad.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Las islas genómicas</b> .....	1
<b>1.2. El sistema genético microcina H47</b> .....	4
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	9
<b>2.1. Objetivo general</b> .....	9
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	9
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
<b>3.1. Estirpes bacterianas y plásmidos</b> .....	10
<b>3.2. Medios de cultivo</b> .....	11
<b>3.3. Prueba de producción antibiótica</b> .....	11
<b>3.4. Obtención de extracto extracelular con actividad ColV</b> .....	11
<b>3.5. Transferencia de plásmidos por conjugación</b> .....	12
<b>3.6. Curado de plásmidos</b> .....	13
<b>3.7. Manipulación y análisis del DNA</b> .....	13
<b>3.8. Estrategia para la detección del fenómeno de escisión del sistema         MccH47</b> .....	15
<b>3.9. Construcciones genéticas</b> .....	16
<b>4. RESULTADOS</b> .....	20
<b>4.1. Determinación de los sitios de recombinación</b> .....	20
<b>4.2. Localización de los genes de movilidad del sistema genético MccH47</b> .....	24
<b>4.3. Relevamiento de la movilidad del sistema genético MccH47 y de la         presencia de su plataforma de integración en una colección de aislamientos         de UPEC</b> .....	26
<b>4.3.1. Análisis de los aislamientos con perfil II</b> .....	26
<b>4.3.2. Análisis de los restantes aislamientos</b> .....	28
<b>4.3.3. Búsqueda de la localización del sitio de integración del                 sistema MccH47 en algunos aislamientos de UPEC con perfil III</b> .....	30
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>6. CONCLUSIÓN</b> .....	39
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	40
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	41
<b>9. ANEXO 1</b> .....	45
<b>10. ANEXO 2</b> .....	48
<b>11. ANEXO 3</b> .....	55

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Las islas genómicas

El continuo aumento en el número de genomas bacterianos secuenciados en los últimos años ha permitido clasificar la información genética de los procariotas en información básica e información flexible. La primera codifica para funciones esenciales de la vida de la bacteria, varía poco y está contenida en el cromosoma. Por su parte, la información flexible codifica para funciones prescindibles dedicadas a la vida de relación de la bacteria, varía mucho y con frecuencia es transferida horizontalmente. Se encuentra contenida en plásmidos, transposones, integrones, bacteriófagos e islas genómicas.

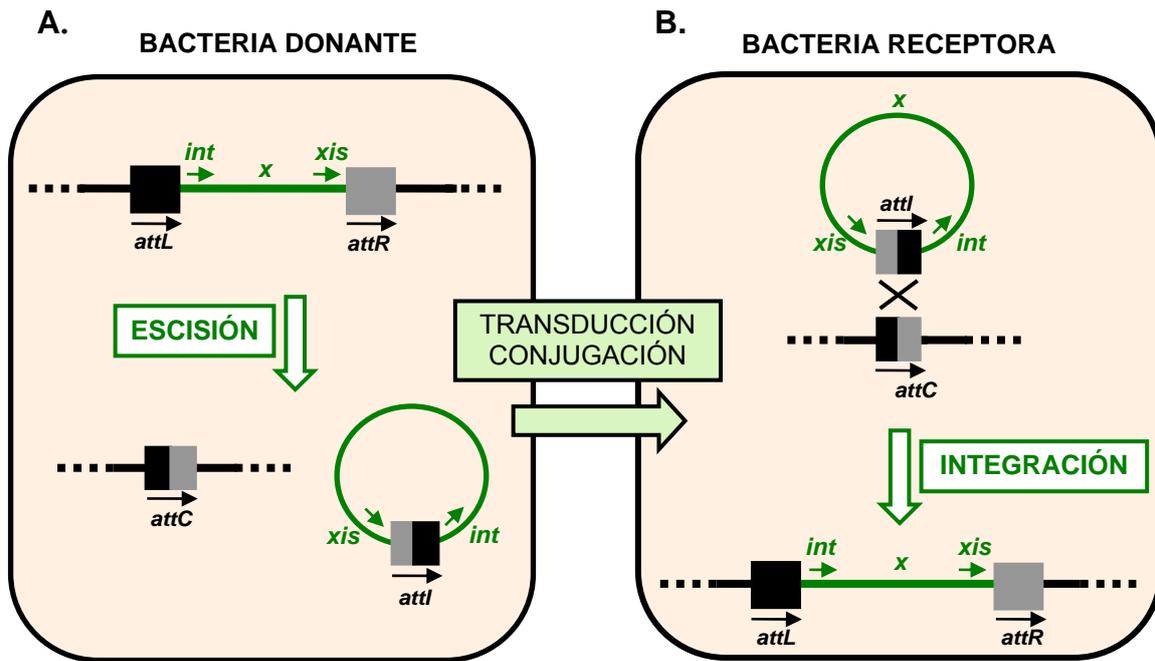
Las islas genómicas (GIs) son elementos genéticos ampliamente distribuidos en el mundo bacteriano, habiendo sido más estudiadas en *Escherichia coli* y en otras enterobacterias. En estos casos se ha visto que las bacterias contienen varias islas genómicas en su cromosoma. Las GIs son segmentos de DNA de hasta 500 kb de extensión que se localizan en el cromosoma, estando en algunos casos insertadas en genes para RNAs de transferencia. Se caracterizan por estar flanqueadas por secuencias repetidas directas cortas (DRs) de 9 a 20 pb, que suelen tener un contenido en G+C y uso de codones distintos al del genoma básico que las porta, así como una estructura en mosaico, i.e. integrada por segmentos de DNA de distinta procedencia. Contienen genes que codifican para funciones que contribuyen fuertemente al desarrollo de distintas estrategias de vida de las bacterias. Además, portan determinantes genéticos para factores de movilidad como son integrasas, escisionasas, transposasas y movilidad conjugativa, derivados de bacteriófagos y plásmidos. Estos genes le otorgan un dinamismo intrínseco al contenido genético de la isla, ya sea integrando nueva información o perdiendo parte de la preexistente. Asimismo, hacen posible que la isla se movilice como una unidad y como tal pueda ser transferida horizontalmente a otra bacteria (Hacker & Kaper, 2000; Hacker & Carniel, 2001; Juhas et al., 2009). Las primeras islas genómicas descritas, y hoy en día más estudiadas, son las islas de patogenicidad (PAIs). Estas islas revisten importancia clínica ya que poseen genes para factores de virulencia que contribuyen al desarrollo de un proceso de infección en un hospedero (Schmidt & Hensel, 2004).

Dada la relevancia que tienen la movilidad y la transferencia de una isla genómica de una bacteria a otra, en los últimos años se han podido dilucidar algunos

aspectos fundamentales de la dinámica de estos elementos genéticos. Primero, la isla integrada en el cromosoma de una bacteria (donante) se escinde por recombinación específica de sitio entre los DRs que la flanquean -estas secuencias se llaman *attL* (izquierda) y *attR* (derecha)-. Dicho intercambio genético es un evento de muy baja frecuencia (ca.  $10^{-5}$ ) y está operado por una integrasa asistida en algunos casos por una escisionasa, ambas codificadas por la propia GI (Fig. 1A) (Rajanna et al., 2003; Middendorf et al., 2004). Como producto se obtienen el cromosoma sin la isla y la isla como molécula circular independiente, ambos portando una secuencia híbrida formada por parte de cada secuencia repetida directa. Dichas secuencias son “sitios de integración”, a los que denominaremos *attC* en el caso del portado por el cromosoma y *attI* para el contenido en la isla escindida. La isla como molécula circular independiente es entonces pasible de ser transferida a otra bacteria (receptora) por mecanismos de transferencia horizontal de genes. Se ha demostrado la transferencia de algunas GIs por transducción y por conjugación. En el primer mecanismo, la isla conserva muchas funciones fágicas, incluso la capacidad replicativa. Es así que se escinde y luego se replica cuando un bacteriófago temperado infecta a la bacteria donante o cuando un profago residente en ella es inducido a desarrollar un ciclo lítico. En este caso, la isla contiene información que direcciona la maquinaria fágica hacia la formación de cápsides virales adaptadas al tamaño de la isla. De este modo, se forman con alta frecuencia partículas transductantes portadoras del DNA de la isla que son liberadas cuando se lisa la bacteria. La transferencia de la GI ocurre si una de estas partículas transductantes infecta una nueva bacteria. Este fenómeno se ha descrito para la familia de islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* que contienen genes para superantígenos (Novick et al., 2010). El segundo mecanismo lo utilizan aquellas GIs que portan información genética dedicada a la transferencia conjugativa. Primero se describieron los denominados elementos integrativos y conjugativos (ICEs), que contienen dentro de la isla toda la información genética necesaria para la transferencia conjugativa, i.e. portan un origen de transferencia (*oriT*), genes *mob* y genes *tra*. Los ICEs se encuentran ampliamente distribuidos en las bacterias, mediando la transferencia de genes para una gran variedad de funciones (Burrus et al., 2002; Burrus & Waldor, 2004). Un ejemplo es la isla de alta patogenicidad de *Yersinia* sp. (HPI), la que se postula se ha diseminado ampliamente dentro de las enterobacterias por conjugación (Benedek & Schubert, 2007; Lin et al., 2008). Posteriormente, se encontraron islas que portan parte de la información genética necesaria para la conjugación, las que se

llamaron elementos integrativos y movilizables (IMEs). Si bien estas islas son incapaces de mediar su transferencia, se ha podido determinar que basta con que tengan un *oriT* para ser movilizadas por otros elementos conjugativos, ya sea ICEs o plásmidos (Waldor, 2010; Wozniak & Waldor, 2010). Ejemplos de IMEs movilizadas por ICEs se han descrito recientemente en distintas especies de *Vibrio* sp. (Daccord et al., 2010). En cuanto a un IME transferido por un plásmido conjugativo, podemos citar el caso de la GI I portada por especies del género *Salmonella*, cuya movilidad es mediada por una familia de plásmidos conjugativos (Douard et al., 2010). En la conjugación entonces la bacteria donante establece un par conjugativo con la bacteria receptora a través del que se transfiere la isla como molécula circular independiente. Cabe señalar que para la mayor parte de las islas genómicas no se conoce su mecanismo de transferencia; más aún no presentan en su estructura genética características que sugieran una posible transferencia por transducción o conjugación. Una vez transferida, la GI se establece en la bacteria receptora al integrarse en su cromosoma por recombinación específica de sitio (Fig. 1B). Dicho intercambio genético ocurre entre el sitio *attI* portado por la isla y su homólogo *attC* presente en el cromosoma. En varias islas genómicas el sitio de integración suele ser una secuencia cromosómica correspondiente a la región 3' de un gen para un RNA de transferencia (tRNA). El evento de integración es operado por la integrasa codificada dentro de la isla genómica. Como producto de la integración, la isla queda limitada en ambos extremos por las secuencias repetidas directas *attL* y *attR*. Por lo tanto, la condición original de la GI se reproduce ahora en el contexto de una nueva bacteria.

La similitud entre una isla genómica y un bacteriófago temperado en cuanto a la estrategia de movilidad sugiere fuertemente que las GIs surgieron a partir de bacteriófagos que perdieron la capacidad de desarrollar ciclo lítico. Dos hallazgos abogan a favor de esta hipótesis: 1) la recombinación específica de sitio es el mecanismo utilizado por estos fagos para integrarse o escindirse del cromosoma bacteriano, siendo los genes para tRNAs los sitios clásicos de integración, y 2) los genes codificantes de la integrasa y de la escisionasa de las GIs son altamente homólogos a los correspondientes de los bacteriófagos (Hochhut et al., 2006; Juhas et al., 2009). En el caso de los ICEs y los IMEs se adicionan a las propiedades fágicas funciones plasmídicas que le permiten a la isla transferirse por conjugación.



**Fig. 1. Esquema de la movilidad de una isla genómica.** **A.** Escisión de una GI desde el cromosoma de una bacteria donante. **B.** Integración de la GI al cromosoma de una bacteria receptora. Con línea llena y punteada se señala el DNA cromosómico y con línea verde el DNA de la isla. *x*, genes característicos de la GI; *int*, corresponde al gen codificante de la integrasa y *xis*, al gen que codifica para la escisionasa. Con rectángulos se indican los repetidos directos que flanquean la isla: *attL* (negro) y *attR* (gris).

En conclusión, la capacidad de las islas genómicas de transferirse horizontalmente como una unidad hace posible que las bacterias adquieran en un único evento propiedades importantes para desarrollar una determinada estrategia de vida. Dado el gran impacto que supone la existencia de las GIs en la evolución bacteriana, el estudio de estos elementos genéticos ha adquirido relevancia en los últimos años.

## 1.2. El sistema genético microcina H47

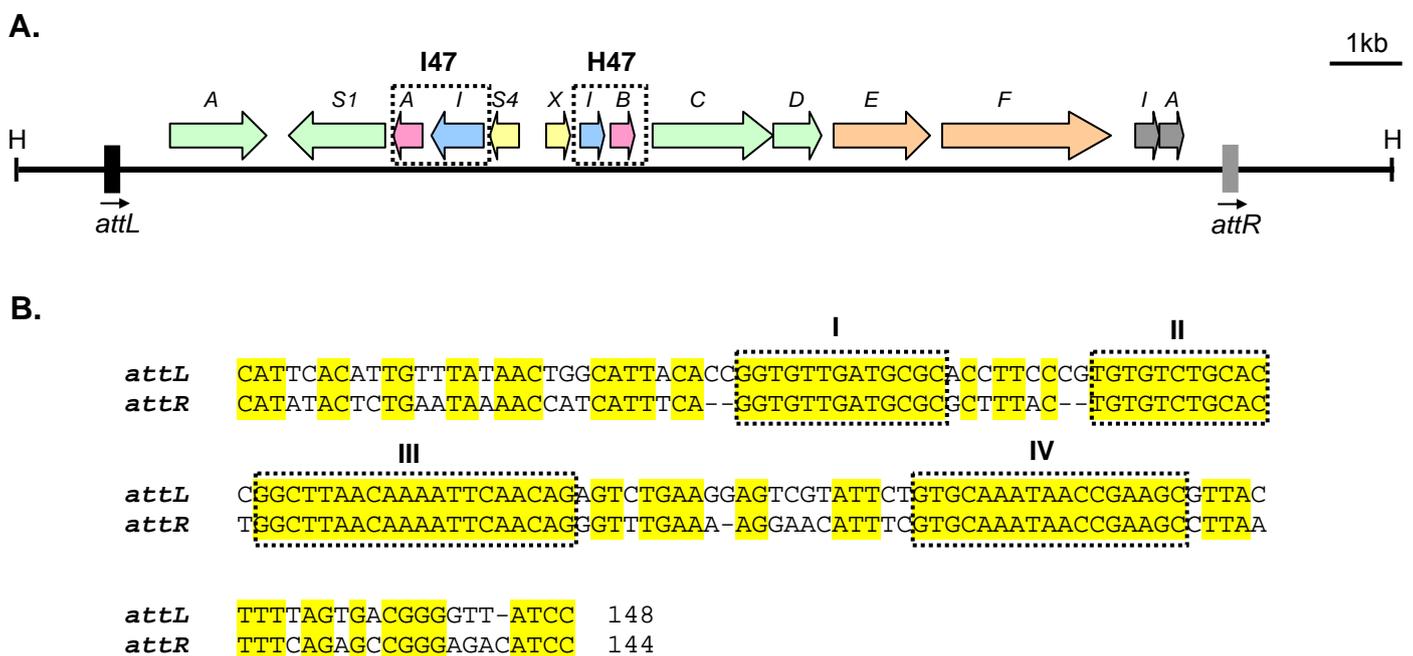
La microcina H47 (MccH47) pertenece a una familia de antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica denominados microcinas catecol. Este grupo está compuesto por las microcinas H47, I47, M y E492, las que se caracterizan por ser péptidos modificados postraduccionalmente por la adición de un sideróforo de tipo catecol. Esta adición hace posible la captación del antibiótico en las bacterias susceptibles a través de la vía de ingreso de los catecoles (Azpiroz & Laviña, 2004; Poey et al., 2006). A su vez, las microcinas catecol componen un grupo más amplio de antibióticos, denominado microcinas de mayor masa molecular (HMMM), que integra a la colicina V (CoIV) (Azpiroz & Laviña, 2007). La producción de estos antibióticos así como la presencia de

algunos de sus genes es frecuente en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC), por lo que se los ha propuesto como un factor de urovirulencia (Grozdanov et al., 2004; Poey et al., 2006; Azpiroz et al., 2009, Poey, 2011).

La producción de MccH47 se identificó por primera vez en un aislamiento clínico de *E. coli* procedente de heces humanas, el que se denominó *E. coli* H47 (Laviña et al., 1990). El fenómeno de antibiosis está codificado en un sistema genético de localización cromosómica que posee aproximadamente 13 kb de extensión. Dicho sistema se compone de: un gen de actividad (*mchB*), que codifica para el péptido precursor de la MccH47; un gen de inmunidad (*mchI*), codificante para un péptido que protege a la célula contra su propia producción; cuatro genes de maduración (*mchA*, *mchS1*, *mchC* y *mchD*), cuyos productos hacen posible la formación de la molécula catecol salmoquelina y su unión al péptido precursor, y dos genes de secreción (*mchE* y *mchF*), que codifican para un sistema de exportación del antibiótico maduro al medio extracelular. Además, dentro del sistema se identificaron dos parejas de genes de actividad-inmunidad para otras dos microcinas catecol. Una de ellas determina la producción de microcina I47 (MccI47), la que se detecta en condiciones de privación de hierro. La otra corresponde a vestigios de los genes de actividad-inmunidad de la microcina M (MccM), por lo que este antibiótico no es producido por *E. coli* H47 (Fig. 2A) (Poey et al., 2006).

En nuestro laboratorio se dispone de cepas de *E. coli* K12 que contienen distintos plásmidos recombinantes portadores del sistema genético MccH47 procedente de *E. coli* H47 (Gaggero et al., 1993). El fragmento clonado abarca 16.823 pb comprendidas entre dos sitios HindIII (fragmento H-H) y contiene el sistema antibiótico más regiones cromosómicas adyacentes a ambos lados (Fig. 2A). La secuencia de este fragmento reveló la existencia de dos repetidos directos flanqueando el sistema MccH47 (Poey et al., 2006). Dichos repetidos son extensos, el izquierdo tiene una longitud de 148 pb y el derecho de 144 pb, y comparten una identidad de secuencia del 76% (Fig. 2B). Esta estructura sugiere que el sistema MccH47 podría ser una isla genómica que tuviera la capacidad de movilizarse. Efectivamente, se comprobó que el sistema MccH47 se escindía de la molécula que lo portaba por recombinación específica de sitio entre los repetidos directos que lo flanquean (Bascuas, 2010). Esto se evidenció por PCR mediante el diseño de oligonucleótidos que generaban amplicones únicamente si había escisión. Dicho intercambio genético ocurrió tanto a partir del DNA cromosómico de la cepa *E. coli* H47 así como de los distintos plásmidos recombinantes portadores del

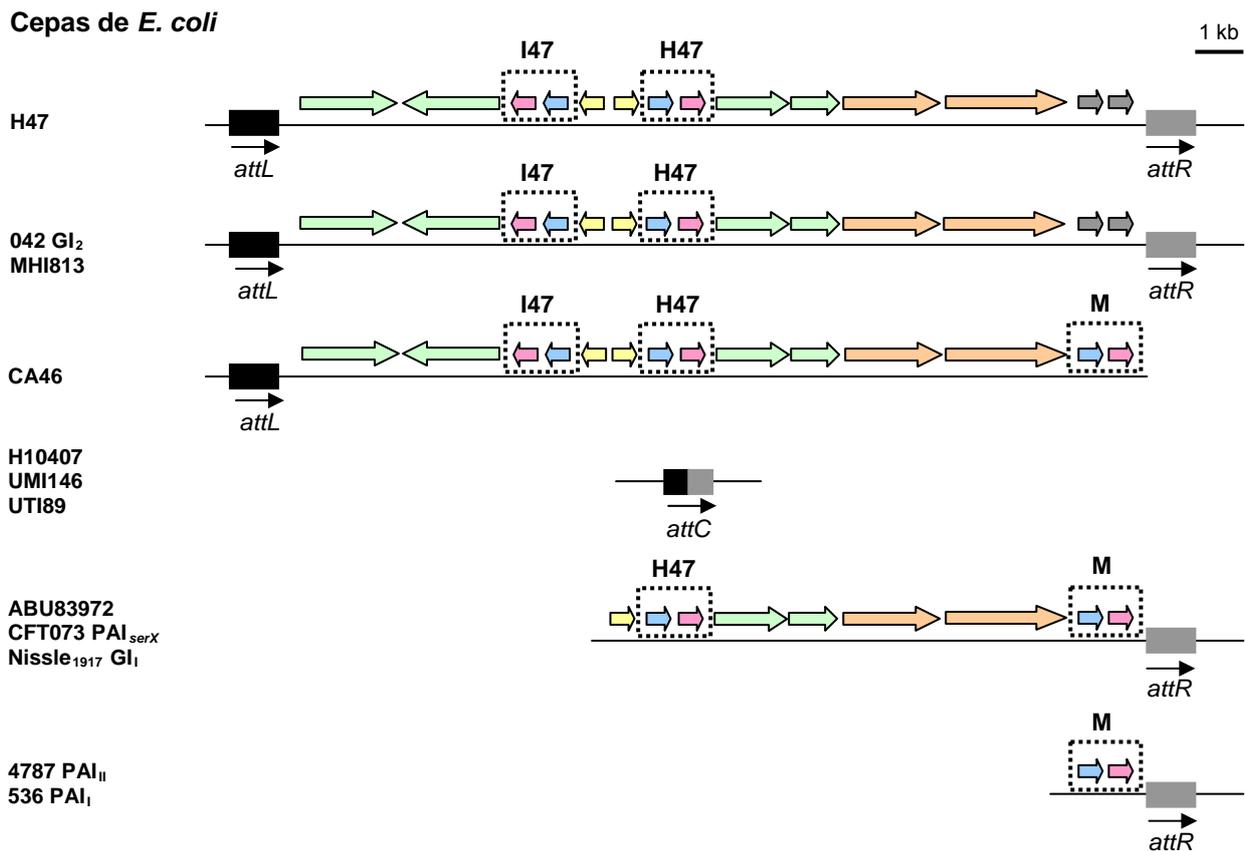
fragmento H-H. Más aún, se pudo determinar que uno de los productos de escisión, el plásmido sin el sistema antibiótico, portaba una secuencia híbrida compuesta por parte de los repetidos directos. Esta secuencia híbrida es entonces un sitio de integración *attC* y las secuencias repetidas que flanquean el sistema MccH47 corresponden a sitios *attL-attR*, izquierdo y derecho, respectivamente. Cabe mencionar que se trabajó siempre en un contexto celular deficiente para la recombinación homóloga, por lo que sólo la recombinación específica de sitio podía ser la responsable de la escisión del sistema MccH47.



**Fig. 2. Sistema genético MccH47, repetidos directos y regiones adyacentes.** A. Representación esquemática del fragmento H-H (EMBL AC: AJ009631). Se representan con rectángulos las secuencias repetidas directas (*attL* y *attR*) que flanquean el sistema MccH47 (de 12.635 pb). Por dentro de los repetidos se indican con flechas de distintos colores los genes que componen el sistema: en verde, genes de maduración; en naranja, genes de secreción; en amarillo, genes regulatorios; en rojo, genes de actividad microcina, y en azul, genes de inmunidad. Se recuadran las parejas de genes de actividad-inmunidad para las microcinas I47 y H47. Con flechas grises se señalan los vestigios de los genes de actividad-inmunidad para la MccM. B. Alineamiento de las secuencias repetidas directas que flanquean el sistema MccH47 con el programa Lalign (Huang & Miller, 1991). Se pintan en amarillo los nucleótidos idénticos y se recuadran las regiones de identidad de extensión mayor a diez nucleótidos.

Por otra parte, el sistema genético MccH47 no sería una GI exclusiva de la cepa *E. coli* H47, sino que se encontraría en el cromosoma de otras cepas de *E. coli*, fundamentalmente patógenas, e incluso en una cepa de *Salmonella enterica* (Bascuas, 2010). Concretamente, el análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento H-H contra los bancos de datos (EMBL) reveló la existencia de tres tipos de estructura genética: el

sistema MccH47 integrado entre los sitios *attL* y *attR*; diferentes extensiones del sistema con el sitio *attR* pero sin *attL*, y posibles sitios de integración *attC* (Fig. 3). La secuencia del fragmento H-H se encontró casi idéntica en la GI 2 de la cepa enteroagregativa *E. coli* 042 y muy recientemente en la cepa productora de toxina de Shiga *E. coli* MHI813 (Chaudhuri et al., 2010; AC: AFDZ01000020). También estaría presente en *E. coli* CA46, cepa que contiene el sistema MccH47 flanqueado por el sitio *attL* (Patzer et al., 2003). En este caso, permanece incierta la presencia del sitio *attR* ya que la secuencia depositada en el banco de datos no se extiende lo suficiente a la derecha. La segunda estructura se encontró fundamentalmente en cepas patógenas extraintestinales de *E. coli*, todas ellas conteniendo distintas extensiones del sistema MccH47 y manteniendo siempre el sitio *attR*. Por último, los supuestos sitios de integración del sistema MccH47 (*attC*) están presentes en cepas patógenas intestinales y extraintestinales de *E. coli* así como en una cepa de *S. enterica*.



**Fig. 3. Comparación de la secuencia nucleotídica del fragmento H-H contra los bancos de datos.** Arriba, se representa el fragmento de DNA de 16.823 pb que contiene el sistema MccH47. Abajo, se muestran algunos ejemplos de secuencias cromosómicas presentes en cepas naturales de *E. coli* que comparten, en los segmentos representados, una identidad mayor al 85% con la secuencia comparada. Con flechas se representan los genes del sistema MccH47 y sus homólogos en otros microorganismos, siguiendo los códigos de colores y recuadros de la Fig. 2.

Por lo tanto, según nuestros resultados previos, el sistema genético MccH47 sería una isla genómica móvil capaz de distribuirse en cepas de *E. coli*, e incluso en otras enterobacterias. Faltan aún por dilucidar aspectos clave en la operativa de su movilidad, los que se abordarán en este trabajo.

Por último, se describen a continuación estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio que serán relevantes para este trabajo. Concretamente, varias colecciones de aislamientos de UPEC fueron analizadas fenotípica y genotípicamente (Poey, 2011). En primer lugar, se estudió el grupo filogenético al que pertenecían dichos aislamientos siguiendo el criterio que divide a las cepas de *E. coli* en cuatro grupos (A, B1, B2 y D), cada uno determinado por una combinación de presencia/ausencia de dos genes y un segmento de DNA (Clermont et al., 2000). Además, se determinó el contenido en genes de urovirulencia y en genes microcina, y la producción de HMMM de cada aislamiento. Se definieron así tres perfiles de virulencia en base a la presencia de determinados genes microcina. El perfil I se caracterizó por la presencia del gen de actividad para la MccM (*mcmA*), el perfil II por la presencia del gen de actividad para la MccH47 (*mchB*) y el perfil III por la presencia del gen de actividad para ColV (*cvaC*). Dentro de cada perfil se agruparon cepas productoras y no productoras de HMMM. Cuando hubo producción, ésta presentó las siguientes características: de MccH47 y MccM conjuntamente en el perfil I, de MccH47 en el perfil II y de ColV en el perfil III. En cuanto al grupo filogenético y al contenido de virulencia, se observaron distintos niveles de asociación de acuerdo al perfil: las cepas pertenecientes al perfil I fueron todas B2 y muy ricas en factores de virulencia, las del perfil II fueron A, B1 o D, y pobres en dichos factores, y las del perfil III pertenecieron a cualquiera de los cuatro grupos filogenéticos, con abundancia en genes para la adquisición de hierro. En suma, se estableció una vinculación entre las HMMM y distintos contextos de virulencia de cepas de UPEC (Poey, 2011). Cabe señalar que nuestro modelo de estudio en este trabajo, el sistema genético MccH47, está contenido en *E. coli* H47, cepa de referencia para el perfil II.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo fue continuar el estudio de la movilidad del sistema genético MccH47 en cuanto a sus aspectos operativos y de distribución en la especie.

### **2.2. Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1. completar la información sobre la región dentro de los repetidos directos donde ocurre la recombinación específica de sitio que da lugar a la escisión de este sistema,
2. buscar y localizar los genes que codifican para la integrasa y la escisionasa involucrados en la movilidad del sistema MccH47 y
3. realizar un relevamiento de la movilidad del sistema genético MccH47 así como de la presencia de su plataforma de integración en una colección de aislamientos de *E. coli* procedentes de urocultivos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Estirpes bacterianas y plásmidos

Se emplearon distintas estirpes de *E. coli* K12 y algunos plásmidos disponibles en el laboratorio (Tabla 1). Para el relevamiento de la movilidad del sistema genético MccH47 y de la presencia de su sitio de integración en aislamientos de UPEC se trabajó con las siguientes cepas de referencia: Nissle<sub>1917</sub> y CFT073 (para el perfil I), y H47 (para el perfil II), cepas naturales de *E. coli* y PAP222 (para el perfil III), BZB1011 portadora del plásmido pUY270 (Azpiroz et al., 2009). Además, se analizaron 301 aislamientos clínicos de *E. coli* procedentes de urocultivos, obtenidos en dos hospitales: Hospital Militar (cortesía de la Prof. G. Borthagaray) y Centro Hospitalario Pereira Rossell (cortesía de la Dra. M. Albini).

**Tabla 1.** Estirpes de *E. coli* K12 y plásmidos

Estirpes/Plásmidos	Genotipo/Fenotipo	Origen/Referencia
BZB1011	<i>gyrA</i>	Pugsley, 1985
MC4100	<i>araD lacU169 relA rpsL thiA</i> (Sm <sup>R</sup> )	Laviña et al., 1986
RYC1000	MC4100 <i>rbs7 gyrA recA</i> (Sm <sup>R</sup> , Nal <sup>R</sup> )	Gaggero et al., 1993
DH5α	<i>supE ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17</i> <i>recA endA gyrA thi relA</i> (Nal <sup>R</sup> )	Miller, 1992
pop3000	HfrH	Laviña et al., 1986
RYC745	F <sup>-</sup> <i>arg gyrA his lac leu pro rpsL sbmA::Tn5 thr</i> (Km <sup>R</sup> , Nal <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> )	Laviña et al., 1986
FGB20	<i>arg gyrA lac rpsL sbmA::Tn5</i> (Km <sup>R</sup> , Nal <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> ) transconjugante pop3000 x RYC745	Colección del laboratorio
pBR322	replicón pMB1 (Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	Miller, 1992
pUC13	<i>bla lacZ'</i> replicón pMB1 (Ap <sup>R</sup> )	Miller, 1992
pACYC184	replicón p15A (Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> )	Miller, 1992
pUCYC5	<i>bla lacZ'</i> replicón p15A (Cm <sup>R</sup> )	Azpiroz et al., 2009
pEX2000	pBR322 con el sistema MccH47 (Ap <sup>R</sup> )	Gaggero et al., 1993
pEX4	pUC13 con el sistema MccH47 (Ap <sup>R</sup> )	Laviña et al., 1990
pEX100	pACYC184 con el sistema MccH47 (Cm <sup>R</sup> )	Gaggero et al., 1993
pUY69	pUC13 con <i>mchI</i> (Ap <sup>R</sup> )	Rodríguez & Laviña, 2003
pUY270	pUC13 con el sistema ColV (Ap <sup>R</sup> )	Azpiroz et al., 2001
pUY272	pUC13 con <i>cvi</i> (Ap <sup>R</sup> )	Azpiroz & Laviña., 2007

### 3.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: medio rico Luria-Bertani (LB) y medio mínimo M63 (Anexo 1).

Los antibióticos se añadieron a las concentraciones finales siguientes: Ampicilina (Ap) 50 µg/ml, Cloranfenicol (Cm) 60 µg/ml, Kanamicina (Km) 30 µg/ml y Tetraciclina (Tc) 15 µg/ml. Estas soluciones se esterilizaron por filtración empleando filtros milipore de 0,45 µm.

Para detectar la actividad β-galactosidasa se utilizó el indicador cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido) a una concentración final de 20 µg/ml. Para crear condiciones de deprivación de hierro se adicionó al medio de cultivo 2,2 dipiridilo (DPP) a una concentración final de 50 µM.

### 3.3. Prueba de producción antibiótica

La prueba de producción antibiótica consiste en realizar “picadas” de las estirpes a ensayar en una placa de medio mínimo M63 sembrada con un tapiz de una cepa indicadora. Para obtener el tapiz se utilizaron 100 µl de una suspensión con c.a. 10<sup>7</sup> células/ml en M63 sales (Anexo 1). Luego de 24 horas de incubación a 37°C, aquellas estirpes productoras de antibiótico generan halos de inhibición del crecimiento del tapiz alrededor de la picada (halos de antibiosis) (Asensio et al., 1976). La producción de MccH47 y de ColV se evidenció sobre la cepa indicadora MC4100, sensible a ambas microcinas. La especificidad de estas producciones se corroboró utilizando tapices de cepas inmunes a cada microcina: MC4100 (pUY69), inmune a MccH47 por presentar el gen de inmunidad *mchI*, y MC4100 (pUY272), inmune a ColV por contener el gen de inmunidad *cvi*. Como controles se picaron las estirpes: RYC1000 (pEX4) y RYC1000 (pEX100), productoras de MccH47, y RYC1000 (pUY270), productora de ColV.

### 3.4. Obtención de extracto extracelular con actividad ColV

El extracto extracelular con actividad ColV (extracto ColV) se obtuvo a partir de RYC1000 (pUY270), estirpe productora de ColV. Dicha cepa se cultivó en LB a 37°C hasta fase logarítmica avanzada y posteriormente se le agregó DPP incubándose una hora más. Dado que la producción de ColV está regulada por la disponibilidad de hierro, el quelante adicionado al cultivo genera las condiciones de inducción de esta actividad antibiótica en las células (Boyer & Tai, 1998). Luego, el cultivo se centrifugó durante 20 min a 13.000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Este último se incubó a una

temperatura de 80°C durante 30 min para provocar la muerte de las células remanentes. La actividad ColV se mantiene indemne ya que este antibiótico es un péptido termoestable. Se prueban gotas de 10 µl del sobrenadante sobre una placa de M63 glucosa sembrada con un tapiz de MC4100. La inhibición del crecimiento del tapiz en el lugar donde se deposita la gota indica la presencia de actividad ColV.

### **3.5. Transferencia de plásmidos por conjugación**

Se realizaron experimentos de conjugación para transferir a una cepa de *E. coli* K12 distintos plásmidos albergados por aislamientos del perfil III. La cepa receptora fue siempre FGB20, estirpe de *E. coli* K12 portadora de un transposón Tn5 que le confiere resistencia al antibiótico Km. Esta resistencia fue utilizada en todos los experimentos de conjugación para la contraselección de las cepas donantes. Para transferir el plásmido portador del sistema genético ColV (pColV) se utilizaron como cepas donantes cinco aislamientos clínicos pertenecientes al perfil III (III-1 a III-5) productores de ColV. Se realizaron cultivos en LB a 37°C hasta fase logarítmica avanzada de las cepas donante y receptora, la primera se incubó sin agitación y la segunda con agitación. Posteriormente, se incubaron juntas en una proporción 4 (receptora):1 (donante) durante 2 horas a 37°C con mínima agitación. Cumplido el tiempo se rompieron los pares conjugativos con fuerte agitación y se sembraron alícuotas de la mezcla en placas de LBKm adicionadas de extracto ColV. El empleo de este extracto permite seleccionar clones transconjugantes resistentes a ColV por haber adquirido el plásmido ColV. Como controles, ambos parentales se procesaron por separado, en paralelo y de igual forma que la mezcla experimental. Para comprobar la transferencia del plásmido ColV, se purificaron algunos clones transconjugantes y se evaluó su capacidad de producir ColV por la prueba de picada sobre tapices sensible e inmune a este antibiótico. Asimismo, se corroboró por PCR que estos clones contenían el gen de actividad *cvaC* para la producción de ColV. Por su parte, para la transferencia de eventuales plásmidos portadores de genes de resistencia antibiótica se siguió el mismo procedimiento descrito para la conjugación anterior. Es así que como cepa receptora se usó FGB20 y como cepas donantes los aislamientos III-4 y III-5. Dichos aislamientos portaban las resistencias a Ap, Cm y Tc y eran sensibles a Km mientras que FGB20 era resistente a Km y sensible a Ap, Cm y Tc. Por lo tanto, para seleccionar transconjugantes Ap<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup> y Tc<sup>R</sup> alícuotas de la mezcla de conjugación se sembraron en placas de LBAPKm, LBCmKm y LBTcKm, respectivamente.

### **3.6. Curado de plásmidos**

La pérdida de plásmidos (“curado”) portados por dos aislamientos pertenecientes al perfil III (III-4 y III-5) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mansi et al., 2000. Esta prueba se basa en tratar las células bacterianas con el detergente iónico SDS que, por razones no dilucidadas, facilita la pérdida de plásmidos. Las cepas a curar se cultivaron en LB e incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente, alícuotas de estos cultivos se colocaron en tres medios, LB, LB adicionado con SDS 6% y LB adicionado con SDS 7%, y se incubaron nuevamente toda la noche a 37°C. Se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó para quitar el medio LB, resuspendiendo las células en 1 ml de M63 sales. Se hicieron diluciones seriadas y alícuotas de éstas se sembraron en LB. La eventual pérdida de plásmidos por parte de los aislamientos se evaluó mediante la técnica de “replica-plating”. Esta prueba consiste en transferir las colonias crecidas a un terciopelo estéril y luego desde este último hacia los medios en que se quiere ensayar el crecimiento. Para determinar el curado del plásmido ColV, las células se replicaron sobre placas de medio mínimo sembradas con un tapiz de MC4100. Luego de 24 horas de incubación a 37°C, las células que perdieron pColV se evidenciaron por su incapacidad de generar halos de antibiosis. Para evaluar la posible pérdida de plásmidos portadores de genes para resistencias antibióticas, las células tratadas se replicaron sobre medios adicionados de los distintos antibióticos. En este caso la ausencia de crecimiento sugirió el curado de plásmidos.

### **3.7. Manipulación y análisis del DNA**

Para la extracción del DNA plasmídico se utilizaron los protocolos de lisis alcalina y de lisis rápida (Anexo 1). La extracción de DNA genómico se realizó con el kit “Wizard genomic DNA purification system” de Promega, según las instrucciones del fabricante. Las mezclas de digestión y ligación contuvieron 1/10 de enzima (Biolabs), 1/10 de buffer específico de la enzima (Biolabs) y distintas cantidades de DNA plasmídico (Sambrook et al., 1989). La obtención de células competentes y la transformación de las mismas con DNA plasmídico se realizó según se describe en el Anexo 1. La resolución de DNA entero, digerido y de productos de PCR se llevó a cabo por electroforesis en geles de agarosa de 0,8% - 2%, utilizando buffer TAE 1x. Las corridas se realizaron en el rango de 50V-80V según los tamaños de DNA a resolver.

Para las reacciones de PCR se utilizó U-Taq DNA polimerasa (SBS Genetech) en un volumen final de 30 µl. Las mezclas de reacción contuvieron buffer 1x, 2 mM de

MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 500 nM de cada oligonucleótido, 0,6 U de DNA polimerasa y como molde 100-200 ng de DNA plasmídico y 200-400 ng de DNA genómico. Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 94°C, 30 ciclos de incubación a 94°C por 30 seg., temperatura de asociación por 30 seg., 72°C por 30 seg. y una extensión final a 72°C por 2 min. Para obtener los fragmentos de amplificación a clonar se utilizó la enzima Vent polimerasa (Biolabs), que garantiza una mayor fidelidad de la secuencia amplificada y genera extremos romos. Los oligonucleótidos de síntesis, las temperaturas de asociación y los tamaños de los amplicones se muestran en la Tabla 2.

Para el estudio del grupo filogenético al que pertenecían las cepas de *E. coli* se realizó una PCR triple que amplifica un fragmento de DNA anónimo, denominado TSPE4.C2, y dos genes, *chuA*, codificante del receptor de hemo, e *yjaA*, cuya función no se conoce. Este método permite clasificar a las cepas de *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos: A (ausencia de bandas o *yjaA*<sup>+</sup>), B1 (*tspE4c2*<sup>+</sup>), B2 (*chuA*<sup>+</sup> e *yjaA*<sup>+</sup> o *chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>+</sup> y *tspE4c2*<sup>+</sup>) y D (*chuA*<sup>+</sup> o *chuA*<sup>+</sup> y *tspE4c2*<sup>+</sup>) (Clermont et al., 2000).

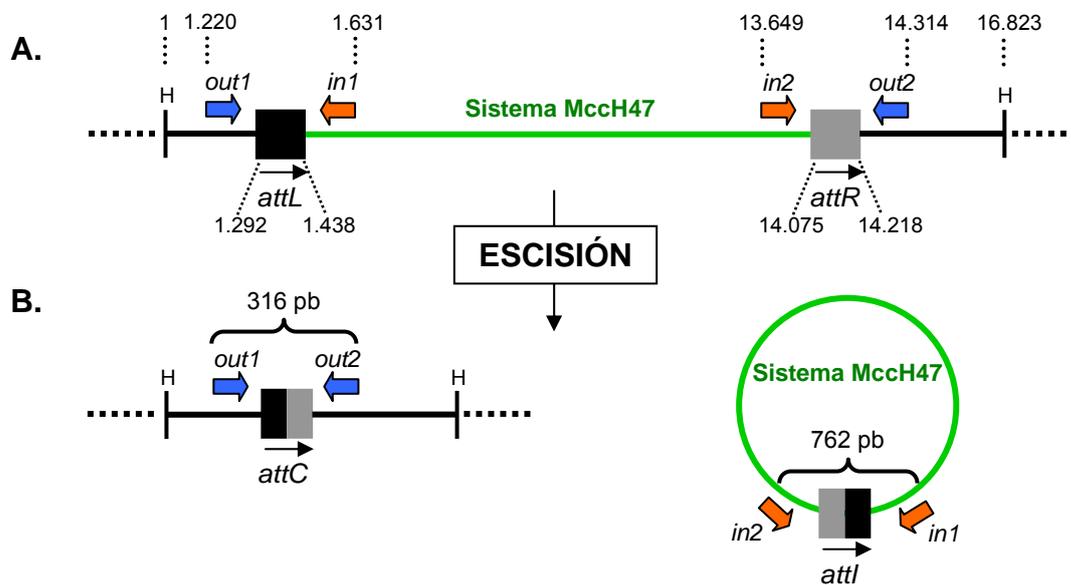
Los productos de PCR obtenidos exclusivamente para secuenciación nucleotídica fueron purificados con “QIAEXII Gel extraction kit” (Qiagen) y aquéllos obtenidos para clonado fueron purificados con “MinElute PCR purification kit” (Qiagen). La secuenciación nucleotídica se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos, temperaturas de asociación y amplicones generados.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA (5' - 3')	T <sub>m</sub> asoc. (°C)	TAMAÑO (pb)
<i>in1</i> <i>in2</i>	GTTTGTAGGAGCTTTCTTTTTG CGCTGATGACTGTTTTATGTTG	53	IN (762)
<i>out1</i> <i>out2</i>	CCGTTCAATTTCTGCTGACCC TCTGTTGCCCGTTGATGTTCTCT	58	OUT (316)
<i>cvaC1</i> <i>cvaC2</i>	ATGAGAACTCTGACTCTAAATGAAT ACATCACTAAGATTATTTGGACT	56	<i>cvaC</i> (302)
<i>chuA1</i> <i>chuA2</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	56	<i>chuA</i> (279)
<i>yjaA1</i> <i>yjaA2</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	56	<i>yjaA</i> (211)
<i>TSPE4C2.1</i> <i>TSPE4C2.2</i>	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	56	<i>tspE4c.2</i> (152)

### 3.8. Estrategia para la detección del fenómeno de escisión del sistema MccH47

Debido a que la escisión de una isla genómica es un evento de muy baja frecuencia, la detección de este fenómeno en el sistema MccH47 se llevó a cabo mediante la técnica de PCR. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos de síntesis que hibridaran a cada lado de los sitios *attL* y *attR* que flanquean el sistema (Fig. 4A). Los cebadores se combinaron en dos parejas: los que se extienden desde fuera del sistema hacia cada sitio *att* (cebadores “*out*”) y los que amplifican desde dentro hacia cada *att* (cebadores “*in*”). Esta combinación de oligonucleótidos asegura que sólo exista amplificación si ocurre escisión, ya que si el sistema MccH47 está integrado los fragmentos a amplificar serían demasiado extensos, siendo imposible su obtención. Estas reacciones de amplificación evidenciarán entonces los productos de escisión: el plásmido sin el sistema al usar los cebadores *out* (amplicón de 316 pb) y el sistema como molécula circular independiente empleando los cebadores *in* (amplicón de 762 pb) (Fig. 4B). Cada fragmento amplificado portará una secuencia híbrida, i.e. un sitio *attC* en el plásmido sin el sistema y un sitio *attI* en el sistema como molécula independiente.



**Fig. 4. Estrategia para la detección de la escisión del sistema genético MccH47 por la técnica de PCR.** **A.** Sistema integrado al plásmido. Con línea negra punteada se representa el DNA plasmídico, con línea negra llena el DNA clonado adyacente al sistema MccH47 y con línea verde el DNA del sistema MccH47. Con flechas azules y naranjas se indican los cebadores *out* e *in*, respectivamente. Se señalan los nucleótidos inicial y final del fragmento H-H, inicial y final de los sitios *attL* y *attR*, e iniciales de los cebadores *out* e *in*. H: HindIII. **B.** Productos de la escisión: plásmido sin el sistema y sistema MccH47 como molécula circular independiente, ambos portando una secuencia híbrida.

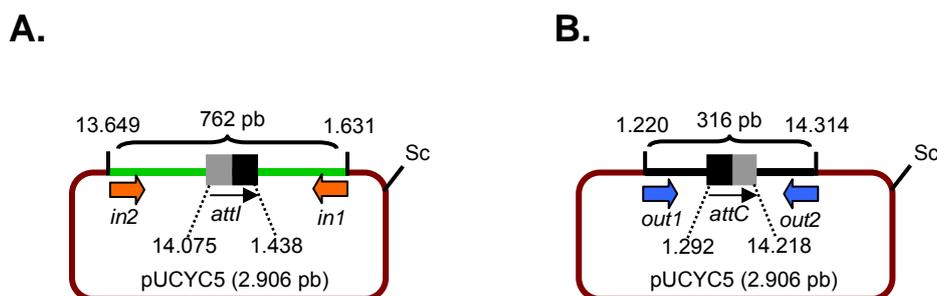
### 3.9. Construcciones genéticas

A continuación se describen los plásmidos construidos en este trabajo.

**pIN.** Porta un segmento de DNA de 762 pb producto de la amplificación con los cebadores *in* a partir de la molécula circular independiente que alberga el sistema MccH47. Dicho amplicón se denominó fragmento IN y contiene el sitio *attI* producto de la escisión del sistema. Se utilizó como molde para la PCR DNA de pEX4 extraído mediante lisis alcalina. El fragmento IN se purificó y se clonó en el vector plasmídico pUCYC5. Dicho vector fue previamente linearizado con la enzima HincII y posteriormente ligado con el amplicón IN. La mezcla de ligación se utilizó para transformar la estirpe DH5 $\alpha$ , deficiente para la restricción (HsdR<sup>-</sup>) pero capaz de modificar el DNA por metilación (HsdM<sup>+</sup>). Este contexto genético permite la instalación de plásmidos recombinantes que tienen clonados productos de PCR. Los clones transformantes se seleccionaron en LBCm, ya que pUCYC5 codifica para la resistencia a cloranfenicol, y los clones recombinantes se detectaron por el sistema de complementación en  $\alpha$  utilizando X-gal. Posteriormente, se extrajo por lisis rápida el DNA plasmídico de algunos clones Lac<sup>-</sup> para transformar la cepa RYC1000. Esta estirpe provee un contexto deficiente para la recombinación homóloga, de buena estabilidad y crecimiento. La identidad del plásmido recombinante se corroboró por análisis físico con la enzima de restricción SacI y por amplificación del fragmento IN. La digestión con SacI da lugar a un único segmento de DNA correspondiente a pIN linearizado (3.668 pb) ya que esta construcción posee un único sitio para esta enzima a nivel del vector (Fig. 5A).

**pOUT.** Porta un segmento de DNA de 316 pb producto de la amplificación con los cebadores *out* del plásmido resultante de la escisión del sistema MccH47. A este segmento se le denominó fragmento OUT y contiene el sitio *attC* producto de la escisión. Para la reacción de PCR se empleó como molde DNA de pEX2000 extraído por lisis alcalina. El clonado del fragmento OUT se realizó en pUCYC5 de igual manera que el del fragmento IN. Posteriormente, se transformó la estirpe DH5 $\alpha$  con la mezcla de ligación y se sembró en medio LBCmX-gal. Los clones recombinantes se seleccionaron por su fenotipo Lac<sup>-</sup>. Para obtener clones independientes, la expresión fenotípica se llevó a cabo distribuyendo la mezcla de transformación en 20 tubos, cada uno adicionado con 200  $\mu$ l de LB. De esta forma, los clones transformantes se separaron antes de que hicieran su primera división celular de modo que los contenidos en los distintos tubos serían obligatoriamente independientes entre sí. Luego de la expresión

fenotípica se sembraron alícuotas de cada tubo en placas separadas de LBCmX-gal. Luego de incubación, se tomó una colonia transformante Lac<sup>-</sup> de cada placa para extraer su DNA plasmídico y posteriormente transformar con él la cepa RYC1000. La estructura de los plásmidos se determinó por análisis físico con la enzima de restricción SacI y por amplificación del fragmento OUT. La digestión con SacI generó un único fragmento de 3.222 pb correspondiente al plásmido recombinante linearizado (Fig 5B).



**Fig. 5. Representación esquemática de los plásmidos recombinantes portadores de los fragmentos IN y OUT.** A. pIN (3.668 pb). B. pOUT (3.222 pb). Se indican los nucleótidos inicial y final de los sitios *attL* y *attR* que generan los sitios híbridos *attI* y *attC*, e iniciales de los cebadores *out* e *in*. La numeración de los nucleótidos corresponde a la del fragmento H-H. Sc: SacI.

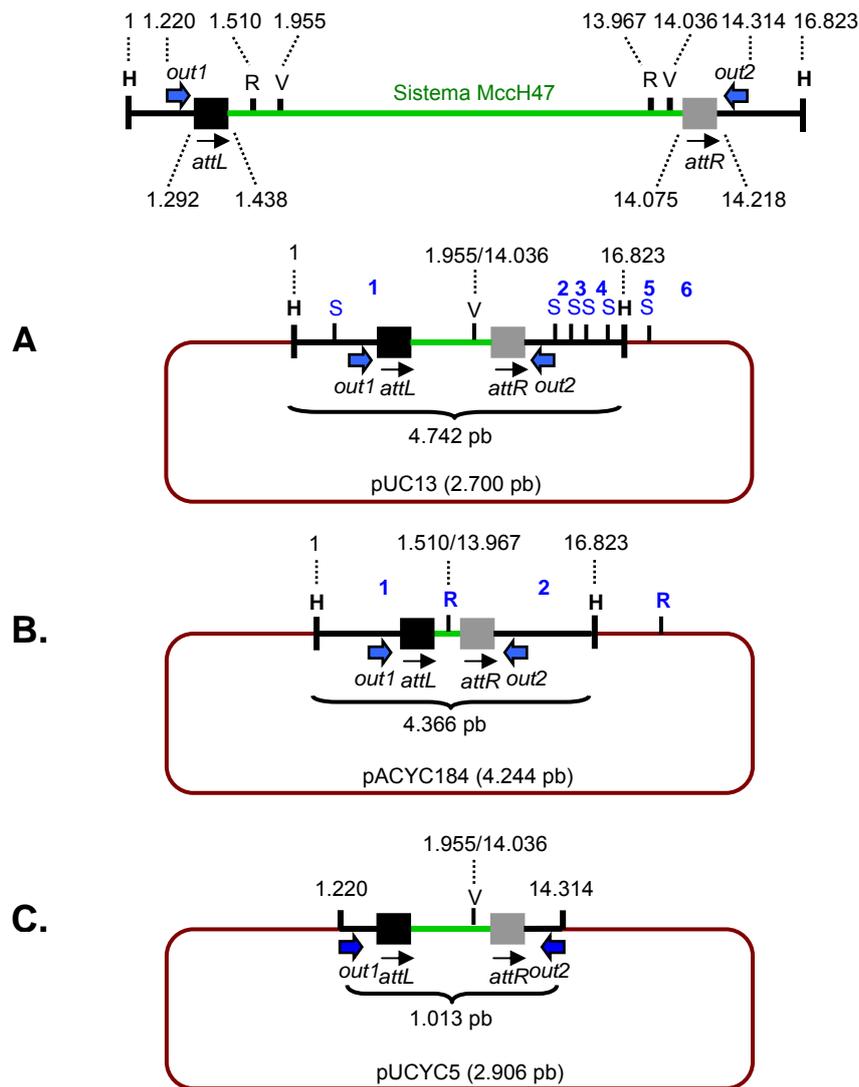
**pΔint1.** Porta el fragmento H-H carente de la mayor parte del sistema MccH47, manteniendo los sitios *attL* y *attR*, y las regiones adyacentes. En total contiene 4.742 pb del fragmento H-H (Fig. 6A). Para obtener esta construcción se utilizó pEX4, plásmido recombinante que porta el fragmento H-H clonado en pUC13. El plásmido pEX4 posee 13 sitios de corte para EcoRV, todos ellos dentro del sistema MccH47 (Anexo 2). Por lo tanto, pΔint1 se construyó como derivado de pEX4 por delección completa de todos los fragmentos EcoRV intermedios quedando únicamente para religar los sitios de corte extremos. De esta forma, la construcción genética retuvo en total 556 pb del sistema MccH47. La cepa RYC1000 se transformó con la mezcla de religación y los clones transformantes se seleccionaron en LBAp, ya que pUC13 porta el gen que codifica para la resistencia a este antibiótico. La incapacidad de producir MccH47 se corroboró por la prueba de picada sobre tapiz. La identificación física de esta construcción genética se realizó por análisis de restricción con EcoRV y SmaI. La digestión con EcoRV genera un único fragmento (7.442 pb) correspondiente al plásmido linearizado. En cuanto a la digestión con SmaI, la construcción mantiene seis sitios, uno en el vector pUC13 y cinco en el inserto (uno en la región adyacente izquierda y cuatro en la región adyacente

derecha). De esta forma, se obtienen los siguientes fragmentos: 1.862 pb (1); 798 pb (2); 613 pb (3); 84 pb (4); 759 pb (5), y 3.326 pb (6) (Fig. 6A) (Anexo 2).

**pΔint2.** Porta el fragmento H-H carente de prácticamente todo el sistema MccH47 y mantiene los sitios *attL* y *attR*, y las regiones adyacentes. En total permanecieron 4.366 pb del fragmento H-H (Fig. 6B). Para obtener esta construcción se utilizó pEX100, plásmido recombinante que porta el fragmento H-H clonado en pACYC184. El plásmido pEX100 se digirió con RcaI, enzima para la que presenta diez sitios de corte, nueve en el sistema MccH47 y uno en el vector pACYC184 (Anexo 2 y 3). De acuerdo a la orientación en que está clonado el fragmento H-H en pEX100, el sitio RcaI del vector se encuentra flanqueando la región adyacente derecha del sistema MccH47 (Fig. 6B). La construcción deseada consistió en ligar dos fragmentos de digestión: uno que se extendía desde el sitio RcaI del extremo izquierdo del sistema MccH47 al sitio RcaI del vector (1), fragmento de 5.294 pb que abarca el sitio *attL*, la región adyacente izquierda y gran parte del vector, y otro que se extendía desde el sitio RcaI del vector al sitio RcaI del extremo derecho del sistema MccH47 (2), fragmento de 3.316 pb que contiene el sitio *attR*, la región adyacente derecha y el fragmento restante del vector. Estos dos segmentos de DNA se purificaron desde un gel de agarosa y se ligaron. Es así entonces que se conservaron en total 180 pb del sistema MccH47. La cepa RYC1000 se transformó con la mezcla de ligación y los clones resultantes se seleccionaron en LBCm. La incapacidad de estos clones de producir MccH47 se corroboró por la prueba de picada sobre tapiz. Para corroborar que se trataba de la construcción deseada se realizó un análisis físico con las enzimas de restricción RcaI, EcoRI y HindIII. La digestión con RcaI generó los dos fragmentos ligados (5.294 pb y 3.316 pb) y la digestión con EcoRI dio lugar a un único fragmento (8.610 pb) correspondiente al plásmido recombinante linearizado, ya que éste posee un sólo sitio de corte para esta enzima en el vector. Por su parte, la digestión con HindIII permitió determinar la correcta ligación de los fragmentos RcaI, la que se evidenció por la aparición de dos productos de digestión, un segmento de 4.244 pb (1) y otro de 4.366 pb (2) (Fig. 6B) (Anexos 2 y 3).

**pΔext.** Porta un fragmento de 1.013 pb producto de la amplificación con los cebadores *out1* y *out2* usando como molde pΔint1. Dicho segmento de DNA mantiene los sitios *attL* y *attR*, y carece del sistema MccH47 y de la mayor parte de las regiones adyacentes (conserva 72 pb y 96 pb a la izquierda y a la derecha, respectivamente) (Fig. 6C) (Anexo 2). El amplicón se ligó con el vector pUCYC5 digerido con HincII y la mezcla

de ligación se utilizó para transformar células competentes de DH5 $\alpha$ . Los clones transformantes se seleccionaron en LBCm y los recombinantes se detectaron por su fenotipo Lac<sup>-</sup> en presencia de X-gal. Se extrajo el DNA plasmídico para transformar la cepa RYC1000. La estructura del plásmido recombinante se corroboró por análisis físico con la enzima de restricción EcoRV. La digestión con EcoRV dio lugar a un único producto correspondiente al plásmido recombinante linearizado (3.919 pb) (Fig. 6C) (Anexo 2).



**Fig. 6. Fragmento H-H y construcciones genéticas derivadas.** Arriba, fragmento H-H. Se indican los nucleótidos de los sitios de restricción extremos para EcoRV (V), HindIII (H) y RcaI (R), inicial y final de los sitios *attL* y *attR*, e iniciales de los cebadores *out1* y *out2*. **A.** p $\Delta$ int1 (7.442 pb). **B.** p $\Delta$ int2 (8.610 pb). **C.** p $\Delta$ ext (3.919 pb). La numeración de los nucleótidos en las construcciones se corresponde a la del fragmento H-H. Con números azules se indican los fragmentos SmaI (S) y RcaI (R).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinación de los sitios de recombinación

Los repetidos directos que flanquean el sistema MccH47 son largos e imperfectos y comparten cuatro regiones extensas de total identidad (Fig. 2B). En principio era esperable entonces que cualquiera de estos cuatro sitios fuera sustrato de la recombinación. Previamente se había clonado el fragmento OUT resultante de la escisión del sistema MccH47 desde el plásmido pEX2000. Dicho fragmento contuvo una secuencia híbrida *attC*, producto de la recombinación específica de sitio en la segunda región de identidad (II) entre los repetidos directos (Fig. 7) (Bascuas, 2010). Faltaba entonces por determinar la secuencia híbrida *attI* portada por el otro producto de escisión, i.e. el sistema como molécula circular independiente. Para ello, se llevó a cabo la construcción del plásmido pIN, según se describe en Materiales y Métodos. Se obtuvo sólo un clon recombinante portador del plásmido pIN y se extrajo su DNA plasmídico mediante lisis alcalina para su posterior secuenciación nucleotídica con los cebadores *in1* e *in2*. Efectivamente, la secuencia nucleotídica contuvo un sitio *attI* resultante de la recombinación específica de sitio entre los repetidos directos que flanquean el sistema antibiótico. Sin embargo y contrariamente a lo esperado, dicho sitio *attI* no surgió del intercambio genético a nivel de la segunda región de identidad entre los sitios *attL* y *attR* sino que fue el generado por la recombinación a nivel de la tercera región de identidad (III) (Fig. 7). Este resultado sugirió entonces que al menos existían dos regiones de identidad entre los repetidos directos (II y III) donde podía operarse la recombinación específica de sitio para dar lugar a la escisión del sistema MccH47. Para determinar si las otras dos regiones de identidad (I y IV) podían ser también sitios de recombinación se procedió a realizar clonados independientes del fragmento OUT. Se pretendía de esta manera obtener distintos pOUTs, cada uno portando uno de los sitios posibles *attC* producto de la recombinación específica de sitio entre *attL* y *attR*. Se eligió el clonado del fragmento OUT ya que es más corto que el IN, con el fin de facilitar la secuenciación. Se obtuvieron clones recombinantes independientes a los que se les extrajo el DNA plasmídico mediante lisis alcalina para su posterior secuenciación con el cebador *out1*. El análisis de la secuencia nucleotídica reveló la existencia de cinco pOUTs distintos, de acuerdo a donde había ocurrido la recombinación: uno en la región de identidad I (*attC<sub>I</sub>*), siete en la región de identidad II (*attC<sub>II</sub>*), diez en la región de identidad III (*attC<sub>III</sub>*), dos en la región de identidad IV

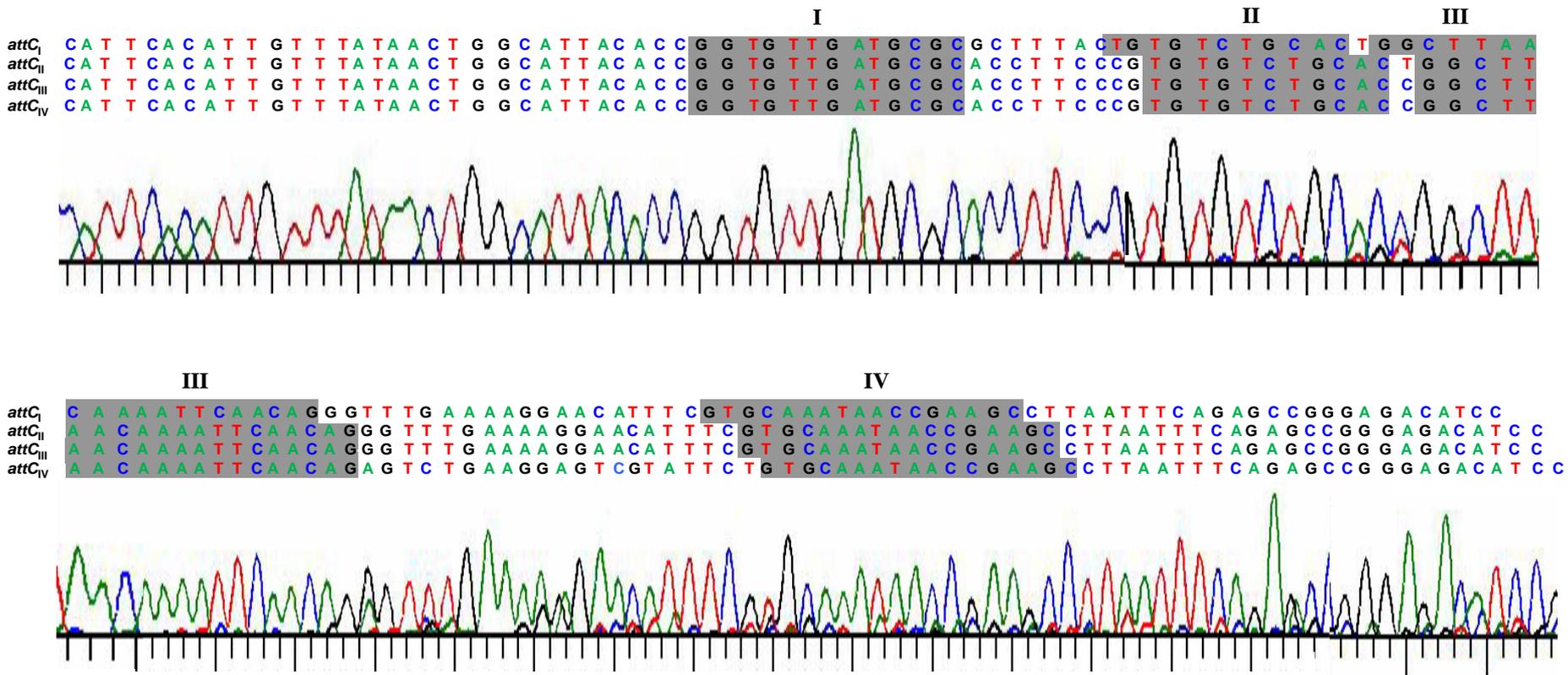
(*attC<sub>IV</sub>*), y uno en una región de identidad muy corta posterior al sitio IV (*attC<sub>V</sub>*) (Fig. 7). Por lo tanto, se determinó que las cuatro regiones de extensa identidad entre los repetidos directos son sitios de recombinación, y más aún se encontró una nueva región de tan sólo cuatro pares de bases de extensión (denominada región V). Estos resultados indicaron que los amplicones OUT e IN serían entonces heterogéneos, i.e. estarían integrados por una mezcla de fragmentos resultantes de la recombinación en las distintas regiones de identidad.

En este sentido, la secuenciación nucleotídica directa del amplicón OUT mostró secuencias solapantes a nivel de los sitios correspondientes a nucleótidos diferentes dependiendo de en qué región había ocurrido la recombinación (Fig. 8). Cabe señalar que se amplificó el fragmento OUT, se corrió en un gel de agarosa y la banda correspondiente al mismo se purificó, eliminando así el molde empleado en la reacción. Para la secuenciación se utilizó el cebador *outI*. Al comienzo, la lectura fue única, pero una vez pasada la región de identidad I se observaron lecturas adicionales exactamente en los sitios donde se esperaba encontrar dos o más nucleótidos si el DNA era una mezcla de secuencias que recombinaron en distintas regiones. De esta manera se evidenciaron las regiones de identidad I a IV como sitios de recombinación, no así la región V. Muy probablemente, la secuencia *attC<sub>V</sub>* no se detectó en el cromatograma debido a la baja frecuencia de recombinación en esta pequeña región de identidad. En coincidencia con los resultados del clonado pOUT, en el que el sitio *attC<sub>III</sub>* fue el más frecuente, la lectura mayoritaria cambió de *attL* a *attR* pasada la región identidad III, indicando entonces que la mayoría de los eventos de escisión tienen lugar en esta región.

Por lo tanto, se confirmó que los sitios *attL* y *attR* que flanquean el sistema MccH47 son regiones donde opera la recombinación específica de sitio. Más aún, se demostró que son secuencias complejas que contienen múltiples sitios de recombinación.

		I	*	II	*	III	*
<i>attL</i>	CATTCACATGTTTATAA	CTGGCATTACA	CCGGTGTGATGCGCAC	CTTCCCGTGTGCTGCAC	CGGCTTAACAAAATTCAACAG	AGTC	
<i>attC<sub>I</sub></i>	CATTCACATGTTTATAA	CTGGCATTACA	CCGGTGTGATGCGCGCTTTAC	--TGTGTCTGCAC	TGGCTTAACAAAATTCAACAG	GGT	
<i>attC<sub>II</sub></i>	CATTCACATGTTTATAA	CTGGCATTACA	CCGGTGTGATGCGCAC	CTTCCCGTGTGCTGCAC	TGGCTTAACAAAATTCAACAG	GGT	
<i>attC<sub>III</sub></i>	CATTCACATGTTTATAA	CTGGCATTACA	CCGGTGTGATGCGCAC	CTTCCCGTGTGCTGCAC	CGGCTTAACAAAATTCAACAG	GGT	
<i>attC<sub>IV</sub></i>	CATTCACATGTTTATAA	CTGGCATTACA	CCGGTGTGATGCGCAC	CTTCCCGTGTGCTGCAC	CGGCTTAACAAAATTCAACAG	GTC	
<i>attC<sub>V</sub></i>	CATTCACATGTTTATAA	CTGGCATTACA	CCGGTGTGATGCGCAC	CTTCCCGTGTGCTGCAC	CGGCTTAACAAAATTCAACAG	AGTC	
<i>attR</i>	CATATACTCGAAATAAAC	CATCATTICA	--GGTGTGATGCGCGCTTTAC	--TGTGTCTGCAC	TGGCTTAACAAAATTCAACAG	GGT	
<i>attI<sub>III</sub></i>	CATATACTCGAAATAAAC	CATCATTICA	--GGTGTGATGCGCGCTTTAC	--TGTGTCTGCAC	TGGCTTAACAAAATTCAACAG	AGTC	
		IV	*	V	*		
<i>attL</i>	TGAAAGGAGTCGTA	TTCGTGCAAATAACCGAAGCGTTAC	TTTTAGT	GACGGG	GTTATCC		
<i>attC<sub>I</sub></i>	TGAAAAGGAACAT	TTC-GTGCAAATAACCGAAGCCTTAA	TTTCAGAGCCGGGAGAC	ATCC			
<i>attC<sub>II</sub></i>	TGAAAAGGAACAT	TTC-GTGCAAATAACCGAAGCCTTAA	TTTCAGAGCCGGGAGAC	ATCC			
<i>attC<sub>III</sub></i>	TGAAAAGGAACAT	TTC-GTGCAAATAACCGAAGCCTTAA	TTTCAGAGCCGGGAGAC	ATCC			
<i>attC<sub>IV</sub></i>	TGAAAGGAGTCGTA	TTCGTGCAAATAACCGAAGCCTTAA	TTTCAGAGCCGGGAGAC	ATCC			
<i>attC<sub>V</sub></i>	TGAAAGGAGTCGTA	TTCGTGCAAATAACCGAAGCCTTAC	TTTTAGT	GACGGG	GTTATCC		
<i>attR</i>	TGAAAAGGAACAT	TTC-GTGCAAATAACCGAAGCCTTAA	TTTCAGAGCCGGGAGAC	ATCC			
<i>attI<sub>III</sub></i>	TGAAAGGAGTCGTA	TTCGTGCAAATAACCGAAGCCTTAC	TTTTAGT	GACGGG	GTTATCC		

**Fig. 7. Secuencia nucleotídica de los sitios *attL*, *attR*, *attC* y *attI* relativos al sistema genético *MccH47*.** Se pintan en celeste y rosado los nucleótidos específicos de los sitios *attL* y *attR*, respectivamente. Se indican en gris y con números romanos las cinco regiones de identidad donde ocurre la recombinación (I-V) y se consignan de igual manera los sitios *attC* y *attI* que las portan. Se señalan con asteriscos las posiciones donde ocurre el cambio de secuencia de *attL* a *attR* posteriores a una región de identidad.



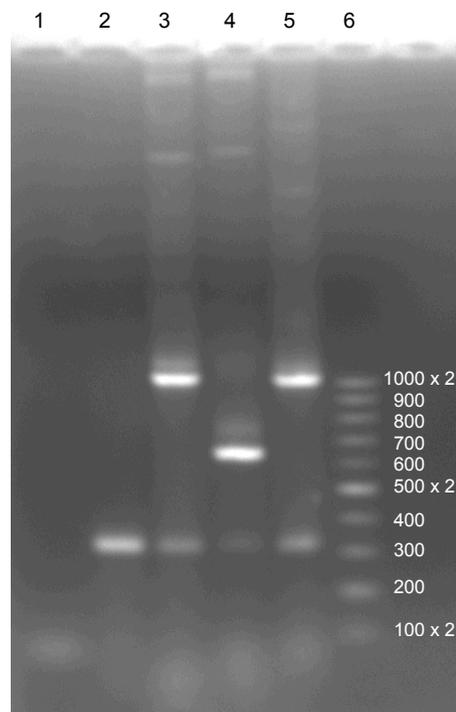
**Fig. 8. Secuencia nucleotídica y cromatograma de un amplicón OUT en la porción correspondiente al sitio *attC*.** Se representan las secuencias nucleotídicas de los sitios *attC* I a IV. Los solapamientos en el cromatograma revelan la existencia de distintos productos de amplificación según la región en que ocurrió la recombinación. En gris y con números romanos se indican las regiones de identidad I a IV donde ocurre la recombinación. Las bases se representan con distintos colores: A, verde; C, azul; G, negro, y T, rojo.

## 4.2. Localización de los genes de movilidad del sistema genético MccH47

Previamente se había demostrado la escisión del sistema genético MccH47 desde plásmidos recombinantes portadores del fragmento H-H procedentes del contexto *E. coli* K12 (Bascuas, 2010). Esto era lo esperado, puesto que los genes de movilidad se encuentran típicamente dentro de las islas. Sin embargo, ninguno de los genes del sistema MccH47 exhibió similitud con determinantes para integrasas o excisionasas. Por lo tanto, el primer abordaje fue eliminar de la manera más exhaustiva posible la información genética correspondiente al sistema MccH47. La estrategia experimental consistió en realizar construcciones genéticas carentes del sistema MccH47 y evaluar posteriormente la escisión a partir de cada una de ellas. Primero, se realizó la construcción del plásmido p $\Delta$ int1, carente de la mayor parte del sistema MccH47, según se describe en materiales y métodos (Fig. 6A). La escisión a partir de este plásmido se evaluó únicamente por amplificación con los cebadores *out1* y *out2* ya que dicha construcción carecía de la secuencia complementaria a los cebadores *in1* e *in2*. Si hubiera escisión se obtendría el fragmento OUT de 316 pb. Asimismo, hubiera o no escisión, se esperaba obtener un amplicón de 1.013 pb correspondiente al segmento derivado del fragmento H-H portado por p $\Delta$ int1 (Figs. 6A y 9). Efectivamente, se detectó el producto de 1.013 pb pero, sorprendentemente, también apareció el amplicón OUT de 316 pb. Este resultado indicaría entonces que los genes de movilidad no se localizan dentro del sistema MccH47. Sin embargo, dado que se encontraron dos posibles y pequeños marcos abiertos de lectura (ORFs) en la escasa secuencia de sistema MccH47 que porta p $\Delta$ int1 (556 pb), se construyó un segundo plásmido para corroborar la hipótesis. Dicha construcción, denominada p $\Delta$ int2, careció de prácticamente todo el sistema MccH47, incluidos los dos ORFs en cuestión (Fig. 6B). Se ensayó la escisión por amplificación con los cebadores *out*, detectándose nuevamente el fragmento OUT de 316 pb. Además, se obtuvo un amplicón de 637 pb correspondiente al segmento derivado del fragmento H-H portado por p $\Delta$ int2 (Fig. 9). De esta forma se determinó que los genes de movilidad no se ubican dentro del sistema genético MccH47, por lo que surgió la posibilidad de que se localizaran en las regiones cromosómicas adyacentes presentes en el fragmento H-H. En este sentido, se había detectado un ORF en la región adyacente izquierda con alta identidad a genes para excisionasas fágicas presentes en islas genómicas de cepas de *E. coli* (Bascuas, 2010). Para evaluar esta alternativa se construyó el plásmido p $\Delta$ ext, que contiene los repetidos directos y carece del sistema MccH47 y de la mayor parte de las regiones adyacentes

(Fig. 6C). Dicha construcción se obtuvo clonando el producto de amplificación con los oligonucleótidos *out* a partir de p $\Delta$ int1, según se describe en materiales y métodos. Es así entonces que se esperaba obtener un amplicón de 1.013 pb y que la escisión no tuviera lugar en este contexto. Sorprendentemente, además del amplicón de 1.013 pb, se obtuvo el fragmento OUT de 316 pb, descartado así que los genes de movilidad del sistema MccH47 se encuentren en las regiones cromosómicas adyacentes al sistema (Fig. 9).

Por lo tanto, los genes de movilidad del sistema MccH47 no están contenidos en el fragmento H-H sino que se encontrarían en una región del cromosoma no ligada al sistema.



**Fig. 9. Localización de los genes de movilidad del sistema genético MccH47.** Amplificaciones con los oligonucleótidos *out* a partir del DNA plasmídico de las construcciones genéticas portadoras de distintos segmentos del fragmento H-H. 1: control sin DNA molde, 2: pEX2000, 3: p $\Delta$ int1, 4: p $\Delta$ int2, 5: p $\Delta$ ext y 6: marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, Bioron).

### **4.3. Relevamiento de la movilidad del sistema genético MccH47 y de la presencia de su plataforma de integración en una colección de aislamientos de UPEC**

El análisis de la secuencia nucleotídica del sistema MccH47 contra los bancos de datos indicó que este sistema está integrado o tendría la capacidad de hacerlo en el cromosoma de algunas cepas de *E. coli* (Fig. 3). En este sentido, estudios realizados en nuestro laboratorio determinaron la presencia del sistema MccH47 en algunas cepas uropatógenas de *E. coli* (Azpiroz et al., 2009; Poey, 2011). Por lo tanto, a partir de estos antecedentes, nos preguntamos si el sistema MccH47 presente en estas cepas era capaz de escindirse. Asimismo, nos planteamos la búsqueda de la plataforma de integración del sistema en el resto de los aislamientos. Se procedió entonces a analizar por PCR, usando los oligonucleótidos *out*, un total de 301 aislamientos de UPEC. Las amplificaciones se realizaron a partir del DNA genómico de los mismos. En principio, la aparición del amplicón OUT podía deberse a: 1) la escisión del sistema MccH47, que daría lugar a una plataforma vacía y 2) la presencia de una plataforma vacía capaz de integrar el sistema genético MccH47.

#### **4.3.1. Análisis de los aislamientos con perfil II**

En esta instancia, el relevamiento se centró en la búsqueda de la plataforma de integración del sistema genético MccH47 en los 12 aislamientos con perfil II (Tabla 3). Dado que *E. coli* H47 integra este perfil, se preveía entonces que el sistema genético MccH47 contenido en dichos aislamientos tuviera también la capacidad de escindirse. De ser así, la aparición del amplicón OUT evidenciaría la escisión del sistema MccH47 en estos aislamientos. Efectivamente, tanto a partir del DNA genómico de la cepa *E. coli* H47 como de todos los aislamientos con perfil II se observó una banda correspondiente al fragmento OUT (Fig. 10). En la mayoría de los casos aparecieron bandas tenues, incluyendo la cepa de referencia *E. coli* H47. Sin embargo, cabe destacar que dos aislamientos (II-2 y II-3) dieron lugar a una banda de notoria intensidad. Todas las amplificaciones se hicieron por duplicado dando el mismo resultado.

En suma, se detectó la plataforma de integración del sistema genético MccH47 en todos los aislamientos de UPEC con perfil II.

**Tabla 3.** Aislamientos de UPEC con perfil II positivos para el fragmento OUT (tomado de Poey, 2011)

Cepa	Producción HMMM	G.F	Genes microcina						Genes de virulencia		
			<i>mch ASI</i>	<i>mci A</i>	<i>mch B</i>	<i>mch C</i>	<i>mcm A</i>	<i>cva C</i>	Fimbrias	Adquisición de Fe	Citotoxinas
H47	H47	A	+	+	+	+	+	-	-	+	-
II-1	H47	A	+	+	+	+	+	-	-	+	-
II-2	H47	B1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
II-3	H47	B1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
II-4	H47	D	+	+	+	+	+	-	-	-	-
II-5	H47	A	+	+	+	+	-	-	+	+	-
II-6	H47	A	+	+	+	+	-	-	-	+	-
II-7	H47	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-
II-8	-	A	+	+	+	+	-	-	-	+	-
II-9	-	A	+	+	+	+	-	-	-	+	-
II-10	-	A	+	+	+	+	-	-	-	+	-
II-11	-	A	+	+	+	+	-	-	-	+	-
II-12	-	B1	+	+	+	+	-	-	-	+	-

II: aislamientos con perfil II

- : ausencia de producción de HMMM

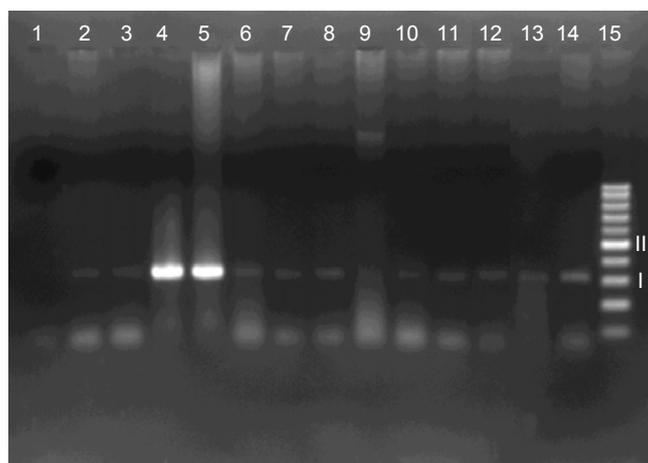
G.F: grupo filogenético

*mchASI*: fragmento que abarca parte de *mchA* y parte de *mchS1*

Genes para fimbrias: (*papC*, *papGII*, *papGIII*) (P) y *sfaA* (S)

Genes para adquisición de Fe: *iutA* (receptor de aerobactina), *fyuA* (receptor de yersiniabactina) e *iroN* e *iroBC* (receptor y proteínas involucradas en la síntesis y exportación de salmoquelinas)

Genes para citotoxinas: *hlyA* (hemolisina) y *cnf* (factor citotóxico necrotizante)



**Fig. 10.** Amplificación del fragmento OUT a partir de los aislamientos con perfil II. 1: control sin DNA molde; 2: H47; 3 a 14: II-1 a II-12, y 15: Ladder 100 pb (Bioron), I: banda de 300 pb y II: banda de 500 pb. El orden de los carriles se corresponde con el orden de la tabla 3.

#### 4.3.2. Análisis de los restantes aislamientos

En segundo lugar, se realizó el relevamiento de la plataforma de integración en el resto de los aislamientos, i.e. los pertenecientes a los perfiles I y III, así como aquéllos sin perfil (SP). Además, se incluyeron en el análisis las cepas de *E. coli* CFT073 y Nissle<sub>1917</sub>, como referencia del perfil I, y PAP222, como referencia del perfil III. En este caso, consideramos que la aparición del fragmento OUT podría indicar la presencia de una plataforma vacía capaz de integrar el sistema MccH47. Cabe señalar que si bien los aislamientos del perfil I contienen varios genes *mch*, el sistema genético MccH47 no está completo, ya que al menos carece de los genes *mchA*, *mchS1* y *mciA* (ver más abajo) (Azpiroz et al., 2009; Poey, 2011). Más aún, en las cepas de referencia de este perfil, CFT073 y Nissle<sub>1917</sub>, el sistema MccH47 carece no sólo de algunos genes *mch* sino también del sitio *attL* (Fig. 3). Por lo tanto, muy probablemente en los aislamientos con perfil I tampoco esté presente el sitio *attL*. Es así entonces que la ausencia de uno de los sustratos de recombinación impediría la escisión y la obtención de un fragmento OUT producto de este fenómeno. Del total de los aislamientos relevados en esta instancia, 45 fueron positivos para el amplicón OUT: 12 con perfil I, siete con perfil III y 26 sin perfil (Tabla 4 y Fig. 11). En su mayoría dieron lugar a una banda intensa. En los casos de amplificación positiva se repitió la determinación, confirmándose el resultado. En cuanto a las cepas de referencia *E. coli* CFT073, Nissle<sub>1917</sub> y PAP222, ninguna de ellas evidenció el fragmento OUT.

En suma, se detectó la plataforma de integración del sistema genético MccH47 en aislamientos de UPEC con perfiles I, III o sin perfil, pertenecientes a los cuatro grupos filogenéticos, con distinto contenido en genes de urovirulencia y en genes microcina.

**Tabla 4.** Aislamientos de UPEC positivos para el fragmento OUT con perfiles I y III y sin perfil (tomado de Poey, 2011)

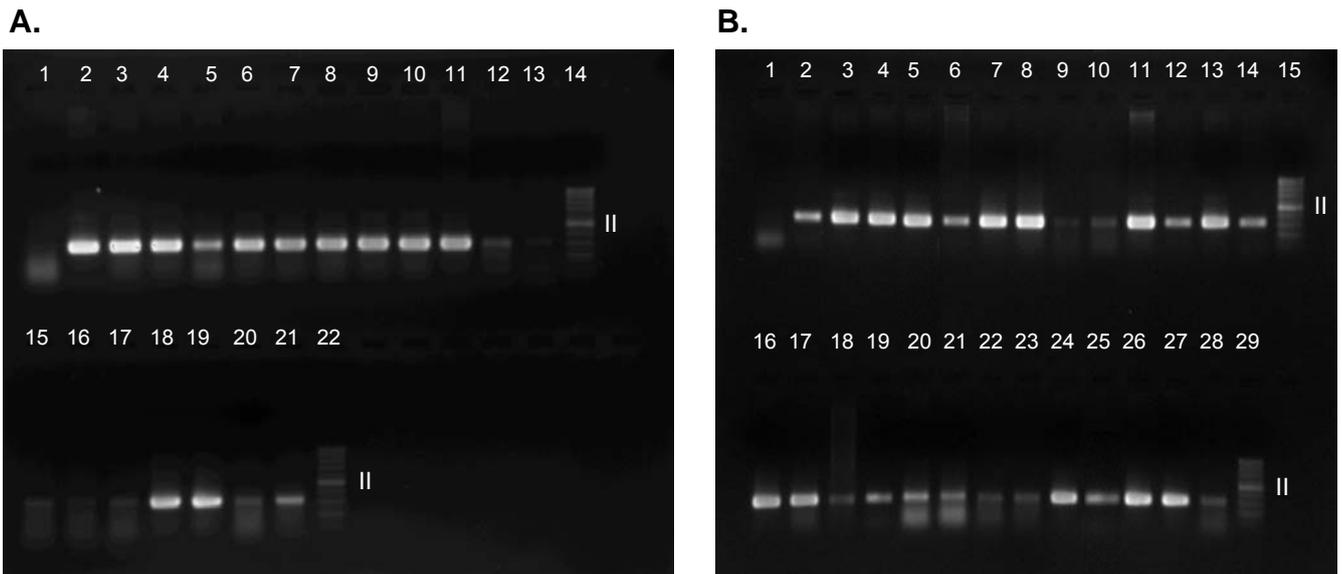
Cepa	Producción HMMM	G.F	Genes microcina						Genes de virulencia		
			<i>mch</i> <i>ASI</i>	<i>mci</i> <i>A</i>	<i>mch</i> <i>B</i>	<i>mch</i> <i>C</i>	<i>mcm</i> <i>A</i>	<i>cva</i> <i>C</i>	Fimbrias	Adquisición de Fe	citotoxinas
I-1	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-2	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-3	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-4	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-5	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-6	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-7	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-8	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-9	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-10	H47 y M	B2	-	-	+	+	+	-	+	+	+
I-11	-	B2	-	-	-	-	+	-	+	+	+
I-12	-	B2	-	-	-	-	+	-	+	+	+
III-1	ColV	A	-	-	-	-	-	+	-	+	-
III-2	ColV	D	-	-	-	-	-	+	-	+	-
III-3	ColV	B1	-	-	-	-	-	+	-	+	-
III-4	ColV	B1	-	-	-	-	-	+	-	+	-
III-5	ColV	B1	-	-	-	-	-	+	-	+	-
III-6	ColV	A	-	-	-	-	-	+	-	+	-
III-7	-	B1	-	-	-	-	-	+	-	+	-
SP-1	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP-2	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP-3	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP-4	-	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP-5	-	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP-6	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP-7	-	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP-8	-	B2	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-9	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-10	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-11	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-12	-	D	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-13	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-14	-	D	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-15	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-16	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SP-17	-	B1	+	-	-	-	+	-	+	+	-
SP-18	-	B2	-	-	-	+	-	-	+	+	-
SP-19	-	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	-
SP-20	-	B1	-	-	-	-	-	-	+	+	-
SP-21	-	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SP-22	-	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SP-23	-	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SP-24	-	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SP-25	-	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SP-26	-	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	+

I: aislamientos con perfil I

III: aislamientos con perfil III

SP: aislamientos sin perfil

Los restantes códigos son los mismos que en la Tabla 3



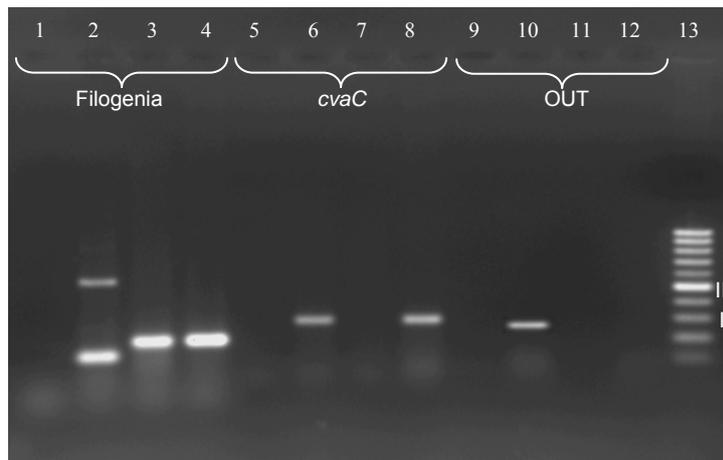
**Fig. 11. Aislamientos pertenecientes a los perfiles I y III, y sin perfil positivos para el fragmento OUT.** **A.** Amplificación *out* a partir de los aislamientos pertenecientes a los perfiles I y III. 1: control sin DNA molde; 2 a 13: I-1 a I-12; 14 y 22: Ladder 100 pb (Bioron); 15 a 21: III-1 a III-7. **B.** Amplificación *out* a partir de los aislamientos sin perfil. 1: control sin DNA molde; 2 a 14: SP-1 a SP-13; 15 y 29: Ladder 100 pb (Bioron); 16 a 28: SP-14 a SP-26. II: banda de 500 pb. El orden de los carriles se corresponde con el orden de la tabla 4.

#### 4.3.3. Búsqueda de la localización del sitio de integración del sistema MccH47 en algunos aislamientos de UPEC con perfil III

En primera instancia, nos centramos en determinar la vinculación entre la presencia de la plataforma de integración del sistema genético MccH47 y los genes para la producción de ColV. Esto resultaba interesante ya que los determinantes para la antibiosis ColV se han asociado siempre a plásmidos, denominados genéricamente pColV (Waters & Crosa, 1991; Azpiroz et al., 2009). Por lo tanto, el hecho de encontrar la plataforma de integración en aislamientos pertenecientes al perfil III planteaba la posibilidad de que ésta pudiese localizarse en plásmidos ColV. Cabe recordar que, hasta el momento, sólo se ha descrito la presencia del sistema MccH47 en el cromosoma bacteriano (Laviña et al., 1990; Chaudhuri et al., 2010).

Concretamente, se realizaron experimentos de conjugación para transferir el plásmido ColV de cinco aislamientos productores de ColV y positivos para el fragmento OUT (III-1 a III-5) a FGB20, cepa de *E. coli* K12, según se describe en materiales y métodos. Se obtuvieron clones transconjugantes productores de ColV únicamente a partir del aislamiento III-3 (T.II-3). Posteriormente, se extrajo el DNA genómico del transconjugante para realizar su análisis genotípico por PCR (Fig. 12). Primero, se determinó que pertenecía al grupo filogenético A al igual que la cepa

receptora F GB20, indicando así que efectivamente se trataba de un transconjugante. Luego, se analizó la presencia del gen de actividad para ColV (*cvaC*) y la presencia de la plataforma de integración (fragmento OUT). Como era esperado para una cepa productora de ColV, el transconjugante fue positivo para la amplificación del gen *cvaC*. Sin embargo, no se amplificó el fragmento OUT a partir del transconjugante, lo que indicó entonces que el plásmido ColV albergado por el aislamiento III-3 no contenía la plataforma de integración del sistema genético MccH47.



**Fig. 12. Análisis genotípico del transconjugante III-3.** 1: control sin DNA molde; 2: III-3; 3: FGB20; 4: T.III-3; 5: control sin DNA molde; 6: III-3; 7: FGB20; 8: T.III-3; 9: control sin DNA molde; 10: III-3; 11: FGB20; 12: T.III-3; 13: Ladder 100 pb (Bioron), I: banda de 300 pb y II: banda de 500 pb.

En segunda instancia, nos centramos en el análisis de los aislamientos III-4 y III-5 ya que presentaban ciertas características que sugerían que la plataforma de integración podía estar localizada en un plásmido. Estas cepas habían sido aisladas del mismo paciente en un corto periodo de tiempo. Además, entre estas dos cepas, se obtuvo del mismo paciente otro aislamiento, que denominaremos “x”. Se consideró la posibilidad de que este trío fuera una misma cepa de base que variaba de un aislamiento a otro según su contenido plasmídico (Tabla 5). Por un lado, los tres aislamientos pertenecían al grupo filogenético B1 y contenían el gen *iutA*, que codifica para el receptor del sideróforo aerobactina. El aislamiento III-5 fue idéntico al III-4 excepto que sólo presentó cinco resistencias de las ocho que poseía III-4. El aislamiento x carecía de un plásmido ColV (no producía ColV y no portaba el gen *cvaC* ni los genes *iroN* e *iroBC* para la producción de salmouelinas) y era resistente a tres antibióticos a los que resistía III-4 pero para los que justamente III-5 era sensible. Pero más relevante aún fue

que, a diferencia de los aislamientos III-4 y III-5, x no poseía la plataforma de integración del sistema genético MccH47. Se consideró entonces la posibilidad de que esta plataforma tuviese una localización plasmídica y que el plásmido portador de la misma se hubiese perdido en el aislamiento x. De ser así, la plataforma podía estar contenida en algún plásmido presente en III-4 y III-5 y ausente en x, e.g. en pColV o en algún plásmido portador de genes de resistencia del grupo 2 (Ap<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>, Nal<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup> y Tc<sup>R</sup>).

**Tabla 5.** Características de los aislamientos III-4, x y III-5 (tomado de Poey, 2011)

Cepa	Día de obtenida	Producción HMMM	OUT	G.F	<i>cvaC</i>	Genes de virulencia			Resistencia Antibiótica	
						<i>iroN</i>	<i>iroBC</i>	<i>iutA</i>	Grupo 1	Grupo 2
III-4	1	ColV	+	B1	+	+	+	+	+	+
x	25	-	-	B1	-	-	-	+	+	-
III-5	36	ColV	+	B1	+	+	+	+	-	+

Grupo 1: resistencia a cefalotina, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol.

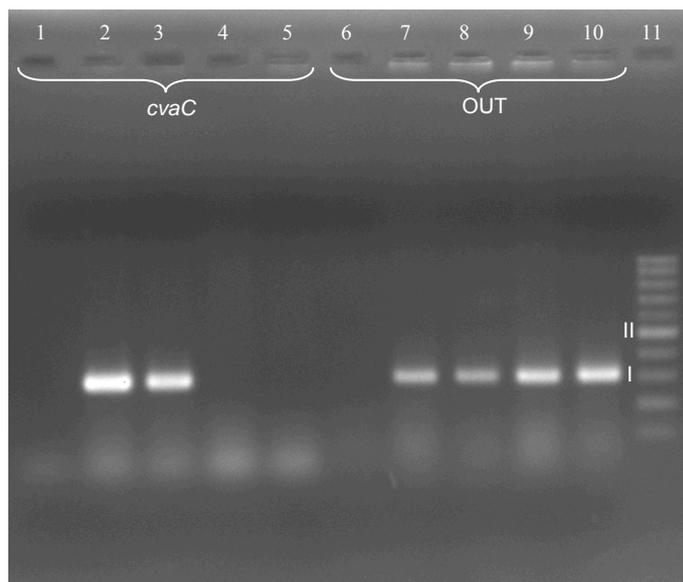
Grupo 2: resistencia a ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomina y tetraciclina.

Los restantes códigos son los mismos que en la Tabla 3.

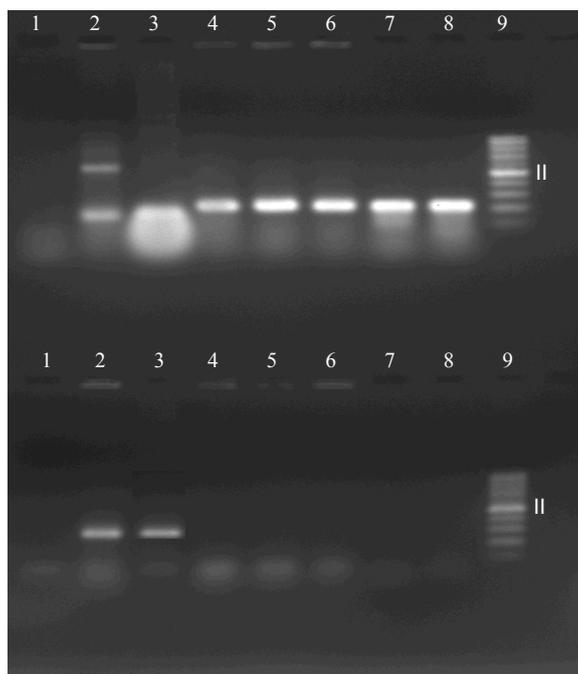
Considerando estas observaciones, se aplicó un procedimiento de “curado de plásmidos” a las cepas III-4 y III-5, según se describe en materiales y métodos. Los clones crecidos después del tratamiento se ensayaron para los fenotipos de producción ColV y resistencia a Ap, Cm y Tc. Se obtuvieron cepas derivadas de III-4 y III-5 no productoras de ColV, pero todos los clones mantuvieron las resistencias antibióticas. Se extrajo entonces el DNA genómico de los clones ColV<sup>-</sup> para realizar amplificaciones del gen *cvaC* y del fragmento OUT (Fig. 13). Como era esperado, todos estos clones fueron negativos para el gen *cvaC*, confirmándose así la ausencia de pColV. En cuanto al fragmento OUT, dichos clones fueron positivos para esta amplificación, lo que indicó que la plataforma de integración del sistema genético MccH47 no estaba contenida en el plásmido ColV portado por los aislamientos III-4 y III-5.

Dado que por este procedimiento no se logró obtener cepas derivadas de III-4 y III-5 sensibles a algún antibiótico del grupo 2, se realizaron experimentos de conjugación, según se describe en materiales y métodos. En este caso, se intentó transferir a una cepa de *E. coli* K12 (FGB20) los posibles plásmidos portadores de los genes para las resistencias a Ap, Cm y Tc de III-4 y III-5. Cabe mencionar que no se pudo evaluar la transferencia de los genes para las resistencias a Nal y Sm ya que no se

contaba con una cepa receptora de *E. coli* K12 sensible a estos antibióticos. De esta forma, se obtuvieron transconjugantes Ap<sup>R</sup> resultantes de la conjugación entre III-4 y FGB20 y transconjugantes Cm<sup>R</sup> resultantes de ambas conjugaciones, entre III-4 y FGB20 y entre III-5 y FGB20. Sin embargo, no se logró obtener transconjugantes Tc<sup>R</sup> a partir de ninguna de las dos conjugaciones, aún luego de repetir el experimento. Posteriormente, los clones Ap<sup>R</sup> y Cm<sup>R</sup> fueron purificados y analizados fenotípica y genotípicamente. Primero, se evaluó el crecimiento de cada tipo de transconjugante en medio rico adicionado de los antibióticos para los que no habían sido seleccionados, i.e. los transconjugantes Ap<sup>R</sup> se ensayaron en LBCm y LBTc, y los transconjugantes Cm<sup>R</sup> en LBAp y LBTc. Asimismo, se estudió su capacidad de producir ColV por la prueba de picada sobre tapiz. Los transconjugantes Ap<sup>R</sup> fueron todos Tc<sup>S</sup> y no productores de ColV, algunos Cm<sup>R</sup> y otros Cm<sup>S</sup>. Por su parte, los transconjugantes Cm<sup>R</sup> fueron todos Ap<sup>S</sup>, Tc<sup>S</sup> y no productores de ColV. Por lo tanto, se transfirieron dos plásmidos, uno portador de la resistencia a Ap y el otro portador de la resistencia a Cm. En segundo lugar, se evaluó mediante PCR el grupo filogenético al que pertenecían, corroborando que todos ellos eran transconjugantes ya que pertenecían al grupo filogenético A al igual que la cepa receptora (Fig. 14). Finalmente, se analizó la presencia de la plataforma de integración del sistema MccH47 por amplificación del fragmento OUT. Ninguno de los transconjugantes generó este amplicón, indicando que dicha plataforma no estaba contenida en ninguno de los plásmidos transferidos.



**Fig. 13. Análisis genotípico de las cepas derivadas de III-4 y III-5 carentes de pColV.** 1: control sin DNA molde; 2: III-4; 3: III-5; 4: III-4 ColV; 5: III-5 ColV; 6: control sin DNA molde; 7: III-4; 8: III-5; 9: III-4 ColV; 10: III-5 ColV; 11: Ladder 100 pb (Bioron), I: banda de 300 pb y II: banda de 500 pb.



**Fig. 14. Análisis genotípico de los transconjugantes III-4 Ap<sup>R</sup>, III-4 Cm<sup>R</sup> y III-5 Cm<sup>R</sup>.** Arriba, determinación del grupo filogenético y abajo, amplificación del fragmento OUT. 1: control sin DNA molde; 2: III-4; 3: III-5; 4: FGB20; 5: T.III-4 Ap<sup>R</sup> Cm<sup>S</sup>; 6: T.III-4 Ap<sup>R</sup> Cm<sup>R</sup>; 7: T.III-4 Cm<sup>R</sup>; 8: T.III-5 Cm<sup>R</sup>; 9: Ladder 100 pb (Bioron), II: banda de 500 pb.

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo corroboran que el sistema genético MccH47 es capaz de escindirse por recombinación específica de sitio. Asimismo, se ha demostrado recientemente la integración de este sistema en una nueva molécula portadora del sitio *attC* (Azpiroz et al., 2011). Por lo tanto, el sistema MccH47 se moviliza como una unidad para escindirse y para integrarse en distintos replicones, cumpliendo así con el criterio más exigente para la identificación de una isla genómica. Es así que denominamos al sistema genético MccH47 “isla genómica H47”. Además, al mantener las funciones de movilidad, debe ser una GI “joven”. En efecto, las islas genómicas jóvenes mantienen su capacidad de moverse, haciendo posible su distribución en otras bacterias. En la medida en que su presencia resulta exitosa para la bacteria hospedera, las islas genómicas inician un proceso de estabilización que siempre comienza por la inactivación de sus funciones de movilidad (Hacker & Kaper, 2000).

Cabe destacar que la mayoría de los experimentos se llevaron a cabo en un contexto *E. coli* K12 gracias a que la región cromosómica de *E. coli* H47 que contiene la isla y sus secuencias adyacentes había sido previamente clonada en varios vectores plasmídicos multicopia. Esto fue posible por el pequeño tamaño de la GI H47 y, de hecho, hasta donde conocemos, éste sería el primer estudio de la movilidad de una isla genómica en contexto recombinante. Esto facilitó en gran forma el estudio de la movilidad de la isla H47 en tanto que permitió obtener construcciones derivadas de las previamente disponibles y propagarlas en cepas de *E. coli* K12. Una ventaja fue la fácil detección de la escisión, observándose siempre a través de una clara banda de amplificación. Muy probablemente esto se deba al alto número de copias de los plásmidos recombinantes utilizados. Asimismo, el hecho de poder estudiar la escisión en células de *E. coli* K12 deficientes para la recombinación homóloga permitió corroborar siempre que este intercambio genético está operado por recombinación específica de sitio.

Previamente, se había clonado y secuenciado el sitio *attC* portado por uno de los productos de escisión (Bascuas, 2010). En esta tesis se completa la identificación de los productos de escisión mediante el clonado y la secuenciación del sitio *attI* portado por la isla H47 como molécula circular independiente. De esta manera se confirma que el intercambio genético ocurre entre las secuencias repetidas directas (*attL* y *attR*) que flanquean el sistema MccH47. Sin embargo, los sitios híbridos inicialmente

secuenciados (*attC* y *attI*) no resultaron de la recombinación en una misma región de identidad entre los repetidos directos. Mediante experimentos independientes de clonado y secuenciación de varios sitios *attC* se dilucidó que la recombinación podía ocurrir en cinco regiones diferentes de identidad entre los sitios *attL* y *attR*. Más aún, estos sitios no serían sustratos igualmente eficientes para el intercambio genético, siendo claramente la región de identidad III la secuencia preferente. Si bien este hallazgo era posible teniendo en cuenta que los repetidos directos son extensos e imperfectos, no deja de ser novedoso para la movilidad de una isla genómica. Hasta el momento, sólo se ha descrito una isla genómica ( $\phi$ SE14 de *S. enterica* serovar enteritidis) con extensos repetidos directos que recombinan en distintas regiones de identidad (Santiviago et al., 2010). Por lo tanto, los repetidos directos que flanquean la GI H47 son secuencias complejas que contienen múltiples sitios de recombinación. Particularmente, uno de ellos presenta una extensión inusualmente corta, siendo tan sólo de cuatro pares de bases.

Considerando que la movilidad de las islas genómicas ocurre por recombinación específica de sitio y que esta última depende de la acción de una integrasa específica y eventualmente de una escisionasa, se realizó la búsqueda de los genes codificantes para estas proteínas. Si bien las GIs generalmente contienen los determinantes para su movilidad, el análisis demostró que la isla H47 carece de dicha información genética. Asimismo, se demostró que las regiones cromosómicas adyacentes a la isla H47 tampoco portan los genes requeridos para la movilidad. Este resultado fue totalmente inesperado pero sumamente informativo ya que revela que las funciones de movilidad de la GI H47 están codificadas en una región no ligada al sistema antibiótico. Más aún, el hecho de haber trabajado en contexto *E. coli* K12 indica que los determinantes de los factores de movilidad serían también provistos por este contexto. Cabe incluso pensar que las proteínas encargadas de efectuar la recombinación específica de sitio puedan estar ampliamente distribuidas en la especie *E. coli* y tal vez también en otras enterobacterias, de modo que la isla H47 tendría un amplio espectro de potenciales hospederos. Si esto fuera así, la integración de la isla en cualquiera de estos hospederos sería exitosa, usando las proteínas de movilidad aportadas por el nuevo contexto. Desde esta visión, la isla H47 seguiría una estrategia original y de alguna manera “parásita” para su movilidad. Algo similar podría pensarse para la isla  $\phi$ SE14 de *S. enterica*, dentro de la cual no se han encontrado los genes de movilidad, según resultados preliminares de los autores (Santiviago et al., 2010).

Teniendo en cuenta la existencia de múltiples sitios de recombinación en los repetidos directos que flanquean la isla, no descartamos que más de una pareja de genes para integrasa-escisionasa lleve a cabo el intercambio genético. En suma, cabe presumir que la identificación de los genes de movilidad de la isla genómica H47 no será sencilla y muy probablemente implicará el desarrollo de un abordaje experimental más complejo y extenso que escapa a los objetivos de este trabajo de tesis.

El relevamiento de la plataforma de integración de la isla genómica H47 en colecciones de *E. coli* uropatógeno aportó información sobre su distribución en las mismas. En principio, la detección del amplicón OUT correspondería a la escisión de la isla en algunas cepas, a la presencia de una plataforma vacía en otras, e incluso a la existencia de ambas estructuras en una misma cepa. Efectivamente, se encontró que varios aislamientos de las colecciones poseían la plataforma.

Un resultado importante fue que todos los aislamientos con perfil II fueron positivos para el fragmento OUT. Teniendo en cuenta que la cepa *E. coli* H47 integra este perfil y que en ella se ha demostrado la movilidad de la isla H47, muy probablemente el amplicón OUT detectado en estos aislamientos resulte de la escisión de la isla desde el cromosoma. En concordancia con esta interpretación, se observaron bandas de amplificación de intensidad débil a partir de la mayoría de los aislamientos, al igual que en *E. coli* H47. Esto era lo esperado considerando que la escisión de la GI H47 ocurriría con muy baja frecuencia y que por lo tanto el DNA molde para la reacción PCR sería muy escaso. De ser así, la isla H47 con capacidad de ser móvil estaría presente en las cepas de UPEC con perfil II. Cabe mencionar que no se observó asociación entre la movilidad de la isla H47 y el mantenimiento de la funcionalidad de los genes que ella contiene, i.e. el amplicón OUT se detectó tanto en aislamientos productores como no productores de MccH47. Por lo tanto, los repetidos directos que flanquean la isla seguirían conservados aún cuando el sistema MccH47 se encuentre mutado. En cuanto a los amplicones OUT generados a partir de los aislamientos II-2 y II-3, que fueron de notoria intensidad, serán necesarios más estudios para comprender este resultado.

Con respecto al resto de los aislamientos, la plataforma de integración se detectó tanto en algunos de los que presentaron perfiles I y III como en algunos que no tenían asignado perfil. Esto abarcó aislamientos con alto, moderado e incluso nulo contenido en factores de urovirulencia, lo que sugiere la ausencia de una asociación entre el contexto de virulencia y la presencia de la plataforma de integración de la GI H47. Cabe

señalar que la mayor parte de estos aislamientos dio lugar a bandas de amplificación intensas, resultado que se repitió en más de una determinación. En estos casos presumimos que las amplificaciones podrían corresponder a plataformas de integración originalmente vacías, de modo que la abundancia de DNA molde daría lugar a un alto rendimiento en la reacción PCR. En cuanto a los aislamientos que generaron amplificaciones tenues, una posible explicación sería que los oligonucleótidos *out* hibridaran parcialmente con el DNA cromosómico. Esto implicaría entonces amplificaciones de distinta intensidad e incluso ausencia de las mismas aún cuando existiera una plataforma de integración en el aislamiento. En este sentido, si bien el análisis de la secuencia nucleotídica de las cepas de referencia *E. coli* CFT073 y Nissle<sub>1917</sub> revela la existencia de una plataforma de integración vacía, no se detectó el amplicón OUT a partir de ellas ya que no poseen la secuencia complementaria al oligonucleótido *out1*. Otra posibilidad que no podemos descartar es que otro tipo de información genética distinta del sistema MccH47 sea capaz de integrarse en la misma plataforma, por lo que las bandas tenues podrían corresponder a la escisión de eventuales islas alternativas.

En términos generales, si bien asumimos que la intensidad de las bandas de amplificación obtenidas podría ser indicativa de la presencia de distintas estructuras genéticas, será necesario efectuar una cuantificación de las amplificaciones para obtener mayor apoyo a las interpretaciones anteriormente mencionadas.

Por último, la presencia de la plataforma de integración de la GI H47 en aislamientos del perfil III planteaba la posibilidad de que dicha plataforma estuviera contenida en plásmidos ColV. Sin embargo, mediante experimentos de transferencia y curado de plásmidos se pudo determinar que pColV de al menos tres aislamientos no la portaban. Por otro lado, la posible vinculación entre los aislamientos III-4 y III-5 sugirió que la plataforma de integración de la isla podía estar ligada a resistencias antibióticas posiblemente codificadas en plásmidos. Nuevamente mediante experimentos de conjugación se comprobó que dicha plataforma no estaba contenida en plásmidos portadores de genes para algunas de las resistencias de estas cepas. Por lo tanto, las evidencias hasta ahora alcanzadas indican que la plataforma de integración de la isla genómica H47 tiene una localización cromosómica.

## 6. CONCLUSIÓN

En suma, el sistema genético MccH47 es una isla genómica pequeña que tiene la capacidad de movilizarse por recombinación específica de sitio. Como tal, exhibe características novedosas en cuanto a su estructura y sus funciones de movilidad. La GI H47 está flanqueada por repetidos directos extensos e imperfectos compuestos por un tándem de cinco regiones de identidad donde opera la recombinación. Además, no contiene los determinantes de movilidad necesarios para llevar a cabo la recombinación, por lo que estos genes deben ser provistos por el contexto genético de la bacteria donde la isla se integra. Asimismo, la isla H47 es un elemento genético móvil que se encuentra integrado o tiene el potencial de hacerlo en el cromosoma de otras cepas, incluyendo variantes uropatógenas de *E. coli*.

## 7. PERSPECTIVAS

**1- Continuar la búsqueda de las recombinasas específicas de sitio que operan la movilidad de la isla genómica H47.** Dado que en este trabajo se determinó que el contexto *E. coli* K12 aporta las funciones de movilidad, se prevé evaluar la escisión de la GI H47 en una colección de estirpes mutantes para las recombinasas específicas de sitio codificadas en el cromosoma de *E. coli* K12. En este sentido, se encuentra disponible la colección Keio, que consiste en un conjunto de mutantes nulos para la mayoría de los genes del cromosoma de *E. coli* K12 (Baba et al., 2006). Se adquirirán entonces todos los mutantes deficientes para las recombinasas específicas de sitio de esta colección y se evaluará en cada uno la escisión de la GI H47. Para ello, se introducirá en cada contexto mutante un plásmido que porte la GI H47 y se evaluará la escisión de la isla por PCR. Más aún, considerando la existencia de múltiples sitios de recombinación en los repetidos directos que flanquean la isla, se prevé que más de una recombinasa específica de sitio opere la movilidad. Por lo tanto, no se descarta construir mutantes dobles o triples en genes para distintas recombinasas y evaluar en ellos la escisión de la GI H47.

**2- Estudio del entorno genético de la plataforma de integración de la GI H47 en los aislamientos de UPEC relevados.** Dado que la distinción entre plataforma vacía y plataforma producto de escisión se basó provisionalmente por la intensidad del amplicón OUT obtenido, es necesario llevar a cabo otros análisis para corroborar estos resultados. Se apuntará al conjunto de aislamientos a los que se asignó la presencia de una plataforma vacía. Para corroborar que efectivamente es así, se realizarán las amplificaciones combinadas *out1* x *in1* y *out2* x *in2* a partir del DNA genómico de cada aislamiento. De esta manera se podrá distinguir la presencia de una plataforma vacía de aquella que contenga información relacionada con la isla H47. En caso de ser una plataforma vacía no se obtendrían amplificaciones mientras que de contener información *mch* sí se generarían amplicones. En cuanto a eventuales plataformas resultantes de la escisión de información genética no relacionada a la isla H47, se prevé realizar amplificaciones con los cebadores *out* utilizando una polimerasa altamente procesiva. De obtenerse amplicones, éstos se clonarán para su posterior secuenciación nucleotídica.

## 8. REFERENCIAS

- Asensio, C., J.C. Perez-Díaz, M.C. Martínez y F. Baquero.** 1976. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**: 7-14.
- Azpiroz, M.F. y M. Laviña.** 2004. Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of Microcin H47. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **48**: 1235-1241.
- Azpiroz, M.F. y M. Laviña.** 2007. Modular structure of Microcin H47 and Colicin V. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **51**: 2412-2419.
- Azpiroz, M.F., T. Bascuas y M. Laviña.** 2011. Microcin H47 system: An *Escherichia coli* small genomic island with novel features. *PloS ONE.* **6**: e26179.
- Azpiroz, M.F., M.E. Poey y M. Laviña.** 2009. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microbiol Pathogenesis.* **47**: 274-280.
- Azpiroz, M.F., E. Rodríguez y M. Laviña.** 2001. The structure, function, and origin of the Microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of Colicin V. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **45**: 969-972.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, et al.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Systems. Biol.* doi: 10.1038/msb4100050:21.
- Bascuas, T.** 2010. Estudio de la movilidad del sistema genético microcina H47. Pasantía para la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de la República.
- Benedek, O. y S. Schubert.** 2007. Mobility of the *Yersinia* High-Pathogenicity Island (HPI): transfer mechanisms of Pathogenicity Islands (PAIs) revisited. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* **54**: 89-105.
- Birnboim, H.C. y J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513.
- Boyer, A.E. y P.C. Tai.** 1998. Characterization of the *cvaA* and *cvi* promoters of the Colicin V export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J. Bacteriol.* **180**: 1667-1672.
- Burrus, V. y M.K. Waldor.** 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* **155**: 376-386.
- Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris y G. Guédon.** 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* **46**: 601-610.
- Chaudhuri, R.R., M. Sebahia, J.L. Hobman, M.A. Webber, D.L. Leyton, M.D. Goldberg, et al.** 2010. Complete genome sequence and comparative metabolic

profiling of prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. PLoS ONE. **5**: e8801.

- Chowdhury, K.** 1991. One step “miniprep” method for the isolation of plasmid DNA Nucleic Acids Res. **19**: 1141-1156.
- Clermont, O., S. Bonacorsi y E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 4555-4558.
- Daccord, A., D. Ceccarelli y V. Burrus.** 2010. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. Mol. Microbiol. **78**: 576-588.
- Douard, G., K. Praud, A. Cloeckaert y B. Doublet.** 2010. The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in *trans* by the incA/C multidrug resistance plasmid family. PLoS ONE. **5**: e15302.
- Gaggero, C., F. Moreno y M. Laviña.** 1993. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. J. Bacteriol. **175**: 5420-5427.
- Grozdánov, L., C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenbora, G. Gottschalk, J. Hacker, et al.** 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. J. Bacteriol. **186**: 5432-5441.
- Hacker, J. y E. Carniel.** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. EMBO reports. **2**: 376-381.
- Hacker, J. y J.B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. **54**: 641-679.
- Hochhut, B., C. Wilde, G. Balling, B. Middendorf, U. Dobrindt, E. Brzuszkiewicz, et al.** 2006. Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Mol. Microbiol. **61**: 584-595.
- Huang, X., y W. Miller.** 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. Adv. Appl. Math. **12**: 337-357.
- Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R.M. Harding, D.W. Hood y D.W. Crook.** 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol. **33**: 376-393.
- Laviña, M., C. Gaggero y F. Moreno.** 1990. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**: 6585-6588.
- Laviña, M., A.P. Pugsley y F. Moreno.** 1986. Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for Microcin B7 action on *Escherichia coli* K12. J. Gen. Microbiol. **132**: 1685-1693.

- Lin, T., C. Lee, P. Hsieh, S. Tsai y J. Wang.** 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICE*Kp1*-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J. Bacteriol.* **190**: 515-526.
- Mansi, M., K.J. Anderson, C.A. Inche, L.K. Knowles y D.J. Platt.** 2000. Isolation and curing of the *Klebsiella pneumoniae* large indigenous plasmid using sodium dodecyl sulphate. *Res Microbiol.* **151**:201-208.
- Middendorf, B., B. Hochhut, K. Leipold, U. Dobrindt, G.B. Oehler y J. Hacker.** 2004. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J. Bacteriol.* **186**: 3086-3096.
- Miller, J.H.** 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Novick, R.P, G.E Christie y J.R Penadés.** 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature Rev.* **8**: 541-551.
- Patzer, S.I., M.R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno y K. Hantke.** 2003. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology.* **149**: 2557-2570.
- Poey, M.E.** 2011. Microcinas y virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógeno. Tesis de Doctorado PEDECIBA Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República.
- Poey, M.E., M.F. Azpiroz y M. Laviña.** 2006. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **50**: 1411-1418.
- Pugsley, A.P.** 1985. *Escherichia coli* K12 strains for use in the identification and characterization of Colicins. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 369-376.
- Rajanna, C., J. Wang, D. Zhang, Z. Xu, A. Ali, Y.M. Hou, et al.** 2003. The *Vibrio* pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholera* forms precise extrachromosomal circular excision products. *J. Bacteriol.* **185**: 6893-6901.
- Rodríguez, E. y M. Laviña.** 2003. The proton channel is the minimal structure of ATP synthase necessary and sufficient for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 181-187.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santiviago, C.A., C.J. Blodel, C.P. Quezada, C.A. Silva, P.M. Tobar, S. Porwollik, et al.** 2010. Spontaneous excision of the *Salmonella enterica* serovar enteritidis-specific defective prophage-like element  $\phi$ SE14. *J Bacteriol.* **192**: 2246-2254.

- Schmidt, H. y M. Hensel.** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 14-56.
- Waldor, M.K.** 2010. Mobilizable genomic islands: going mobile with oriT mimicry. *Mol. Microbiol.* **78**: 537-540.
- Waters, V.L. y J.H. Crosa.** 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* **55**: 437-450.
- Wozniak, R. A. F. y M. K. Waldor.** 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Rev.* **8**: 552-563.

## 9. ANEXO 1

### MEDIOS DE CULTIVO

#### Medio completo Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992)

Contiene por litro de solución:

bactotriptona.....	10g
extracto de levadura.....	5,0g
NaCl.....	10g

El medio LB sólido se prepara añadiendo 15g de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (30 min. a 121°C).

#### Medio mínimo M63

Contiene por litro de solución:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	4,5g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	9,8g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	2,0g

Se añaden 15g de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (30 min. a 121°C) y posteriormente se agregan 1ml de  $\text{MgSO}_4$  (1M), 10ml de glucosa al 20% y 1ml de vitamina B1 (1mg/ml).

#### M63 sales

Contiene por litro de solución:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	4,5g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	9,8g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	2,0g

### SOLUCIONES TAMPÓN

#### TAE

Trisbase.....	4,84g
Ácido acético glacial.....	1,142g
EDTA (0,5M) (pH 8).....	2,0g

Se agrega agua hasta completar 1 litro.

## EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

### Lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979)

1. Realizar un cultivo en 3 ml de LB y dejar crecer a 37°C toda la noche.
2. Centrifugar a 5.000 rpm por 5 min.
3. Resuspender en 200 µl de Tris-HCl (50 mM) (pH 8)-EDTA (10 mM).
4. Agregar 10 µl de Rnasa 10 mg/ml y dejar a temp. ambiente por 5 min.
5. Agregar 200 µl de NaOH (200 mM)-SDS (1%).
6. Mezclar suavemente y dejar 5 min a temperatura ambiente.
7. Agregar 200 µl de Acetato potásico (2,55 M) (pH 4,8).
8. Mezclar y centrifugar a 13.500 rpm por 20 min.
9. Recuperar el sobrenadante.
10. Fenolización:
  - 10.1. Agregar 1 volumen de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1).
  - 10.2. Vortexear y centrifugar a 13.500 rpm por 5 min.
  - 10.3. Extraer la fase acuosa.
  - 10.4. Repetir una vez los pasos 10.1, 10.2 y 10.3.
  - 10.5. Agregar 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
  - 10.6. Vortexear y centrifugar a 13.500 rpm por 5 min.
  - 10.7. Extraer la fase acuosa.
  - 10.8. Repetir una vez los pasos 10.5, 10.6 y 10.7.
  - 10.9. Agregar 1 ml de alcohol absoluto. Dejar en freezer toda la noche.
  - 10.10. Centrifugar a 13.500 rpm por 20 min.
  - 10.11. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con alcohol 70% frío.
  - 10.12. Secar y resuspender el pellet en 30-50 µl de agua ultrapura.

### Lisis rápida (Chowdhury, 1991)

1. Realizar un cultivo en 2 ml de LB y dejar crecer a 37°C toda la noche.
2. Procesar 500 µl del cultivo y agregarle 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).
3. Vortexear por 1 min. y centrifugar a 13.500 rpm por 5 min.
4. Extraer la fase acuosa y agregarle 500 µl de isopropanol.
5. Mezclar bien y dejar 5 min a temperatura ambiente para que precipite el DNA.
6. Centrifugar a 13.500 rpm por 5 min.
7. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con alcohol 70% frío.
8. Secar y resuspender el pellet en 30-50 µl de agua ultrapura.

## **OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

1. Realizar un cultivo en 50 ml de LB de la estirpe a transformar hasta una  $DO_{600}$  de 0,2-0,3.
2. Centrifugar a 5.000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 20 ml de  $CaCl_2$  (100 mM).
4. Dejar en hielo durante 30 min.
5. Centrifugar a 5.000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 500  $\mu$ l de  $CaCl_2$  (100 mM).
7. Guardar las células a 4°C.

## **TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

1. Mezclar 100  $\mu$ l de células competentes con 5-10  $\mu$ l de DNA plasmídico.
2. Incubar la mezcla en hielo durante 10 min.
3. Someter a shock térmico poniendo la mezcla a 45°C por 5 min.
4. Agregar 2 ml de LB e incubar 2 horas en baño con agitación (30°C o 37°C).
5. Sembrar alícuotas de la mezcla en medio selectivo.

## 10. ANEXO 2

### HindIII

aagcttaaggcctgagcctccgctcctggaacactccgctcggtaaaaacttaccgcattgattaatgatgtgaa 1-75 pb

ctgaagtcaacggagatcattcatcctgaacctgaatccggtgttctgtcccttatcttcccgttctgcttcagt 76-150 pb

tcttcacttattccatcaatctcatccgcaagccataaacacgtcagctcattcacgggcaggacgcattgtgggc 151-225 pb

tgcgcataacggaacatatcttatgaatgctattccttatttcgactatagcctggcacccttctggccatctta 226-300 pb

tcagaacaaagtcatcggcgtccttgagcgtgcgctgcgtgagcagctccggtcacggatacggcggatcctgct 301-375 pb

tcgctgcgctgggaacatgacaacgccttcaacagcagacagacctggtttggtatggattttatcgaaacctg 376-450 pb

cagtcgctgatgaatgcgaaacccggacgcgacctttgctggctcctgacctcatccggaagccggaata 451-525 pb

ccacgtggtgctgtgcgtcagacaggagtatttcgacggccccgaactggaccggctgattctggatgcctggag 526-600 pb

caacgtactgggcttcgctcaccgggggaagcggcaccgtaccgaaacagataa**cccgga**atgtggtgctgga 601-675 pb

cagtcgctcaccggactgcgaagacatcctcaaagattgatctggcgttcagtgatttcgcccgcgatcgtcg 676-750 pb

tggtgtgctgcgatccggaagccgctgcctcgcggtaatcccggtatccggatctgcaggaccgttctgaga 751-825 pb

atacggctcagcaccttccccgcattcgcacaaccttcataaatctcacagaggatattctgacctggtgacc 826-900 pb

tcaatgacaggccacgactgcgtgtgctgcgtgccgacgatccctgatcgacatgaactacatcaccagtttc 901-975 pb

accggtatgacagataaatggtttacaagctgatcagtgaaggccatttccgaaacccatcaagctgggcccgc 976-1050 pb

agcagccgctggtacaaaagtgaagtggagcagtggtgacgacgcaattgaggaatcacgaggagcagcagca 1051-1125 pb

tgaaacgtgttgatgcccgtacgctggcaatgtgcaaaatgccggcgtggtattgcgaaatcagccctgtc 1126-1200 pb

cctggtgctggcgacattacgcttcatcttctgctgacctctccggtcagccagcaggttgtagctcttctct 1201-1275 pb

gactgattcgtcattc**attc**acattggtttataactggcattacacgggtgttgatgcccaccttcccgtgtgct 1276-1350 pb

**tg**cacccgcttaacaaaattcaacagagctgaaggagtcgtattctgtgcaaaataaccgaagcgttacttttag 1351-1425 pb

**tg**acggggttatcccaataactttctagtcagtggttagtatttatgcaagcagatgtaagtagtaaccgcttagac 1426-1500 pb

tattgacat**tc**atgatgcctgttaattcaaatccaggtatgatctgtcatttattggtgtgatactgattccgg 1501-1575 pb

taggttggcataactgtcctgtaactcattgttcaaaaaagaaagctcctacaaactgtatcctgtatctctacc 1576-1650 pb

agaagataagatacttggttattttgtgcataagctcacataaaaaataattaattatgttttcttagcgata 1651-1725 pb

gaaaaataaacaggtgaagcagaagcggacttttttaatgcgaaaacgtattctttttattggcccaccgctgta 1726-1800 pb

cggtttgtataccattgatttctctggtcaggccttctggtgtaatcggacatgatgtagtaattagtagtg 1801-1875 pb

tggcaaatcgcgaataaaagcagcagaagctggactggtgtttttgatgcagttccaggtttagattcagaggc 1876-1950 pb

**EcoRV**  
tggat**atc**gccatcaggaagagttgaggaaaaaagtaataattatggtcatttctcttttttagcgatgaaat 1951-2025 pb

ggcagataacctcatcgattttgcaggaataatggaggccagatttaatagcttatcccccgcttggccggcagg 2026-2100 pb

**EcoRI**  
cccattggttgcgtctaaatata**gaattc**cttcagtgatgctggcgttggattcgcgcatacatctgccat 2101-2175 pb

tcagatgttaaaccgttctttaaagcaatgcttacaggcggcatggagtcagcgggtccactatgtgattagcatg 2176-2250 pb

gattgatgttgcctcccaagatgagcatctttaaagctggaagaaccgggttatctcaatgagatataattcc 2251-2325 pb

ttataacggagggtgctgtaaaggaaacatgggtgggacagggattctgatcgaaaacgtttactcatcagccttg 2326-2400 pb

cactgtaaaaccaatggttgatggtctggagctgatttcatgggttatggattctgcaaatgaagtgtgatgctga 2401-2475 pb

**EcoRV**  
**tatc**atctttgcaacttgcaataaatgctcgtactggattacgaaaactaccatcaaatgtacgtctggttgactg 2476-2550 pb

gatacctatgggtgatttcttaagggagctgatggatttattcatcatggtggcaggtaataccctgacagc 2551-2625 pb

gttgtatagtgggataccacagattgtgttggcgaaggtgcagatcgctctgttaatgcagaaattgttgcgat 2626-2700 pb

gcgtgggtgtgggattattccggacaagcatggactgaccagtgatttggtaaatacgctgctttatgatgattc 2701-2775 pb  
 actacgcttctgttcagatcaggtagccgctgaaatggctgaacaaccagtcctgcagagatcgagaggtttt 2776-2850 pb  
 gatgagaaaaataaaaaacaacgggaataattgtatagatttgcgatattatcgacgaaaaatg**RcaI**tcatgagta 2851-2925 pb  
 atagaatgtccttcaacttatatgatgaaggacataactaaataaatgagtatgtctcccgttataatggtgcaga 2926-3000 pb  
 aagcgttatcggtagcatgagataatcgcttacacaaagtattattatct**EcoRV**gatatcttccctgcaattataatttgc 3001-3075 pb  
 aatgcatcaataattgctccgcccaccaggcataa**RcaI**tcatgaccaccggcatagacagtgaggttactttccaaa 3076-3150 pb  
 cctgctgcgattaacgactgatgcaaccgctgaacatgtgagacgggtgtaccttctaagaaccgactccaagt 3151-3225 pb  
 tggatatttacaactcttcggaggcctgaaagtatctgctcacttaccaggagat**EcoRV**gatatcttctcagtaaacaaa 3226-3300 pb  
 atcgggctgcccgtcagggtccaccacattgaaggtgagtggttaattgattgtaccaaatggtgtgcagcga 3301-3375 pb  
 tataatagctgccatcagtgctgctcactccaccgaggtctgaccggccagtatagattagaacgaccagccat 3376-3450 pb  
 acgatattcgggtagtctctgtataactggggtatcagattttccgctatatcaaagataagttctttattgct 3451-3525 pb  
 cccagtataatcacaagatcagattcattaatattgtctatcccataattgccattggcgcaatatgaccagtg 3526-3600 pb  
 gtaatggccatatctaattg**SmaI**cccggttaatatccatccggtcaaaccatatttcagcatcaggtaacacaagta 3601-3675 pb  
 ccaagaggtactgatggttgattctgggaaaataataacgaatccggcgtt**EcoRV**gatatctgcaacaaaggaatg 3676-3750 pb  
 aatgtgaaagaatacctgtacatttatgggaagtatcatccattcctttgttcaggagccatatcaagagaa 3751-3825 pb  
 aggactgattctccgaatcctcgtatatttattctgctgtttgttaaatggatcagatttaccgggtaatgga 3826-3900 pb  
 gagaagcgacttccatgaaatattgtctttttgtgctatctgtgggaatttctataaatgagtatgagccc 3901-3975 pb  
 cgatatgaagctggttaacaccagtgctcagcatccagat**EcoRV**gatatctgctgaaggatagatgagtcattagtcctttttg 3976-4050 pb  
 acatctttttatctgtaacacgattcaggcgaagatatacgccttgactgctttctctgagcgcacagaaa 4051-4125 pb  
 gtaacctcccgatatttctgtagtggtgctttttgtgatcaccggaagagttgctgactcaagatagtgccagaa 4126-4200 pb  
 ttagcaatatctgttcttatttgtagcaggatgtgctattttttaactgtacacaaatatcttcgggagtc 4201-4275 pb  
 tggaaaagatagttttcataggtatcatcttaaataatccaagtgaagaataatacatcaaataagcgttcat 4276-4350 pb  
 tcaaggggtgatgagtgactttccggaattaaatctggttattgatgataaaataaaaacaggtttaataaaa 4351-4425 pb  
 ttttgctttatactgtagatttcacgtatgtaagtaataatgaaaaggctctcgttaagatgtctggtacaaa 4426-4500 pb  
 tgtcagatcatatgcctttgtaaagagacgacagaagtagagcttacaggcacatcataaatccctccggcat 4501-4575 pb  
 agccggatggtatttatttaactgcccgtggttgactggatgtggaactactcactataagaaggtccactt 4576-4650 pb  
 cccccggatcacatgatgatggatggagtagtccggagcccagcatgctccattagcatcaatatatggtccata 4651-4725 pb  
 tctttccacgtagatctattacattagtagaagcaggtaatccattaagattcatccctcctttcacggaatca 4726-4800 pb  
 agcatggtatctgatatttctctcaatttaaaaacctcctgctcatttatggtcagatattaatttgggtgtgca 4801-4875 pb  
 accatttattatcacaga**EcoRI**tcagaatatcattcagttttattttgttaaaatatccctccttaagacagacac 4876-4950 pb  
 atattcttgtttatcattttcattaacaatgactctataattttctacgtttaaataaatatagcccacaagcagc 4951-5025 pb  
 ataaatttagactccttagttgactttctattttttattatatttttaaatatctcttcgggattatctaattg 5026-5100 pb  
 aagaatgtgtgtgataattttcccttcgctctgatagcctataaacccattcatacctatagaaaaataggt 5101-5175 pb  
 tgtttttctaacgattgttgaaggggaggtggatctgatgaaaatgcagcagatggtaataataaacatcact 5176-5250 pb  
 tattataatcttttcgtaagatacactttccctttggttttccatcgataaaatattcagataaacaatata 5251-5325 pb  
 tgtttttctgttaattgttcatatcgatggattgataactggaatattcagcataaataatcaacaggcctgtac 5326-5400 pb  
 ctgatcaggtatcagtttgcaaatatggtttgttatagg**RcaI**tcatgaccgcaaccaggacacataatttcaccacaac 5401-5475 pb  
 cacaaatataatcggcatcatagtcagtggttactataccggaagccgacttattatttgtgatacagtggtct 5476-5550 pb

ccagctctacggaggattctacctctatagggaaaattatcgtgttttcgtcttgaattgtcttgcttgttgcctt 5551-5625 pb  
EcoRI  
tatcaaaggttaacaatgaattcttctgtgattattatcacaattcattcttatgcctcctcacatttccc 5626-5700 pb  
gatgtatgaccgtcagtgctattagtgtagcttcaagtctcaggttatacatgagcgcacaaccatgagatcctga 5701-5775 pb  
ctaacaattgcatcagttacataacgtaaaatacctcttgactttatatggacaatatgacactttttttgaaaa 5776-5850 pb  
gtaaaataacaatcattctcttttgtctttgtctgggtgaggtctggtaagatggaatttgcacaaacagggtta 5851-5925 pb  
ctgtaaatgacagtcggtcagcactgtcatcaactttgctgttctttgatcatgagcgcactctactggaat RcaI  
5926-6000 pb  
attctttatcgatgacctgactcccctgactgaagcgcctaagatttggtaacttttcataatgaaaaataagcaa 6001-6075 pb  
caggtaggtattaatgagttataaaaaactgtaccaattgacggctatatttagtttacctcttactatcttatt 6076-6150 pb  
EcoRI HindIII  
ggtttcactttcatcccttcggattgttggcgaagggattatgttgacggtttttctaaagctttataatatt 6151-6225 pb  
tcttggttttattgagctgattcatgggattcgaagattttggctggctcaggtggaaaaacggaagttaaat 6226-6300 pb  
atgatggagtttatatgcgagaaataacagaatcacagttaagatatatttcggggcgagggtgcgccagcga 6301-6375 pb  
cttcagctaatgcccgaggtgctgcagctattgttggagctctcgccgaatacctgggtggtccacttgggggtg 6376-6450 pb  
tagttggagccgtatctgccggtttgacaacagcaattggctcgaccgtgggaagtggtagtgccagttcttctg 6451-6525 pb  
ctggtggcggtagctaatataattttattttttacaggcacttttcgatagtgctgtaaaatataccct 6526-6600 pb  
ttcgtttaaagcagatagaagatccatttataagtgtgtttttatgttcaacactttactgatgaagatatgatt 6601-6675 pb  
tacagtcggtgataaataattattaattttatgtgtaattaatagagtttactgtaataaggaagaagctgtcag 6676-6750 pb  
gacacttacttgctcttttatgaacactcttttatgaaaataaaacggagaatactgccagatgagtcacagt 6751-6825 pb  
gttcactttctgaactgaatgaaaacctgggtgcctttcactgccagcgagatcaagtcctcattaatctggtgtg 6826-6900 pb  
cagaggatgtcagaaatccaggcagctgcaaaatgcctgcagttatattatcgatcctgacagtcaggtctctg 6901-6975 pb  
ccaaagtgttccatgcagagcgtatgggtggcagtggtattcagcgaatggaggtgggtgcacgttgggtttg 6976-7050 pb  
atggttaactaccaggttaaaggaataggaagtaatccggttgggtggtaaggtactgacgaacgtcattcctaatg 7051-7125 pb  
gtgcactcggcgtgttcatgcaatataatgaggtttgtggggagaagtactggctcaaataattactttatagtg 7126-7200 pb  
ctgtgcgggttcggggttttactttacagatctctatactgaaaaggcatttgagcgtccgggatgaaatcac 7201-7275 pb  
gaagagccctgttggtagctgagcctgttctgcccggcgcattttgaacgggcaccatacttccaagtaaaac 7276-7350 pb  
EcoRV  
cggagtatccagtcagtttaattcacgatgcctgtcgggttagatctgtgatccacaagctgccaggatattctac 7351-7425 pb  
ctgtaccaccggaagaaattgatgtgaagcacgaactgatccccgatttattgcatgagggattatgtgaac 7426-7500 pb  
tggcacgtctgtaggctggcaaatggcattttgtcgaacacgtttctgagattgacaacttctcttctaata 7501-7575 pb  
ttgcaatggatggcagattaatggattttaacggactcagttgctcgtttccgggagattcccagctgattttg 7576-7650 pb  
gggtataaactaagattagctgaactggcaaaagaccgatggtaacttatgcaagggtgtctgatctctgctgtg 7651-7725 pb  
atatcggaataatatagtttgacctgacttcaactctgcagcccgtttgaaggttgaggagatatttcagaaaa 7726-7800 pb  
RcaI  
ctttcatgagagcatgttattactgttatctagaactgttgggtattcctggagaatttataaacacaaaaagaga 7801-7875 pb  
tacctgataatattgaacaactggtaacagttttgttgactactcaataaatactgagagaaatcacatgccc 7876-7950 pb  
aagatattgtcaatcaggatgggtccacattgcaaaagttgggtgtgacgctaatacatcagcacaatacaaa 7951-8025 pb  
agcaggcactgaatagtagcatcaagaatgatgtttatcccggttgcaaacagtggtttttccagactatcc 8026-8100 pb  
actggctgacgcaaggcagtagcagcagataaatgttcttactcctgaaagaaattgaacatcatacca 8101-8175 pb  
tgaaaaggctgcaaccagggaagagctgaggaaagagaatatgtgcgaaaaaattgccatcctgctggataatc 8176-8250 pb  
atggcagatgaccccttttttacaagaagcaattctgatatgaaaaattttatgcttaagttttccagagatg 8251-8325 pb  
EcoRV  
catttggatattcgaaccgataagaaacacagtgtaataaatatataagggaatagtaatacatgtcttatata 8326-8400 pb

agggaaacatcagaggaaaagatgaatggactgtttatgaacagataggttttgcggtcagttgtatgctctac 8401-8475 pb  
 aatcgtaattacagtctgtatccgggtgtaaacatctcaactggactgaatatgcgatacagcataatcagatt 8476-8550 pb  
 aaattcctgtttgattcagaggttttccactggcgtatataacctgggcatatcttgaggctgatacgggaagcg 8551-8625 pb  
 cgctgctcagggatccagaa**EcoRI**gaattcaggttgcctcctgaatggaatgaagatggaaggatctggatcctggat 8626-8700 pb  
 ttctgttgtaaacaggcctttggtcgaaaagtatttgactatctcatacagcttcagccatggggggaaggagaa 8701-8775 pb  
 gtacgatggttaagcaggcgaaagaaaattgtgacatacatccctgagcggctgcataaaacgtagtacctctga 8776-8850 pb  
 agatacagagataattgtaaattacggggtaaatgcatcgcgtgatactattttgacaggactctgtattttctgg 8851-8925 pb  
 ctttgattatagcgtttcggtaatcagtgaaaggtattacaggaaaagtgtgagtaaggagactattttgtttc 8926-9000 pb  
 gtcaggatgctttagaaaacagaaaatgaagtggcagggacgggcaatattacttcccgaataccactatggt 9001-9075 pb  
 taatcatgctgggaagcattgtgtttattacggcatttctgatgttcattatgttggtagctatagccgccgtg 9076-9150 pb  
 ttaatgtcagtggtgaggtcacaacctggccaagagctgtcaatatatattcaggtgtacagggatttgtgtca 9151-9225 pb  
 ggcaatttgt**RcaI**tcataagggcagttgataaaaaagggatcctgtttatctgattgacatcagtaaaagtacac 9226-9300 pb  
 gtagtggattgtcactgataatcatcggcgggatatagaaaatcagctggttcctgtggacaacattatttccc 9301-9375 pb  
 gtctggaagaaagtaaaaaataacgttagataccctggaaaaacaacgtctgcaatacacagatgcggttctgtc 9376-9450 pb  
 gctcatcagatattatacagcgtgcagaggaaggataaaaaatgaaaaacaataggagaattacagaaact 9451-9525 pb  
 atcaggcaaaagggtgattaataaagatcagttaactaaccaggtggcattatattatcagcaacaaaacaatc 9526-9600 pb  
 ttctcagcctgagcggacagaaacagaatgcctgcagataaccactctggagagtcagattcagactcagg 9601-9675 pb  
 ctgcagattttgataaccgtatctaccagatggaactgcaacggtagcagttacagaaagaactggttaactg 9676-9750 pb  
 atgtggagggcgaaattattatccggcgttgactgacgggaaagttgactcctgagtgctactgctgggcaaa 9751-9825 pb  
 tggtaataccggagacagccttctgcaggttattcctgagaacattgaaaactattatcttattctctgggtcc 9826-9900 pb  
 caaatgatgctgttccttatatttcggctggtgacaaagtgaatattcgttatgaaagcctttccggcagaaaaat 9901-9975 pb  
 ttgggcagttctctgctacggttaaaactatattccaggactcctgcgtcaacacaggaaatgtagctataagg 9976-10050 pb  
 gtgaccacagaatacggcggcgcctctgttccctggatataaagtcattgcatgacctgaaaagcagattatca 10051-10125 pb  
 gatatgacgaaaaatacctcctctggaaaatggaatgaaagccgaaagtacactatttctggaaaaaggcgta 10126-10200 pb  
 tttaccagtgatgcttttctcttctatgacatgaaacacagtgcaacaggaccgctcaatgactaacgggagt 10201-10275 pb  
 ttcagacaaattataaatcagcttgatgctgctggcagcgtcgtgttccggttattcatcagacggagaccgct 10276-10350 pb  
 gaatgtggactggcctgctggcaatgatagcggcatttttggtaagaatattgacct**EcoRV**gatatcctctgcgg 10351-10425 pb  
 aagtttaatctctcggccgtggagcaaacctgcaggaatcaatggaatagcggagcagctggggatggtcac**SmaI** 10426-10500 pb  
**cggg**ctctttcactggagctggatgaacttggcgcctcaaatgcogtgtattctccactgggattcagtcac 10501-10575 pb  
 tttgtcgtgctggtcagcgtaaagcgtaacggttatgtactgcatgatccggccagaggcagaagat**EcoRV**ctcgg 10576-10650 pb  
 cgggagaaatgagcggatatttaccggcattgcaacttgaggtctggcctggaagt**EcoRI**gaattcctggcgaaacc 10651-10725 pb  
 cagcagatccgataagctcctgctcactgattaacagatatttacggatataaaagaacactggcgaaaattttc 10726-10800 pb  
 tgtctgctcagttgtaattgaagcaatcaatctggtaatgccgggtgggactcagctggttatggatcatgctgatt 10801-10875 pb  
 ccggcgggggacagagggtgctgacgctatttctgctggcctgatgttctttatattgctcagggccgcgggtg 10876-10950 pb  
 agtatgctgctgcatggtcctcactgggttatgagcacgctcatcaatatacagtgccagtcgggtctgtttaac 10951-11025 pb  
 catcttctcagactgccgctggcgtttttgaaacccgtaaatagg**EcoRV**gatatcagtcgcttttggctccctt 11026-11100 pb  
 gacactttgagggccacctttaccacctgtgtggttggggcaatcatggacagattatggttgtgggggttttt 11101-11175 pb  
 gtgatgatgctgttatatggag**EcoRV**gatatctacctggatagtgctcggttttaccatggtttacgttcttattcgt 11176-11250 pb  
 ctggtgacatacggctattaccggcaaatatcggaagaaactctgtcaggggg**SmaI**cccggtccagctcctatttt 11251-11325 pb

atggaaagcctgtatggatgccaacggtaaaaatccaaggtatggctgggatccggggaacacactggcttaac 11326-11400 pb  
ctgaaaatagatgcatcaattcaggtatataagttaaccaagatggatgtctctcggggggataaatactttt 11401-11475 pb  
gttgccgcctgtgatcaggtggcgattttatggctgggtgcaagccttgtgatcgataatcagatgacaataggg 11476-11550 pb  
atgtttgtggcatttggttcttttcgctgggcagtttccggatcgggttgcctcgcctgaccagtttcttcttcaa 11551-11625 pb  
ctgagaataatgagctcgcataatgagcgcattgcagatattgcactacatgaaaaggaagaaaagaaaccggaa 11626-11700 pb  
attgaaatcgttgcctgacatgagccgggttccactggaaaccactgatttaagctaccgggatgacagccagtc 11701-11775 pb  
gcacaggtattcagtggtctgaatttgcctgtggctccgggagaaagtgtggctataactggctcctccggtgcc 11776-11850 pb  
ggaaaaaccacattaatgaaagtattatgtggactgttgaaccagatagtggaagactggtaaatggcacg 11851-11925 pb  
gatatacgtcaacttggataaataattatcacctgatgatagcctgtgttatgcaggacgaccggctattttca 11926-12000 pb  
ggatcaattcgtgaaaatatctgtgggttgcagaagaaacagacgacgaatggatgacagaatgtgccagagca 12001-12075 pb  
agtcatat **RcaI** tcatgtagtataatgaaaatgccaatggggatgaaacgttaataggtgaactgggggaaggtcct 12076-12150 pb  
tccggcgggtcaaaaacagcgtatattcattgcccagccttataccggaaacctggaatattatttatggatgag 12151-12225 pb  
gctacaagttctcttgatacagaaaagtgaacgttctcgtgaatgctgccataaaaaaaatgaatatca **SmaI** cccgggtg 12226-12300 pb  
attatgacacagagaaaactacgttgagaactgttgacaggattatctctatttaaaatccactggtgtaactt 12301-12375 pb  
tgtaaggagttttgtcgatgggggagggttaagaaggatataaaaaaacagtgattgcttttggtatcaattatc 12376-12450 pb  
tgttcttttatattccgggtgcattatattcttagttattactatagatataattttttaattctatatatgtttt 12451-12525 pb  
tttatcactgtagttacatttttatcgttgggttaaacgtgaatttttacttcttcacaaattttatagcgaa 12526-12600 pb  
gggtgtgaaatgagaaaactatctgaaaatgaaataaaacaaatatctggagggtgacgggaatgacgggcaggca 12601-12675 pb  
gaattaattgctattgggtcacttgcaggtacgtttattag **SmaI** cccgggatttgggtctattgcagggccttatata 12676-12750 pb  
gggtataaagtacattcatgggcaacgactgcgacgggttagtccctccatgtctccctcaggtataggattatca 12751-12825 pb  
tcctagtttggatccggcagatgtacatcaagtgtctctcgtctcggggagtggaataaaccttatattgt 12826-12900 pb  
taatgatgcctatgtaattgggttaagttaggctctccgaacgtttatcattttatgcataccgcatagtaacaa 12901-12975 pb  
tgctagtcctgttaatttttatcatatgagattgtaacagaaaatgctctgttaattgggaataactgatataagc 12976-13050 pb  
tagatattgtattcctgctatgactgcattcatcgccatgtgaagtaatatgggcattaacagaccattcgactt 13051-13125 pb  
tatttgtgcgctaataagaactaacgatactaaaaagagcataaaaaatgtacgaaagtcagtatatgtgatg 13126-13200 pb  
caatgcagagaatatgactgatgttacaatagcagagatgtaaatattgtcattaaccagaattataaagaatt 13201-13275 pb  
aaaaaacaccctcgaaaatacaatctcttcatatacaggaacatagaagtacagaagaaacataaaatggcctcag 13276-13350 pb  
aaaaagataatttgcgagatcatccattcttccgttttctcactgccagcagataagggacaataactgaataa 13351-13425 pb  
tcattatataagagaaaagagtaaaaaacatccggtcgaaaagaacctcttccctaatccttctcttttccggaag 13426-13500 pb  
aaaataaaatacagtggaacaagaattagaaattcagcaagaaataatgctggaacaagaagtccctcgatata 13501-13575 pb  
agttcctgcctgtttgtaaggaatgcaggaataaaaggtaatagaaaatgataaagtaaacattaaaaagcagccg 13576-13650 pb  
ctgatgactgtttttatgttgcattttttgttatttccatttatattcccttacttgttattttaaatttttata 13651-13725 pb  
taacaggaagaggttaacatagaatgaacgtttcttctccggatcagaacagccataatttttattttatagtt 13726-13800 pb  
gttatcagtgaaatgaaataaaactaatagaacaataaaaaagaatggagaaaaaacgacgggcaggacgccatagt 13801-13875 pb  
tcataattctcctcgtatcagcctcagctatcaacctttctgaaacggtttcaatttctcttctcctcagaaata 13876-13950 pb  
tatttgaatgtttct **RcaI** tcatgacatataccgaaaactggaaccagattaatggatggatacacaacacataaa 13951-14025 pb  
cttctgat **EcoRV** gatcgcctagggaaacgtatcttgagcgggtaaaagaagtc **attR** catatactctgaataaaaccatcatt 14026-14100 pb  
tcaggtgttgatgcgcgcttactgtgtctgcactggcttaacaaaattcaacaggggttgaaaaggaacatttc 14101-14175 pb

gtgcaaataaccgaagccttaatttcagagccgggagacatccggcgttttgttcagcagcggtggaccactgg 14176-14250 pb  
 ccgcgctctgctggcagctccacttcacgctccattcgggtgaaggaaacatcaacgggcaacagattcaggcattc 14251-14325 pb  
 tgtacttcttttatcgacaactgcatgaacgtattactgagcgtaatcacactgccagtcctatcctctccggtg 14326-14400 pb  
 gtattacgctgggttcggggaacaacatgaaggagcaacaattcgatgctgttgctgctcagccagacgagtatt 14401-14475 pb  
 tgtcacccgcgagccagtgccacagttgatgaacaatggttcgcaagtgggtgatttactgcaacatagctggcag 14476-14550 pb  
 gtgataagtgctggcgggacaatgccgggtgaaagggtgttttcgggttgcccggtgtagatacatccggtcagtat 14551-14625 pb  
 gttcgcgttaaaaacagtcgattgtctctgggttaccggttgtagccgcatcaccatcgtccggtacagcgc 14626-14700 pb  
 tgtacattgattacagctcagtgaaatcagcgtttctggctttctgctggctcattctgtcaacgccacagtgttt 14701-14775 pb  
 gaccgttatggggatgcccagcattccctgcacagcgttgtttcaggtgggtgtagcgaacaccgctgttaa 14776-14850 pb  
 aacagtcgctcagtcctttgtgttaccggttgtagacaacaatcagttggtaatggcagtgtagaacatctgcgc 14851-14925 pb  
 ttccgttgatttttatggactgataaagttttgccagctgaatctttatacggaatgctcttcagtatgctgaca 14926-15000 pb  
 cgaattgactatctggcgataaatacagttttactgagctgaatgagctctcccgctcttcgccagcagtgggcag 15001-15075 pb  
 gatgttctggaggagtgccggcagacagaggccgggcccagaagaacggctgctgattgcaactgctgaatgtggat 15076-15150 pb  
 tacgtcaccagttttgaaactgcctttctgctgcttaccggacaccacaactgattgccgcgctgctgaa 15151-15225 pb  
 gaatggggcatcagccagaaaaatgtgggtgttaacgataaacggtttggttgctgtacagcctgaaggccagc 15226-15300 pb  
 cttctgggtgtagccgatacattccggatcatctgtctcaccgattctgctgctggttgggaatgaaaacaca 15301-15375 pb  
 tcattgccatcagcaggttgcccggaagtgaagcgcctcctgaaacggctgaaatgcaactgagggcgggt 15376-15450 pb  
 ttactggtagctgactgagcggcctgttctgggtttggcagtcagcgtattgctggctgatgttctgaggctgaga 15451-15525 pb  
 aaggccggaatgccgggtgtagccagcaccgctggaggtgtagcagataaacctgacaggaacaaccgcaaagtaccg 15526-15600 pb  
 gcataccatctctgatacaaccatcagggggaatattgctctggcagcagtagacattctttatactttat 15601-15675 pb  
 ccccgctgctgaaaaatgtgctaaggaaaacgggaatggcaaggtccgattatgatattattaatctgtctctga 15676-15750 pb  
 aacatgaaactgaatgagtgctgacagagagaggttatgcccggactggcgggataaccggaaccgctggcagagg 15751-15825 pb  
 tggttaccggaaatgtagcagcagctttatataaacggttctcgggatgctgctgaacacggcagcagtgaaac 15826-15900 pb  
 accctgagtggttttcagggctgtctccggagatgagaattaataagtggtattatgctgccatcaggcagtggtg 15901-15975 pb  
 attgccggcagggatttctgttttattctgtttcttcccggtgggggttgaattttccagaaaagttgtacat 15976-16050 pb  
 cggctgcatgcagggatgcccgatgcccgtcccgcataaacaccaaccgggttttctcaacactggtcacggtgac 16051-16125 pb  
 aagcgcaccatgatcgtctttgtatcgctgattgactttcggtaattggaacatcttctgacataaaattttagtac 16126-16200 pb  
 ggtaacagttaactaaattttcatgtggtagcactgaatcaggagactgctttctctgatgtgctggttaattt 16201-16275 pb  
 tctgtttttagcaaacattttccccttctctctgtatattttattgctcctcctttcatgtccttcccatatc 16276-16350 pb  
 ctgaaactcacttaaatgctggtgaaatcgtcatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaatgcaat 16351-16425 pb  
 tttagctaaccaactgagcattcagtggaataattttctgcaactttccattaattatgggtataaaattttgcaa 16426-16500 pb  
 tgtgctgtttttgcatatatagacagaataaagaactgttcatgtgttatatcgatcgataaatctgtcatat 16501-16575 pb  
 tgctgtagttcagattatttctataatgatcaaaaataagtcagctaaaaattggcagatttattgtctcagca 16576-16650 pb  
 ttctggtagcgggtgatgcccgtgaaataccggaagggcggtagcgtgccatcgcaaacatgggtgggaggtatcg 16651-16725 pb  
 tcagggaggtggtgattggtgtagcatgaataaaagggttttctggttactggaatattatgtgtagcagaaac 16726-16800 pb  
 gagagggctgaggaacaagcctt 16801-16823 pb

**Sitios de corte**

Enzima	Nro.Cortes	Posiciones	Secuencia de reconocimiento
EcoRI	6	2124 4892 5642 6187 8644 10708	g/aattc
EcoRV	13	1955 2476 3051 3281 3730 4013 7419 8334 10412 10642 11076 11200 14036	gat/atc
HindIII	3	1 6211 16818	a/agctt
RcaI	9	1510 2917 3112 5439 5977 7805 9236 12084 13967	t/catga
SmaI	10	659 3622 10501 11308 12295 12719 14602 15400 16013 16097	ccc/ggg

**Anexo 2. Análisis físico de la secuencia nucleotídica del fragmento H-H.** Se realizó con el programa Webcutter 2.0 ([bio.lundberg.gu.se/cutter2/](http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/)). Se indican con distintos colores los sitios de corte para las enzimas de restricción EcoRI, EcoRV, HindIII, RcaI y SmaI. En gris se señalan los sitios *attL* y *attR* que flanquean el sistema genético MccH47. Con flechas se indica la secuencia nucleotídica correspondiente a los oligonucleótidos *out1* y *out2* (complementaria).

## 11. ANEXO 3

**EcoRI**  
gaattc cggatgagcattcatcaggcgggcaagaatgtgaataaaggccggataaaaacttgtgcttatttttctt 1-75 pb

tacggtctttaaaggccgtaatatccagctgaacggctctggttataggtacattgagcaactgactgaaatgc 76-150 pb

ctcaaatgttctttacgatgccattgggatataatcaacgggtggtatccagtgatttttttctccatttttagc 151-225 pb

ttccttagctcctgaaaatctcgataactcaaaaaatcggccggtagtgatcttatttcattatggtgaaagt 226-300 pb

ggaacctcttacgtgccgatcaacgtctcattttcgccaaaagttggcccagggttcccggatcaacagggac 301-375 pb

accaggatttatttattctgcaagtgatcttccgtcacaggattttattcgggcgaagtgcgtcgggtgatgc 376-450 pb

tgccaacttactgatttagtgatgatgggtgttttgagggtctccagtggttctgtttctatcagctgtccct 451-525 pb

cctgttcagctactgacggggtggtgcgtaacggcaaaagcaccgcccagacatcagcgttagcggagtgtatact 526-600 pb

ggcttactatggtggcactgatgaggggtcagtgaaagtcttcatgtggcaggagaaaaaggctgcaccgggtg 601-675 pb

cgtcagcagaatatgtgatacaggatataatccgcttccctcgctcactgactcgctacgctcggctcgttcgactg 676-750 pb

cggcgagcggaaatggcttacgaacggggcggagatttccctggaagatgccaggaagatacttaacagggaagt 751-825 pb

agaggcccgggcaaaagcgtttttccataggctccgccccctgacaagcatcacgaaatctgacgctcaaatc 826-900 pb

agtgggtggcgaaccgcaggaactataaagataaccaggcgtttcccccctggcggctccctcgtgcgctctcctg 901-975 pb

ttcctgcctttcggtttaccgggtgctattccgctgttatggcgcggttctctcattccacgctgacactcagt 976-1050 pb

tccgggtaggcagttcgctccaagctggactgtatgcacgaaccccccttcagtcggaccgctgcgcttatcc 1051-1125 pb

ggtaactatcgtcttgagtcacaccggaaagacatgcaaaagcaccactggcagcagccactggtaattgattt 1126-1200 pb

agaggagttagtctgaagtcagcggcgttaaggctaaactgaaaggacaagttttggtgactgcgctcctcc 1201-1275 pb

aagccagttacctcggttcaagagttggtagctcagagaacctcgaaaaaccgcccctgcaaggcgggttttttc 1276-1350 pb

gttttcagagcaagagattacgcgcagacaaaacgatctcaagaagatcatcttattaatcagataaaaatattt 1351-1425 pb

ctagatttcagtgcaatttctcttcaaatgtagcactgaagtcagccccatacagataaagtgttaattctc 1426-1500 pb

**HindIII**  
atgtttgacagcttatcatcgataagcttaaatgtagctttatcacagttaaattgctaacgcagtcaggcac 1501-1575 pb

cgtgtatgaaatctaacaatgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggcataggcttgg 1576-1650 pb

ttatgcccgtactgccgggctcttgccggatatacgtccattccgacagcatcggcagtcactatggcgtgctgc 1651-1725 pb

tagcgtatatagcgttgatgcaatttctatgcccacccgttctcggagcactgtccgaccgctttggccgccgcc 1726-1800 pb

cagtcctgctcgcttcgctacttgagccactatcgactacggatcatggcgaccacaccgctcctgtggatcc 1801-1875 pb

tctacgccggacgcacgtggcggcatcaccggcggcaccaggtgcggttgctggcgctatatacggcagatca 1876-1950 pb

**RcaI**  
ccgatggggaagatcgggctcgccacttcgggctcatgagcgttcttgcggcggggtgctcaacggcctcaacc 1951-2025 pb

tggccgggggactgtggggcggcatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcgggtgctcaacggcctcaacc 2026-2100 pb

tactactgggctgcttccctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgaccgatgcccttgagagccttcaacc 2101-2175 pb

cagtcagctccttccgggtggggcggcggcagctatcgtcgccgacttatgactgtcttctttatcatgcaac 2176-2250 pb

tcgtaggacaggtgccggcagcgtctgggtcattttcggcgaggaccgcttccgctggagcggcagcagatgatcg 2251-2325 pb

gcctgtcgttgcgggtattcggaaatcttgcaagcctcctcgtcactgggtcccggcaccacaaacggt 2326-2400 pb

tcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcggcggcagcggctgggctacgtcttgctggcgttcggcagc 2401-2475 pb

gaggctggatggccttccccattatgattcttctcgttccggcggcagcgggtgcccgcgttgcaaggccatgc 2476-2550 pb

tgtccaggcaggtagatgacgaccatcagggacagcttcaaggatcgctcgggctcttaccagcctaacttcga 2551-2625 pb

tcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatgccgcctcggcgagcacatggaacgggttggcatggattgtag 2626-2700 pb

gcgccgcctataccttgtctgcctccccgcgttgcgctcgcggtgcatggagccggccacctcgacctgaatgg 2701-2775 pb  
 aagccggcggcactcgctaacggattcaccactccaagaattggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaa 2776-2850 pb  
 tgcgcaaaccaacccttggcagaacatataccatcgctccgccatctccagcagccgcacgcgggcgcacatctcggg 2851-2925 pb  
 cagcgttgggtcctggccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgctggtgaggaccggctaggctggcgggggtg 2926-3000 pb  
 ccttactggttagcagaatgaatcaccgatcgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaacgtctcgcgac 3001-3075 pb  
 ctgagcaacaacatgaatggtcttcgggttccggttctgtaaagtctggaaacgcggaagtcccctacgtgctg 3076-3150 pb  
 ctgaagtggcccgaacagagagtgaaccaaccgggtgataccacgatactatgactgagagtcaacgccatgag 3151-3225 pb  
 cggcctcatttcttattctgagttacaacagtcgcacccgctgctcggtagctccttccgggtggcgcggggcat 3226-3300 pb  
 gactatcgtcgcgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgcaccaacag 3301-3375 pb  
 tcccccgccacggggcctgccaccataaccacgcgaaacaagcgcctgcaccattatgttccggatctgcat 3376-3450 pb  
 cgcaggatgctgctggctaccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgtaacctgtttttatcaggctc 3451-3525 pb  
 tgggaggcagaataaatgatcatatcgtcaattattacctccacggggagagcctgagcaaaactggcctcaggca 3526-3600 pb  
 tttgagaagcacacgggtcactgcttccggtagtcaataaacggtaaacagcaatagacataagcggctatt 3601-3675 pb  
 taacgacctgcctgaaccgacgacgggtgcaatttgcttccgaatttctgccattcatcgccttattatcac 3676-3750 pb  
 ttattcaggcgtagcaccagggcttaaggccaccaataactgccttaaaaaa **ttacgccccgcctgccactc** 3751-3825 pb  
**atcgcagtaactggttaattcattaagcattctgcccagatggaagccatcacagacggcatgatgaacctgaat** 3826-3900 pb  
**cgccagcggcatcagcaccttgtcgccttgcgtataaatatttgccatggtgaaaacggggcgagaagtgtc** 3901-3975 pb  
**catattggccacggttaaatcaaaactgggaaactcaccagggattggctgagacgaaaaacatattctcaat** 3976-4050 pb  
**aaacctttagggaaatagccaggttttcaccgtaaacacgccacatcttgcgaatatatgtgtagaaaactgccg** 4051-4125 pb  
**gaaatcgtcgtggtattcactccagagcgtgaaaacggttccagtttgcctcatggaaaacgggtgtaacaagggtg** 4126-4200 pb  
**aacactatcccatatcaccagctcaccgtctttcattgccaat** <sup>← cat</sup> acg 4201-4245 pb

#### Sitios de corte

Enzima	Nro. Cortes	Posiciones	Secuencia de reconocimiento
EcoRI	1	1	g/aattc
HindIII	1	1524	a/agctt
RcaI	1	1984	t/catga

**Anexo 3. Análisis físico de la secuencia nucleotídica del vector plasmídico pACYC184.** Se realizó con el programa Webcutter 2.0 (bio.lundberg.gu.se/cutter2/). Se indican con distintos colores los sitios de corte para las enzimas de restricción EcoRI, HindIII y RcaI. En amarillo se señala el gen *cat*, codificante para la cloranfenicol acetiltransferasa que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol.