



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

**“Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter* spp.  
de origen hospitalario y ambiental”**

---

***Lic. Ileana Paula Salto***

***Director: Prof. Dr. Mariano Pistorio***

***Año 2017***



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

# Facultad de Ciencias Exactas

## DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



### Caracterización de plásmidos de *Acinetobacter* spp. de origen hospitalario y ambiental

*Tapa: "Plásmidos"*

*Por Rodrigo Cañas*

*El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Mariano Pistorio*

A Iván

## Reconocimientos

A la Universidad Nacional de La Plata por haberme formado a nivel medio, de grado y de postgrado.

Al Insituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata por brindarme el lugar de trabajo y formación.

Al CebBiTec y sus integrantes por hacer muy grata mi experiencia en Alemania.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mis estudios de formación de postgrado.

## Agradecimientos

Al Prof. Dr. Mariano Pistorio por su dirección, por su confianza, y por haber aceptado (espero, alegremente), el desafío de guiarme y formarme durante estos 5 años.

Al Prof. Dr. Antonio Lagares y a la Prof. Dra. María Florencia del Papa por su ayuda, consejos y charlas.

A mis compañeros becarios y amigos de RPS , Charly, Yuli, Fran, Lucas, Piru, Moni, Jose, Jensen, y a los investigadores jóvenes (y no tanto!) Gonza, Mauri y Walter, que me han acompañado y soportado en estos años. Gracias por su ayuda, por las charlas, por los mates, por los chistes, por las peleas, por las reconciliaciones, y por sobre todas las cosas, por aguantar mis caprichos y quejas (constantes!) en el laboratorio.

A mi equipo de fútbol femenino, mis "Angelitas", Castañas, Carla, Caro, Sole, Yani, Peti, Florcita, Mengu, Juja, Lulum, Charly, Messi y Euge, uno de los cables a tierra más importantes durante estos años y fuente inagotable de buena onda (Y también de peleas!).

A todos los integrantes del IBBM, investigadores, personal de apoyo, y en especial a todos los becarios con los que he compartido mucho más que experimentos y un lugar de trabajo, sino un espacio de alegría, enojos, quejas, reuniones formales, reuniones informales, fiestas, cervezas.y mucho más.

A mis bondios queridas, Charly, Peti, Florcita y Juja. Gracias por su amistad, por su aguante y por nuestras cenas increíbles en donde puede pasar de todo!

A mis amigos "de la vida", Cali y Augusto, siempre presentes, SIEMPRE. Porque aún no teniendolos físicamente al lado, un solo mensaje hace posible que todo lo malo de un día, desaparezca .

A mi familia, por acompañarme en este y todos los trayectos de mi vida. Por el apoyo que recibo de todos, por sus consejos, por sus retos, por sus felicitaciones, por ser parte de mi.

A mis padres, por acompañarme siempre a todo momento. Por preocuparse y ocuparse de mi, siempre.

A Gonzalo. Uf!, no me alcanzan las palabras para describir lo importante que fue que me hayas acompañado en este camino. Sin dudas, nada de esto hubiese sido posible sin tu ayuda y apoyo incondicional. Gracias por enseñarme, por guiarme, aconsejarme, escucharme y por retarme, pero por sobre todas las cosas, gracias por tu amistad y aguante.

Y por último, quiero agradecer a la persona más importante en mi vida, Iván. Gracias por ser mi compañero en la vida, gracias por creer en mi, por escucharme, por acompañarme en cada decisión. Por compartir mis días buenos, y soportarme en los días malos a lo largo de este tiempo. Fuiste y sos mi eje en este camino, y en mi vida. Gracias por elegirme todos los días.



## Índice general

# CAPÍTULO I

Introducción	1
I.1 Los plásmidos son entidades independientes de ADN extracromosomal	2
I.2 Características generales de los plásmidos	2
I.3 Módulo de replicación plasmídica	3
I.3.1 Características generales de la replicación de plásmidos	3
I.3.2 Mecanismo de inicio de replicación Theta	5
I.3.3 Mecanismo de inicio replicación por desplazamiento de cadena	6
I.3.4 Mecanismo de replicación por Círculo Rodante (CR)	7
I.3.5 Regulación de la replicación	8
I.3.6 Incompatibilidad plasmídica y rango de huésped	10
I.4 Módulos de movilización plasmídica	12
I.4.1 Mecanismo de transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos	12
I.4.2 Módulos de conjugación plasmídica	14
I.4.3 Clasificación de plásmidos según sus propiedades de movilización	17
I.5 Módulo de mantenimiento plasmídico	17
I.5.1 Resolución de multímeros	18
I.5.2 Partición activa	19
I.5.3 Muerte post-segregacional o toxina-antitoxina (TA)	21
I.6 Módulos accesorios	24
I.7 <i>Acinetobacter</i> spp como modelo de estudio.	26
I.8 Objetivo General	29
I.8.1 Objetivos específicos	30

# CAPÍTULO II

Materiales y métodos	31
II.1 Cepas Bacterianas	32
II.2 Plásmidos	34
II.3 Medio de Cultivo	35
II.3.1 Medios para crecimiento bacteriano	35
II.3.2 Medios de conservación bacterianos	35
II.4 Condiciones de cultivo	36
II.5 Antibióticos	36
II.6 Técnicas microbiológicas	36
II.6.1 Conjugaciones biparentales	36
II.6.2 Conjugaciones triparentales	36
II.6.3 Tinción de Gram	37
II.6.4 Determinación de movilidad natatoria	37
II.6.5 Ensayo de Oxidasa	37
II.6.6 Preparación de células electrocompetentes	37
II.6.7 Transformación bacteriana	38
II.6.8 Recuento de bacterias	38
II.7 Técnicas moleculares	38
II.7.1 Obtención de ADN genómico para su uso en PCR	38

II.7.2 Preparación de ADN plasmídico	39
II.7.3 Electroforesis de ADN	41
II.7.4 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	42
II.7.5 Determinación de las concentraciones de ADN en una muestra	43
II.7.6 Secuenciamiento de fragmentos de ADN	43
II.7.7 Oligonucleótidos	43
II.7.8 Secuenciación masiva de muestras compuestas de plásmidos	43
II.7.9 Tratamientos enzimáticos del ADN	44
II.7.10 Desalado de soluciones de ADN	45
II.7.11 Estrategias de clonado	45
II.8 Técnicas bioinformáticas	46
II.8.1 Diseño de oligonucleótidos	46
II.8.2 Tratamiento de los datos crudos del secuenciamiento	46
II.8.3 Herramientas bioinformáticas para genómica comparativa	46
II.9 Análisis filogenéticos	46
II.9.1 Análisis filogenéticos de las relaxasas	46
II.9.2 Análisis filogenético de proteínas de replicación	47
II.10 Identificación de aislamientos por espectrometría de masas MALDI-TOF	47

## CAPÍTULO III

Análisis de contenido plasmídico de una colección hospitalaria de bacterias clasificadas como <i>Acinetobacter</i> spp.	49
III.1 Introducción	50
III.2 Descripción de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	51
III.3 Análisis del contenido plasmídico en la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	51
III.4 Aislamiento de plásmidos de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	53
III.5 Purificación de los plásmidos obtenidos para su posterior secuenciación	55
III.6 Secuenciación masiva de la muestra compuesta de ADN plasmídico de la colección de <i>Acinetobacter</i> spp.	55
III.7 Distribución general de funciones encontradas para los marcos abiertos de lectura (ORFs)	57

## CAPÍTULO IV

Genómica comparativa de los replicones plasmídicos de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	60
IV.1 Introducción	61
IV.2 Análisis comparativo de replicones plasmídicos	61
Análisis de pIH1	62
Análisis de pIH2	63
Análisis de pIH3	65
Análisis de pIH6	66
Análisis de pIH7	66
Análisis de pIH8, pIH9, pIH11 y pIH18	67
Análisis de los plásmidos pIH12 y pIH15	69
Análisis del plásmido pIH13	69
Análisis del plásmido pIH16	70

Análisis de los plásmidos pIH17 y pIH19	71
Análisis del plásmido pIH14	71
Análisis de los replicones pIH4, pIH5 y pIH10	72

## CAPÍTULO V

Análisis de los módulos de replicación, movilización y mantenimiento plasmídico de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	74
V.1 Introducción	75
V.2 Proteínas de inicio de replicación plasmídica (Reps)	75
V.2.1 Análisis bioinformático de los módulos de replicación	76
V.3 Proteínas de mantenimiento plasmídico.	82
V.3.1 Búsqueda in silico de proteínas de mantenimiento plasmídico	83
V.4 Módulos de movilización plasmídica	84
V.4.1 Análisis in silico de módulos de conjugación	85
V.4.2 Clasificación filogenética de plásmidos de acuerdo a sus relaxasas	88
V.4.3 Análisis del módulo de Movilización de los plásmidos MOBQ4 de la colección hospitalaria	95

## CAPÍTULO VI

Obtención y secuenciación de una colección ambiental de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> spp.	101
VI.1 Introducción	102
VI.2 Características fisiológicas del género <i>Acinetobacter</i>	103
VI.3 Obtención de la colección ambiental de bacterias del género <i>Acinetobacter</i> portadoras de plásmidos	103
VI.4 Extracción y purificación de plásmidos de la colección ambiental de <i>Acinetobacter</i> spp.	106
VI.5 Secuenciación masiva de la muestra compuesta de ADN plasmídico de la colección ambiental de <i>Acinetobacter</i> spp.	108

## CAPÍTULO VII

Descripción bioinformática de los módulos plasmídicos de la colección ambiental de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> spp.	110
VII.1 Introducción	111
VII. 2 Análisis general de los <i>contigs</i> plasmídicos de la colección ambiental de <i>Acinetobacter</i> spp.	111
VII. 3 Análisis de las proteínas de inicio de replicación (Reps) de la colección ambiental de plásmidos	112
VII.4 Análisis de las proteínas de movilización de la colección ambiental de plásmidos	116
VII.5 Descripción de las proteínas de mantenimiento plasmídico de la colección ambiental de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> spp.	122
VII.6 Descripción de módulos plasmídicos accesorios de la colección ambiental de <i>Acinetobacter</i> spp.	122

## CAPÍTULO VIII

Discusión general y conclusiones	128
----------------------------------	-----

# ANEXO

	139
Tablas	139
Tabla A.1 Proteínas homólogas a los ORFs de los plásmidos de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	140
Tabla A.2 <i>Scaffolds</i> remanentes no ensamblados	148
Tabla A.3 <i>Contigs</i> plasmídicos de secuenciación ambiental	149
Tabla A.4 Proteínas MURR homólogas en <i>contigs</i> plasmídicos ambientales	150
Tabla A.5 Proteínas de resistencia homólogas en <i>contigs</i> plasmídicos ambientales	152
Tabla A.6 Proteínas Rep_3 de <i>Acinetobacter</i> spp. de base de datos utilizadas para construcción del árbol filogenético	153

## Referencias Bibliográficas

154

# Índice de tablas

Tabla II.1 Cepas bacterianas	32
Tabla II.2 Aislamientos hospitalarios de <i>Acinetobacter</i> spp	32
Tabla II.3 Aislamientos ambientales de <i>Acinetobacter</i> spp. portadores de plásmidos	33
Tabla II.4 Plásmidos utilizados en este trabajo	34
Tabla II.5 Composición de medios de cultivo	35
Tabla II.6 Lista de oligonucléidos	43
Tabla III.1 Características generales de los plásmidos secuenciados de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp	58
Tabla V.1 Reps halladas in silico en la colección hospitalaria de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> spp.	78
Tabla V.2 Proteínas de mantenimiento plasmídico en la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	83
Tabla V.3 Proteínas de conjugación plasmídica en la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp	87
Tabla V.4 Frecuencias de conjugación	97
Tabla VII.1 Proteínas de inicio de replicación de la colección ambiental de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> spp	113
Tabla VII.2 Proteínas de conjugación y MGEs asociados a la colección ambiental de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> spp	117
Tabla VII.3 Proteínas de mantenimiento plasmídico de la colección ambiental de <i>Acinetobacter</i> spp	123
Tabla A.1 Proteínas homólogas a los ORFs de los plásmidos de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp	140
Tabla A.2 <i>Scaffolds</i> remanentes no ensamblados	148
Tabla A.3 <i>Contigs</i> plasmídicos de secuenciación ambiental	149
Tabla A.4 Proteínas MURR homólogas en <i>contigs</i> plasmídicos ambientales	150
Tabla A.5 Proteínas de resistencia homólogas en <i>contigs</i> plasmídicos ambientales	152
Tabla A.6 Proteínas Rep_3 de <i>Acinetobacter</i> spp. de base de datos utilizadas para construcción del árbol filogenético	153

# Índice de Figuras

Figura I.1 Arquitectura de zona involucrada en replicación de plásmidos ColE1	5
Figura I.2 Inicio de replicación en plásmidos tipo ColE1	6
Figura I.3. Generalidades del inicio de replicación por mecanismo de desplazamiento de cadena	6
Figura I.4. Mecanismo de replicación plasmídica por círculo rodante	7
Figura I.5 Regulación del inicio de replicación en plásmidos ColE1	9
Figura I.6 Regulación de la replicación mediada por iterones	10
Figura I.7 Incompatibilidad Plasmídica	12
Figura I.8. Resolución de multímeros y su impacto en la segregación	19
Figura I.9 Sistema de partición activa	21
Figura I.10 Generalidades del sistema TA Tipo I	22
Figura I.11 Sistema TA Tipo II	23
Figura I.12 Sistemas TA Tipo III	24
Figura III.1 Geles de lisis in situ para la observación de los perfiles plasmídicos de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	53
Figura III.2 Aislamientos de plásmidos de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	54
Figura III.3 Evaluación de la purificación a gran escala	55
Figura IV.1 Comparación de pIH1 con pENT 4-bd	63
Figura IV.2 Comparación de pIH2 con plásmidos IncN	64
Figura IV.3 Comparación de pIH3 y ZW85p2	65
Figura IV.4 Comparación de pIH7 con plásmidos similares de base de datos	67
Figura IV.5 Comparación de pIH13 con plásmidos de la familia pRAY	70
Figura IV.6 Comparación de pIH16 con plásmidos similares de base de datos	71
Figura IV.7 Comparación de pIH10 con regiones homólogas en base de datos	72
Figura V.1 Distribución de dominios en Reps de <i>Acinetobacter</i> spp.	77
Figura V.2 Árbol filogenético de proteínas Rep_3 de <i>Acinetobacter</i> spp.	79
Figura V.3 Arquitectura de <i>oriVs</i> de proteínas Rep_3 de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	81
Figura V.4. Ensayo funcional de <i>oriVs</i> de Rep_3	82
Figura V.5. Comparación de la arquitectura de pIH2 con R46 y R388	88
Figura V.6. Relación filogenética de pIH2 con plásmidos pertenecientes a la familia MOB <sub>F</sub> .	91
Figura V.7 Relación filogenética de pIH13 con plásmidos de la familia MOB <sub>HEN</sub>	92
Figura V.8 Árbol filogenético de relaxasas de la familia MOB <sub>Q</sub>	93
Figura V.9 Motivos característicos de familias MOB <sub>Q</sub>	94
Figura V.11 Comparación del esqueleto plasmídico entre pTF1 de <i>T. ferrooxidans</i> , pIH6 y pIH7 de la colección hospitalaria de <i>Acinetobacter</i> spp.	95
Figura V.11 Ensayo funcional de Dtr de plásmidos MOB <sub>Q4</sub>	97
Figura V.12. Alineamiento de las relaxasas de pIH6 y pIH7	98

Figura VI.1 Protocolo de aislamiento de <i>Acinetobacter</i> spp. desde muestras ambientales	105
Figura VI.2 Perfiles plasmídicos de los aislamientos de la colección ambiental de <i>Acinetobacter</i> spp.	107
Figura VII.1 Distribución de funciones en la colección ambiental de plásmidos de <i>Acinetobacter</i> spp.	112
Figura VII.2 Árbol filogenético de Rep_3 de <i>Acinetobacter</i> spp.	115
Figura VII.3 Árbol filogenético de relaxasas MOB <sub>F</sub>	119
Figura VII.4 Árbol filogenético de relaxasas MOB <sub>P</sub>	120
Figura VII.5 Árbol filogenético de relaxasas MOB <sub>Q</sub>	121



# **CAPÍTULO I**

## **Introducción**



## **I.1 Los plásmidos son entidades independientes de ADN extracromosomal**

El término “plásmido” fue establecido por Joshua Lederberg (Lederberg, 1952) para referirse a cualquier determinante extracromosomal que pueda heredarse y tener relevancia en las características genéticas del organismo que lo hospeda. Para diferenciar a estos elementos de los fagos, se estableció que los plásmidos, además de permanecer como elementos extracromosomales, deben poder replicarse de forma autónoma. Los plásmidos son elementos más pequeños que los cromosomas bacterianos y contienen en su estructura molecular genes que no se encuentran en el cromosoma. Si bien estos elementos contribuyen a la diversidad y plasticidad genética de los microorganismos, no son, en principio, esenciales para la vida microbiana, y por lo tanto, constituyen un recurso genético distinto, dinámico y adicional a los genes cromosomales (Frost *et al.*, 2005).

## **I.2 Características generales de los plásmidos**

La información codificada en los plásmidos es muy diversa, como también lo son sus características. El rango de tamaños de los plásmidos es amplio, desde los muy pequeños que sólo contienen la información suficiente para poder sostener su propia replicación, como también mega-plásmidos cuyos tamaños son comparables con algunos cromosomas bacterianos (Barnett *et al.*, 2001, Spaková *et al.*, 2013). El número de copias por cromosoma en que puede encontrarse un plásmido en un huésped celular es también muy variable y estará determinado según el mecanismo de control de la replicación que posea (Del Solar *et al.*, 1998). Otra característica distintiva de los plásmidos es el contenido porcentual de las bases nitrogenadas. Debido al costo energético que requiere mantener G y C por sobre A y T, se ha sugerido que el porcentaje de GC de los plásmidos es siempre un tanto menor que el correspondiente al cromosomal del microorganismo de origen. Teniendo en cuenta esto, el contenido porcentual de CG de estos elementos resulta de interés cuando se desea determinar el origen del replicón o la distancia evolutiva con algún ancestro (Nishida, 2012).

Los plásmidos pueden entenderse como un conjunto de bloques o módulos funcionales que fueron adquiriéndose a un esqueleto molecular común (Thomas, 2000). Cada uno de estos módulos está compuesto por proteínas involucradas en una

determinada función general como replicación, mantenimiento y movilización. La restante información adquirida que no cumple ninguna de las tres funciones anteriores, se agrupa en un cuarto módulo denominado accesorio o de adaptación. Estos cuatro módulos, que serán descritos más adelante, determinan la naturaleza del plásmido y se han utilizado como criterio de clasificación teniendo en cuenta la variedad, cantidad, disposición estructural y funcionalidad de los genes que los componen.

Los plásmidos pueden presentar distinta geometría, existiendo elementos circulares cerrados y otros de configuración lineal. Los plásmidos lineales fueron primero descritos en *Streptomyces* sp. (Hayakawa *et al.*, 1979) y al momento existen trabajos que describen su presencia en distintos géneros y especies bacterianos y eucariotas (Hishinuma & Hirai, 1991, Dib *et al.*, 2010, Kasimatis *et al.*, 2013, Miller *et al.*, 2013). Si bien es importante destacar la existencia de este tipo de geometría plasmídica, la mayoría de los estudios relacionados a plásmidos están abocados a aquellos con geometría circular. En este trabajo de Tesis el estudio de estos elementos se enfocó exclusivamente en plásmidos circulares, por lo tanto, al utilizar el término “plásmido”, se hará referencia exclusivamente a los elementos circulares covalentemente cerrados.

En consecuencia a su naturaleza geométrica, a diferencia de los lineales, los plásmidos circulares pueden presentar diferencias en su topología, encontrándose generalmente superenrollados. La acción de enzimas que generan cortes (*nicks*) en una de las hebras, generan la relajación de la estructura y los plásmidos pueden entonces adquirir una conformación abierta y circular. También, enzimas recombinasas pueden actuar y modificar la estructura de plásmidos circulares generando (o resolviendo) estructuras multiméricas como así también generando rearrreglos intra- o inter-moleculares (R. Fernández-López, 2006, Crozat *et al.*, 2015).

### **I.3 Módulo de replicación plasmídica**

#### **I.3.1 Características generales de la replicación de plásmidos**

Como se mencionó previamente, para poder permanecer como elementos de ADN extracromosomal los plásmidos deben ser capaces de replicarse independientemente del cromosoma. Existen distintos mecanismos de replicación de

plásmidos que requieren, en su inicio, de factores codificados en su mismo esqueleto molecular (Del Solar *et al.*, 1998). Una vez iniciado el proceso, la maquinaria celular del huésped toma acción y continúa con la duplicación del material genético. Por último, la acción tanto de factores plasmídicos como cromosomales se encargan de los procesos de terminación y resolución para la generación de dos copias del material plasmídico. El inicio de la replicación plasmídica puede ser dependiente de una proteína de inicio de replicación codificada en el propio plásmido (Rep), o independiente de Rep, en donde están involucrados ARNs antisentido codificados también en el mismo esqueleto molecular. A su vez, de acuerdo a la configuración que adoptan las moléculas durante la replicación, se pueden reconocer tres mecanismos de replicación de plásmidos circulares: Mecanismo *Theta*, Desplazamiento de Cadena y Mecanismo de Círculo Rodante (Del Solar *et al.*, 1998).

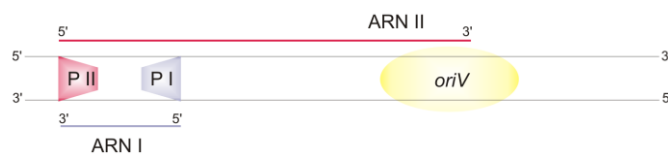
Independientemente del mecanismo de replicación que adopte la molécula, la duplicación del ADN siempre tiene comienzo en un *loci* determinado que se denomina origen de replicación (*oriV*). Estrictamente, el *oriV* puede definirse como I) la secuencia nucleotídica mínima que puede dar a lugar a la replicación, II) la región en donde se produce la desnaturalización de la doble hebra, o III) las bases en donde la cadena adelantada comienza la síntesis de la nueva hebra (Lilly & Camps, 2015). De aquí en adelante, nos referiremos al *oriV* cómo a la mínima secuencia nucleotídica que puede dar a lugar a la replicación. El *oriV* contiene en su secuencia señales que son reconocidas por las proteínas encargadas de iniciar y prolongar la replicación como así también regiones ricas en AT, en donde se produce la desnaturalización inicial de las hebras. En muchos casos, es posible reconocer la presencia de iterones, es decir, repeticiones directas cortas, generalmente en tándem, donde es llevado a cabo el reconocimiento por parte de las Rep. A su vez, estos iterones también cumplen un rol esencial en la regulación de la replicación (Koniczny *et al.*, 2014). La posición relativa que adoptan todos estos elementos en este *loci* determina múltiples arquitecturas o configuraciones que pueden o no encontrarse conservadas, incluso cuando las Reps involucradas pertenecen a una misma familia.

### I.3.2 Mecanismo de inicio de replicación *Theta*

El mecanismo de replicación *Theta*, involucra la desnaturalización local de las hebras de ADN parentales, la hibridación de oligoribonucleotidos cebadores (*primers*) y la iniciación de la síntesis de ADN por elongación del cebador, uniendo covalentemente al hidroxilo 3' desoxinucleótidos en dirección 5'-3'. La síntesis de ADN es continua en una de las hebras (cadena adelantada) y discontinua en la otra (cadena retrasada). Estas ocurren simultáneamente y son llevadas a cabo por ADN polimerasas celulares (Lilly & Camps, 2015).

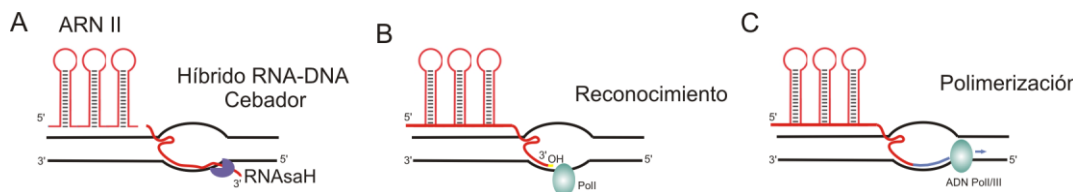
El inicio de la replicación tiene lugar cuando se produce la desnaturalización local de las hebras de ADN. Este proceso, puede ser dependiente de la transcripción (mecanismo Rep-independiente) o mediado por proteínas (Rep-dependiente). En el último caso, la Rep se une al *oriV* en los iterones o en repeticiones invertidas adyacentes. Esta interacción promueve el reclutamiento de otras proteínas celulares que resulta en la formación de un complejo que abre las hebras en las zonas adyacentes ricas en AT. La apertura de las hebras permite la acción de proteínas primasas que sintetizan cebadores de ARN sobre las hebras de ADN que luego serán elongadas por la maquinaria de replicación de la célula huésped (Konieczny *et al.*, 2014). En los plásmidos que presentan un mecanismo Rep-independiente, como es el caso de los plásmidos del tipo

ColE1, la desnaturalización de las hebras ocurre durante la transcripción (Del Solar *et al.*, 1998). Estos replicones, codifican para un pre-cebador, bajo el control de un promotor



**Figura I.1 Arquitectura de zona involucrada en replicación de plásmidos ColE1.** En la figura se muestra la posición de los promotores P I y P II y los productos de transcripción ARN I y ARN II. Este último, es de mayor longitud y su segmento 3' terminal es complementario al *oriV*.

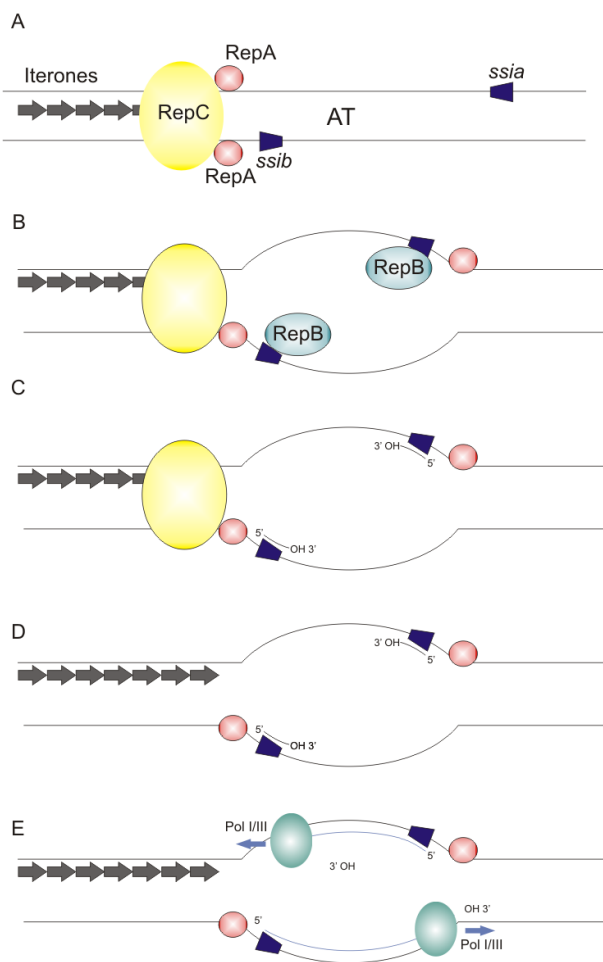
constitutivo denominado P II (**Figura I.1**). El segmento 3' del producto de la transcripción denominado ARN II, se une establemente por complementariedad de bases al ADN molde en el *oriV*, formando una estructura de bucle denominada R. La subsiguiente acción de la RNasaH del huésped sobre el ARN II deja un extremo 3'OH libre el cual es reconocido por las polimerasas DNA pol I y III (en ese orden) quienes llevan a cabo la polimerización. (Del Solar *et al.*, 1998) (**Figura I.2**).



**Figura I.2 Inicio de replicación en plásmidos tipo ColE1.** A) La unión de ARN II en el oriV genera un híbrido ADN-ARN que es reconocido y clivado por la RNAsaH del huésped. B) La polimerasa Pol I reconoce el extremo 3'OH cebador. C) La acción de Pol I y Pol III elongan la cadena nueva por adición de desoxinucleótidos en el extremo 3'.

### I.3.3 Mecanismo de inicio replicación por desplazamiento de cadena

El mecanismo de replicación por desplazamiento de cadena requiere la acción conjunta de tres Repls codificadas en el mismo replicón, denominadas RepA, RepB y



RepC. El *oriV* está compuesto necesariamente por al menos 20 iterones en tándem y segmentos adyacentes ricos en AT y otros en GC. Adicionalmente pueden encontrarse también pequeñas secuencias palindrómicas *ssia* y *ssib*

**Figura I.3. Generalidades del inicio de replicación por mecanismo de desplazamiento de cadena.** A) Reconocimiento y unión de RepC en los iterones adyacentes al oriV. Reclutamiento de RepA. B) Actividad helicasa de RepA deja expuestos los sitios ssi. C) RepB reconoce los sitios ssi y sintetiza los cebadores en las dos hebras. D) RepC y RepB abandonan la burbuja de replicación para dar lugar a la maquinaria de replicación del huésped. E) Las polimerasas celulares Pol I y III elongan la cadena adicionando desoxinucleótidos a los extremos 3'. Imagen adaptada de Del solar et al, 1998

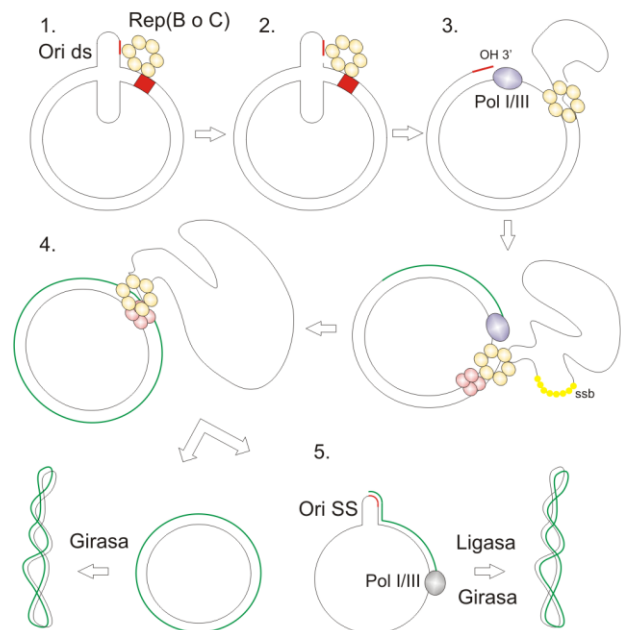
El inicio de la replicación ocurre gracias la interacción específica entre los iterones y RepC. RepA, es luego reclutada a la región rica en AT del origen de replicación y su actividad helicasa 5'-3' produce la desnaturalización del ADN. La separación de las

hebras, deja expuesto los sitios *ssi*, y de esta manera pueden ser reconocidos por RepB, que se une a cada una de las hebras y sintetiza los cebadores que luego serán reconocidos por la maquinaria de replicación de la célula huésped. La replicación se produce de manera continua por acción de las polimerasas celulares en ambas hebras y ocurre gracias al desplazamiento de RepA que permite la desnaturalización local del ADN (Del Solar *et al.*, 1998) (**Figura I.3**)

### I.3.4 Mecanismo de replicación por Círculo Rodante (CR)

El mecanismo de replicación por Círculo Rodante tiene inicio cuando la Rep plasmídica reconoce e interacciona con el *oriV* doble cadena (*ds ori*) generando un corte monohebra en la que será posteriormente la cadena adelantada. El corte genera un oxhidrilo 3' libre que será

reconocido como cebador por la maquinaria replicativa del huésped. La replicación de la cadena adelantada tendrá lugar hasta completar una vuelta completa y volver a alcanzar el *ds ori*, reconstituido. La Rep catalizará la reacción de transferencia de hebra liberando una molécula doble cadena híbrida donde una cadena proviene del plásmido parental y otra fue recientemente sintetizada. Esto deja la hebra simple parental libre, la cual es reconocida por la ARN pol del huésped en un segundo *oriV*, esta vez



**Figura I.4. Mecanismo de replicación plasmídica por círculo rodante.** 1) Reconocimiento y unión de RepB (o RepC) al *ori* doble cadena. 2) Clivaje. 3) Reclutamiento de proteínas e inicio de la replicación. 4) Clivaje y liberación. 5) Conversión a doble cadena. Imagen adaptada de Ruiz-Masó *et al.*, 2015

monohebra y distante del anterior. La síntesis de la nueva hebra será llevada a cabo nuevamente por la maquinaria replicativa celular. Ambos replicones resultantes deberán ser reconocidos por una ADN girasa celular para llegar a su correcta conformación supernrollada final (Ruiz-Masó *et al.*, 2015) (**Figura I.4**).

### I.3.5 Regulación de la replicación

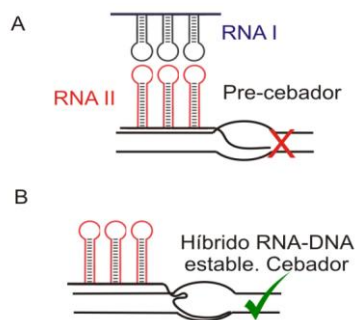
Los mecanismos de replicación plasmídica tienen un control específico que determina a su vez el número de copias del replicón dentro de la célula huésped. Los elementos de control están codificados por el mismo plásmido, y son los ya mencionados factores de iniciación de la replicación. Estos últimos, se encargan de mantener la tasa de replicación y de corregir desviaciones del número promedio de copias. Existen distintas estrategias bien conocidas para el control de la replicación: algunas involucran ARNs antisentido y otras son dependientes de iterones junto a factores presentes en *trans*. Existen también mecanismos híbridos que involucran tanto ARNs antisentido como el reconocimiento de repeticiones mediado por proteínas.

#### Estrategias mediadas por ARNs antisentido

Las estrategias de control por ARNs antisentido funcionan por mecanismos inhibitorios. Estas moléculas son sintetizadas constitutivamente y son poco estables, por lo tanto, cualquier alteración en la concentración del plásmido que la codifica, se traducirá inmediatamente en una variación en la concentración de la molécula. La inhibición se lleva a cabo por medio de distintos mecanismos como: I) Atenuación de la transcripción de Repls II) inhibición de la traducción de Repls III) Inhibición de formación del complejo cebador-ADN molde (Brantl, 2014).

- I. La atenuación de la transcripción de las Repls tiene lugar cuando el ARNm naciente se hibrida al ARN antisentido. Esta unión produce la formación de una estructura secundaria atenuadora de la transcripción del tipo *Rho* independiente.
- II. La inhibición de la traducción del mensajero puede darse mediante la unión de un ARN antisentido en una región específica del ARNm de la Rep, obstaculizando la traducción de un péptido líder acoplado a la traducción. El híbrido es consecuentemente reconocido y clivado por la RNAsa III de la maquinaria celular. Otra opción involucra la formación de estructuras secundarias en los híbridos de ARN que obstaculizan el reconocimiento de los ribosomas para acoplar la traducción.

- III. El mecanismo de inhibición mediante la formación del complejo cebador-molde es el encargado de regular la replicación de plásmidos del tipo ColE1 (Actis *et al.*, 1999). En este caso, para iniciar la replicación, es necesaria la presencia del ARN cebador de 550 pb ARN II. Este oligonucleótido, debe adoptar una conformación específica de manera de poder interactuar con el ADN para formar el híbrido ADN-ARN que más tarde será reconocido por la RNasaH del huésped. El control del inicio de la replicación estará dado por otra molécula, el ARN I, complementario al pre-cebador ARN II. La unión entre ARN I y ARN II, no permite que este último adopte la conformación tridimensional necesaria para la interacción con el origen de replicación. Existe también un tercer componente, codificado por el plásmido, la proteína Rop, que se encarga de mediar la interacción y estabilizar el complejo ARN I-ARN II, inhibiendo de este modo la replicación (**Figura I.5**)



**Figura I.5 Regulación del inicio de replicación en plásmidos ColE1.** **A)** La interacción ARN I-II no permite la formación estable del híbrido ARN-ADN en la burbuja de replicación. **B)** En ausencia del ARN I, el ARN II es capaz de generar una estructura secundaria y un híbrido ARN-ADN estable en la burbuja de replicación, que luego será reconocido procesado por la RNasaH para generar el correspondiente cebador.

#### Estrategias reguladas por iterones

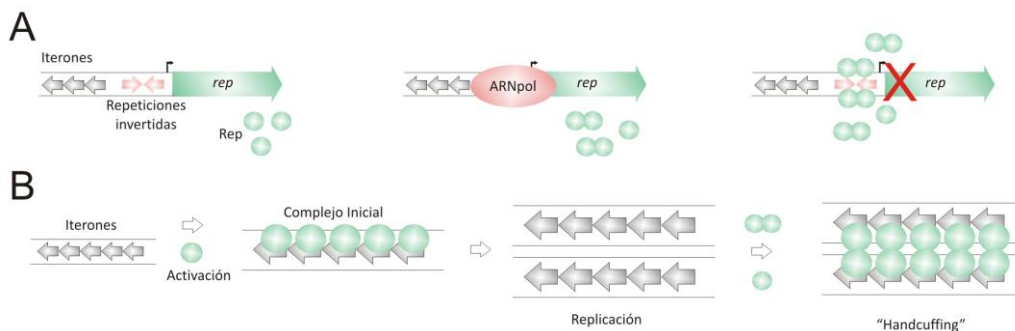
Los plásmidos que contienen iterones en sus orígenes de replicación pueden regular su número de copias mediante dos mecanismos, ambos consistentes en la interacción de la Rep con secuencias repetidas en *cis* en el origen de replicación: I) Impedimento estérico de la interacción ARN pol-oriV, II) *handcuffing* o esposamiento” (Del Solar *et al.*, 1998, Konieczny *et al.*, 2014):

- I. La concentración de Rep en el medio celular es proporcional al número de copias del plásmido. Cuando la cantidad de moléculas de Rep es alta, dímeros de esta proteína son capaces de asociarse a secuencias repetidas invertidas río arriba del gen *rep* (**Figura I.6 A**). Esta unión es muy estable y le proporciona un impedimento estérico a la ARN pol sobre el promotor de *rep*, anulando de esta



forma la transcripción de la proteína. Esta auto-represión transcripcional limita la cantidad de moléculas de Rep en el citoplasma celular. Es importante destacar que la afinidad de los dímeros de Rep es mucho mayor por las repeticiones invertidas en contraposición con las repeticiones directas. Los dímeros son capaces de reconocer la simetría entre estas secuencias (Del Solar *et al.*, 1998, Konieczny *et al.*, 2014).

- II. Como se ha mencionado anteriormente, para dar inicio a la replicación en plásmidos que contienen iterones, es preciso contar con la interacción de las Reps con las secuencias repetidas en el *oriV*. Cuando el número de copias del plásmido es alto, las moléculas de Rep son capaces de interactuar con los iterones de dos moléculas plasmídicas a la vez, o con otras Reps, asociadas a otro plásmido. Estas interacciones resultan en complejos plásmido-proteína-(proteína)-plásmido, que impiden estéricamente el inicio de la replicación (Del Solar *et al.*, 1998, Konieczny *et al.*, 2014).



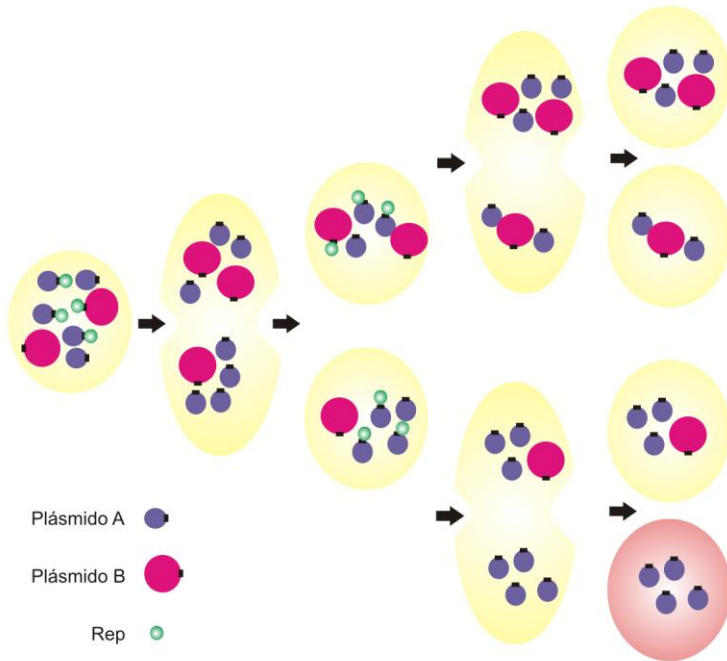
**Figura 1.6 Regulación de la replicación mediada por iterones.** A) Mecanismo por inhibición de transcripción del gen *rep*. Dímeros de Rep se unen fuertemente a repeticiones invertidas impidiendo estéricamente la unión de la ARNpol celular para la transcripción del gen *rep*. B) Handcuffing. La unión de Rep a los iterones puede resultar en complejos ADN-Rep-(Rep)-ADN que impiden el acceso de la maquinaria replicativa a los *oriVs*. Imagen adaptada de Konieczny *et al.*, 2014.

### I.3.6 Incompatibilidad plasmídica y rango de huésped

La regulación del número de copias por célula está controlada por la maquinaria de replicación que el plásmido codifica. El control, en todos los casos, está enfocado en la inhibición del inicio de la replicación. Tanto el fenómeno de incompatibilidad plasmídica, como el rango de huésped de un determinado plásmido, están relacionados estrechamente al mecanismo de replicación de cada replicón (Del Solar *et al.*, 1998).

El rango de huésped de un plásmido puede definirse como al grupo de microorganismos en donde un plásmido tiene la capacidad de replicar y perpetuarse (Jain & Srivastava, 2013). La capacidad de replicar de un plásmido en un determinado huésped, dependerá del reconocimiento de la maquinaria replicativa celular sobre el plásmido, una vez iniciada el proceso de replicación. Así, cuanto menos factores del huésped sean necesario ser reclutados, más autosuficiente será la replicación del plásmido, y por lo tanto, mayor su rango de huésped.

La incompatibilidad plasmídica, se define como la imposibilidad de dos replicones de coexistir en una determinada célula, y por lo tanto de ser heredado establemente, en ausencia de una presión de selección (Kittell & Helinski, 1993). Este fenómeno ocurre cuando dos replicones diferentes comparten su maquinaria replicativa. Las proteínas encargadas de llevar a cabo el reconocimiento de los *oriVs* no son capaces de discernir entre un plásmido y otro y generan sesgos en la replicación. Este fenómeno provoca cambios en el número de copias de los replicones que se traducen en cambios en la probabilidad de herencia de cada replicón (Croizat *et al.*, 2015) (**Figura I.7**). En otras palabras, elementos en *cis* idénticos en ambos plásmidos son determinantes de incompatibilidad, pues ambos competirán por el reconocimiento de proteínas que se encuentran en cantidades limitantes en el citoplasma celular, responsables de la regulación del número de copias y herencia del replicón.



**Figura 1.7 Incompatibilidad Plásmídica.** A y B comparten la misma Rep la cual no puede diferenciar entre sus oriVs (bloque negro). Debido al mayor número de copias de A, la Rep reconoce y replica más frecuentemente a A provocando una disminución del número de copias de B. En la primer división celular, una de las células hijas recibe sólo una copia de B y muchas de A. Nuevamente, Rep reconocerá más frecuentemente a A y en la subsiguiente división celular, una de las células hijas no recibirá una copia de B. Este fenómeno prosigue en las subsiguientes divisiones celulares provocando la pérdida de B en la población.

La capacidad de un plásmido de replicar en un determinado entorno en presencia de otros replicones ha sido utilizada para clasificar a los plásmidos en distintos grupos, definiendo de esta forma, distintos grupos de Incompatibilidad (Inc), en donde plásmidos incompatibles pertenecen a un mismo grupo (Del Solar *et al.*, 1998, Shintani *et al.*, 2015). Para poder clasificar a un replicón dentro de un grupo Inc, es necesario realizar ensayos funcionales en presencia de otros replicones. Para ello, es preciso que los replicones tengan marcadores de selección y la posibilidad de ser transferidos de una bacteria a otra. Sin embargo, el hecho de que no todos los plásmidos tengan estas características, sumado a la posibilidad de que un replicón tenga más un sistema de replicación, hacen que esta clasificación no pueda aplicarse a todos los replicones plasmídicos. Las nuevas tecnologías de secuenciación han permitido en los últimos años obtener secuencias de genes de proteínas de inicio de replicación, así como también las de otros módulos plasmídicos, dando a lugar a nuevas estrategias de clasificación.

## I.4 Módulos de movilización plasmídica

### I.4.1 Mecanismo de transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos

Los plásmidos pueden ingresar a los microorganismos por al menos dos mecanismos bien conocidos de transferencia horizontal de genes: Transformación y

Conjugación, aunque también, se han descrito vías no canónicas de transferencia horizontal, como la transmisión célula a célula en vesículas de membrana externa (Gaudin *et al.*, 2013, Fulsundar *et al.*, 2014).

#### ***1.4.1.1 Transformación bacteriana***

La transformación es el mecanismo por el cual las bacterias pueden tomar ADN desnudo del medioambiente, incorporarlo establemente a su genoma y expresar los genes codificados. Este sistema, ampliamente distribuido en arqueas y gran cantidad de bacterias (Johnsborg *et al.*, 2007), no sólo se encarga de proveer a la bacteria de nucleótidos para la reparación del ADN y su nutrición, sino que también, le permite a la bacteria acceder a nuevos componentes para la adaptación a las condiciones ambientales cambiantes, que pueden encontrarse codificados en plásmidos (Krüger & Stingl, 2011). El proceso de transformación natural se da en bacterias fisiológicamente competentes, es decir, deben poseer y regular la expresión de los genes que codifican para los componentes de la maquinaria que le permita introducir el ADN exógeno dentro del citoplasma bacteriano (Mell & Redfield, 2014). Con excepción de algunas bacterias, el estado de competencia tiene una duración limitada y responde a condiciones ambientales tales como alteraciones en las condiciones de crecimiento, disponibilidad de nutrientes, densidad celular (*quórum sensing*) o ayuno (Johnston *et al.*, 2014).

#### ***1.4.1.2 Conjugación***

La conjugación es un proceso que requiere el contacto directo célula-célula para la transferencia de los plásmidos desde una célula donadora a una receptora. Este mecanismo es considerado un factor importante para el flujo de genes entre bacterias debido al amplio rango de transferencia y replicación que presentan muchos plásmidos conjugativos (Lanka & Wilkins, 1995).

El mecanismo canónico de conjugación en bacterias Gram negativas, puede dividirse en tres grandes pasos (Llosa *et al.*, 2002):

- I. Procesamiento: la primera etapa en el proceso de conjugación lo constituye el reconocimiento del origen de transferencia (*oriT*) y el procesamiento del ADN de transferencia (ADN<sub>t</sub>). En este paso, están involucrados los elementos del

denominado sistema Dtr, del inglés DNA Transfer and Replication, compuesto de elementos en *cis* (*oriT*) y en *trans* (proteínas del relaxosoma). La proteína más importante de este sistema, la relaxasa, es la encargada del reconocimiento y unión específica a las repeticiones o señales secuenciales en el *oriT* (Lanka & Wilkins, 1995, de la Cruz *et al.*, 2009).

- II. Reclutamiento: llevado a cabo por una proteína acopladora CP (del inglés *Coupling Protein*), que reconoce el complejo del relaxosoma, se une a él y lo transporta a la cara interna de la membrana interna donde se acopla al sistema secretor (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).
- III. Translocación: llevado a cabo por las proteínas del Mpf (del inglés *Mating Pair Formation* o formación del par conjugativo). Esta maquinaria, corresponde a un Sistema de Secreción de Tipo 4 (T4SS) que transporta el complejo proteína/ADNt hacia la célula receptora. Una vez allí, la maquinaria de la célula huésped reconoce al ADN monohebra y sintetiza la cadena complementaria, completando así, la transferencia del material genético (Alvarez-Martinez & Christie, 2009, de la Cruz *et al.*, 2009).

#### I.4.2 Módulos de conjugación plasmídica

Todos los elementos encargados de llevar a cabo el proceso de conjugación plasmídica se dividen en dos grandes módulos, de acuerdo a su función: el Dtr, que se encarga del procesamiento del ADN que se va a transferir, y el Mpf, que se encarga del reclutamiento y transporte a la célula receptora (de la Cruz *et al.*, 1993).

##### I.4.2.1. Sistema Dtr

Compuesto por elementos codificado en el propio plásmido: el *oriT*, las proteínas relaxasas y otras de reconocimiento y procesamiento del *oriT*:

##### Relaxasas

Las relaxasas son enzimas codificadas por los plásmidos, involucradas tanto en la iniciación como en la finalización del procesamiento del ADN a ser transferido por conjugación. Esta enzima es la encargada de reconocer secuencias específicas del *oriT*, unirse y catalizar el *nick* en la hebra que será transferida. Debido a que la generación del *nick* produce la relajación del plásmido superenrollado, se ha denominado al complejo proteico asociado como el “relaxosoma” y a la proteína encargada de

generar el corte como relaxasa. La reacción catalizada por la relaxasa es una transesterificación, y como resultado de ella, el extremo 3' de la hebra cortada queda unido al sitio activo de la enzima (Lanka & Wilkins, 1995).

El análisis de las secuencias de las relaxasas en base de datos, ha demostrado que estas proteínas contienen 3 dominios bien conservados hacia el extremo N-ter, relacionados directamente con la función de transesterificación. El denominado Motivo I, contiene el sitio activo de la enzima, en donde la presencia de una Tyr es esencial para la actividad. El Motivo II contiene una Ser que parecería ser importante para interacción no covalente ADN-proteína en el extremo 3' del sitio de *nick*. Por último, el Motivo III o Motivo 3H, contiene tres residuos que participarían ayudando al ataque nucleofílico de la Tyr del Motivo I al ADN, mediante la activación de la misma y por medio del reclutamiento de iones  $Mg^{+2}$  (Lanka & Wilkins, 1995, Francia *et al.*, 2004)

El estudio de la relaxasa del plásmido R388, denominada TrwC (R. Fernández-López, 2006), ha demostrado que puede existir más de una función asociada a las relaxasas. En particular, TrwC, contiene además de los tres motivos nombrados recientemente, un dominio distinto en su extremo C-ter con actividad helicasa cuya funcionalidad es esencial para el procesamiento su *oriT* (Gonzalez-Perez *et al.*, 2007).

Estas características bien conservadas en las proteínas relaxasas, han sido de utilidad a la hora de clasificar a los plásmidos movilizables y/o conjugativos, de acuerdo a las variaciones dentro de los tres motivos ya descritos. Utilizando las secuencias de los 300 aa N-ter de las relaxasas en un análisis filogenético, es posible reconocer y clasificar a los plásmidos dentro de distintas familias MOB, haciendo a un lado clasificaciones basadas en grupos de incompatibilidad (Francia *et al.*, 2004, Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

#### Origen de Transferencia (*oriT*)

El *oriT* es el único elemento requerido en *cis* para la transferencia de ADN por conjugación y corresponde a la región de reconocimiento y acción de la relaxasa. En este *loci*, es posible destacar determinadas características generales (Lanka & Wilkins, 1995):

- I. Se sitúa asimétricamente con respecto a los genes de transferencia. En consecuencia, ingresan a la célula receptora al final del proceso conjugativo.
- II. Contiene una zona rica en AT donde posiblemente ocurra la desnaturalización y apertura de la doble hebra.
- III. Contiene una serie de repeticiones cortas directas y/o indirectas que le confieren una estructura secundaria compleja. Estas estructuras estarían involucradas en el reconocimiento de proteínas accesorias de unión a ADN necesarias para el procesamiento eficiente del plásmido a ser transferido.
- IV. Contiene señales en sus secuencias que le confieren curvaturas intrínsecas (*DNA bending*) que actúan como potenciales sitios de unión de proteínas para alterar la estructura local del *oriT*, de modo de facilitar el acceso de las proteínas a la región de corte.
- V. Contiene promotores para la expresión de los genes de transferencia (*tra*), los cuales en muchos casos promueven una transcripción divergente desde el *oriT*.

#### **I.4.2.1 Sistema Mpf**

El sistema de formación del par conjugativo, Mpf, funciona como una maquinaria secretora del ADN intracelular durante la conjugación bacteriana. Los componentes del Mpf comprenden un set mínimo de 10 proteínas conservadas que forman un complejo asociado a las membranas, un canal de secreción y un *pili*, necesarios para el establecimiento del contacto íntimo célula-célula. El complejo del Mpf requiere de la CP que puede o no estar asociada al Mpf, y que interactúa con el ADNt a través del relaxosoma, y lo transporta y acopla al poro de secreción creado por las proteínas del Mpf (Schroder & Lanka, 2005).

Uno de los sistemas de secreción mejor caracterizado en bacterias Gram negativas, es el VirB/VirD4 de *Agrobacterium tumefaciens* (Christie & Cascales, 2005) conformado por 11 proteínas del operón *virB*, y la proteína VirD4 (CP), que pertenece al operón *virD*. Muchos sistemas de secreción de tipo 4 de bacterias Gram negativas están compuestos de homólogos de los sistemas VirB y VirD presentando menores o mayores variaciones, con la excepción de las familias de proteínas relacionadas a VirB4, encargadas de aportar energía al sistema y la VirD4. Estas proteínas siempre se encuentran presentes en los T4SS y es debido a su universalidad en plásmidos

conjugativos, que son usadas también como criterio de clasificación de plásmidos (Alvarez-Martinez & Christie, 2009, de la Cruz *et al.*, 2009).

#### I.4.3 Clasificación de plásmidos según sus propiedades de movilización

De acuerdo a los elementos codificados en los replicones, se ha establecido un criterio de clasificación que comprende 3 grandes grupos (Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2013):

- I. Plásmidos conjugativos o autotransmisibles: son aquellos plásmidos que contienen en su genoma todos los elementos necesarios para ser transferido por sí mismo de una célula a otra, es decir, tiene un sistema completo del Dtr y Mpf.
- II. Plásmidos movilizables: son aquellos plásmidos que sólo contienen el Dtr. Por lo tanto, para poder ser conjugados a otra célula, necesitan de la maquinaria en *trans* del Mpf que puede ser aportada por otro replicón. En este caso, el plásmido que le confiere esta función de “ayuda” se denomina *helper*.
- III. No movilizables: son aquellos replicones que no contienen en su esqueleto plasmídico ninguno de los dos sistemas, ni Dtr, ni Mpf.

Si bien la clasificación de plásmidos de acuerdo a sus propiedades de movilización es actualmente aceptada, es importante destacar que la conjugación se encuentra sujeta a regulación, y este control depende de factores que pueden o no estar codificados por el propio plásmido (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Además, existe evidencia de que plásmidos de *Staphylococcus* spp., que no contienen sistemas de Dtr y Mpf, son capaces de ser movilizados por plásmidos conjugativos gracias a reconocimiento de *locus* cuyas estructuras secundarias imitan a los *oriT* de los sistemas de Dtr (Ramsay *et al.*, 2016).

#### I.5 Módulo de mantenimiento plasmídico

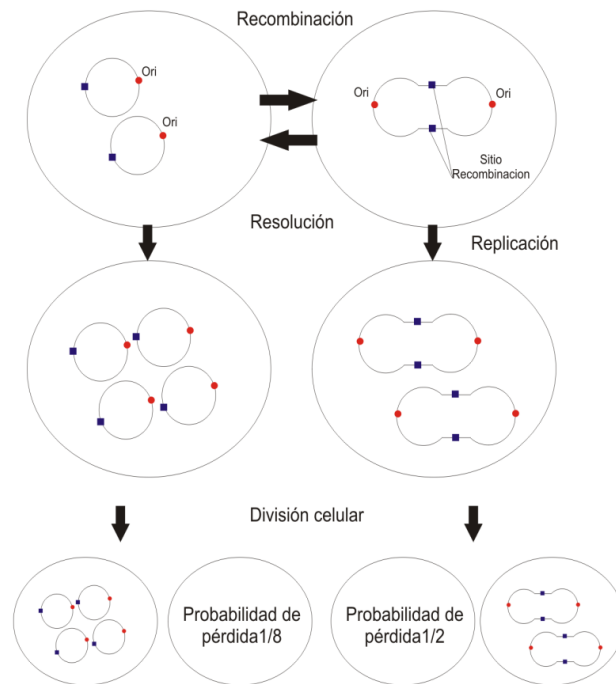
Existen al menos tres mecanismos activos que aseguran que los plásmidos puedan permanecer en el huésped celular, como así también heredarse correctamente: la resolución de multímeros, la partición activa, y la muerte post-segregacional o toxina antitoxina. Los plásmidos pueden tener uno, múltiples, o



ninguno de estos sistemas codificados en su esqueleto molecular (Sengupta & Austin, 2011).

### I.5.1 Resolución de multímeros

Tanto los plásmidos como los cromosomas circulares son propicios a sufrir rearrreglos debido a eventos de recombinación homóloga. Estos eventos pueden dar lugar a la formación de moléculas diméricas o multiméricas, en donde dos copias de un replicón se fusionan para dar una molécula de mayor tamaño. Los multímeros de plásmidos afectan la estabilidad plasmídica al disminuir el número de unidades segregacionales independientes (Croizat *et al.*, 2015) (**Figura I.8**). Los plásmidos de alto número de copias se segregan azarosamente, de manera que la probabilidad de que una célula hija no herede una copia del replicón es inversamente proporcional a su número de copias al iniciar la división celular (Million-Weaver & Camps, 2014). La formación de multímeros, disminuye el número de unidades heredables por orígenes de replicación y aumenta, la probabilidad de la pérdida de estos plásmidos. Además, estos multímeros por poseer más de un *oriV*, son reconocidos más veces por la maquinaria replicativa, por lo tanto su tasa de replicación es mayor en comparación a los monómeros. Esta ventaja replicativa, causa la acumulación de multímeros en la progenie. Este fenómeno, reconocida como la “catástrofe del dímero”, es responsable en gran parte del defecto segregacional y por lo tanto, de la inestabilidad plasmídica (Summers *et al.*, 1993).



**Figura 1.8. Resolución de multímeros y su impacto en la segregación.** La recombinación entre las moléculas disminuye el número de unidades segregacionales aumentando la probabilidad de pérdida en la división celular. La acción de recombinasas específicas resuelve las moléculas multiméricas y reestablece el número de unidades independientes. La probabilidad de que una célula hija no reciba una copia del plásmido es calculada como  $Po = 2^{(1-n)}$  donde  $n = N^\circ$  de copias del plásmido. Imagen adaptada de Crozat et al., 2015.

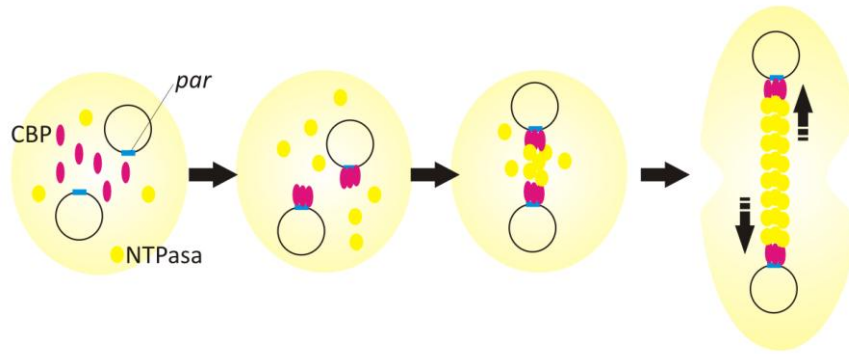
El mecanismo de resolución involucra enzimas pertenecientes a la familia de la Ser- o Tyr-recombinasas, de acuerdo a la naturaleza del aminoácido nucleófilo que se encuentre en el sitio activo. Estas proteínas median la recombinación en fragmentos pequeños de ADN ~30 pb que constituyen las señales de reconocimiento de las recombinasas. Cada segmento contiene dos motivos separados por una región central en donde se va a producir el corte e intercambio de las hebras. Existen también sitios de reconocimiento de otras proteínas accesorias sin las cuales no podría llevarse a cabo el proceso y que son importantes en la regulación de la resolución de multímeros (Crozat *et al.*, 2015).

### I.5.2 Partición activa

Los plásmidos de bajo número de copias suelen tener un mecanismo de partición activa que les asegura su correcta segregación y herencia estable (Schumacher, 2008). Dicho mecanismo, moviliza y posiciona a los plásmidos en polos celulares opuestos de manera tal que, al finalizar la división celular, cada célula hija recibe al menos una copia del replicón. El mecanismo requiere la acción de dos

proteínas sobre un *loci* del tipo centromérico *par*. Una de las proteínas se denomina CBP del inglés *Centromere-Binding Protein* o proteína de unión a centrómero y se trata de una proteína con dominio de unión a ADN que reconoce específicamente al sitio *par*. La segunda proteína involucrada se trata de una proteína motora con actividad ATPasa o GTPasa encargada de proveer energía al sistema (Schumacher, 2012, Baxter & Funnell, 2014). El primer paso en el mecanismo de partición se da por el reconocimiento de CBP sobre el sitio *par*. La unión de una sola molécula de CBP no es suficiente, por lo que es necesario el reclutamiento de más unidades. De esta manera, se genera una estructura grande en donde cada molécula de CBP representa un sitio de unión para moléculas de la NTPasa. La unión ADN-CBP-NTPasa conforma el complejo de partición. La unión ADN-CBP estimula la acción de la NTPasa asociada, la cual comienza a funcionar cíclicamente, uniendo e hidrolizando NTPs, obteniendo así la energía necesaria para el movimiento del complejo (**Figura I.9**)(Schumacher, 2012, Baxter & Funnell, 2014).

Los genes que codifican para estas proteínas generalmente se encuentran formando un operón y sufren de una autoregulación; una de las proteínas reprime la transcripción del operón y la otra estimula la actividad del represor. En general, CBP es el represor directo que hace las veces de operador, aunque en algunos sistemas, este mecanismo puede estar invertido. Con respecto al sitio *par*, se ha encontrado que puede variar tanto su localización, como así también su número (Gerdes *et al.*, 2000).



**Figura 1.9 Sistema de partición activa.** Las proteínas CBP reconocen y se unen al sitio par de los plásmidos. Posteriormente son reclutadas las NTPasas las cuales se unen a CBP. Esta unión estimula la acción de la NTPasa que comienza a polimerizarse a expensas de la hidrólisis de NTPs. La polimerización “empuja” a los complejos localizando a los plásmidos en los polos celulares previamente a la división celular. Imagen adaptada de Bouet et al., 2007.

El sistema de partición puede ser clasificado basándose en los dominios de unión de la NTPasa, como así también en los dominios de unión a ADN de la proteína CBP (Baxter & Funnell, 2014).

### 1.5.3 Muerte post-segregacional o toxina-antitoxina (TA)

Muerte post-segregacional es el término utilizado para definir a la muerte celular inducida por la pérdida de algún elemento debido a una segregación incorrecta. Este mecanismo requiere de dos elementos: uno tóxico que induce la muerte celular, y una molécula antitoxina que inhibe la acción de la toxina. Este sistema impone una presión sobre la célula que recibe la toxina, de manera que sólo puede sobrevivir en presencia del antídoto, el cual deberá ser heredado establemente para la supervivencia de la progenie. Los plásmidos utilizan esta estrategia para asegurarse su correcta segregación y permanencia dentro de un huésped (Mruk & Kobayashi, 2013, Hernández-Arriaga *et al.*, 2014).

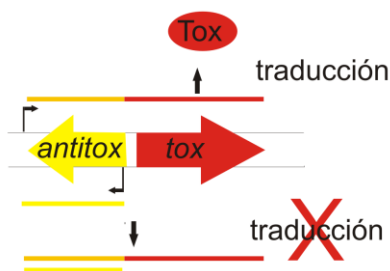
Las toxinas de todos los sistemas toxina-antitoxina, TA, son siempre proteínas, mientras que las antitoxinas pueden ser proteínas o pequeños ARNs. En general, las toxinas son moléculas más estables que las antitoxinas, por lo tanto permanecen en el citoplasma celular por más tiempo que la antitoxina. Cuando la división celular tiene lugar, ambas moléculas del sistema TA, que están distribuidas azarosamente en el citoplasma, son heredadas por las células hijas. Con el tiempo, las moléculas antídoto heredadas se degradarán en contraposición a las toxinas, por lo cual, la actividad

tóxica de estas últimas se desarrollará. Si la célula hija heredó el plásmido que codifica para el sistema TA, la concentración del antídoto nunca disminuirá y por lo tanto, la célula sobrevivirá. De esta forma, el replicón se asegura que aquella célula que no haya heredado el plásmido, no sea viable (Unterholzner *et al.*, 2013).

Existen distintos tipos de toxinas que tienen como blanco distintos elementos involucrados en procesos del metabolismo celular y/o estructural esencial. La amplia variedad de funciones tóxicas atribuidas a estas proteínas, conllevan también a una gran variedad de sistemas antídoto para lograr la supervivencia celular. La naturaleza y función de las antitoxinas han servido de marco para la clasificación de los módulos TA. Al momento, han sido descritos 5 sistemas diferentes (Unterholzner *et al.*, 2013):

### 1.5.3.1 Sistemas Tipo I

Los sistemas de TA Tipo I son aquellos cuyo antitoxina es un pequeño ARN antisentido inestable, complementario al ARNm de la toxina. La unión de ambos inhibe la traducción del mensajero al impedir la unión del ribosoma. Algunos sistemas contienen además mecanismos adicionales de regulación en donde intervienen otras proteínas que pueden ser factores transcripcionales, RNasa H o proteasas (Brantl, 2012).

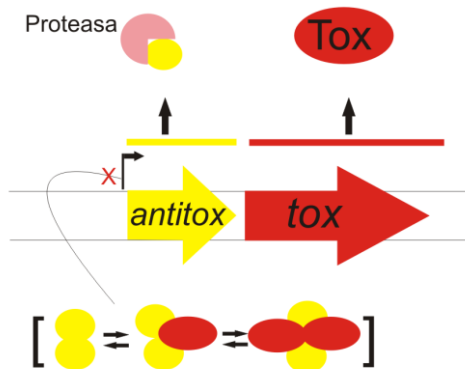


**Figura 1.10 Generalidades del sistema TA Tipo I.** Todas las antitoxinas de este sistema son ARN complementarios al producto de transcripción del operón. La unión genera un ARN doble cadena que impide la traducción del mensajero de la toxina por efectos estéricos o por degradación. Imagen adaptada de Unterholzner *et al.*, 2013.

### 1.5.3.2 Sistemas Tipo II

En estos sistemas, tanto la toxina como la antitoxina son proteínas. La interacción entre ambas, conlleva a la neutralización de la actividad tóxica. La toxina es una proteína estable; la antitoxina, tiene una vida media corta, gracias a la acción de distintas proteasas. Aunque existen excepciones conocidas, en general, los genes que codifican para la toxina y antitoxina se encuentran formando un operón en donde la antitoxina se ubica río arriba de la toxina. El operón está autoregulado negativamente

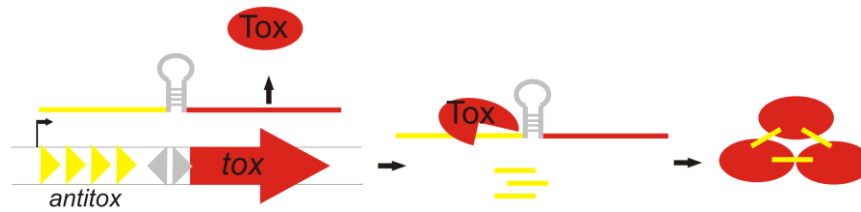
por unión del producto de sus genes a la región promotora, inhibiendo la transcripción (Figura I.11). Originalmente los sistemas TA tipo II se clasificaban en función de la similitud en la secuencia y estructura, y se asoció a cada antitoxina una toxina del mismo grupo o familia. Sin embargo, se han descrito sistemas híbridos en donde un mismo operón contiene codificado toxinas y antitoxinas pertenecientes a distintas clases (Unterholzner *et al.*, 2013, Chan *et al.*, 2016).



**Figura I.11 Sistema TA Tipo II.** Los genes de este sistema se encuentran conformando un operón. La proteína antitoxina es capaz de dimerizarse y unir a la toxina para neutralizar su actividad. La antitoxina es inestable debido a que es blanco de la acción de proteasas. El operón se halla bajo autoregulación: cuando las concentración de toxinas y antitoxinas es alta, pueden unirse al promotor del operón e impedir su transcripción al bloquear a la ARN polimerasa del huésped. Imagen adaptada de Unterholzner *et al.*, 2013.

### I.5.3.3 Sistemas Tipo III

En este sistema, la antitoxina es un ARN, pequeño, cuyo mecanismo de acción es diferente a los sistemas Tipo I. En este caso, el gen de la toxina es precedido por una serie de repeticiones directas en tándem y una secuencia repetida invertida. El producto de transcripción de la zona de repeticiones directas es un ARN cuya interacción con la toxina produce la inhibición de su toxicidad. Las repeticiones invertidas, generan una estructura secundaria que funciona como terminador de la transcripción para el pequeño ARN. La toxina además tiene función endorribonucleasa, que cliva al mensajero codificado río arriba para generar el pequeño ARN regulatorio (Figura I.12) (Blower *et al.*, 2012).



**Figura 1.12 Sistemas TA Tipo III.** El producto de transcripción de la zona río arriba del gen de la toxina es clivado por esta última generando pequeños fragmentos de ARN que interactúan con la toxina, neutralizando su acción. Imagen adaptada de Unterholzner et al., 2013.

#### 1.5.3.4 Sistemas Tipo IV

Este sistema corresponde al módulo *ctbA/ctbB* de *E. coli* (Masuda et al., 2012). La toxina, interfiere en el metabolismo del citoesqueleto celular al interactuar con proteínas clave para su ensamble. La acción de la antitoxina no tiene como objetivo inhibir directamente a la toxina, sino en estabilizar las proteínas que son diana de la toxina. Se han descrito también sistemas en donde tanto la toxina como la antitoxina tienen como blanco a los ARN mensajeros, ejerciendo su función de estabilización/desestabilización de proteínas esenciales para la supervivencia del microorganismo.

#### 1.6.3.5 Sistemas Tipo V

En este caso en particular, la antitoxina del sistema tiene un dominio con actividad endoribonucleasa que reconoce específicamente y cliva el ARNm de la toxina, aboliendo así su traducción y consecuente actividad tóxica (Wang et al., 2012).

### 1.6 Módulos accesorios

Además de los módulos funcionales exclusivamente plasmídicos que le confieren a la molécula la capacidad de replicarse, permanecer y heredarse establemente y movilizarse, los plásmidos pueden contener en su esqueleto molecular una gran variedad de genes denominados accesorios (Norman et al., 2009). Debido a que los plásmidos no cumplen funciones esenciales para la vida de los microorganismos, los genes accesorios plasmídicos, en general tienen funciones del metabolismo secundario y su existencia en la célula huésped puede generarle una ventaja adaptativa frente a aquellas que no lo contengan. Es por esta misma razón que

los módulos accesorios de los plásmidos variarán en concordancia con el nicho ecológico que ocupe la célula huésped.

De acuerdo a la función que los módulos accesorios cumplen en el entorno celular, pueden agruparse, en grandes rasgos, en los siguientes grupos:

- I. Determinantes de simbiosis: un ejemplo muy claro lo constituyen los plásmidos simbióticos de rizobios, pSym. Estos (mega) plásmidos, contienen en su esqueleto molecular un grupo de genes accesorios que contienen la información necesaria para el establecimiento de una relación simbiótica entre las bacterias y las raíces de las leguminosas, en donde los rizobios, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en forma de sustratos asimilables a cambio de protección y nutrientes aportados por la planta. Si bien estos plásmidos no son esenciales para la vida libre de los rizobios, son fundamentales en el establecimiento de esta relación simbiótica (Banfalvi *et al.*, 1981, Kondorosi *et al.*, 1982).
- II. Determinantes de patogenicidad y/o virulencia: existen plásmidos "patogénicos" que por su sola presencia modifican la conducta de la bacteria huésped. Estos plásmidos contienen en su estructura genes cuya expresión le da a la bacteria huésped la capacidad de invadir un determinado tejido o de efectuar una actividad tóxica para su medio circundante, beneficiando la persistencia y multiplicación del microorganismo portador del plásmido, y, generando consecuentemente, un daño en los organismos superiores blanco de ataque de estos microorganismos (Hale, 1991, Wijetunge *et al.*, 2014).
- III. Metabolismo/degradación de compuestos xenobióticos: la capacidad de utilizar fuentes de carbono y energía alternativas, como lo son los compuestos xenobióticos, muchas veces son adquiridas por los microorganismos por medio de plásmidos, los cuales contienen en su esqueleto molecular genes accesorios involucrados en rutas metabólicas de degradación de distintos compuestos orgánicos. Por lo general, se tratan de plásmidos de alto peso molecular y son encontrados en bacterias que han sido expuestas y seleccionadas en ambientes contaminados con dichos compuestos. La existencia de estos plásmidos constituyen una herramienta biotecnológica de mucha importancia debido a



que las propiedades degradativas podrían potencialmente transferirse a consorcios microbianos encargados de llevar a cabo procesos de biorremediación (Basta *et al.*, 2004, Ghosal *et al.*, 2016).

- IV. Resistencia a antimicrobianos: los plásmidos pueden llevar genes accesorios que le permiten a la célula huésped tolerar y resistir a la presencia de antibióticos y metales pesados (entre otros antimicrobianos). La gran cantidad de mecanismos por los que los microorganismos pueden resistir en estas condiciones adversas se traduce en una amplia variedad de genes que pueden ser codificados por los plásmidos de resistencia, pudiéndose encontrar plásmidos con un sólo gen de resistencia, plásmidos con *clusters* de genes de resistencia, o estructuras especializadas que contienen varios casetes de genes de resistencia bajo el control de un solo promotor como los son los integrones (Smalla *et al.*, 2006, Carattoli, 2013, Chen *et al.*, 2014, Szmolka *et al.*, 2015).

Todas las características que presentan los módulos accesorios detallados previamente, hacen de los plásmidos elementos independientes especializados en la dispersión de la información. Los plásmidos pueden además perder, adquirir o modificar su información accesorio, provocando una inmensa variedad de estructuras asociadas a los módulos plasmídicos. El movimiento de estos vectores entre microorganismos, les proporciona a los huéspedes un nuevo recurso genético que permite la adaptación a nuevos ambientes, como así también, la posibilidad de intercambio genético intracelular. Por esta razón, los plásmidos son considerados elementos claves en los procesos de adaptación y especiación de poblaciones bacterianas (de la Cruz & Davies, 2000, Norman *et al.*, 2009).

### 1.7 *Acinetobacter* spp como modelo de estudio

Los estudios que involucran a bacterias identificadas como *Acinetobacter baumannii*, han cobrado importancia en las últimas décadas debido a la emergencia de cepas causantes de brotes de infecciones hospitalarias (Villegas & Hartstein, 2003, Scott *et al.*, 2007, Kempf & Rolain, 2012). A pesar de ser considerado un patógeno oportunista, actualmente se encuentra dentro del grupo de patógenos ESKAPE (acrónimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp.) que

constituyen una de las causas más importantes de infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados inmunodeprimidos (Santajit & Indrawattana, 2016). Si bien inicialmente se ha descrito a las especies *A. baumannii* o al complejo *A. calcoaceticus/baumannii* como los responsables de las infecciones hospitalarias; gracias a las nuevas tecnologías de tipificación y secuenciación para la identificación de microorganismos, existen hoy numerosos trabajos que describen también a otras especies del género como agentes causales de infecciones hospitalarias (Visca *et al.*, 2011, Rit & Saha, 2012, Townsend *et al.*, 2015).

La razón por la que *Acinetobacter* spp. se ha convertido en un género de relevancia clínica se debe a que han desarrollado una increíble capacidad de sobrevivir bajo múltiples condiciones ambientales como la baja disponibilidad de agua y nutrientes, amplios rango de pH y en particular, en los ambientes hospitalarios, bajo intensa presión de selección debido al uso continuo de desinfectantes y antimicrobianos (Bergogne-Berezin & Towner, 1996). Estas habilidades se corresponden a la adquisición e incorporación de genes accesorios al genoma, cuyos productos funcionales les confiere a las bacterias estas ventajas adaptativas (Imperi *et al.*, 2011). Dentro de estos genes adquiridos, se encuentran los genes de resistencia a antimicrobianos. La incorporación de estos últimos han llevado a bacterias de este género a convertirse en individuos multi/pan resistentes, es decir, a presentar resistencia a todas las familias de antibióticos conocidas en la actualidad, haciendo muy difícil su erradicación en ambientes hospitalarios (Chuang *et al.*, 2014, Hanif *et al.*, 2016, Leite *et al.*, 2016, Pan *et al.*, 2016).

Las bacterias del género *Acinetobacter* en general son portadoras de plásmidos cuyos tamaños y contenido son variables y pueden transferirse horizontalmente. Por este motivo, es de esperar que los plásmidos sean responsables de la presencia de gran cantidad de información accesorio en su pangenoma, como también a la evolución hacia el fenotipo de multi/panresistencia (Imperi *et al.*, 2011). Estas características convierte a *Acinetobacter* spp. en un blanco interesante de estudio y un modelo adecuado para investigar acerca de la evolución de los genomas bacterianos mediado por plásmidos.

Los trabajos publicados sobre plásmidos de *Acinetobacter* spp. se hallan en su mayoría asociados a la dispersión de los genes de resistencia a antibióticos (Hamidian *et al.*, 2012, Nigro & Hall, 2014, Nigro & Hall, 2015, Nigro *et al.*, 2015, Ou *et al.*, 2015, Yoon *et al.*, 2015, Da Silva & Domingues, 2016, Nigro & Hall, 2016, Rao *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016). En éstos, se hace especial hincapié en la búsqueda de genes de resistencia a antimicrobianos y a la descripción de su contexto genómico, es decir, la presencia y disposición estructural de Secuencias de Inserción (IS), transposones, puntos de recombinación sitio específica, genes de proteínas de inicio de replicación, como así también de genes relacionados a la transferencia conjugativa y algunos relacionados al mantenimiento plasmídico. En general, estos trabajos fueron realizados sobre plásmidos individuales pertenecientes a aislamientos multiresistentes de *Acinetobacter* spp. de relevancia clínica. Los trabajos publicados por Bertini *et al.*, 2010 y Jurènaite *et al.*, 2013, si bien están realizados también sobre cepas clínicas de *A. baumannii*, son los únicos estudios en donde se hace foco en módulos plasmídicos no accesorios: el primero, describe la tipificación de plásmidos por PCR basado en la presencia de zonas de similitud de secuencia en Repts y el segundo trabajo, corresponde a la identificación y descripción de módulos de TA hallados en plásmidos y cromosomas de *A. baumannii*. Por otra parte, el único estudio integral realizado sobre plásmidos de *Acinetobacter* spp. en general, corresponde al publicado por Fondi *et al.*, 2010, en donde se describe la información asociada al pan-plasmidoma de estas bacterias y a la relación encontrada entre los replicones plasmídicos y cromosomales, poniendo en evidencia el intercambio de información entre estos y la importancia de estos rearrreglos en la evolución de los genomas de *Acinetobacter* spp.

## I.8 Objetivo General

Los plásmidos pueden ser considerados como un ensamble de distintos módulos funcionales característicos que le confieren su identidad (Thomas, 2000). Los plásmidos pueden contener en su secuencia genes de proteínas con funciones plenamente plasmídicas (replicación, movilización y mantenimiento), como así también módulos accesorios que le confieren al microorganismo huésped alguna función beneficiosa para competir por un nicho ecológico. Estos plásmidos, cumplen una función particular y necesaria para la supervivencia del organismo bajo distintas condiciones de estrés. En este marco, se han descrito numerosos genes accesorios, que incluyen determinantes de patogenicidad y virulencia, operones de degradación de compuestos xenobióticos, determinantes de simbiosis, y resistencia a antimicrobianos, entre otros.

El fenotipo de multiresistencia a antimicrobianos ha tenido un impacto muy grande en las últimas décadas, debido a la presencia de estos genes en bacterias intrahospitalarias (Zavascki *et al.*, 2007, Jean & Hsueh, 2011, Magiorakos *et al.*, 2012). Cuando esta información alcanza a los elementos móviles como los plásmidos, la dispersión de esta información dentro de la comunidad bacteriana cobra lugar rápidamente, dando a lugar a epidemias de bacterias multiresistentes (Woodford *et al.*, 2011, Halachev *et al.*, 2014, Verroken *et al.*, 2014, Eldholm *et al.*, 2015).

Debido a la capacidad de los plásmidos de movilizarse, replicarse y mantenerse autónomamente, como así también de adquirir nueva información genética, se han convertido en vehículos especializados en la transmisión de dicha información y por lo tanto en un blanco importante de estudio para diseñar estrategias de control de la diseminación de resistencia a antimicrobianos (Tabone *et al.*, 2014, Getino *et al.*, 2016).

Las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* han cobrado en los últimos años relevancia clínica, debido a la aparición frecuente de cepas multi/pan resistentes asociadas a infecciones hospitalarias (Villegas & Hartstein, 2003, Scott *et al.*, 2007, Zarrilli *et al.*, 2013, Halachev *et al.*, 2014). Este fenotipo de resistencia ha sido asociado a la adquisición de información por transferencia horizontal de genes, en donde los plásmidos son protagonistas principales. El estudio de la biología de estos

replicones puede proporcionar nueva evidencia molecular que ayude a comprender el peso de la transferencia horizontal de plásmidos en la dinámica de transferencia de ADN en general y de resistencia en particular, como así también en la adaptación de estas bacterias a los distintos nichos ecológicos que ocupa.

**Por lo mencionado anteriormente, en este trabajo de Tesis doctoral se propone caracterizar molecular y funcionalmente a plásmidos de bacterias del género *Acinetobacter* aisladas de ambientes naturales e intrahospitalarios.**

### **I.8.1 Objetivos específicos**

En el marco del objetivo general expuesto, en la presente Tesis Doctoral se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Identificación de aislamientos de *Acinetobacter* spp. de origen hospitalario portadores de plásmidos.
- Obtención y caracterización de una colección ambiental de *Acinetobacter* spp. Evaluación de su contenido plasmídico.
- Purificación y secuenciación del conjunto de plásmidos de las colecciones bacterianas.
- Análisis bioinformático, filogenético y funcional de los módulos plasmídicos.
- Comparación de los módulos plasmídicos pertenecientes a las colecciones plasmídicas intrahospitalarias y ambientales.



## **CAPÍTULO II**

### **Materiales y métodos**

## II.1 Cepas Bacterianas

Las bacterias utilizadas en este trabajo y sus características más relevantes se muestran en la **Tabla II.1** En la **Tabla II.2** se muestran los aislamientos de origen hospitalario y en la **Tabla II.3** se muestran los aislamientos portadores de plásmidos de la colección ambiental.

**Tabla II.1 Cepas bacterianas**

Cepa	Características relevantes	Referencias
<i>E. coli</i> HB101	<i>pro, leu, thi, lacY, endA, recA, hsdR, hsdM, Rif<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>.</i>	(Boyer & Roulland-dussoix, 1969)
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1, endA1, 80d, lacZ, dm15</i>	Bethesda Laboratory
<i>E. coli</i> S17-1	294 <i>recA</i> , RP4 integrado en cromosoma, Tc <sup>R</sup>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>A. baumannii</i> A118	Aislamiento intrahospitalario, libre de plásmidos, Tp <sup>R</sup>	(Ramírez <i>et al.</i> , 2012)

**Tabla II.2 Aislamientos hospitalarios de *Acinetobacter spp.***

Denominación	Identificación	Origen	Hospital
1	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	1
2	<i>A. baumannii</i>	Manos personal	1
3	<i>A. baumannii</i>	Exudado nasal	1
4	<i>A. baumannii</i>	Urocultivo	1
5	<i>A. baumannii</i>	Catéter	1
6	<i>A. baumannii</i>	Superficie	1
7	<i>A. baumannii</i>	Superficie	1
8	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	1
9	<i>A. baumannii</i>	Exudado nasal	1
10	<i>A. baumannii</i>	Superficie	1
11	<i>A. baumannii</i>	Lavado Broncoalveolar	1
12	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo + catéter	1
13	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	1
14	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo + catéter	1
15	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	1
16	<i>A. baumannii</i>	Secreción respiratoria	1
17	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivocultivo	1
18	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivocultivo	1
19	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	2
20	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	2
21	<i>A. baumannii</i>	No informado	2
22	<i>A. baumannii</i>	No informado	2
23	<i>A. baumannii</i>	Aspiración Traqueal	2
24	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	2
25	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	2
26	<i>Acinetobacter spp.</i>	Urocultivo	2
27	<i>Acinetobacter spp.</i>	Esputo	2
28	<i>Acinetobacter spp.</i>	No informado	2
29	<i>Acinetobacter spp.</i>	Lavado broncoalveolar	2
30	<i>Acinetobacter spp.</i>	Urocultivo	2
31	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	3
32	<i>A. baumannii</i>	Piel/Quemadura	3
33	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	3
34	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	3
35	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	3
36	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	3

**Tabla II.2 (Continuación)**

Denominación	Identificación	Origen	Hospital
37	<i>A. baumannii</i>	Líquido cefaloraquídeo	4
38	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	4
39	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	4
40	<i>A. baumannii</i>	Cultivo/Catéter	4
41	<i>A. baumannii</i>	Cultivo/Catéter	4
42	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	4
43	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	4
44	<i>A. baumannii</i>	Líquido Pleural	4
45	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	4
46	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	4
47	<i>A. baumannii</i>	Catéter	4
48	<i>A. baumannii</i>	Cultivo/Catéter	4
49	<i>A. baumannii</i>	Líquido Pleural	4
50	<i>A. baumannii</i>	Hueso	4
51	<i>A. baumannii</i>	Herida	4
52	<i>A. baumannii</i>	Músculo	4
53	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	4
54	<i>A. baumannii</i>	Hueso	4
55	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	4
56	<i>A. baumannii</i>	Orina	4
57	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	4
58	<i>A. baumannii</i>	Aspiración traqueal	4
59	<i>A. baumannii</i>	Punción piel/partes blandas	4
60	<i>A. baumannii</i>	Aspiración Traqueal	4
61	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	4
62	<i>A. baumannii</i>	Cultivo/Catéter	5
63	<i>A. baumannii</i>	Lavado broncoalveolar	5
64	<i>A. baumannii</i>	Hemocultivo	5

**Tabla II.3 Aislamientos ambientales de *Acinetobacter spp.* portadores de plásmidos**

Denominación	Identificación	Origen
5	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
11	<i>A. radioresistens</i>	Zona 1
13	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
21	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
28	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
30	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
31	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
37	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
38	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
39	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
40	<i>A. tandoii</i>	Zona 1
45	<i>A. johnsonii</i>	Zona 1
C2	<i>A. johnsonii</i>	Zona 2
C4	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C11	<i>A. radioresistens</i>	Zona 2
C13	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C14	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C16	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C17	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C18	<i>A. tandoii</i>	Zona 2
C19	<i>A. castellii</i>	Zona 2
C20	<i>A. calcoaceticus</i>	Zona 2
C21	<i>A. tandoii</i>	Zona 2
C23	<i>A. lwofii</i>	Zona 2
C24	<i>A. radioresistens</i>	Zona 2
C25	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C26	<i>A. towneri</i>	Zona 2



**Tabla II.3** (continuación)

Denominación	Identificación	Origen
C28	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C33	<i>A. johnsonii</i>	Zona 2
C34	<i>A. tandoii</i>	Zona 2
C35	<i>A. johnsonii</i>	Zona 2
C41	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C42	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C43	<i>A. johnsonii</i>	Zona 2
C45	<i>A. lwofii</i>	Zona 2
C48	<i>A. calcoaceticus</i>	Zona 2
C54	<i>A. johnsonii</i>	Zona 2
C55	<i>A. towneri</i>	Zona 2
C59	<i>A. junii</i>	Zona 2
C62	<i>A. tandoii</i>	Zona 2
D22	<i>A. johnsonii</i>	Zona 3
D46	<i>A. johnsonii</i>	Zona 3
D61	<i>A. johnsonii</i>	Zona 3
D66	<i>A. johnsonii</i>	Zona 3
D80	<i>A. guillouiae</i>	Zona 3
D82	<i>A. guillouiae</i>	Zona 3
D83	<i>A. johnsonii</i>	Zona 3
D84	<i>A. johnsonii</i>	Zona 3
D85	<i>A. tjernbergiae</i>	Zona 3
D88	<i>A. guillouiae</i>	Zona 3
D89	<i>A. guillouiae</i>	Zona 3
D90	<i>A. Junii</i>	Zona 3
D93	<i>A. Junii</i>	Zona 3
E1	<i>A. tandoii</i>	Zona 4
E14	<i>A. towneri</i>	Zona 4
E19	<i>A. johnsonii</i>	Zona 4
E20	<i>A. towneri</i>	Zona 4
E31	<i>A. towneri</i>	Zona 4
E53	<i>Acinetobacter sp.</i>	Zona 4

Zona 1: 34° 54' 20" S, 57° 56' 0,5" O; Zona 2: 34° 54' 27" S, 57° 56' 26,5' 'O; Zona 3: 34° 53' 57" S, 58° 4' 3,7" O; Zona 4: 34° 53' 42" S, 58° 4' 11,8" O.

## II.2 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo y sus características más importantes se muestran en la **Tabla II.4**.

**Tabla II.4 Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Características relevantes	Referencias
pK18	Vector de clonado, Km <sup>R</sup>	(Pridmore, 1987)
pK18mob	Vector de clonado, mob, Km <sup>R</sup>	(Schäfer et al., 1994)
R751	Tp <sup>R</sup> .IncPβ helper de conjugación	(Jobanputra & Datta, 1974)
R388	Tp <sup>R</sup> .IncW helper de conjugación	(Llosa et al., 1991)
RN3	Tc <sup>R</sup> .IncN helper de conjugación	(Gotz et al., 1996)
RK600	Cm <sup>R</sup> .IncP1α helper de conjugación	(Kessler et al., 1992)
pHX*	Plásmido Intrahospitalario	Este trabajo
phHY**	Probable fago Intrahospitalario	Este trabajo

**Tabla II.4** (continuación)

Plásmido	Características relevantes	Referencias
pMob6	Km <sup>R</sup> . Derivado de pK18 que posee clonado Dtr de pH6	<i>Este trabajo</i>
pMob7	Km <sup>R</sup> . Derivado de pK18 que posee clonado el Dtr de pH7	<i>Este trabajo</i>
p7_Rep3	Km <sup>R</sup> . Derivado de pK18mob que posee clonado el oriV de la Rep_3 de pH7	<i>Este trabajo</i>
p8_Rep3	Km <sup>R</sup> . Derivado de pK18mob que posee clonado el oriV de la Rep_3 de pH8	<i>Este trabajo</i>
p16_Rep3	Km <sup>R</sup> . Derivado de pK18mob que posee clonado el oriV de la Rep_3 de pH16	<i>Este trabajo</i>

\*X e Y corresponden a los números con los que se identificaron a los replicones

## II.3 Medio de Cultivo

### II.3.1 Medios para crecimiento bacteriano

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo, así como su composición detallada, se indican en la **Tabla II.5**. Todos los medios fueron llevados a volumen con agua destilada. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121°C por 20 minutos a 1 atm de sobrepresión.

**Tabla II.5** Composición de medios de cultivo

LB (Luria-Bertani) (J Sambrook))	Glucosa	1g	LAM (Jawad <i>et al.</i> , 1994)	Sacarosa	5g
	NaCl	5g		D-manitol	5g
	Triptona	10g		L-fenilalanina	1g
	Ágar-agar	15g		D-(-)-fructosa	5g
Baumann (Baumann, 1968)	Acetato de sodio	2g	Citrato férrico amónico	0,4g	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1g	NaCl	5g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2M	Peptona de soja	5g	
	Base Mineral Hutner	20ml	Hidrolizado ácido de caseína	15g	
	pH	6	Ágar-agar	10g	
			pH	7	

\*Las cantidades indicadas corresponden a la preparación de 1 l de cultivo

### II.3.2 Medios de conservación bacterianos

Para conservar a largo plazo las bacterias, éstas se cultivaron hasta fase logarítmica tardía en el medio adecuado y se suplementaron con glicerol al 50% (v/v) y 25% (v/v) para su conservación a -20°C y -80°C respectivamente. Para uso rutinario, alícuotas de estas reservas se hicieron crecer en medio sólido con el/los antibióticos correspondientes.

## II.4 Condiciones de cultivo

Los cultivos líquidos se incubaron en todos los casos en agitación a 180 rpm. Las cepas de *Escherichia coli* fueron incubadas a 37°C, tanto en medio líquido como en sólido. Las cepas de origen hospitalario, fueron incubadas a 37°C. Los aislamientos de bacterias de suelo fueron incubados a 30°C.

## II.5 Antibióticos

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua destilada salvo para los casos de tetraciclina, cloranfenicol y cicloheximida, en donde se utilizó etanol; y rifampicina y trimetoprima en los que se utilizó metanol como solvente. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración empleando membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 10  $\mu\text{g/ml}$  tetraciclina (Tc), 50  $\mu\text{g/ml}$  kanamicina (Km), 20  $\mu\text{g/ml}$  trimetoprima (Tp), 20  $\mu\text{g/ml}$  cloranfenicol (Cm), 100  $\mu\text{g/ml}$  rifampicina (Rif).

## II.6 Técnicas microbiológicas

### II.6.1 Conjugaciones biparentales

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon *et al.*, 1983 con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1,5 ml se mezclaron 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora ( $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0,4 - 0,5$ ) con 0,7 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora. La mezcla fue luego centrifugada a 640 *g* durante 8 minutos y el sedimento fue resuspendido suavemente en aproximadamente 50  $\mu\text{l}$  de medio líquido LB. La suspensión fue colocada en una caja de Petri con medio LB (sin antibióticos) e incubada a 37°C ON. La mezcla de bacterias fue finalmente resuspendida en medio LB líquido y sembrada en medio LB sólido suplementado con distintos antibióticos para seleccionar los transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron los controles correspondientes a la bacteria donadora y la receptora.

### II.6.2 Conjugaciones triparentales

Las conjugaciones triparentales fueron llevadas a cabo de manera similar a las biparentales, con la diferencia de que se utilizó 0,5 ml de los cultivos bacterianos de la

cepa donadora y de la receptora y se agregó además 0,5 ml de cultivo en fase logarítmica de una cepa *helper* (de ayuda).

### II.6.3 Tinción de Gram

Se tomó una pequeña alícuota de un cultivo bacteriano líquido crecidos ON se dispuso en un portaobjeto. La muestra se extendió, secó y fijó con calor. La muestra se cubrió durante 2 minutos con solución de Cristal Violeta al 1%. Luego de escurrir se cubrió con solución de mordiente Lugol durante 30 segundos. Este paso se repitió otra vez. Una vez escurrido el mordiente, se decoloró la muestra con alcohol-acetona y se lavó con abundante agua. Finalmente, la muestra fue cubierta con solución de Fucsina al 0,1% por 2 minutos. Luego de escurrir, la muestra se dejó secar a temperatura ambiente y se observó al microscópio óptico con objetivo de inmersión.

### II.6.4 Determinación de movilidad natatoria

Alícuotas de 10  $\mu$ l de cultivos líquidos crecidos ON a 30°C fueron dispuestas sobre un portaobjeto, cubiertas con cubreobjetos y fueron observadas sin tinción al microscopio óptico usando el objetivo de inmersión.

### II.6.5 Ensayo de Oxidasa

Alícuotas de 1 ml de cultivo líquido ON en medio Baumann fueron trasvasadas a tubos de ensayo estériles para la determinación de la presencia de la enzima citocromo C oxidasa utilizando Discos de Oxidasa Britania siguiendo las indicaciones del fabricante.

### II.6.6 Preparación de células electrocompetentes

Se siguió la técnica de Tung & Chow (1995) con pequeñas modificaciones. Se inocularon 500 ml de medio LB sin NaCl con 1 ml de un cultivo ON de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . El cultivo fue incubado a 37°C y agitado hasta que la DO<sub>600 nm</sub> llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4.000 g por 15 minutos a 4°C y se lavaron 2 veces con 200 ml de glicerol 10% a 4 °C. Luego, las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de glicerol al 10% y se fraccionaron en alícuotas de 100  $\mu$ l, las cuales fueron almacenadas a -80°C.

### II.6.7 Transformación bacteriana

Las electrotransformaciones fueron llevadas a cabo usando un equipo *Gene Pulser* (Bio-Rad) en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25  $\mu$ F, 200 $\Omega$ , 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a las células 1 ml de medio LB líquido y la mezcla se incubó 1 h a 37 °C para permitir la expresión de la información contenida en el ADN plasmídico incorporado. Finalmente, las células fueron plaqueadas en medio LB sólido selectivo y se incubaron a 37 °C.

### II.6.8 Recuento de bacterias

El recuento del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se determinó por el método de recuento de gotas en placa (Herigstad *et al.*, 2001). Para ello, se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica estéril del cultivo cuyo número de UFC se quiso determinar. Para cada dilución, se sembraron 10 gotas de 10  $\mu$ l cada una en medio LB sólido (conteniendo o no antibiótico según el caso). Luego se incubó durante 24 hs a 37°C y pasado este tiempo se contaron las colonias en cada gota. En aquellas diluciones en las que se visualizaron entre 1 y 20 colonias, se realizó un promedio de las 10 gotas y se refirió al número de UFC/ml teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado.

## II.7 Técnicas moleculares

### II.7.1 Obtención de ADN genómico para su uso en PCR

Para cada cepa, se partió de una colonia aislada y se resuspendió en 300  $\mu$ l de una solución de NaCl 1 M. Luego se incubó a 25°C por 15 minutos, mezclando en vórtex en distintas oportunidades. Posteriormente se centrifugó 3 minutos a 17.000 *g* y los *pellets* se lavaron con 300  $\mu$ l de agua destilada estéril. Luego se resuspendieron los *pellets* en 150  $\mu$ l de resina Chelex (BioRad) al 6% p/v y se los incubó por 20 minutos a 56°C y luego durante 8 minutos a 100°C. Finalmente, se centrifugó a 17.000 *g* por 3 minutos y se utilizó el sobrenadante como molde para las reacciones de PCR.

## II.7.2 Preparación de ADN plasmídico

### II.7.2.1 Obtención a pequeña escala (“miniprep”)

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por J Sambrook, con la siguiente modificación: luego de realizar la lisis alcalina y la neutralización se recogió el sobrenadante y se le agregó la cantidad apropiada de una suspensión de sílica (1,33 g/ml SiO<sub>2</sub>). Se estima una capacidad de unión de 200 ng de ADN/μl de suspensión. Se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad y se lavó tres veces con 500 μl de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH=7,5, EDTA 2.5 μM, etanol 50%). Luego se hizo una centrifugación final a máxima velocidad y el *pellet* se secó al aire. La elución se realizó agregando el volumen deseado de TE o agua, incubando 5 minutos a 60 °C; luego se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

### II.7.2.2 Obtención de ADN a gran escala para secuenciamiento masivo

La preparación de plásmidos a gran escala se realizó utilizando dos metodologías distintas, dependiendo del origen de la muestra:

#### Técnica de Kieser

Los plásmidos de bacterias hospitalarias fueron aislados siguiendo la técnica descrita por Kieser (1984). En breve, 20 ml de cultivo bacteriano crecido ON en LB a 37°C se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm. El *pellet* fue resuspendido y se procedió a la lisis utilizando una solución de lisozima 2 mg/ml en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8,0) y solución alcalina 2% SDS/NaOH 0,3M durante 50 minutos a 55°C. Se realizó la extracción de proteínas con solución de fenol/cloroformo, se centrifugó nuevamente 10 minutos a 13.000 rpm y la fase acuosa fue transferida a microtubos con acetato de sodio 3M. El ADN de la muestra se precipitó agregando isopropanol incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego centrifugando a la misma velocidad durante 10 minutos. La muestra nuevamente fue resuspendida en TE (10:1) y sometida a una nueva extracción de proteínas usando acetato de sodio 3M y solución neutralizada de fenol/cloroformo, seguida de la precipitación del ADN de la fase acuosa usando la misma metodología anterior. El *pellet* resultante se resuspendió en TE (10:1) y solución de espermina 10 mM. Se dejó reposar la muestra por 5 minutos

a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó. El *pellet* se resuspendió en acetato de sodio 0,3 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se sometió a una última precipitación de ADN utilizando etanol e incubando por 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y el *pellet* fue resuspendido en agua bidestilada estéril.

#### Extracción de ADN total enriquecido en ADN plasmídico

Los plásmidos de bacterias ambientales fueron aislados empleando la técnica descrita por Jouanin *et al.* (1981). Muestras de 50 ml de cultivo bacteriano en LB líquido crecidos ON a 30°C en agitación se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos. Las células se trataron con sarcosyl 0,1% en TE (Tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH=8,0), se centrifugaron y se lavaron con la misma solución dos veces. Las células resuspendidas en TE (50:20) se lisaron con SDS a una concentración final de 1% y 5 mg/ml de pronasa a 37°C durante 2 hs. La lisis se llevó a pH=12,45 adicionando NaOH 3N paulatinamente y agitando suavemente. Una vez alcanzado el pH se dejó en reposo durante 20 - 30 minutos, para luego neutralizar con Tris (2 M, pH=7) hasta alcanzar un pH de 8,5. La preparación se incubó en hielo 15 minutos y se añadió NaCl 5 M hasta una concentración final de 1 M. Después de 1 h a 0 – 4 °C se sedimentaron los restos de proteínas y ADN cromosómico centrifugando 30 minutos a 6.500 g. El sobrenadante se precipitó añadiendo polietilenglycol (PEG 6000) al 20% hasta una concentración final de 10% dejándolo durante toda la noche a 4°C. El ADN enriquecido en plasmídicos se recogió centrifugando a 2.500 g 10 minutos y el precipitado se resuspendió en TE (50:20).

#### Gradiente isopícnico de CsCl-bromuro de etidio

Las muestras de ADN fueron sometidas a un gradiente de CsCl-bromuro de etidio para la eliminación de ADN cromosomal (J Sambrook). Para ello, se añadió 1 g de CsCl sólido por cada 1 ml de solución de muestra. Posteriormente se adicionó bromuro de etidio disuelto en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8,0) hasta llegar a una concentración final de 400 µg/ml. La suspensión se transfirió a tubos apropiados (Beckman) para someterlos nuevamente a una centrifugación durante 72 hs a 100.000 g a 20°C. La banda inferior, correspondiente al ADN plasmídico, fue recogida usando una aguja y perforando por debajo de la banda. Se utilizó luz UV de 360 nm para

mejorar la observación. La eliminación del bromuro de etidio se consiguió agregando un volumen igual de *n*-butanol saturado en agua. Se mezcló y se extrajo la fase superior. El proceso se repitió 4 veces hasta desaparición de todo el color rosado de la solución acuosa. A ésta se le agregaron 2 volúmenes de agua y se precipitó el ADN con 6 volúmenes de etanol a 4°C durante una noche. Pasado este tiempo, se centrifugó a 15.000 *g* 20 minutos; se lavó el precipitado 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

### II.7.3 Electroforesis de ADN

#### II.7.3.1 Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR

La verificación de la calidad de las preparaciones de ADN y la separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de concentración entre 0,8% y 1,5% en *buffer* TBE (Tris 89 mM, EDTA Na<sub>2</sub> 2,5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 89 mM, pH=8,2). Este mismo *buffer* se utilizó como solución de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 50 y 120 volts/cm según los tamaños a separar. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación de 5 µl solución de ADN en agua o TE / µl solución de siembra. El agregado de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio a los geles de agarosa permitió la visualización de los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta de  $\lambda = 260$  nm. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital bajo iluminación UV.

La estimación del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se realizó utilizando como patrón de peso molecular el marcador comercial *Ladder* 50 bp o *Ladder* 100 bp (Productos Bio-Lógicos) o bien el ADN del fago  $\lambda$  digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III.

#### II.7.3.2 Geles de lisis *in situ*

Para la observación de los perfiles plasmídicos se utilizó la técnica de lisis *in situ* (Eckhardt, 1978) con modificaciones como se indican a continuación:



### Aislamientos ambientales

A partir de un cultivo crecido ON se obtuvo por centrifugación (14.000 g, 3 minutos) la masa bacteriana equivalente a 1 ml de cultivo a  $DO_{600\text{ nm}} = 0,4$ . El *pellet* se lavó con 1 ml de sarcosyl 0,3% en TE (10:1, pH 8) frío, mezclando suavemente con una punta de pipeta, y luego de remover el sarcosyl se secó el *pellet* por inversión de los tubos. Posteriormente se agregaron 15  $\mu\text{l}$  de ficoll 20% p/v, manteniendo las muestras en un baño de hielo. Para la siembra de la muestra, se adicionaron 15  $\mu\text{l}$  de *buffer* de lisis (Tris 50 mM, EDTA 25 mM, RNAsa 0,4 mg/ml, lisozima 1mg/ml), y 15  $\mu\text{l}$  de esta mezcla se sembraron en el gel de agarosa. Para la preparación del gel, se utilizó agarosa 0,8% en TBE 1X. Una vez listo, se colocó en la cuba electroforética con *buffer* TBE 1X de manera tal que el mismo no sobrepase la altura del gel. Luego se sembró 15  $\mu\text{l}$  del colorante xylene cyanol en todas las fosas del gel y se corrió con la polaridad invertida a 110 V (hasta que el colorante azul salga de las fosas). Luego se agregó TBE 1X hasta cubrir completamente el gel, se sembró la muestra y se corrió por 1 h a 30 V y luego se subió el voltaje a 110 V, y se corrió 1 h más. Finalmente se realizó el revelado en una cuba conteniendo una solución de bromuro de etidio (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se observó bajo luz UV.

### Aislamientos hospitalarios

A partir de un cultivo crecido ON se obtuvo por centrifugación (14.000 g, 3 minutos) una masa bacteriana de 200  $\mu\text{l}$  que fue resuspendida en 50  $\mu\text{l}$  de TE (10:1 pH 8) ficoll 20% p/v (50:50) frío. Para la siembra de la muestra, se adicionaron 15  $\mu\text{l}$  de *buffer* de lisis (Tris 50 mM, EDTA 25 mM, RNAsa 0,4 mg/ml, lisozima 1mg/ml), y 15  $\mu\text{l}$  de esta mezcla se sembraron en el gel de agarosa 0,8%, 1% SDS preparado con *buffer* TBE 1X. Una vez listo, se colocó en la cuba electroforética con *buffer* TBE 1X cubriendo todo el gel. Se corrió por 1 h a 40 V y luego se subió el voltaje a 110 V, y se corrió 1 h más. Finalmente se realizó el revelado en una cuba conteniendo una solución de bromuro de etidio (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se observó bajo luz UV.

### II.7.4 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los productos de PCR fueron amplificados y corridos en geles de agarosa (0,8-1,5%). Las bandas correspondientes fueron eluidas del gel y purificadas usando el *kit* comercial Gel Purification Kit (Bioneer). Alternativamente los cebadores y nucleótidos

en exceso fueron eliminados mediante precipitación del producto de PCR con una solución PEG 8000 20% (Rosenthal *et al.*, 1993) o por tratamiento enzimático con ExoSAP siguiendo las instrucciones del proveedor.

### II.7.5 Determinación de las concentraciones de ADN en una muestra

La concentración y calidad de las preparaciones de ADN se analizó por medidas de la absorbancia a 260 y 280 nm. Las medidas y cálculos fueron realizados en un equipo Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies) según las especificaciones del fabricante.

### II.7.6 Secuenciación de fragmentos de ADN

Para secuenciar fragmentos de ADN, las muestras previamente purificadas se enviaron al servicio de INTA-Castelar Argentina, en donde se secuenciaron utilizando la metodología de Sanger.

### II.7.7 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo fueron sintetizados en Genbiotech SRL. La **Tabla II.6** detalla los nombres y sus correspondientes secuencias.

**Tabla II.6 Lista de oligonucleótidos**

Nombre	Oligonucleótidos: Secuencia 5' - 3'	Referencia
M13 Rv	CAGGAAACAGCTATGAC	Cebador universal
M13 Fw	GTTTTCCAGTCACGAC	Cebador universal
p6MobLS-F	TCCACATGCGAGTAAGACCG	Este trabajo
p6MobLS-R	ACCAAAGACAACGGCAGTCA	Este trabajo
p7MobLS-F	ATCAAAAGTCGCTAAAACCCCC	Este trabajo
p7MobLS-R	TTCGTTTAGCAGCAGATGGGT	Este trabajo
p7Rep3-F	ACTTTTCACGTTCCACGCCT	Este trabajo
p7Rep3-R	ACGAGCGACACAACGAAAGT	Este trabajo
p8RepA-F	TGTGGCTGCATCACTAACACT	Este trabajo
p8RepA-R	GCGAAGCGAATCCGAGTTG	Este trabajo
p16Rep3-F	GAAGCGAAAACCAAGGGCAA	Este trabajo

### II.7.8 Secuenciación masiva de muestras compuestas de plásmidos

El secuenciamiento de las muestras compuestas de plásmidos obtenidas a partir de los aislamientos hospitalarios y ambientales se llevaron a cabo en el CeBiTec (*Center for Biotechnology*), Bielefeld, Alemania. Cantidades aproximadamente equimolares de los plásmidos previamente purificados fueron mezcladas para su

secuenciación en conjunto. La concentración de ADN en la muestra final fue determinada mediante el uso de *Bioanalyzer (Agilent technologies)*, que permitió determinar la cantidad, la calidad y tamaño de los fragmentos de ADN. 50 ng de la muestra fueron utilizados para preparar las bibliotecas utilizando el protocolo *Nextera Libraries (Illumina)* de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Finalmente se llevó a cabo la secuenciación de la muestra utilizando el equipo MiSeq de Illumina

## II.7.9 Tratamientos enzimáticos del ADN

### II.7.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando los termocicladores BioRad ICycler o BioRad Mycycler. Las concentraciones estándar que se utilizaron para la reacción de PCR son las siguientes: *buffer* de reacción 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH=8,0), dNTPs en concentración 200  $\mu$ M de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 5  $\mu$ M de cada *primer* y 1 U de Taq Polimerasa Pegasus (Productos Bio-Lógicos). Cuando se requirió amplificar fragmentos con alta fidelidad se utilizó Pfx polimerasa (Invitrogen). Cuando fue necesario, se variaron las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> para aumentar la especificidad de la reacción.

Las condiciones de ciclado empleadas variaron de acuerdo a los cebadores utilizados y al tamaño del producto de amplificación esperado siempre siguiendo el protocolo estándar compuesto por: una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos; 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* a la temperatura adecuada por 30 segundos y elongación a 72°C (tiempo variable, dependiendo de la longitud del fragmento a amplificar; se estimó 1 minuto cada 1.000 pb) y una etapa final de 5 minutos a 72°C.

### II.7.9.2 Digestiones de ADN

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones de reacción (temperatura y *buffer*) propuestas por los proveedores comerciales (Fermentas y Promega) y las recomendaciones descritas por (J Sambrook). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5 - 5  $\mu$ g de ADN, el volumen adecuado de *buffer* suministrado por el proveedor y 0,5 - 1 U de la enzima a utilizar en un volumen final de

20 - 25  $\mu$ l. Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas por un período de tiempo mayor que 5 hs.

### **II.7.9.3 Ligaciones de ADN**

Las ligaciones de fragmentos de ADN fueron llevadas a cabo utilizando la enzima ligasa del fago T4 (Promega), según las indicaciones del comerciante. Las reacciones de ligación se incubaron a 16°C por al menos 4 h. Para el clonado de fragmentos de ADN en vectores de clonado, se utilizó una relación molar de 3:1 de inserto : vector.

### **II.7.10 Desalado de soluciones de ADN**

Para desalar soluciones de ADN se realizó microdiálisis utilizando las membranas Millipore VSWP P02500 de tamaño de poro de 0,025  $\mu$ M. Las soluciones conteniendo el ADN a desalar se colocaron durante 20 minutos a temperatura ambiente sobre las membranas, las cuales se ubicaron sobre una placa de Petri conteniendo 30 ml de agua bidestilada estéril.

### **II.7.11 Estrategias de clonado**

#### **II.7.11.1 Clonado de Dtr**

Las regiones del Dtr fueron amplificadas por PCR con polimerasa Pfx (Invitrogen) desde una dilución 1:1000 de una alícuota de la muestra compuesta que se secuenció. Los productos romos de PCR fueron ligados con T4 ligasa (Promega) al vector pK18 digerido con la enzima *Sma*I (corte romo). Los productos fueron sometidos a desalado y luego transformados en *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes. La selección de los transformantes se llevó a cabo en LB sólido suplementado con Km y X-gal. Luego de la incubación ON a 37°C. Las colonias blancas fueron repicadas y posteriormente utilizadas para corroborar el correcto clonado de las secuencias por PCR convencional y secuenciación.

#### **II.7.11.1 Clonado de orígenes de replicación**

Las regiones correspondientes a los orígenes de replicación de las Rep\_3 de los plásmidos pIH7, pIH8 y pIH16 fueron clonadas en el vector pK18mob (no replicativo en *Acinetobacter* spp.) digerido con la enzima *Sma*I siguiendo la misma metodología que en la sección anterior.

## II.8 Técnicas bioinformáticas

### II.8.1 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó el servidor web Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y se variaron los parámetros según las necesidades.

### II.8.2 Tratamiento de los datos crudos del secuenciación

Para eliminar las lecturas cromosomales, éstas fueron alineadas utilizando como referencia genomas de *A. baumannii* haciendo uso del programa Bowtie2 (Langdon, 2015). Las lecturas que se alinearon a los cromosomas de esos genomas fueron desechadas y las lecturas que no alinearon fueron seleccionadas como lecturas plasmídicas. Estas lecturas fueron ensambladas mediante el programa GS de novo Assembler software (gs Assembler, version 2.8, Roche). Los *contigs* plasmídicos fueron importados a la plataforma de anotación GenDB versión 2.2 (Meyer *et al.*, 2003), la cual contiene una interfaz fácil de utilizar y permite refinar los datos manualmente. Para la predicción de regiones como ORFs, se utilizó el software GLIMMER (Delcher *et al.*, 1999). Cuando fue posible, el cerrado de los plásmidos se llevó a cabo usando la herramienta CONSED (Gordon *et al.*, 1998).

### II.8.3 Herramientas bioinformáticas para genómica comparativa

Las comparaciones y los diversos análisis bioinformáticos realizados durante este trabajo fueron realizados utilizando las herramientas del paquete BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y los programas EasyFig (Sullivan *et al.*, 2011) y UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012).

## II.9 Análisis filogenéticos

### II.9.1 Análisis filogenéticos de las relaxasas

Para el análisis filogenético de las relaxasas de las colecciones se usaron los 300 aminoácidos del extremo N-ter y se alinearon con los de las familias MOB correspondientes haciendo uso de la herramienta ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) La reconstrucción filogenética fue llevada a cabo siguiendo las indicaciones publicadas por (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

### II.9.2 Análisis filogenético de proteínas de replicación

Para el análisis filogenético de las proteínas de inicio de replicación en primer lugar se tomaron todas las secuencias correspondientes a las proteínas que presentan el dominio Rep\_3 (PF01051) pertenecientes a plásmidos de *Acinetobacter* spp. depositadas en base de datos al 1/2/2016 (**Tabla A.6 ANEXO**). Se llevó a cabo un alineamiento múltiple de estas secuencias junto a las correspondientes de las colecciones encontradas en este trabajo haciendo uso del programa MUSCLE (Edgar, 2004) usando los parámetros seleccionados por defecto. El alineamiento resultante fue utilizado para calcular el mejor modelo de evolución que se ajuste a las secuencias utilizando el programa ProtTest (Abascal *et al.*, 2005). Utilizando el mismo alineamiento y el mejor modelo de evolución encontrado (LG+F), se calculó el árbol filogenético por Máxima Verosimilitud (ML, *Maximun Likelihood*) usando el programa PhyML (Guindon *et al.*, 2009). Para explorar topologías nuevas se utilizaron 100 árboles iniciales y el mejor de los algoritmos NNI (*Nearest Neighbor Interchange*) y SPR (*Subtree Pruning and Regrafting*). La robustez del árbol resultante se evaluó por *bootstrap* (100 réplicas).

### II.10 Identificación de aislamientos por espectrometría de masas MALDI-TOF

La confirmación de aislamientos de *Acinetobacter* spp. fue realizada por la técnica de espectrometría de masa MALDI-TOF mediante el empleo del *software* MALDI Biotyper 3.1 (*Bruker Daltonics, Bremen, Germany*) (Maier *et al.*, 2006). La preparación de las muestras para su posterior identificación fue llevada a cabo de acuerdo al método de extracción de proteínas por lisis celular descrito por Bruker Daltonics. Inicialmente, colonias bacterianas de 12-24 hs de crecimiento en medio LB fueron resuspendidas en etanol 80%, centrifugadas a 10.000 rpm por 2 min y finalmente resuspendidas en 20 µl de ácido fórmico 70%: acetonitrilo 100% (1:1). Para el análisis de las muestras 1 µl de suspensión celular fue adicionado sobre cada uno de los *spot* de una placa MALDI (384 *spots*) que, inmediatamente después de secarse, fue recubierta con 1 µL de solución saturada de matriz (10 mg/mL) consistente de ácido  $\alpha$ -ciano-4 hidroxí cinámico (HCCA) resuspendido en solución orgánica (50% acetonitrilo + 2,5% TFA). Los espectros de masas fueron obtenidos manualmente en un rango de 2 a 20 KDa en modo lineal positivo utilizando el software FlexControl (3.3) acoplado a un

espectrómetro de masas modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics). Se utilizó el calibrante BTS (*bacterial test standard*) (Bruker Daltonics) que consiste en proteínas ribosomales de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  más las proteínas RNAsa A y mioglobina con masas moleculares correspondientes a 13.683 y 16.954 Da, respectivamente. La identificación a nivel de género o especie de los espectros obtenidos fue realizada de acuerdo a los valores de puntuación (*scores*) del software MALDI Biotyper: > 2 identificación a nivel de especie, entre 1,7 y 1,9 identificación a nivel de género y < 1,7 identificación no confiable.



## **CAPÍTULO III**

**Análisis de contenido plasmídico de  
una colección hospitalaria de  
bacterias clasificadas como  
*Acinetobacter* spp.**



### III.1 Introducción

Los plásmidos son elementos de ADN extracromosomal de replicación autónoma que pueden transmitirse vertical u horizontalmente entre bacterias que pueden o no pertenecer al mismo género y/o especie. Estos elementos pueden incorporar información genética de una célula huésped y luego transmitirla a nuevas células cuando se transfieren tanto por conjugación como por transformación. Por este motivo, los plásmidos, además de codificar funciones esenciales para asegurar su propia replicación, movilización y mantenimiento, pueden acarrear funciones de metabolismo secundario tales como determinantes de simbiosis y patogenicidad, resistencia a metales pesados y antimicrobianos, entre otras; que le permiten a la bacteria hospedadora explotar nuevos nichos ecológicos.

Los plásmidos de bacterias que habitan ambientes hospitalarios muchas veces codifican para determinantes de resistencia a antimicrobianos y desinfectantes en consecuencia a la alta presión de selección que las bacterias portadoras encuentran en estos nichos. Debido a la capacidad de movilizarse entre distintos organismos, los plásmidos se han convertido en vehículos eficientes en la transferencia de genes de resistencia, ampliando de esta forma la población de microorganismos capaces de resistir en condiciones de intensa presión de selección y aumentando la posibilidad de adquirir infecciones en pacientes hospitalizados (Iguchi *et al.*, 2014, Chang *et al.*, 2015, Matsumura *et al.*, 2015, Carraro *et al.*, 2016).

Algunas especies del género *Acinetobacter*, como *A. calcoaceticus* y *A. baumannii*, son consideradas patógenas oportunistas en entornos hospitalarios y se han convertido en uno de los agentes más importantes responsables de colonización e infecciones graves en pacientes en unidades de cuidados intensivos en los últimos 10 años (Razavi Nikoo *et al.*, Clark *et al.*, 2016, Da Silva & Domingues, 2016). Esto se debe, no sólo a su capacidad para adquirir diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos, sino también a su habilidad para recibir e incorporar genes en su genoma que permiten a esta bacteria sobrevivir en condiciones adversas tales como la desecación, la alta concentración de los desinfectantes, la radiación y competir con otros patógenos que pueden estar presentes. Esta habilidad de adquirir ADN exógeno con frecuencia está mediada por plásmidos, y numerosos estudios han descrito que la

propagación de genes de resistencia a antibióticos entre cepas de aislamientos de *Acinetobacter* spp. es mediada por dichos vectores (Huang *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2015, Nigro *et al.*, 2015, Da Silva & Domingues, 2016). Sin embargo, las características de la biología de los mismos no han sido exploradas en profundidad. Teniendo en cuenta la importancia de las infecciones debido a bacterias del género *Acinetobacter* y a los plásmidos como vehículos de transferencia de la información, en una primera etapa, este trabajo se enfocó en la caracterización de plásmidos de aislamientos de *Acinetobacter* spp. hospitalarios. En particular se estudió la información asociada a las funciones que le permiten a los plásmidos ser exitosos en la transferencia de la información genética, es decir, qué estrategias le permiten no sólo incorporar nueva información a su estructura, sino también cómo pueden propagarse a distintos microorganismos, replicar en otros entornos, asegurar su mantenimiento dentro del huésped y por ende, dentro de la comunidad.

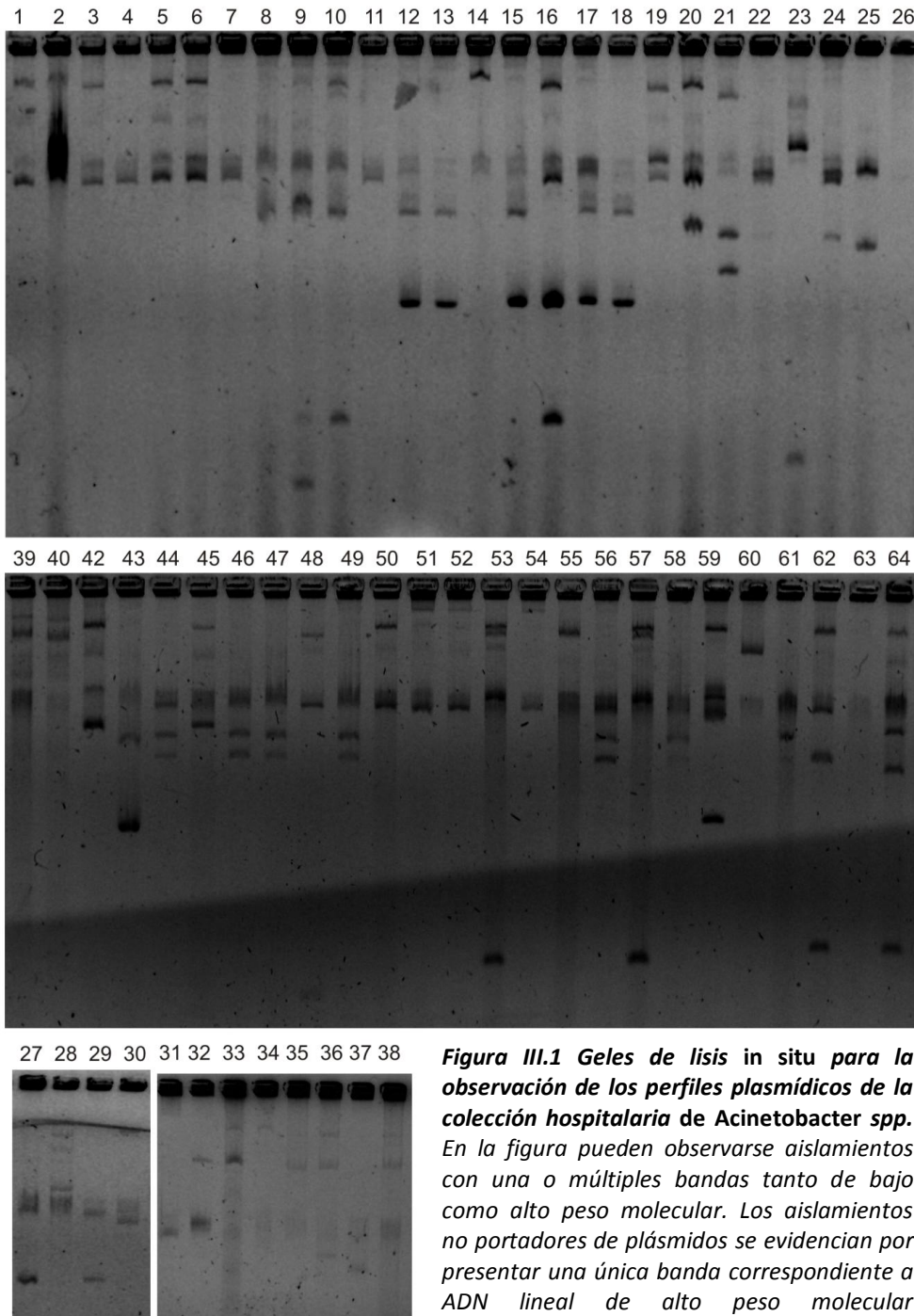
### III.2 Descripción de la colección hospitalaria de *Acinetobacter* spp.

La colección de bacterias hospitalarias utilizada en este trabajo consistió en 64 aislamientos. Todos los aislamientos fueron recolectados en salas de unidades de cuidados intensivos de 5 hospitales de Ciudad Autónoma de Buenos Aires durante el año 2006. Las bacterias fueron recolectadas tanto de superficies abióticas, como así también de materiales, equipos y muestras asociadas a pacientes hospitalizados. Los aislamientos fueron identificados por profesionales de laboratorio de bioquímica clínica en cada institución, y caracterizados según su fenotipo. Las características del origen de cada aislamiento, su clasificación y la denominación utilizada en este trabajo, se encuentran resumidas en la **Tabla II.2** (Capítulo II, sección II.1). Del total de los 64 aislamientos, 59 fueron inicialmente identificados como *A. baumannii* y 5 como *Acinetobacter* sp.

### III.3 Análisis del contenido plasmídico en la colección hospitalaria de *Acinetobacter* spp.

Para avanzar en la caracterización, cada aislamiento fue examinado en su perfil plasmídico mediante la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa (Eckhardt, 1978). Dicha metodología minimiza la ruptura mecánica de los plásmidos y permite la

visualización de replicones de gran variedad de tamaño y número de copias. Como primera etapa se ensayaron distintas modificaciones de la técnica de lisis *in situ* con el objetivo de encontrar las condiciones que permitiera evidenciar la presencia de plásmidos en *Acinetobacter* spp. (Capítulo II, sección II.7.3.2). La aplicación de la técnica de lisis *in situ* permitió detectar no sólo la presencia de replicones, sino también inferir información acerca del número de plásmidos por cepa y tamaño (**Figura III.1**). Es importante destacar que en el caso de los plásmidos no puede descartarse que distintas bandas en el gel correspondan a formas de superenrollamiento de un mismo plásmido (topoisómeros). Del mismo modo, una única banda puede corresponder a la presencia de más de un plásmido con la misma movilidad electroforética. Por tanto, el número de bandas observado en cada una de los aislamientos debe ser considerado con reserva si se desea determinar en forma fehaciente el número real de replicones plasmídicos presentes. Del total de los aislamientos analizados, fue posible de detectar que en el 80 % de los casos existió al menos un replicón plasmídico. Los tamaños de los replicones fueron inferidos al comparar la movilidad electroforética de las bandas características de cada aislamiento con la de plásmidos de peso molecular conocido, sembrados en el mismo gel. Los tamaños relativos visualizados cubrieron un amplio rango de movilidades electroforéticas, comparables a plásmidos de entre 3-60 Kb. El número de plásmidos por aislamiento también fue variable, habiéndose encontrado en algunos casos hasta 6 bandas que podrían ser indicativas de al menos 6 replicones con movilidad electroforética distinta. El análisis de los distintos geles permitió observar perfiles conservados entre aislamientos provenientes de un mismo hospital, como así también la presencia de plásmidos de movilidad electroforética similares entre aislamientos de distintos hospitales.

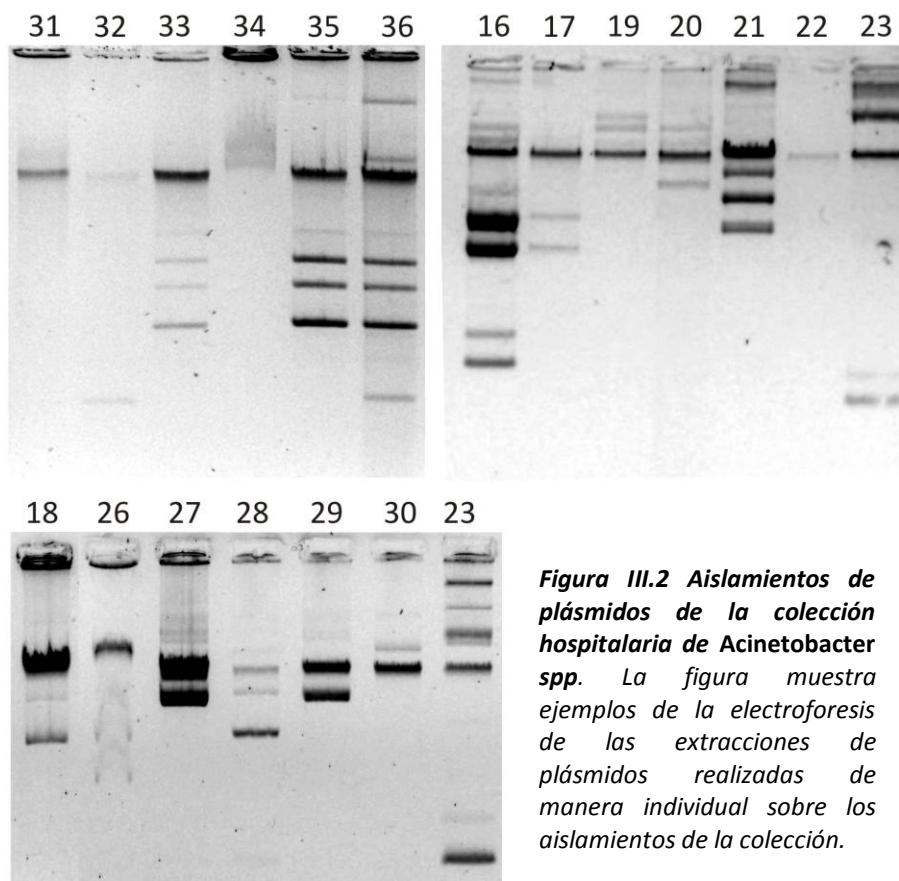


**Figura III.1** Geles de lisis in situ para la observación de los perfiles plasmídicos de la colección hospitalaria de *Acinetobacter spp.* En la figura pueden observarse aislamientos con una o múltiples bandas tanto de bajo como alto peso molecular. Los aislamientos no portadores de plásmidos se evidencian por presentar una única banda correspondiente a ADN lineal de alto peso molecular (cromosomal).

#### III.4 Aislamiento de plásmidos de la colección hospitalaria de *Acinetobacter spp.*

Una vez identificados los aislamientos de la colección portadores de plásmidos, la etapa siguiente consistió en identificar la técnica preparativa más adecuada para el aislamiento de los distintos replicones plasmídicos. Debido a que muchos de los

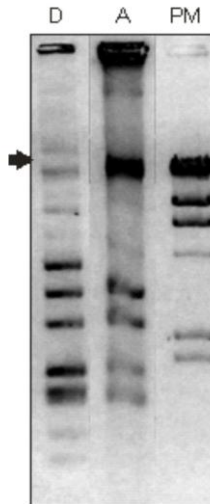
aislamientos parecían contener plásmidos tanto de alto como bajo peso molecular, fue necesario encontrar una técnica que permita en un mismo ensayo, obtener plásmidos de diferente tamaño, con un rendimiento adecuado para su posterior purificación y secuenciación. Se ensayaron técnicas de mini y maxipreparación de ADN plasmídico siendo la descrita por Kieser, 1984 la elegida, ya que posibilitó la observación de una mayor cantidad y mejor separación de bandas en geles de agarosa. Cada uno de los aislamientos fue sometido a la mencionada técnica y los resultados fueron evidenciados en geles de agarosa (**Figura III.2**).



**Figura III.2 Aislamientos de plásmidos de la colección hospitalaria de *Acinetobacter spp.*** La figura muestra ejemplos de la electroforesis de las extracciones de plásmidos realizadas de manera individual sobre los aislamientos de la colección.

### III.5 Purificación de los plásmidos obtenidos para su posterior secuenciación

Las preparaciones de ADN plasmídico suelen siempre tener fragmentos de ADN cromosomal. La contaminación de las muestras con ADN de origen cromosomal bajan la calidad de las muestras e interfieren en la identificación de secuencias plasmídicas



**Figura III.3 Evaluación de la purificación a gran escala.** La figura muestra la electroforesis de la muestra compuesta antes (A) y después (D) de su purificación en un gradiente de CsCl-bromuro de etidio. La flecha indica la posición de la banda correspondiente al ADN lineal (cromosomal). PM: marcador de peso molecular (ADN del fago Lambda digerido con HindIII)

en las etapas posteriores a la secuenciación. Debido a esto, se decidió realizar una purificación por ultracentrifugación en un gradiente isopícnico de CsCl-bromuro de etidio (Capítulo II, sección II.7.2.2). Dicha metodología permite separar el ADN plasmídico (doble hebra, circular y covalentemente cerrado) del ADN cromosomal (doble y

simple hebra, lineal) y del ARN remanente, debido a las diferencias en sus densidades. Para llevar a cabo dicha técnica, las preparaciones obtenidas por el método de Kieser, 1984 fueron unidas conformando una única muestra. La banda plasmídica obtenida del gradiente se descontaminó, precipitó y se analizó en geles de agarosa para determinar el grado de pureza y la integridad de los replicones. En el gel se observó la disminución de la contaminación cromosomal y distintas bandas correspondientes a los distintos plásmidos observados en cada uno de los aislamientos (**Figura III.3**).

### III.6 Secuenciación masiva de la muestra compuesta de ADN plasmídico de la colección de *Acinetobacter* spp.

Una vez obtenida la muestra enriquecida en ADN plasmídico se procedió a su secuenciación a través de la plataforma Illumina MiSeq en el *Center for Biotechnology* (CeBiTec, Universidad de Bielefeld, Alemania). La utilización de la plataforma Illumina MiSeq, requiere de un tratamiento previo a la secuenciación propiamente dicha. Para ello, debe primero fragmentarse la muestra de ADN por sonicación, y sus fragmentos ser separados en geles de agarosa. Para la muestra de ADN plasmídico, las bandas correspondientes a los fragmentos de alrededor de 500 pb fueron cortadas, eluidas y posteriormente ligadas a adaptadores en los extremos de los fragmentos. La

secuenciación con Illumina MiSeq, permite la lectura de los fragmentos de 500 pb desde ambos extremos, y las dos lecturas generadas pueden unirse para formar una lectura larga, en caso de que el solapamiento de sus extremos sea lo suficientemente bueno.

La secuenciación generó un total de 1.419.341 de lecturas de una longitud promedio de 250 pb que cubrieron un total de 347.374.930 pb, alcanzando un valor de cobertura de aproximadamente 650. Estas lecturas fueron ensambladas en *contigs* y *scaffolds* utilizando el programa GS de novo Assembler software (gs Assembler, versión 2.8, Roche). En total, se obtuvieron 64 *contigs* de una longitud promedio de 5 Kb, y tamaño máximo de 39 Kb y 40 *scaffolds* de un tamaño promedio de 8 Kb, y un tamaño máximo de 58 Kb.

De total de los 40 *scaffolds*, tres fueron descartados por poseer contaminación cromosomal y 23 de ellos correspondieron a 19 replicones cerrados. La información plasmídica contenida en los 14 *scaffolds* restantes fue analizada en conjunto, debido a que la presencia de zonas repetidas en las secuencias impide el correcto ensamblado y el cerrado de los plásmidos *in silico*.

Los 19 replicones ensamblados junto a los *scaffolds* restantes fueron importados a la plataforma de anotación GenDB (Meyer *et al.*, 2003) para determinar el tipo y número de marcos de lectura abiertos (ORFs; del inglés *Open Reading Frames*) potencialmente presentes. Posteriormente, se realizó una predicción automática de funciones usando una combinación de herramientas bioinformáticas como RAST (Aziz *et al.*, 2008) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990). La información obtenida mediante las plataformas bioinformáticas fue refinada manualmente: se corroboró la anotación de los genes, se asignaron nombres a los genes cuando correspondía, y se clasificaron en familias de proteínas según Pfam (Bateman *et al.*, 2004) y en funciones metabólicas predichas (**Tabla A.1 y A.2, ANEXO**).

El contenido promedio de GC de los 19 replicones fue del 40%, consistente con el porcentaje hallado para especies del género *Acinetobacter* (Murray *et al.*, 1984). Sin embargo, los valores de porcentaje de GC en los plásmidos individuales fueron variados, encontrando valores mínimos del 33% y máximos de hasta un 60% (**Tabla III.1**). Estas desviaciones con respecto al valor promedio del porcentaje de GC encontrado en

genomas del género *Acinetobacter*, podrían indicar que dichos replicones pudieron ser adquiridos recientemente desde bacterias de otros géneros a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes. Con respecto a la información contenida en los *scaffolds* restantes, el contenido promedio de GC fue del 44%.

EL número total de ORFs fue de 369, de los cuales, 321 fueron contenidos dentro de los 19 replicones cerrados. Respecto a estos últimos, el 97% (310) de los ORFs mostraron tener homólogos en base de datos, y el 3% (11) restante correspondieron a proteínas hipotéticas nuevas. Del total de las proteínas predichas con homólogos en base de datos (310), el 54% (167) mostraron similitud con proteínas de funciones conocidas, que incluyeron replicación, mantenimiento, movilización, unión/modificación al ADN y genes de resistencia entre otros. Los plásmidos fueron nombrados como pIH (**plásmido IntraHospitalario**) acompañados de un número. Los replicones pIH4, pIH5 y pIH10 fueron designados como tal por presentar identidad con fagos (*phage* **IntraHospitalario**).

### III.7 Distribución general de funciones encontradas para los marcos abiertos de lectura (ORFs)

Como se mencionó anteriormente, mediante el uso de base de datos *online* y algoritmos de búsqueda de similitud de secuencia a nivel proteína, fue posible predecir la función de 167 ORFs pertenecientes a los 19 replicones cerrados y de 23 ORFs de los *scaffolds* plasmídicos no cerrados. Además de los genes codificantes para proteínas asociadas a funciones meramente plasmídicas, tales como replicación, mantenimiento y movilización, fue posible encontrar similitud con moléculas de funciones accesorias tales como proteínas de unión y/o modificación a ADN (factores de transcripción, recombinasas, enzimas de restricción, etc), enzimas que forman parte de metabolismo esencial celular (polimerasas, ligasas, enzimas de rutas metabólicas primarias y secundarias, transporte), proteínas de fagos, toxinas, y finalmente proteínas asociadas a resistencia a antimicrobianos.



**Tabla III.1 Características generales de los plásmidos secuenciados de la colección hospitalaria de *Acinetobacter spp.***

Plásmido	Tamaño (pb)	% GC	ORFs°	Módulos presentes			
				Replicación	MGE	Mantenimiento	Resistencia
pIH1	61.669	50,83	75	+	+	+	+
pIH2	42.507	49,49	54	+	+	+	
pIH3	49.725	41,84	46	+		+	
phiH4	14.125	36,73	17				
phiH5	9.501	39,31	11				
pIH6	6.481	40,38	8	+	+		
pIH7	5.273	34,99	6	+	+		+
pIH8	9.156	34,81	14	+	+	+	
pIH9	10.229	34,14	15	+	+		
phiH10	6.699	37,78	12	+			
pIH11	7.349	33,02	9	+		+	
pIH12	6.780	37,79	10		+		
pIH13	4.135	42,42	4		+		+
pIH14	5.629	37,29	11	+			
pIH15	5.351	60,77	9		+		
pIH16	8.752	36,76	11	+	+	+	
pIH17	1.846	39,54	3	+			
pIH18	3.979	32,92	4	+			
pIH19	2.177	39,27	2	+			

*La presencia/ausencia de módulos plasmídicos hallados in silico fueron asignados por similitud de secuencia en base de datos, y se muestran en la tabla simbolizados con +/- respectivamente. MGE, Elementos Genéticos Móviles.*

En este Capítulo, en una primera instancia se evaluó la presencia de plásmidos en una colección de bacterias hospitalarias multiresistentes pertenecientes al género *Acinetobacter*. Los perfiles en geles de lisis *in situ*, demostraron que la mayoría de los aislamientos eran portadores de al menos un replicón plasmídico y que la distribución tanto en tamaño como en cantidad de plásmidos fue variada entre los aislamientos. A partir de aquellos aislamientos portadores de plásmidos, se realizó el aislamiento plasmídico en gran escala y las muestras fueron purificadas por ultracentrifugación en gradiente isopícnico de CsCl-bromuro de etidio. La muestra enriquecida en plásmidos fue secuenciada utilizando la plataforma MiSeq de Illumina la cual demostró ser eficiente para lograr una buena cobertura. La secuenciación permitió obtener 19 replicones cerrados y secuencias adicionales correspondientes a ADN plasmídico. En la asignación de funciones, además de los módulos típicos que se esperan encontrar en plásmidos, fue posible identificar proteínas con funciones accesorias, dentro de las cuales se encontraron algunos genes de resistencia a antimicrobianos, probablemente

responsables, en parte, del fenotipo multiresistente de las bacterias de esta colección. En el Capítulo siguiente se estudiará en profundidad cada uno de los plásmidos obtenidos mediante técnicas de genómica comparativa.



## CAPÍTULO IV

**Genómica comparativa de los  
replicones plasmídicos de la  
colección hospitalaria de  
*Acinetobacter* spp.**

## IV.1 Introducción

Generalmente los plásmidos incluyen uno o más genes esenciales para su persistencia y pueden también codificar funciones y procesos metabólicos que son en general accesorios y diferentes de los codificados por el cromosoma. Además, la arquitectura de los plásmidos es más flexible que la cromosómica, teniendo en cuenta tanto el contenido de genes como la organización de los mismos, incluso entre algunos plásmidos de aislamientos del mismo género bacteriano. Debido a este grado de diversidad dentro de los plásmidos se ha planteado que los mismos representan un recurso genético distinto al cromosomal y que muchas veces la información que portan es crucial para la ecología del anfitrión (Norman *et al.*, 2009).

Muchos trabajos han demostrado que cepas de *Acinetobacter* spp. aisladas de brotes hospitalarios contienen plásmidos, tanto crípticos como relacionados a la resistencia a antibióticos (Huang *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2015, Nigro *et al.*, 2015, Ou *et al.*, 2015, Da Silva & Domingues, 2016, Rao *et al.*, 2016); sin embargo, pocos trabajos han caracterizado estos plásmidos más allá de sus determinantes de resistencia. En este Capítulo se abordó la descripción y caracterización genómica comparativa de los 19 replicones cerrados descrito en el Capítulo III.

## IV.2 Análisis comparativo de replicones plasmídicos

El resultado final del ensamble de las lecturas obtenidas en la secuenciación permitió reconocer 19 replicones circulares, cerrados e independientes que variaron en tamaño y porcentaje de GC. Cada uno de estos replicones se analizó teniendo en cuenta su contenido y organización genética. Para ello las secuencias completas se compararon con otras secuencias en bases de datos en busca de semejanzas y/o diferencias con otros plásmidos. Algunos de los plásmidos cerrados mostraron un buen alineamiento utilizando BLASTn y alta cobertura con otros plásmidos presentes en genomas bacterianos ya depositados en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A continuación, se detalla el análisis para cada replicón independiente según la semejanza encontrada con plásmidos en base de datos.

## Análisis de pIH1

El plásmido pIH1 presentó un tamaño de 61,7 Kb y un porcentaje de GC de 50,8, siendo el plásmido más grande que se obtuvo en la secuenciación de esta colección. En el mismo fueron reconocidos 75 marcos abiertos de lectura (ORFs), de los cuales 72 presentaron homología con proteínas en base de datos pertenecientes a enterobacterias de distinto género, tales como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Serratia*, entre otras. En el plásmido pIH1 fueron reconocidas proteínas de todos los módulos asociados a la biología de los plásmidos: replicación, movilización, mantenimiento, y proteínas accesorias, en particular de resistencia.

Con respecto a las proteínas asociadas a la replicación plasmídica, el plásmido pIH1 posee tres proteínas de distintas familias de inicio de replicación, Rep\_3, IncFII\_RepA y RepC-like (Capítulo V, sección V.2.1) cada una de las cuales sería importante dependiendo del entorno genómico en donde el plásmido se encuentre. Respecto a los módulos de movilización, se pudieron reconocer dos proteínas involucradas en la conjugación plasmídica: TraX y un fragmento de la relaxasa TraI; además fue posible reconocer la presencia de una secuencia de Inserción (IS), Tn5403 (N°A X75779) hallada originalmente en *Klebsiella pneumoniae* que contiene dos ORFs, una resolvasa accesoria y una transposasa. Los determinantes implicados en el mantenimiento, fueron del tipo Toxina-Antitoxina (TA) y partición activa (Capítulo V, sección V.3.1), todos de naturaleza proteica. Como módulos de genes adaptativos pIH1 lleva un *cluster* de resistencia a los metales pesados Ag y Cu, y genes de resistencia a UV

Como se mencionó previamente, la comparación de la secuencia nucleotídica haciendo uso de BlastN, demostró que el plásmido pIH1 tiene gran similitud de secuencia con plásmidos de enterobacterias, en particular con pENT-4bd (N°A CP008907), de *Enterobacter cloacae* ECR091. Un análisis más detallado de la zona conservada entre ambos replicones indicó que casi la totalidad del plásmido pIH1 se correspondió con pENT-4bd, sin embargo, existieron algunas excepciones: En pIH1 existe un fragmento de 8 Kb, ausente en pENT 4-bd, que contiene entre otras, la proteína de inicio de replicación Rep\_3, y ParA, una proteína del sistema de partición activa. Además, en el replicón de esta colección, se encontraron dos ORFs

correspondientes a los elementos de la IS-Tn5403 entre los genes del *cluster* de resistencia a metales (**Figura IV.1**).

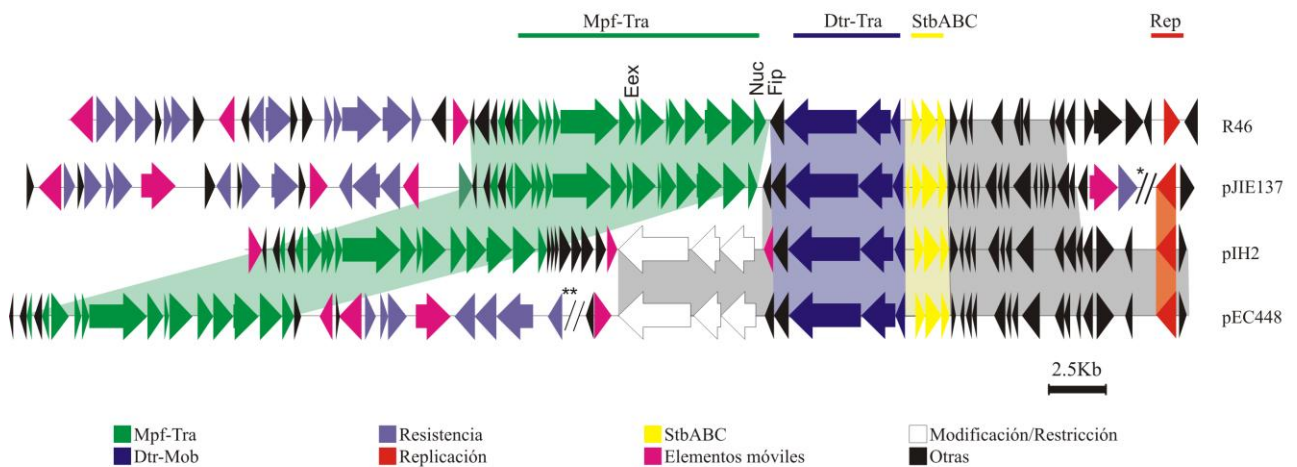


**Figura IV.1 Comparación de pIH1 con pENT 4-bd.** La figura muestra el alineamiento de pIH1 con un fragmento del plásmido pENT4-bd. Las zonas de similitud de secuencia se encuentran sombreadas en gris.

### Análisis de pIH2

El plásmido pIH2, fue la segunda molécula completa más grande identificada en esta colección, con un tamaño de 42.507 pb y un contenido de GC del 49,5 %. Fueron reconocidos 57 ORFs y cada uno de ellos fue utilizado para buscar homólogos en base de datos utilizando el algoritmo BlastP. Se pudieron identificar tanto módulos de replicación, movilización y mantenimiento como así también proteínas accesorias tales como enzimas de modificación/restricción, resolvasas y reguladores transcripcionales, entre otros. La mayoría de los ORFs resultaron ser homólogos a proteínas identificadas en enterobacterias, en particular los géneros *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*.

Con respecto al módulo de movilización, el plásmido pIH2 contiene en su secuencia a los operones completos correspondientes a los sistemas Dtr (del inglés *DNA Transfer and Replication*) y Mpf (del inglés, *Mating Pair Formation*) de conjugación, sugiriendo fuertemente la posibilidad de que se tratase de un plásmido conjugativo (Capítulo I, sección I.4.3). La proteína relaxasa perteneciente al Dtr de pIH2 fue utilizada para clasificar al plásmido según la clasificación propuesta por Garcillan-Barcia *et al.*, 2009 Este análisis reveló que el plásmido pIH2 pertenece a la gran familia MOB<sub>F</sub>, y más específicamente a la subfamilia MOB<sub>F11</sub>. Miembros de esta familia, incluyen a plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad, tales como IncN, IncW e IncP-9 (Capítulo V, sección V.4.2).



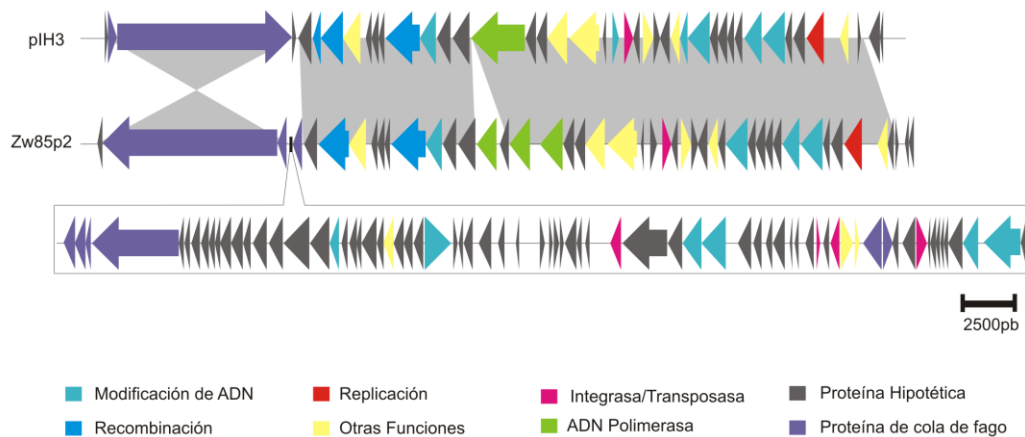
**Figura IV.2 Comparación de pH2 con plásmidos IncN.** La figura muestra el alineamiento de pH2 con los plásmidos IncN2 pJIE137, pEC448-OXA63 y el plásmidos R46 como representante de la familia IncN. Las similitudes encontradas entre los módulos de conjugación (Tra), estabilidad (StbABC), replicación (Rep) y otras proteínas regulatorias e hipotéticas se encuentran señaladas en color. Pueden notarse dos grandes diferencias al comparar el esqueleto plasmídico de pH2 con sus homólogos en base de datos: una inserción de aproximadamente 11 Kb en pH2 que comprende genes hipotéticos y de proteínas de modificación/unión a ADN flanqueadas por elementos transponibles truncados; y la ausencia de genes de resistencia asociados a elementos genéticos móviles como transposasas, secuencias de inserción y/o integrones. (\*// y \*\*// indican fragmentos de 5,7 y 15,9 Kb respectivamente, omitidos en esta representación gráfica)

Un análisis bioinformático más detallado mostró que la estructura genómica del plásmido pH2 presenta características similares a las que se encuentran en plásmidos del grupo IncN2 de incompatibilidad. En particular, el plásmido pH2 comparte una alta identidad de secuencia con los módulos completos de replicación, estabilidad y conjugación del plásmido IncN2 pJIE137 (N°A EF219134) (Partridge *et al.*, 2012). Además, el plásmido pH2 mostró 99% de identidad nucleotídica con el plásmido pEC448-OXA63 (N°A CP015078), aislado de *E. coli* 448, multirresistente de origen hospitalario de la Ciudad de Buenos Aires. El alineamiento entre pH2, pEC448-OXA63 y pJIE137 mostró dos diferencias principales: los plásmidos pH2 y pEC448-OXA63 comparten una inserción dentro del sitio de integración *fipA-nuc* típico de los plásmidos IncN que comprende tres ORFs que codifican para enzimas de restricción/modificación flanqueados por recombinasas, así como 7 genes hipotéticos que sólo se encuentran en el plásmido pH2. La segunda y más interesante diferencia

entre pIH2 y otros plásmidos IncN es la ausencia de genes de resistencia, integrones y otros elementos transponibles asociados que están frecuentemente presentes en plásmidos pertenecientes a dicho grupo de incompatibilidad (**Figura IV.2**).

### Análisis de pIH3

El plásmido pIH3 presentó un tamaño de 49.795 pb y un contenido de GC del 41,8%. En este replicón fueron reconocidos 44 ORFs que en su totalidad encontraron homólogos en distintas cepas de *A. baumannii* en base de datos utilizando el algoritmo BlastP. En este replicón, se logró identificar una Rep, una proteína de mantenimiento ParA, proteínas con función accesoria, pero no se encontraron módulos de movilización.



**Figura IV.3 Comparación de pIH3 y ZW85p2.** Las similitudes de secuencias entre pIH3 y ZW85p2 se muestran sombreadas en gris. El bloque comprendido en el recuadro representa la región de 112,8 Kb ausente en pIH3.

El análisis de la secuencia nucleotídica por BlastN reveló que pIH3 es altamente similar a los plásmidos WZ85p2 (N°A CP006769) (Wang *et al.*, 2014), p6200-114.848 (N°A CP010398.1) y pORAB01-1(N°A CP015484.1), todos ellos pertenecientes a las cepas de *A. baumannii*. WZ85, 6200 y ORAB01 respectivamente. Un análisis comparativo entre ZW85p2 y pIH3 demostró que en este último, está ausente un módulo de 112.800 pb, río abajo del ORF que codifica para una proteína de cola de fago. El fragmento ausente en pIH3 contiene proteínas de origen fágico, enzimas de unión/modificación/restricción de ADN, como así también integrasas y elementos transponibles asociados a genes de resistencia a tetraciclina. El análisis de la secuencia



del plásmido ZW85p2 usando la base de datos PFAST (Zhou *et al.*, 2011) para la identificación de fagos mostró que el mismo codifica para el profago SSU5 completo de *Salmonella* (JQ965645.1) (Kim *et al.*, 2012). El mismo análisis para el plásmido pIH3, mostró que sólo 13 ORFs del replicón eran homólogos a las proteínas de dicho fago.

### Análisis de pIH6

El plásmido pIH6 tiene 6.481 pb y un valor de GC del 40,4 %. En este replicón, fueron identificados 8 ORFs que en su totalidad tuvieron homología con proteínas de bacterias del género *Acinetobacter* en base de datos. Entre ellas, pudieron reconocerse módulos de replicación y movilización. Este último comprendió el gen de la relaxasa (*mobL*) y otro accesorio (*mobS*), pertenecientes al Dtr. Debido a la ausencia de los elementos que componen el Mpf, este replicón podría potencialmente ser movilizable, sólo en presencia de un plásmido conjugativo que le aporten las funciones del Mpf en *trans*.

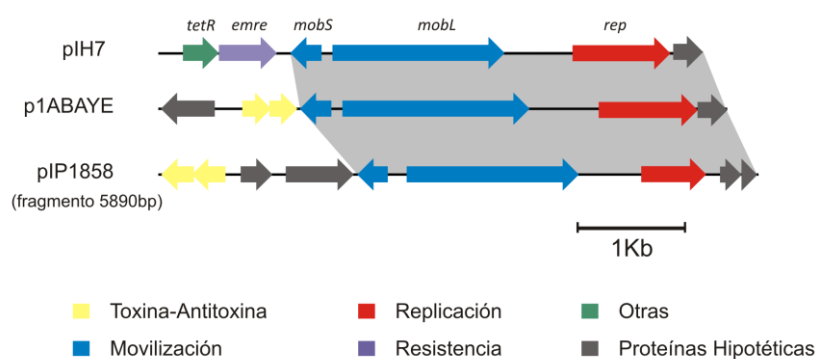
El análisis de la secuencia por BlastN mostró que sólo dos regiones del plásmido pIH6 tuvieron similitud secuencial con otros plásmidos en base de datos. Estas dos regiones de aproximadamente 570 y 1.200 pb incluyeron gran parte de la Rep, y una porción del módulo de movilización MobS-MobL, respectivamente. El análisis de la secuencia por BlastP de las probables proteínas de movilización indicaron que eran homólogas a la encontradas en el *contig* (N°A APPS01000010) de 5,8 Kb de *Acinetobacter junii* CIP 107470 (N°A NZ\_APPS00000000.1). El alineamiento de este *contig* y el plásmido pIH6, reveló que la Rep presente en pIH6 no se encuentra en el *contig*. La estructura genómica común consistió en 6 ORFs: 4 relacionados con la transferencia conjugativa, una proteína implicada en el mantenimiento del plásmido y una proteína hipotética (no mostrado).

### Análisis de pIH7

El plásmido pIH7 tiene 5.273 pb y un porcentaje de GC de 35%. En este replicón se reconocieron 6 ORFs cuyos productos tuvieron homólogos con proteínas de *Acinetobacter* spp. en base de datos. Fueron reconocidos módulos de replicación, de conjugación y proteínas accesorias, dentro de las cuales se identificó el gen *emrE*, *codificante* de un transportador multidroga, responsable de conferir resistencia a una gran variedad de compuestos cargados positivamente e hidrofóbicos, tales como

bromuro de etidio y metilviológeno, entre otros (Bay & Turner, 2012). El módulo encontrado de movilización correspondió a proteínas pertenecientes al Dtr, de manera que, al igual que pIH6, este replicón se consideró como potencialmente movilizable por conjugación, sólo en presencia de un plásmido que le aporte las funciones del Mpf en *trans*.

El análisis de la secuencia del plásmido pIH7 por BlastN reveló que los módulos de replicación y movilización comparten alto porcentaje de identidad con los correspondientes en los plásmidos pIP1858 (N°A. KP890934) (Yoon *et al.*, 2015) y p1ABAYE (N°A CU459137) (Vallenet *et al.*, 2008), ambos de las cepas de *A. baumannii* BM2686 y AYE respectivamente. A pesar de esta similitud, los genes accesorios de pIH7 (un probable regulador transcripcional perteneciente a la familia TetR y el transportador EmrE antes mencionado), no se encuentran conservados (**Figura IV.4**).



**Figura IV.4 Comparación de pIH7 con plásmidos similares de base de datos.** La figura muestra el alineamiento de pIH7 con los plásmidos p1ABAYE y pIP1858. La similitud de secuencia se encuentra señalada en gris.

#### Análisis de pIH8, pIH9, pIH11 y pIH18

El análisis de los plásmidos pIH8, pIH9, pIH11 y pIH18 reveló que sólo presentaron similitud con los módulos de replicación, mantenimiento y/o conjugación de otros plásmidos de *Acinetobacter* spp.

El plásmido pIH8 tiene 9.156 pb y un porcentaje de GC de 34,8%. En este replicón fueron identificados 14 ORFs cuyos productos tuvieron homólogos en plásmidos del género *Acinetobacter* en su totalidad. Fueron reconocidos módulos de replicación, movilización y mantenimiento, además de otras proteínas hipotéticas. El módulo de conjugación consistió sólo en la proteína relaxasa codificada por el gen

*mobL*, perteneciente al Dtr, por lo cual, este plásmido fue clasificado como potencialmente movilizable. Con respecto a las funciones de mantenimiento, se pudieron reconocer dos genes correspondientes al sistema toxina-antitoxina de Tipo II (Capítulo V, sección V.3.1).

El análisis de la secuencia nucleotídica de pIH8 usando BlastN indicó que los módulos de replicación y movilización tienen similitud de secuencia con los módulos correspondientes en los plásmidos pM131-3 (N°A JX101646), pMAC (N°A AY541809) (Dorsey *et al.*, 2006), pOXA58 (N°A CP014479), pABLAC1 N°A (NZ\_CP007713) (Ou *et al.*, 2015), pD1279779 (N°A CP003968.1) (Farrugia *et al.*, 2013), pMMD (N°A GQ904226) (Merino *et al.*, 2010) y muchos otros plásmidos de *A. baumannii*. Sin embargo, a pesar de que todos estos plásmidos contienen genes de resistencia a antimicrobianos, ningún determinante de resistencia fue hallado en pIH8.

Resultados similares se obtuvieron cuando fueron analizados los plásmidos pIH9 y pIH11. El pIH9, es un replicón de 10 Kb que presentó un valor de GC del 34,1 % y 15 ORFs predichos, que incluyeron proteínas hipotéticas y módulos de replicación. El análisis por BlastN, demostró que sólo la Rep tuvo homólogos en base de datos con otras pertenecientes a los plásmidos pAB2 (N°A CP000523) (Giannouli *et al.*, 2010), p2AB5075 (N°A NZ\_CP008708), pA85-2 (N°A KJ477078) (Hamidian *et al.*, 2014) y pAC12 (N°A CP007550) (Gan *et al.*, 2012) todos, de *A. baumannii*. El plásmido pIH11, con un tamaño 7,3 Kb y un porcentaje de GC del 60.8%, presentó 9 ORFs, en donde se pudieron reconocer módulos de replicación y mantenimiento además de otras proteínas accesorias e hipotéticas. La búsqueda en base de datos haciendo uso de BlastN, indicó que los ORFs codificantes para el sistema TA, tuvieron similitud secuencial con aquellos encontrados en los plásmidos pABIR (N°A EU294228) (Zarrilli *et al.*, 2008), pAV1 (N°A DQ278485) (Mengoni *et al.*, 2007) y pXBB1-6 (N°A NZ\_CP010357), todos pertenecientes a bacterias del género *Acinetobacter*.

En el plásmido pIH18, con un tamaño de 3,9 Kb y un valor de GC de 33%, fueron reconocidos 4 ORFs que correspondieron a: 2 Reps, una proteína de la familia solenoide Sel1-like generalmente involucrada en rutas de señalización; y una proteína hipotética. El análisis realizado con BlastN demostró que este replicón tuvo similitud

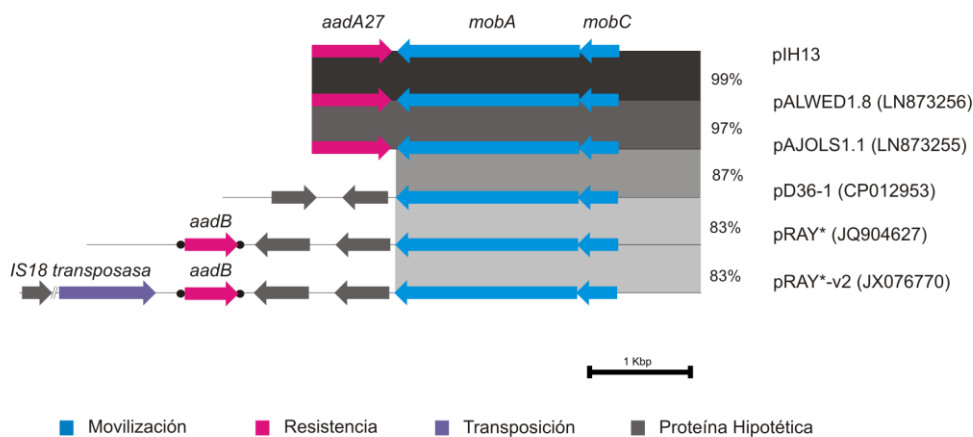
con otros plásmidos aislados de *Acinetobacter* spp. en zonas acotadas de los módulos de replicación y en la proteína Sel1-like.

#### **Análisis de los plásmidos pIH12 y pIH15**

El plásmido pIH12 (6,78 Kb, 37,8% GC, 10 ORFs) mostró pequeños segmentos con identidad de secuencia con plásmidos de *Acinetobacter* spp. presentes en base de datos. Estos segmentos incluyeron una secuencia de inserción IS17, así como un conjunto de proteínas hipotéticas. Resultados similares se obtuvieron con el análisis del plásmido pIH15 (5,35 Kb, 60,77% GC, 9 ORFs), que presentó similitud con plásmidos presentes en distintas enterobacterias que presentaron una secuencia de inserción ISPa38 así como otras proteínas hipotéticas (no mostrado).

#### **Análisis del plásmido pIH13**

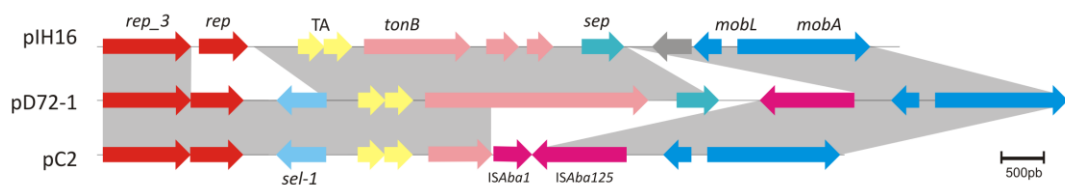
El análisis de pIH13, (4,1 Kb, 42,4% GC, 3 ORFs) por BlastN demostró que este replicón está estrechamente relacionado con la familia de plásmidos pRAY, que se tratan de replicones movilizables involucrados en la resistencia a distintos aminoglicósidos en cepas de *A. baumannii* (Hamidian *et al.*, 2012). El alineamiento de pIH13 con plásmidos de la familia pRAY, indicó que comparte alta similitud en la secuencia y estructura con los plásmidos pALWED1.8 y pAJOLS1.1 (Kurakov *et al.*, 2016) (**Figura IV.5**). Estos replicones poseen, al igual que el plásmido pIH13, el gen *aadA27* que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina. Estos 3 plásmidos comparten además una particularidad que los diferencia de otros plásmidos de la misma familia: la ausencia de secuencias casetes asociadas al gen de resistencia a aminoglicósidos. Tanto para pIH13 como para todos los plásmidos de la familia pRAY, no han sido identificadas proteínas de inicio de replicación, indicando que tendrían un mecanismo Rep- independiente.



**Figura IV.5 Comparación de pIH13 con plásmidos de la familia pRAY.** El plásmido pIH13 es similar a los plásmidos pALWED1.8 y pAJOLS1.1 aislado de especies de *Acinetobacter* de permafrost ártico. El esqueleto altamente conservado entre estos replicones comprende una región no codificante, el módulo de movilización MobAC y el gen de resistencia a aminoglicósidos aadA27. El porcentaje de identidad se indica mediante una escala de grises. Las flechas flanqueadas con puntos indican la presencia de casetes genéticos. Entre paréntesis se muestran los N° de Acceso a las secuencias plasmídicas en base de datos NCBI.

### Análisis del plásmido pIH16

El plásmido pIH16 (8.752 pb, 39,5% GC) posee 11 ORFS, que en su totalidad fueron homólogos a proteínas de plásmidos de cepas de *Acinetobacter spp.* Los módulos reconocidos incluyeron los de movilización (específicamente genes del Dtr), de replicación, de mantenimiento (TA) y proteínas accesorias, dentro de las cuales se reconoció a una toxina citolisina colesterol dependiente, denominada Septicolisina. La secuencia del plásmido fue muy similar a la descrita anteriormente en los plásmidos pD72-1 (N°A KM051986) (Nigro & Hall, 2014) y pC2 (N°A KU549174) (Nigro & Hall, 2016) de *A. baumannii*. Los 3 plásmidos presentan una estructura genómica casi idéntica (**Figura IV.6**), sin embargo el plásmido pIH16 mostró una versión truncada de TonB y carece de secuencias de inserción que están presentes en pD72-1 (ISAb125). Estos plásmidos también codifican para la citolisina colesterol dependiente putativa, Septicolisina ausente en el plásmido pC2.



**Figura IV.6 Comparación de pIH16 con plásmidos similares de base de datos.** La figura muestra el alineamiento de pIH16 con pD72-1 y pC2. Las flechas de un mismo color representan genes ortólogos. Las zonas de similitud de secuencia entre los replicones se encuentran señaladas en gris. – rep\_3 y rep, proteínas de inicio de replicación de distintas familias; TA, componentes de sistema Toxina-Antitoxina; tonB, gen proteína TonB; sep, gen de proteína Septicolisina; mobAL, genes de conjugación (Dtr)-

### Análisis de los plásmidos pIH17 y pIH19

Los plásmidos pIH17 y pIH19 conformaron los replicones más pequeños en esta colección. El pIH17 tiene 1,8 Kb y un porcentaje de GC del 39,5%, el pIH19, tiene 2,1 Kb y un contenido de GC del 39,2%. En estos replicones, se reconocieron 3 (pIH17) y 2 (pIH19) ORFs, y sólo los correspondientes a proteínas de inicio de replicación encontraron homólogos con función conocida en base de datos. Ambas Rep tuvieron homología con proteínas identificadas como Rep63, las cuales están involucradas en la replicación de pequeños plásmidos por el mecanismo de círculo rodante (Capítulo I, sección I.3.4). El hecho de que estos plásmidos no contienen aparentemente más información que aquella que les permite mantenerse independientemente del cromosoma, permite clasificar a estos replicones como plásmidos crípticos cuya función dentro de la célula huésped se desconoce. Lo dicho anteriormente se ve reforzado con análisis de las secuencias nucleotídicas de ambos plásmidos ya demostraron ser muy similares al plásmido críptico pAB49-v1 (N°A KC417495) (Gifford *et al.*, 2014) de *A. nosocomialis*.

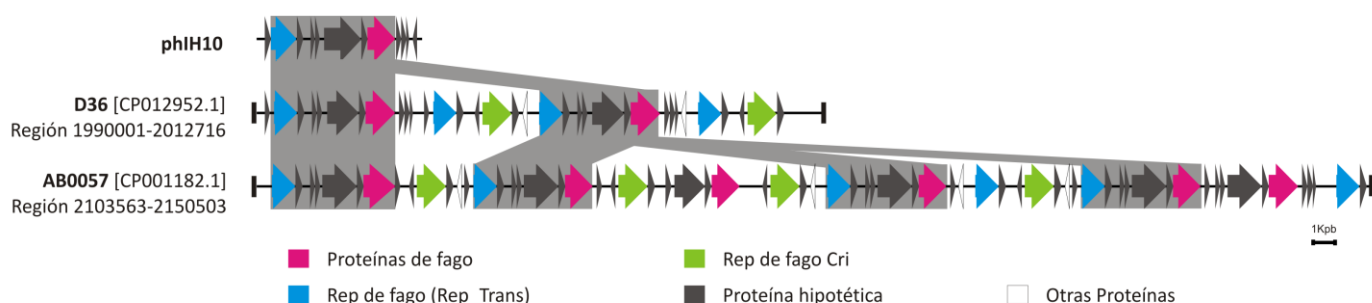
### Análisis del plásmido pIH14

En el plásmido pIH14 (5,6 Kb, 37,3% GC) se reconocieron 11 ORFs, dentro de los cuales pudieron ser identificadas: una Rep, proteínas de fagos y algunas proteínas hipotéticas, todas con homólogas en genomas de *A. baumannii*. El análisis de la secuencia nucleotídica por BlastN mostró homología con secuencias relacionadas a fagos que se encuentran integrados al cromosoma de la cepa *A. baumannii* AB0057. Sólo la Rep, así como un pequeño segmento de nucleótidos aguas abajo de la misma

presentó homología con el pequeño plásmido críptico de 1,96 Kb pM131-10 (N°A JX101639) de *Acinetobacter* sp. M13.

### Análisis de los replicones *phiH4*, *phiH5* y *phiH10*

El análisis de la secuencia de nucleótidos de los replicones *phiH4* (14,1 Kb, el 36,7% de GC, 17 ORF), *phiH5* (9,5 Kb, el 39,3% de GC, 11 ORF) y *phiH10* (6,7 Kb, el 37,8% de GC, 12 ORF) mostró una alta identidad con secuencias de fagos integrados a cromosomas de aislamientos de *Acinetobacter* spp. En particular, la secuencia de *phiH10* es idéntica a una región de 6,8 Kb de las cepas AB0057 (Adams *et al.*, 2008) y D36 ambas de *A. baumannii* (Hamidian *et al.*, 2015) (**Figura IV.6**). Esta secuencia también se encuentra en los cromosomas de otras cepas de *A. baumannii* como AB5075-UW (N°A CP008706) y AYE (N°A NC010410). En todos estos genomas aparece en repeticiones en tándem de número variable y no siempre completas. Teniendo en cuenta sus similitudes con fagos, junto con el hecho de que no presentan proteínas de inicio de replicación, estos tres replicones deben ser considerados como profagos que se escindieron probablemente al momento de la purificación.



**Figura IV.7 Comparación de *phiH10* con regiones homólogas en base de datos.** La figura muestra el alineamiento de *phiH10* con regiones de cromosomas de *A. baumannii* en base de datos. Las zonas de similitud de secuencia se hallan resaltadas en gris.

En este Capítulo se realizó un análisis bioinformático de los replicones haciendo uso de bases de datos disponibles *online* y las secuencias nucleotídicas y proteicas de cada molécula ensambladas descritas en el Capítulo III. El análisis *in silico* de los

replicones completos mostró que la mayoría de los plásmidos presentaron similitud de secuencia con otros plásmidos aislados de cepas de *Acinetobacter* spp. y que algunos tenían secuencias homólogas a plásmidos aislados de otros géneros bacterianos. Muchos replicones mostraron no sólo tener identidad sino que también presentaron similitud con plásmidos presentes en base de datos. Sin embargo, en muchos casos la similitud no fue completa. La presencia de módulos de replicación adicionales, como así también la ausencia de módulos accesorios, como por ejemplo de resistencia, podrían indicar que los replicones tienen un ancestro en común, el cual, pudo haber incorporado o perdido información a lo largo de su evolución. Estos cambios en la estructura, le pudieron haber conferido al replicón la capacidad de poder dispersarse y mantenerse en bacterias de distinto género y/o especie. La presencia de distintos módulos de replicación encontrados en varios replicones (pIH1, pIH9, pIH11, pIH16 y pIH18) y la ausencia de conjunto de genes de resistencia asociados a elementos transponibles como por ejemplo en pIH2, refuerza esta hipótesis de evolución y especialización plasmídica. Es interesante mencionar la presencia de plásmidos crípticos, esto es, plásmidos sin más funciones aparentes que las necesarias para su herencia. Si bien aún no es sabida con certeza la función de estas moléculas, es notable que son capaces de permanecer y heredarse correctamente y esto es suficiente para actuar como potenciales vehículos de información genética, al incorporar distintos módulos a su esqueleto molecular, y movilizarse entre distintos microorganismos.

Con el propósito de avanzar en las características intrínsecas de los plásmidos presentes en bacterias del género *Acinetobacter*, en el Capítulo siguiente se estudiaron los sistemas de replicación, transferencia y mantenimiento encontrados en los plásmidos de la colección hospitalaria y se compararon con los anteriormente descritos presentes en bases de datos.





## CAPÍTULO V

**Análisis de los módulos de replicación,  
movilización y mantenimiento  
plasmídico de la colección hospitalaria  
de *Acinetobacter* spp.**

## V.1 Introducción

Los plásmidos como unidades de ADN extracromosomales independientes han sido encontrados en microorganismos pertenecientes a distintas ramas del árbol evolutivo (Sorensen *et al.*, 2005). Para permanecer como una entidad independiente, estas moléculas han evolucionado al incorporar módulos funcionales que les permite, además de iniciar su propia replicación, permanecer en un huésped dado y transferirse vertical y/u horizontalmente. El conjunto de los microorganismos en donde un plásmido puede replicar y mantenerse se denomina rango de huésped (Jain & Srivastava, 2013) y de acuerdo al tamaño y composición de estos grupos de microorganismos, los plásmidos pueden considerarse como de amplio o estrecho rango de huésped. La primera clasificación en estos dos grandes grupos fue realizada por Datta & Hedges (1972), quienes definieron como un plásmido de amplio rango de huésped a aquel que era capaz de transferirse y replicar entre especies de *Enterobacterias* y *Pseudomonas*. Sin embargo, una clasificación más aceptada hoy en día considera que un plásmido es de amplio rango de huésped cuando es capaz de transferirse, replicarse y mantenerse entre bacterias pertenecientes a distintos grupos filogenéticos (Jain & Srivastava, 2013).

Debido a que los plásmidos pueden considerarse como vectores eficientes de información, es importante estudiar los posibles huéspedes de estas moléculas para poder determinar el impacto que acarrea su propia dispersión. Por este motivo, es de gran relevancia estudiar los módulos de replicación, movilización y mantenimiento plasmídico, que en conjunto, determinan el nicho en donde estas moléculas pueden habitar, esto es, el rango de huésped.

En este Capítulo se muestra el análisis realizado para identificar y caracterizar *in silico* los módulos de replicación, movilización y mantenimiento hallados dentro de la colección hospitalaria de plásmidos de *Acinetobacter* spp.

## V.2 Proteínas de inicio de replicación plasmídica (Reps)

Como se ha mencionado previamente, los plásmidos, para permanecer como una entidad independiente dentro del huésped celular, deben poseer un mecanismo que les asegure su replicación autónoma. Existen dos mecanismos generales de

control de inicio de replicación plasmídica: uno de ellos requiere de pequeños ARNs antisentido regulatorios; y otro requiere del reconocimiento del origen de replicación (*oriV*) por parte de proteínas de origen plasmídico (Capítulo I, sección I.3.5). Los plásmidos que precisan de una menor cantidad de factores de origen celular para poder duplicarse, tendrán la capacidad de replicar en una mayor cantidad de microorganismos y por ende, tendrán un rango de huésped mayor en comparación con otros plásmidos que demuestren una dependencia más grande del entorno celular.

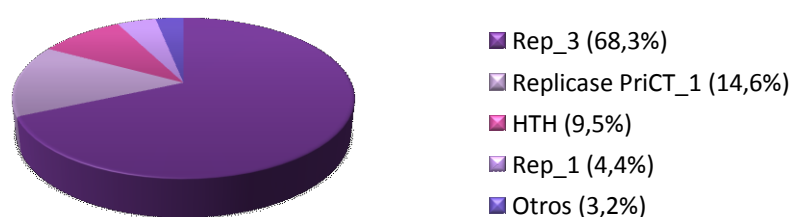
En esta sección se abordó la búsqueda y caracterización *in silico* de proteínas de inicio de replicación plasmídica. También, se realizó el análisis filogenético para poder establecer las relaciones existentes entre estas proteínas y así poder proponer una clasificación de las Reps encontradas comúnmente en plásmidos de bacterias del género *Acinetobacter*.

### V.2.1 Análisis bioinformático de los módulos de replicación

El análisis *in silico* de los replicones obtenidos por secuenciación, permitió reconocer 23 ORFs cuyas secuencias aminoacídicas tuvieron homología con Reps. De los 19 replicones cerrados de esta colección, 15 presentaron Reps, las cuales estuvieron distribuidas de la siguiente manera: Los replicones pIH2, pIH3, pIH6, pIH7, pIH8, pIH10, pIH14, pIH17 y pIH19 presentaron una única Rep, los plásmidos pIH11, pIH16 y pIH18 presentaron 2 Reps y los plásmidos pIH1 y pIH9 presentaron 3. Las 2 proteínas restantes encontradas en esta colección pertenecieron al conjunto de datos de plásmidos no cerrados (**Tabla V.1**). El hecho de que un plásmido contenga múltiples proteínas de inicio de replicación se relacionaría con la capacidad de poder duplicarse en los distintos huéspedes en donde las maquinarias replicativas sean funcionales, aumentando las chances de ampliar su rango de huésped. En este marco, encontrar plásmidos de *Acinetobacter* con múltiples Reps, sería un indicativo fuerte de que estos replicones pudieron haber alcanzado a estas bacterias desde microorganismos distantes, como así también tendrían el potencial de poder diseminarse a otras bacterias no relacionadas.

Del total de las proteínas encontradas *in silico*, un 83% tuvieron homólogas en Reps reportadas en distintas especies microbianas del género *Acinetobacter*. EL 17% de las proteínas restantes, encontraron sus homólogas en distintos géneros de

enterobacterias. Dentro de las 23 Reps encontradas, en 13 de ellas fue posible identificar dominios conservados relacionados a Reps según la base de datos Pfam: IncFII\_repA (PF02387), RepA\_C (PF04796), HTH\_17 (PF12728), Rep\_trans (PF02486) y Rep\_3 (PF01051), siendo esta última familia, la más representada dentro de las Reps de esta colección (**Tabla V.1**). Un análisis realizado sobre los dominios conservados de las Reps de plásmidos de todas las especies de *Acinetobacter* presentes en base de datos reveló que el dominio Rep\_3 también fue el más representado, seguidos por el conjunto Replicase + PriCT\_1, cuyas proteínas contienen un dominio primasa funcional hacia su extremo C-ter (**Figura V.1**).



**Figura V.1 Distribución de dominios en Reps de *Acinetobacter* spp.** La figura muestra proporción de los dominios encontrados en la base de datos Pfam para las proteínas de inicio de replicación halladas en todos los plásmidos de *Acinetobacter* spp. en base de datos. El dominio mayormente representado pertenece a la familia Rep\_3 y fue coincidente con lo encontrado en los plásmidos de la colección hospitalaria de este trabajo.

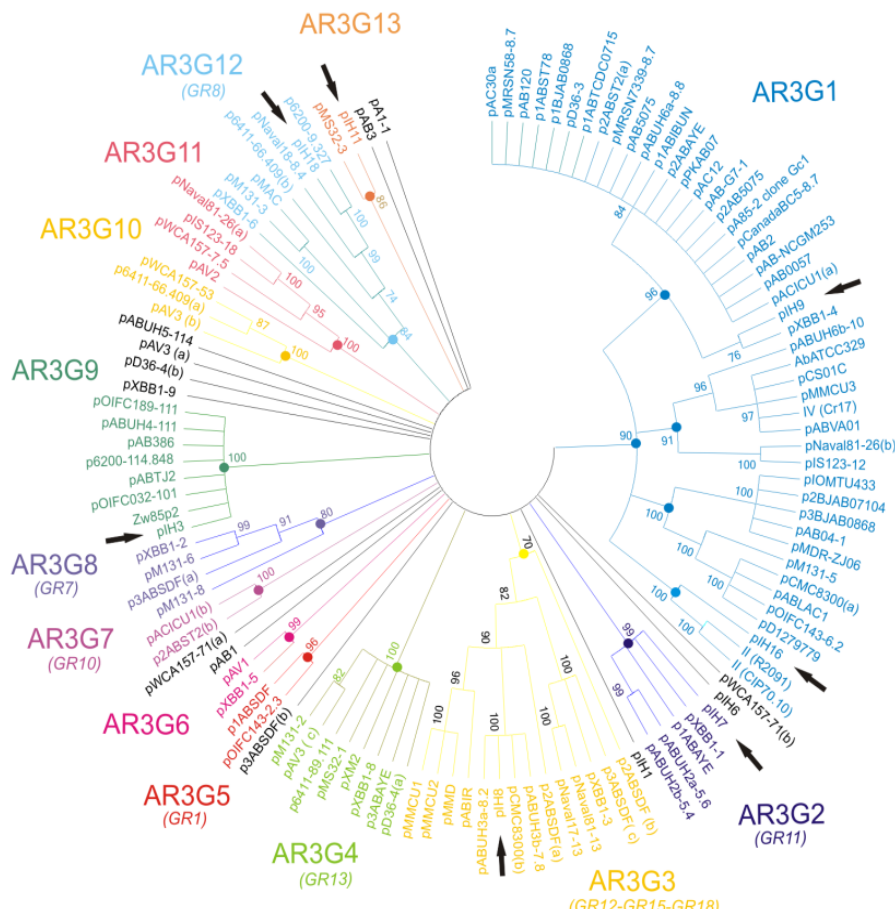
Con el propósito de determinar la relación filogenética existente entre las Reps mayormente representadas en plásmidos de este género, se recopilieron las secuencias de las Rep\_3 (PF01051) de todos los plásmidos cerrados de esta colección y de los plásmidos cerrados de las bacterias del género *Acinetobacter* depositadas en base de datos. En total, se recopilieron 119 secuencias aminoacídicas que fueron alineadas utilizando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004). El resultado del alineamiento fue analizado por Prottest (Abascal *et al.*, 2005) para encontrar el mejor modelo de evolución que ajuste la filogenia de estas proteínas. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el modelo de evolución LG+F y su topología fue chequeada por *bootstrap*. Los resultados obtenidos fueron graficados considerando como válido valores de *bootstrap* mayores al 70 % como se muestra en la **Figura V.2**.

**Tabla V.1 Reprs halladas in silico en la colección hospitalaria de plásmidos de *Acinetobacter* spp.**

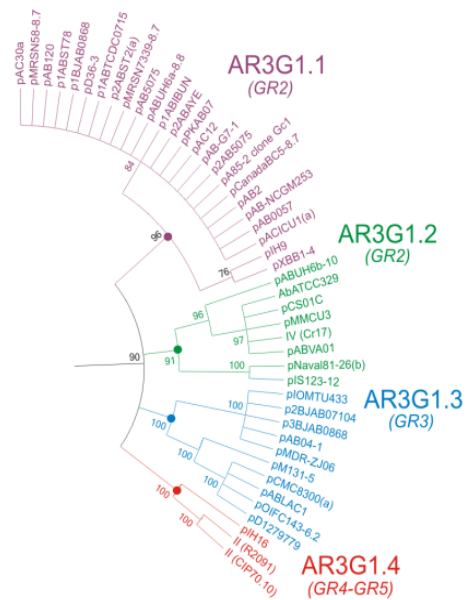
Plásmido	NOMBRE	NOMBRE PFAM	CODIGO PFAM	Microorganismo con mayor % identidad	% Indentidad
pIH1	Proteína de inicio de replicación	IncFII_repA	PF02387	<i>Enterobacter cloacae</i>	100
	RepB	Rep_3	PF01051	<i>Enterobacteriaceae</i>	100
	RepC-like de plásmido F	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	85
pIH2	Rep_A	RepA_C	PF04796	<i>Enterobacteriaceae</i>	100
pIH3	RepB	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter</i>	100
pIH6	RepB	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
pIH7	RepB*	-	-	<i>Acinetobacter parvus</i>	100
pIH8	RepB	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter</i>	100
pIH9	Proteína de inicio de replicación*	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
	Proteína de Replicación de ADN	HTH_17	PF12728]	<i>Acinetobacter pittii</i>	98
	RepB	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
phIH10	Proteína de replicación	Rep_trans	PF02486	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
pIH11	Replicasa	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	98
	Proteína de Replicación de ADN	-	-	<i>Wuchereria bancrofti</i>	95
pIH14	Rep63	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99
pIH16	RepB	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
	Proteína de Replicación de ADN	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.	62
pIH17	Rep63	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	86
pIH18	RepB	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
	Proteína de Replicación de ADN	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
pIH19	Rep63	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
Scaffolds remanentes	Proteína de Replicación de ADN *	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100
	Proteína de Replicación de ADN*	Rep_3	PF01051	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100

En el árbol filogenético resultante pudieron ser identificados 13 grupos soportados por valores altos de *bootstrap*, denominados AR3G (***Acinetobacter Rep\_3 Group***). De los 8 plásmidos de la colección portadores de proteínas pertenecientes al dominio Rep\_3, 7 fueron clasificados dentro de 7 grupos diferentes: pIH9 en AR3G1.1, pIH16 en AR3G1.4, pIH7 en AR3G2, pIH8 en AR3G3, pIH3 en AR3G9, pIH18 en AR3G12 y pIH11 en AR3G13.

A



B



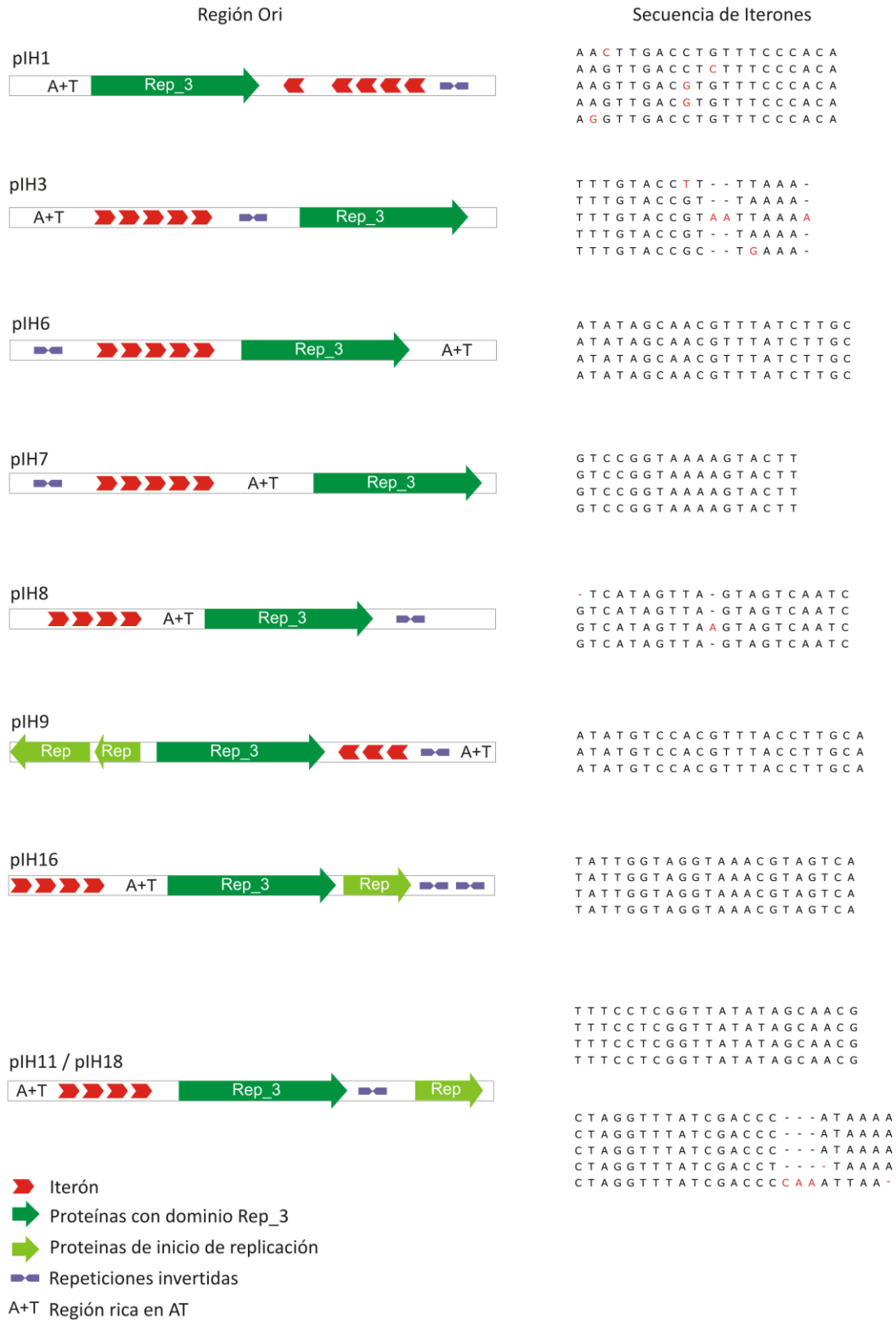
**Figura V.2** Árbol filogenético de proteínas Rep<sub>3</sub> de *Acinetobacter* spp. **A)** La figura muestra el árbol completo de Rep<sub>3</sub> de plásmidos de *Acinetobacter* spp. Los grupos fueron definidos con un valor de corte de bootstrap (cut-off) de 70. Los grupos se encuentran diferenciados en colores. Entre paréntesis se muestra la correspondencia entre los grupos definidos en este trabajo y el realizado por Bertini et al., 2010. Las flechas negras indican las posiciones de las Rep<sub>3</sub> de la colección hospitalaria de este trabajo. Los plásmidos no clasificados se encuentran en negro. **B)** Detalle de los subgrupos del grupo AR3G1.

Previamente, Bertini et al. (2010) propusieron una clasificación de las Reps de plásmidos de *A. baumannii* haciendo uso tanto de las secuencias aminoacídicas como nucleotídicas. El análisis, que incluyó otras Reps además de las Rep<sub>3</sub>, implicó el alineamiento de las secuencias y un árbol realizado sólo a partir del porcentaje de similitud entre las secuencias sin tener en cuenta ningún modelo de evolución. De esta forma, fueron definidos 19 grupos de plásmidos basados en la proteína de inicio de replicación (GR 1-19), dentro de los cuales 15 contenían proteínas con dominio Rep<sub>3</sub>

(PF01051). La comparación de los grupos propuestos por Bertini *et al.* (2010) y el análisis filogenético realizado aquí, reveló que los grupos identificados en este trabajo, AR3G 2, 4, 5, 7, 8 y 12, fueron coincidentes con GR 11, 13, 1, 10, 7 y 8 respectivamente. Las principales diferencias entre estos dos estudios fueron encontradas para los grupos AR3G1 y AR3G3. El grupo AR3G1 se dividió en cuatro ramas soportadas con valores de *bootstrap* mayores a 90 % que conformaron 4 subgrupos: AR3G1.1 y AR3G1.2 que incluyeron miembros de GR2; AR3G1.3, coincidente con GR3 y AR3G 1.4, que contuvo Reps altamente similares (100 - 98 % similitud aminoacídica) a aquellas encontradas en los grupos GR4 y GR5. En cuanto al grupo AR3G3, este incluyó a los miembros de los grupos GR12, GR15 y GR18. Finalmente, el resto de los grupos definidos en este estudio, AR3G6, AR3G9, AR3G10, AR3G11 y AR3G13 incluyeron Reps que no han sido previamente clasificadas. Las Reps correspondientes a los grupos GR9, GR17 y GR19 definidos por Bertini y colaboradores, no fueron encontradas formando parte de ningún grupo definido en este estudio filogenético (**Figura V.2**).

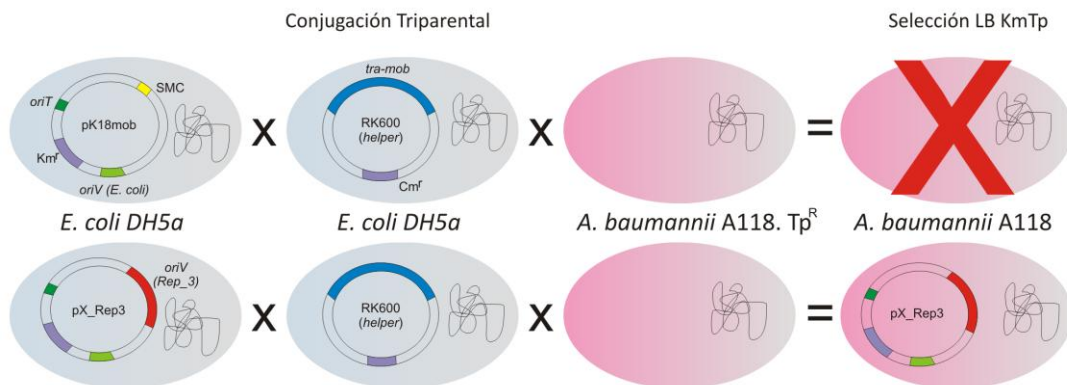
La búsqueda de homólogos a las Rep\_3 del árbol filogenético reveló que si bien, este dominio está ampliamente distribuido en plásmidos dentro del género *Acinetobacter*, con una representación del 60%, también es posible encontrar ortólogos dentro de los géneros *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Neisseria* y *Escherichia* entre otros, siendo estos los más representados después de *Acinetobacter* spp. Estos resultados indicarían que los plásmidos portadores de Rep\_3 podrían considerarse de amplio rango de huésped debida a la gran variedad de géneros bacterianos en donde proteínas homólogas son potencialmente funcionales.

La búsqueda de regiones ricas en AT, iterones y repeticiones invertidas en las inmediaciones de las Rep\_3 de los plásmidos de esta colección, permitió identificar los posibles *oriVs* de estos replicones (Capítulo I, sección I.3.1). La distribución relativa de los elementos que componen estos *loci* fueron variables, conformando 8 arquitecturas diferentes (**Figura V.3**). Los iterones identificados variaron en longitud (15-25 pb), en la cantidad de repeticiones y también en su secuencia. Esto indica que existe una alta especificidad entre el *oriV* y la propia proteína Rep\_3 codificada en el mismo plásmido.



**Figura V.3 Arquitectura de oriVs de proteínas Rep\_3 de la colección hospitalaria de Acinetobacter spp.** La figura muestra las disposiciones encontradas de los elementos típicos que conforman el oriV en todos los plásmidos de la colección con Rep\_3. Se reconocieron 8 arquitecturas diferentes. A la derecha de la figura, se muestra para cada caso, la secuencia de los iterones correspondientes a cada oriV.





**Figura V.4. Ensayo funcional de oriVs de Rep\_3.** Los oriVs de las Rep\_3 de los plásmidos pIH7, pIH8 y pIH16 fueron clonados en el vector pK18mob no replicativo en *A. baumannii*. Las construcciones (pX\_Rep3, X= 7, 8 y 16) fueron movilizadas por conjugación triparental a *A. baumannii* A118 libre de plásmidos, resistente a Tp y sensible a Km. Los transconjugantes se seleccionaron en LB suplementado con Km y Tp. Sólo se seleccionaron las bacterias que contenían las construcciones con un oriV funcional en la célula receptora.

### V.3 Proteínas de mantenimiento plasmídico.

Los plásmidos han evolucionado no sólo para asegurarse su duplicación en distintos entornos celulares, sino también para asegurar su herencia estable a la progenie celular. Existen al menos 3 mecanismos que promueven la estabilidad plasmídica: la resolución de multímeros, en donde la acción de recombinasas sitio específicas asociadas a los llamados sistemas de resolución de multímeros evitan los efectos desestabilizadores que surgen por la formación de multímeros de plásmidos (Sengupta & Austin, 2011); la partición activa, en donde un complejo núcleo proteico asegura que los plásmidos sean posicionados en los polos de la célula antes de la división (Schumacher, 2012, Baxter & Funnell, 2014); y la muerte post-segregacional, cuyo sistema incluye (al menos) dos genes: uno que codifica para una toxina estable, y otro para una antitoxina inestable (sistemas TA). Si el plásmido es perdido durante la división celular, la antitoxina, inestable, es degradada y la bacteria muere por acción de la toxina estable (Mruk & Kobayashi, 2013, Hernández-Arriaga *et al.*, 2014) (Capítulo I, sección I.5).

### V.3.1 Búsqueda *in silico* de proteínas de mantenimiento plasmídico

El análisis *in silico* para la asignación de funciones por similitud de secuencia demostró que 15 ORFs fueron homólogos a proteínas relacionadas al mantenimiento plasmídico. Estas últimas estuvieron distribuidas en 6 replicones y pertenecieron a mecanismos involucrados en la partición activa y muerte post-segregacional o TA. Los módulos de mantenimiento encontrados en los plásmidos pIH1 y pIH2, en su totalidad, encontraron a sus homólogos más cercanos en enterobacterias. Los restantes, distribuidos entre pIH3, pIH8, pIH11 y pIH16, fueron homólogos a proteínas de distintas especies del género *Acinetobacter* (Tabla V.2).

**Tabla V.2 Proteínas de mantenimiento plasmídico en la colección hospitalaria de *Acinetobacter* spp.**

PLÁSMIDO	NOMBRE	GÉNERO/ ESPECIE	N° ACCESO	NOMBRE PFAM	CÓDIGO PFAM	% IDENTIDAD
pIH1	Proteína de estabilización plasmídica ParE	<i>Enterobacter hormaechei</i>	KJP73628.1.1	Par Etoxin	PF05016	100
	Proteína asociada a virulencia VagC	<i>Enterobacter</i> sp.	EUM08956.1	Maz Eantitoxin	PF04014	100
	Proteína con dominio PilT	<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_032662169.1	PIN	PF01850	99
	StbA	<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_045328477.1	StbA	PF06406	100
	Mediador de estabilidad plasmídica	<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_045325846.1	Plasmid stabB	PF10784	99
pIH2	StbA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80235.1	-	-	99
	Proteína de estabilización plasmídica StbB	<i>Enterobacteriaceae</i>	YP_004765036.1	-	-	100
	StbC	<i>Escherichia coli</i>	YP_004765035.1	-	-	100
pIH3	Proteína de partición A	<i>Acinetobacter calcoaceticus / baumannii</i>	WP_000770709.1	ParA	PF10609	100
pIH8	Módulo de adicción. Toxina	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_000176412.1	YafQ toxin	PF15738	100
	Módulo de adicción. Antitoxina	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_0051430357.1	RelB	PF04221	100
pIH11	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	EEY94627.1	BrnT toxin	PF04365	93
	Antitoxina	<i>Acinetobacter</i>	WP_061855757.1	BrnA antitoxin	PF14384	94
pIH16	Proteína de membrana	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EKK14970.1	Brn Ttoxin	PF04365	100
	Antitoxina	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000438826.1	BrnA antitoxin	PF14384	100

El plásmido pIH3 fue el único en donde fue posible identificar una proteína relacionada al sistema de partición activa, ParA, que constituye una ATPasa encargada de dar energía al sistema para transportar el material genético hacia los polos. Los plásmidos pIH1, pIH8, pIH11 y pIH16 sólo presentaron proteínas pertenecientes al sistema TA de Tipo II. (**Tabla V.4**). Entre ellos, se encontraron proteínas con dominios ParE/YafQ, correspondiente a toxinas que tienen como blanco a la enzima ADN girasa y consecuentemente acción sobre la replicación del ADN celular (Unterholzner *et al.*, 2013); y toxinas con dominio BrnT, ribonucleasas cuya función es impedir la traducción de proteínas esenciales para la célula al degradar ARNm importantes para el metabolismo del huésped (Heaton *et al.*, 2012). En dichos plásmidos, también pudieron reconocerse distintas antitoxinas con los dominios reconocidos MazE, RelB y BrnA. Es importante destacar que es muy difícil asignar el nombre correcto a las proteínas de estos sistemas haciendo uso de herramientas informáticas de búsqueda de similitud. En general, la asignación de función y nombre a los ORFs se ve dificultada por el nivel de similitud entre las proteínas tóxicas de los sistemas TA, incluso aún cuando su mecanismo de acción es diferente. Debido a esto, para poder llevar a cabo una identificación *in silico* más certera de estos módulos, será necesario determinar y comparar las estructuras tridimensionales de estas enzimas. Por último, en los plásmidos pIH1 y pIH2 se pudieron reconocer proteínas del sistema StbABC, involucrado tanto en procesos de mantenimiento como conjugación plasmídica (Guynet *et al.*, 2011).

#### V.4 Módulos de movilización plasmídica

Los plásmidos pueden ser transferidos verticalmente al ser heredados luego de la división celular, como así también ser transferidos horizontalmente a microorganismos que pueden o no estar relacionados filogenéticamente. El mecanismo más importante de transferencia horizontal plasmídica entre microorganismos involucra el contacto célula-célula y una maquinaria proteica capaz de identificar, procesar y traslocar una copia del material genético desde la bacteria dadora hacia la receptora (Capítulo I, sección I.4). Este mecanismo, denominado conjugación, precisa de elementos exclusivamente plasmídicos para poder ser llevado

a cabo. De acuerdo a la maquinaria conjugativa codificada, los plásmidos pueden ser considerados como conjugativos (autotransmisibles) o movilizables (Smillie *et al.*, 2010). El conjunto constituido por el *oriT*, la relaxasa y otras moléculas accesorias que conforman el complejo inicial de reconocimiento y procesamiento del ADN (relaxosoma), se denomina Dtr (*Dna transfer and replication*); y el sistema de secreción de tipo IV, se denomina Mpf (*Mating pair formation*) (Capítulo I, sección I.4.2). En este marco, aquellos plásmidos que codifican para un Dtr y Mpf completo, son considerados conjugativos. Los plásmidos que sólo contienen elementos del Dtr se denominan movilizables y pueden ser transferidos a otras células sólo en presencia de los factores del Mpf en *trans* que suelen ser aportados por otros plásmidos conjugativos (funciones *helper*). Los genes que codifican para este sistema de transporte se hallan codificados exclusivamente en los plásmidos y han sido utilizados como criterio de clasificación. En esta sección se buscaron y estudiaron *in silico* a las proteínas encargadas de la movilización por conjugación de la colección hospitalaria de plásmidos de *Acinetobacter* spp.

#### V.4.1 Análisis *in silico* de módulos de conjugación

El análisis *in silico* de los plásmidos obtenidos por secuenciación, permitió reconocer 28 ORFs cuyas secuencias aminoácidas presentaron homología a proteínas asociadas a sistemas de conjugación. En la **Tabla V.3** se detallan las funciones asociadas a cada ORF de acuerdo a su porcentaje de similitud con proteínas en base de datos. Los plásmidos más grandes de esta colección, pIH1 y pIH2 mostraron tener proteínas de movilización cuyos homólogos más cercanos correspondieron en su totalidad a proteínas identificadas en enterobacterias del género *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia*. En contraposición, las proteínas de conjugación de los plásmidos pIH6, pIH7, pIH8, pIH13 y pIH16 encontraron sus homólogas más cercanas en distintas especies del género *Acinetobacter*.

Para cada uno de los plásmidos se investigó la presencia de las proteínas del Dtr y Mpf y fue posible clasificar a la mayoría de los mismos según los sistemas presentes. La única excepción la constituyó el plásmido pIH1, que mostró contener sólo dos proteínas involucradas en la conjugación: una relaxasa truncada, perteneciente al Dtr, y una proteína TraX perteneciente al Mpf. Debido a la ausencia de un Mpf completo y

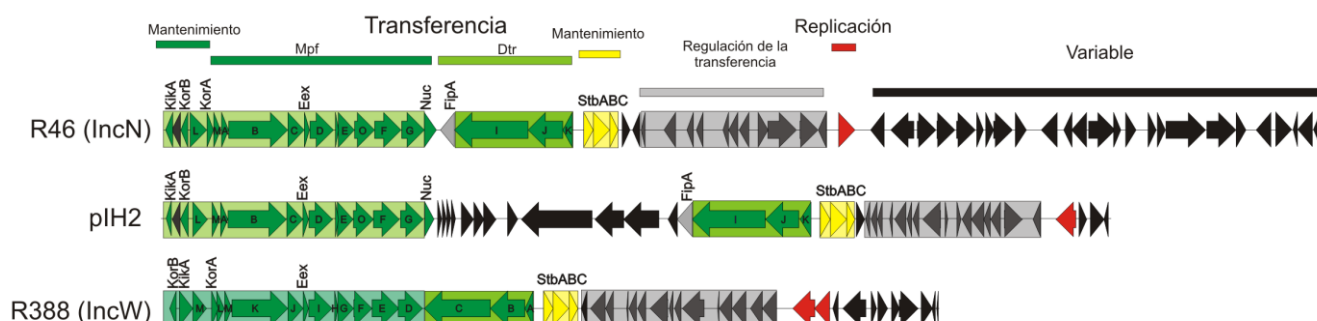
a que la proteína relaxasa se encontró truncada, presentando sólo 81 aminoácidos correspondientes al extremo C-ter, no fue posible predecir si este replicón constituye un plásmido del tipo movilizable. El plásmido pIH2 fue el único replicón de esta colección en donde se pudo identificar sistemas de Dtr y Mpf completos, por lo que correspondió al único plásmido potencialmente conjugativo. Como ya se ha descrito en el Capítulo IV, los módulos de movilización de pIH2 guardan alta similitud a nivel de secuencia y estructura con plásmidos de la familia IncN (R46, N°A AY046276) e IncW (R388, N°A NC\_028464) (**Figura V.5**).

**Tabla V.3 Proteínas de conjugación plasmídica en la colección hospitalaria de *Acinetobacter* spp**

PLÁSMIDO	NOMBRE	FAMILIA/ GÉNERO /ESPECIE	N° ACCESO	NOMBRE PFAM	CÓDIGO PFAM	% IDENTIDAD
pIH1	Proteína de conjugación TraX	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_032638097.1	TraX	PF05857	100
	Proteína de conjugación Tral*	<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_069597126.1	-	-	99
pIH2	Relaxasa Tral	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80231.1	TrwC	PF08751	100
	Proteína de conjugación TraJ	<i>Escherichia coli</i>	WP_063131939.1	TraG-D C TrwB AAD bind	PF12696 PF10412	99
	TraK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80233.1	-	-	100
	TraL	<i>Enterobacteriaceae</i>	YP_004765023.1	-	-	99
	TraM	<i>Escherichia coli</i>	YP_001121032.1	TrbC	PF04956	100
	TraA	<i>Escherichia coli</i>	YP_004765021.1	VirB3	PF05101	100
	TraB (ATPasa tipo VirB4)	<i>Enterobacte homaechei</i>	KTK22616.1	CagE, TrbE , VirB	PF03135	100
	VirB5	<i>Salmonella entérica</i>	EHC71373.1	T4SS	PF07996	100
	EeX	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000858958.1.1	-	-	100
	TraD	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_014014948.1.1	TrbL	PF04610	100
	TraE	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001208352.1	VirB8	PF04335	100
	TraO	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000758230.1	CagX	PF03524	100
	TraF	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000101920.1	TrbI	PF03743	100
TraG	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001076634.1	T2SSE	pfam00437	100	
Nuc	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000715148.1	PLDc 2	pfam13091	100	
pIH6	Proteína de conjugación TrbL	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_004918993.1	TrbL	PF04610	99
	Proteína de conjugación TrbJ	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_068564382.1	-	-	99
	Proteína de movilización	<i>Acinetobacter pittii</i> .	OCY51628.1 1	-	-	70
pIH7	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter junii</i>	WP_004919014.1	MobA MobL	PF03389	99
	Proteína de movilización (MobL-like)	<i>Acinetobacter sp</i>	WP_068913314.1	MobA MobL	PF03389	99
	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter spp.</i>	WP_046128218.1	-	-	100
pIH8	MobA/MobL	<i>Acinetobacter sp.</i>	EFF84546.1	MobA MobL	PF03389	100
pIH13	Relaxasa MobA	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	CTQ57091.1	Relaxase	PF03432	100
	Proteína de movilización	<i>Acinetobacter parvus</i>	WP_050041694.1	MobC	PF05713	100
pIH16	Nickasa	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_033107832.1	MobA MobL	PF03389	100
	Proteína de movilización	<i>Acinetobacter sp.</i>	KQD09980.1	-	-	99

(\*) *Secuencias parciales.*

No obstante, la presencia de los genes *fipA* y *nuc* en pIH2, considerados como “puntos calientes” (*hot spots*) de integración en plásmidos IncN, es indicio suficiente para la clasificación de pIH2 en el mencionado grupo según su arquitectura modular.



**Figura V.5. Comparación de la arquitectura de pIH2 con R46 y R388.** La figura muestra la comparación de pIH2 con la arquitectura típica encontrada en plásmidos IncN e IncW. En particular, pIH2 contiene entre los genes que codifican para la maquinaria del Dtr y Mpf dos genes, *nuc* y *fipA* característicos de plásmidos IncN que se encuentran ausentes en plásmidos IncW.

En los 5 plásmidos restantes pIH6, pIH7, pIH8, pIH13 y pIH16 sólo fue posible identificar módulos de conjugación correspondientes al sistema del Dtr (relaxasas y proteínas accesorias), haciendo estos plásmidos potencialmente movilizables sólo en presencia de plásmidos conjugativos.

#### V.4.2 Clasificación filogenética de plásmidos de acuerdo a sus relaxasas

La proteína relaxasa es fundamental para la transferencia por conjugación y se encuentra presente tanto en plásmidos movilizables como conjugativos (Lanka & Wilkins, 1995). Debido a su universalidad en plásmidos transmisibles por conjugación, es utilizada como criterio de clasificación. Todas las proteínas relaxasas conocidas al momento presentan el dominio funcional que les da nombre en los primeros 300 aminoácidos pertenecientes a su extremo N-ter. En todas estas proteínas, dentro del dominio funcional, existen tres motivos secuenciales conservados: El Motivo I, que contiene una Tyr catalítica responsable de la unión y posterior clivaje al ADN; el Motivo II, involucrado en la interacción ADN-proteína en el extremo 3' del sitio de corte; y un Motivo III, o 3H que contiene 3 His conservadas, el cual estaría involucrado en la estabilización y activación del ataque nucleofílico del residuo Tyr del motivo I (Capítulo I, sección I.4.2.1). Francia *et al.*, 2004, propusieron una clasificación de plásmidos conjugativos/movilizables, basado en las similitudes y diferencias encontradas en el N-

ter de las relaxasas. Para ello, usaron los primeros 300 aminoácidos de las relaxasas de los plásmidos movilizables RSF1010, ColE1, CloDF13 y pMV158. Estos plásmidos se encuentran dentro de los replicones movilizables mejor estudiados cuyas proteínas relaxasas han sido purificadas y caracterizadas *in vitro*. Haciendo uso de sus secuencias y de la herramienta Blast iterativo (PsiBlast), las secuencias homólogas a cada una de las proteínas fueron procesadas y utilizadas para realizar alineamientos. Estos últimos fueron utilizados para el análisis filogenético que permitió distinguir 5 súper-familias distintas de proteínas relaxasas: MOB<sub>Q</sub>, MOB<sub>P</sub>, MOB<sub>F</sub>, MOB<sub>HEN</sub>, MOB<sub>V</sub>, con características distintivas dentro de los tres motivos conservados. Más adelante, Garcillan-Barcia *et al.*, 2009 profundizaron este análisis hacia plásmidos conjugativos teniendo también en consideración las características de las proteínas de acoplamiento. De este análisis, surgió una nueva súper familia, MOB<sub>C</sub>, como así también, se diferenciaron y reorganizaron nuevas sub-familias dentro de las ya descritas.

Con el propósito de clasificar a los replicones de esta colección de acuerdo a sus módulos de movilización, se realizó el análisis de los 300 aminoácidos N-ter de las relaxasas identificadas *in silico*. Cada una de las secuencias de las relaxasas de los distintos plásmidos fue alineada con las correspondientes a cada súper-familia y se realizaron los análisis filogenéticos utilizando los mismos parámetros reportados por Garcillan-Barcia *et al.*, 2009. Los resultados permitieron clasificar a los 6 plásmidos dentro de 3 súper-familias. En particular, 3 de ellos se encontraron formando parte de un nuevo sub-grupo con características de secuencia únicas que se detallan más adelante.

El análisis filogenético del extremo N-ter de la relaxasa correspondiente al pIH2 permitió clasificar al plásmido dentro de la super-familia MOB<sub>F</sub>, en particular, la subfamilia MOB<sub>F11</sub>. Las relaxasas pertenecientes a la super-familia MOB<sub>F</sub> tienen ciertas particularidades. En principio, todas las proteínas contienen 2 dominios bien definidos: uno hacia el extremo N-ter con actividad relaxasa y uno hacia el extremo C-ter con actividad helicasa. Además, estas relaxasas poseen dos Tyr conservadas, con actividad catalítica dentro del Motivo I (Guasch *et al.*, 2003, Francia *et al.*, 2004). El subgrupo MOB<sub>F11</sub> tiene 2 ramas bien definidas: una en donde se encuentran a plásmidos IncW,

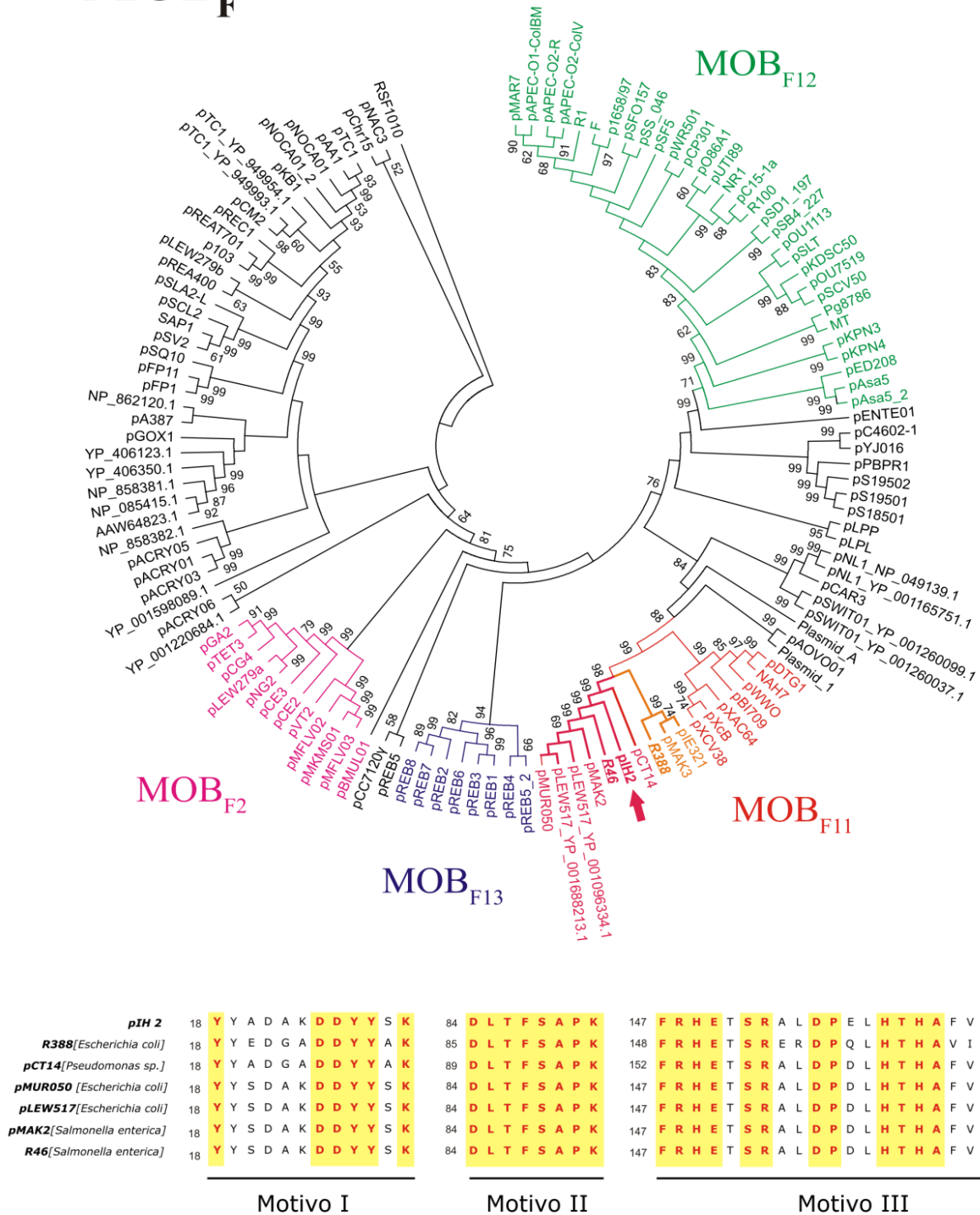


cuyo representante es R388, y otra donde se encuentran plásmidos IncN, cuyo representante es R46. El análisis filogenético de la relaxasa del pIH2, una vez más reforzó la cercanía de este replicón con plásmidos IncN como puede verse en la **Figura V.7**.

El análisis filogenético de la relaxasa de pIH13 permitió identificar a este último como miembro de la familia MOB<sub>HEN</sub> y se relacionó particularmente con el plásmido pRAY (N°A NC\_000923) (**Figura V.7**), un replicón distribuido en cepas de *Acinetobacter* spp., asociado a resistencia a aminoglicósidos (Segal & Elisha, 1999). Todos los miembros pertenecientes a esta gran familia pertenecen al *phylum proteobacteria*, especialmente a la clase  $\gamma$ -*proteobacteria*, y muestran una gran conservación no sólo en la secuencia de sus módulos de movilización, sino también en la arquitectura que estos presentan. Las relaxasas de esta gran familia conservan una Tyr en el Motivo I, una Ser en el Motivo II, y en el Motivo III encontramos una particularidad que diferencia a estas proteínas del resto de las relaxasas: la presencia del motivo HEN que le da el nombre a este grupo (**Figura V.7**) (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

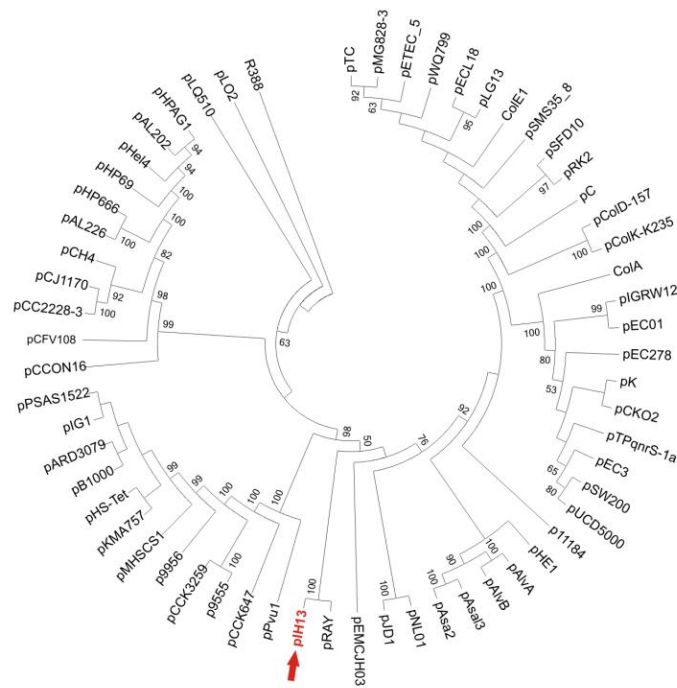
El análisis filogenético de las relaxasas de los plásmidos pIH6, pIH7, pIH8 y pIH16, permitió clasificar a estos replicones dentro de la gran súper-familia MOB<sub>Q</sub> (**Figura V.8**). Dentro de los plásmidos prototipo de esta gran familia, se encuentra el replicón de muy amplio rango de huésped RSF1010 (N°A M28829) (Scholz *et al.*, 1989). Este plásmido, pertenece al subgrupo MOB<sub>Q1</sub> cuyos miembros corresponden a plásmidos que pueden ser movilizados eficientemente por plásmidos que aportan funciones *helper* de los grupos de incompatibilidad IncI $\alpha$ , IncM, IncX e IncP (Francia *et al.*, 2004). La secuencia del extremo N-ter de estas proteínas muestran la conservación de una Tyr en su Motivo I, y las 3 His en el Motivo III, pero no se ha encontrado una Ser conservada en el Motivo II, sino que en su lugar, se hallan residuos de Glu o Asp (**Figura V.9**) (Francia *et al.*, 2004). Hacia su extremo C-ter, estas proteínas contienen un dominio primasa conservado, con excepción del plásmido pTF1 (M. Drolet, 1990). Existen distintas arquitecturas descritas para plásmidos de esta familia que pueden poseer sólo la proteína relaxasa en las inmediaciones del *oriT*, como así también proteínas accesorias (Francia *et al.*, 2004).

# MOB<sub>F</sub>



**Figura V.6. Relación filogenética de pIH2 con plásmidos pertenecientes a la familia MOB<sub>F</sub>.** A) Árbol filogenético obtenido haciendo uso de los extremos N-ter de las proteínas relaxasas. Las distintas subfamilias se muestran en colores. Los plásmidos que no pertenecen a ningún subgrupo, se muestran en negro. El plásmido pIH2 se encuentra formando parte del subgrupo MOB<sub>F11</sub> muy cercano a plásmidos IncN, como había sido demostrado en el análisis por comparación de su esqueleto plasmídico. B) Alineamientos de la relaxasa de pIH2 y plásmidos relacionados pertenecientes a MOB<sub>F11</sub>. La figura muestra los tres motivos conservados encontrados en las relaxasas de esta subfamilia. Los aminoácidos invariantes que caracterizan a esta subfamilia están marcados en rojo sobre amarillo

A



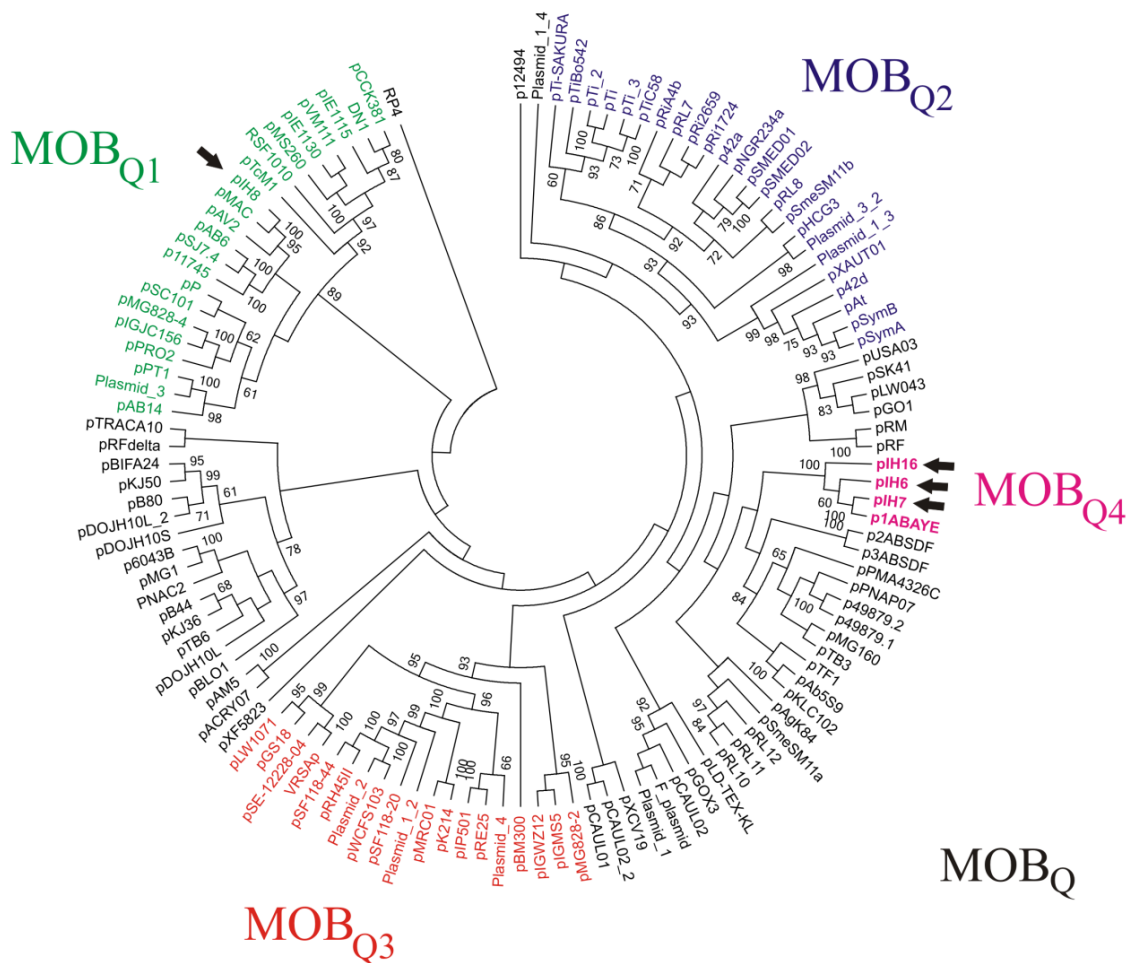
MOB  
HEN

B

pIH13	17	L	D	<b>Y</b>	<b>L</b>	L	G	56	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>Y</b>	<b>E</b>	H	93	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	V	N	Q	V	T	G	E	T	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	N	V
pRAY [ <i>A. baumannii</i> ]	17	L	D	<b>Y</b>	<b>L</b>	L	G	56	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>Y</b>	<b>E</b>	H	93	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	I	N	Q	D	T	G	E	T	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	N	V
CoIE1 [ <i>E. coli</i> ]	17	V	D	<b>Y</b>	<b>L</b>	L	G	56	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	K	93	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	G	-	-	-	-	-	-	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	N	M	
pJD1 [ <i>N. gonorrhoeae</i> ]	17	I	D	<b>Y</b>	<b>L</b>	L	G	56	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	S	93	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	G	-	-	-	-	-	-	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	N	I	
pVu1 [ <i>P. vulgaris</i> ]	1	M	D	<b>Y</b>	<b>L</b>	L	R	40	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	S	77	<b>T</b>	<b>W</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	N	-	-	-	-	-	-	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>Y</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	N	V	

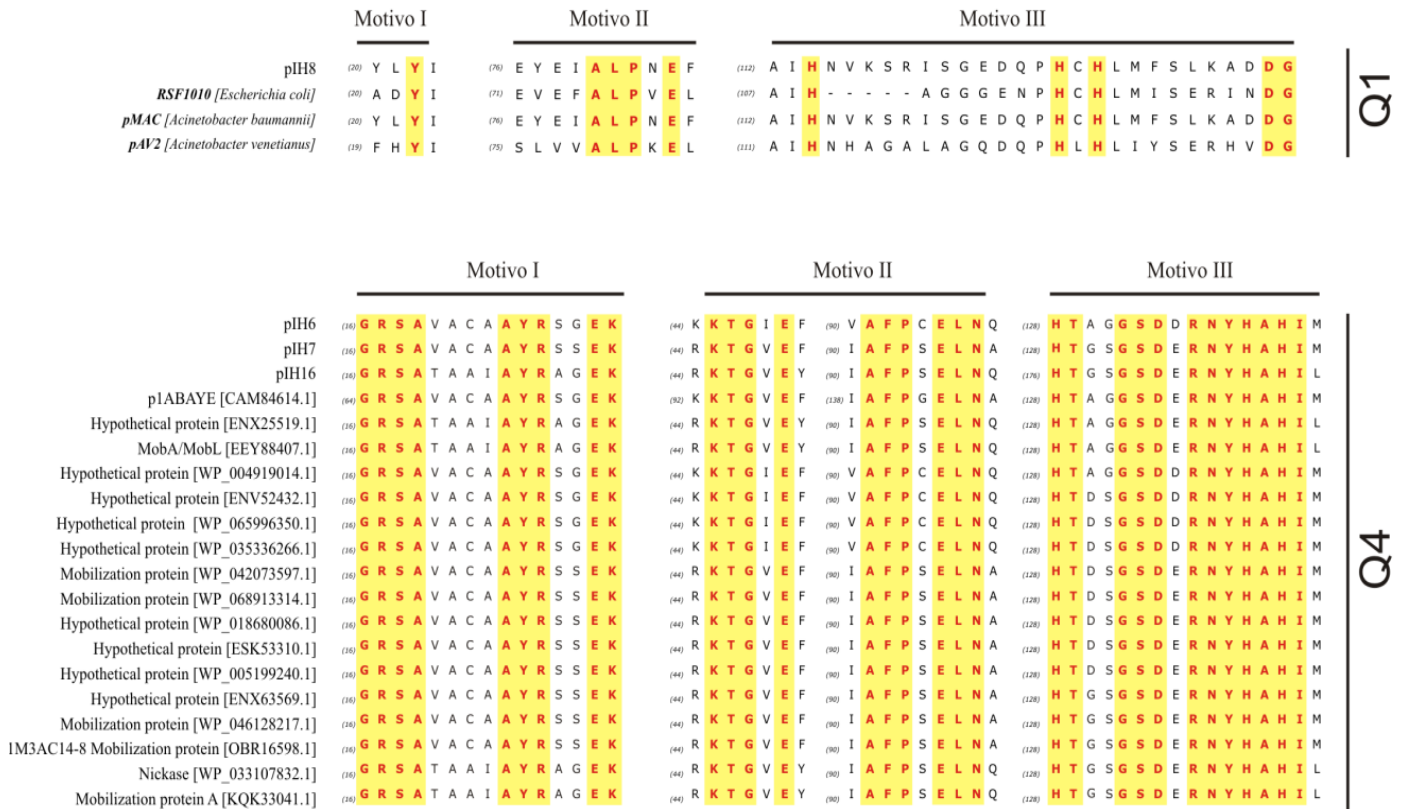
**Figura V.7 Relación filogenética de pIH13 con plásmidos de la familia MOB<sub>HEN</sub>.** **A)** Árbol filogenético de relaxasas de plásmidos de la subfamilia MOB<sub>HEN</sub>. La relaxasa de pIH13 (en rojo) mostró estar estrechamente relacionada con la correspondiente al plásmido pRAY, un replicón movilizable de *A. baumannii*. La similitud encontrada en este análisis reforzó los resultados obtenidos en el análisis de la secuencia nucleotídica del esqueleto plasmídico. **B)** Fragmentos del alineamiento del segmento N-ter de la relaxasa de pIH13 con plásmidos pertenecientes a la subfamilia MOB<sub>HEN</sub>. Se detallan los tres motivos conservados y los aminoácidos invariantes característicos de esta subfamilia en rojo sobre amarillo.

En el caso de pIH8, se ha identificado a la relaxasa como la única proteína del módulo de movilización y esto fue congruente con los dos plásmidos más cercanos obtenidos del análisis filogenético, pMAC (N°A AY541809) (Dorsey *et al.*, 2006) y pAV2 (N°A DQ278486) (Mengoni *et al.*, 2007) ambos replicones aislados de cepas de *Acinetobacter spp* (**Figura V.8**), pertenecientes a la subfamilia MOB<sub>Q1</sub>.



**Figura V.8** Árbol filogenético de relaxasas de la familia  $MOB_Q$ . En la figura se muestra el árbol filogenético derivado del alineamiento de las relaxasas de la gran familia  $MOB_Q$  y las relaxasas de la colección de plásmidos hospitalarios de este trabajo. Se destacan en colores los grupos Q1, Q2 y Q3 y en negro se muestran los plásmidos no incluidos en ningún subgrupo. El plásmido pIH8 aparece formando parte de la subfamilia  $MOB_{Q1}$ , estrechamente relacionado con los plásmidos pMAC y pAV2. Los plásmidos pIH6, pIH7 y pIH16 se encontraron formando un subclado definido junto al plásmido y p1ABAYE de *A. baumannii*.

Las relaxasas de los plásmidos pIH6, pIH7 y pIH16 resultaron ser muy similares y filogenéticamente cercanas al plásmido p1ABAYE (N°A CU459137) de *A. baumannii* AYE (Vallenet *et al.*, 2008). Estas 4 relaxasas se ubican en un subclado bien diferenciado y soportado por valores altos de *bootstrap*, por lo que podrían constituir un nuevo subgrupo. Por esta razón, las proteínas fueron analizadas para determinar la identidad de los motivos secuenciales únicos y diferenciales a los encontrados comúnmente en esta gran súper-familia. Para ello, las secuencias de los extremos N-ter de las relaxasas de este subclado fueron usadas para buscar homólogos en base de datos.



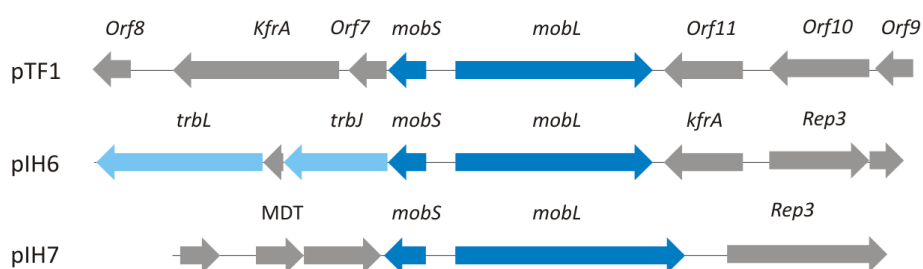
**Figura V.9 Motivos característicos de familias MOB<sub>Q</sub>.** Alineamiento del segmento N-ter de la relaxasas correspondientes a subfamilias MOB<sub>Q1</sub> y MOB<sub>Q4</sub>. Se detallan en color los aminoácidos conservados dentro de los tres motivos encontrados comúnmente en relaxasas de esta familia.

Aquellas secuencias que presentaron un alto porcentaje de similitud de secuencia (100-98 % identidad; 100-90 % cobertura) fueron elegidas y se realizó un alineamiento múltiple en busca de aminoácidos conservados representativos. El análisis secuencial comparativo y detallado del alineamiento de este subclado permitió reconocer la presencia de los tres motivos que constituyen el dominio funcional de las relaxasas. Éstos conservaron las características encontradas en todas las relaxasas de la gran familia MOB<sub>Q</sub>, pero además, fueron identificados aminoácidos invariantes que les confieren a las relaxasas de este subgrupo una característica diferencial conservada que lo distingue de los subgrupos ya descritos Q1, Q2 y Q3, confirmando la existencia de un nuevo subgrupo que fue denominado MOB<sub>Q4</sub>. Los aminoácidos invariantes encontrados que caracterizan a la subfamilia MOB<sub>Q4</sub> incluyen: residuos de Tyr y Arg dentro del Motivo I; residuos Glu, Arg, Phe y Pro dentro del Motivo II, y dentro del

Motivo III, las típicas 3 His con posible actividad catalítica conservada, entre otro atando residuos (**Fig. V.9**).

#### V.4.3 Análisis del módulo de Movilización de los plásmidos MOB<sub>Q4</sub> de la colección hospitalaria

Con el objetivo de caracterizar a los miembros de la colección hospitalaria pertenecientes a la nueva subfamilia MOB<sub>Q4</sub>, se analizaron bioinformáticamente los módulos de movilización de los plásmidos pIH6 y pIH7. Estos demostraron que guardan semejanza estructural con los encontrados en el plásmido pTF1 de *Thiobacillus ferrooxidans*, un plásmido clasificado como perteneciente a la familia de plásmidos movilizables IncQ e IncQ-like (Rawlings & Tietze, 2001) que presentó ciertas características diferenciales. La estructura genómica de los módulos de movilización de pTF1 está constituida sólo por dos genes de proteínas pertenecientes al Dtr: una relaxasa MobL y una proteína accesoria MobS, las cuales se encuentran flanqueando el *OriT*, orientadas en direcciones contrarias (**Figura V.10**) (Drolet *et al.*, 1990). Por otra parte, la proteína relaxasa, a diferencia de otras encontradas en plásmidos IncQ, sólo contiene un dominio funcional, hacia el extremo N-ter. Sin embargo, estudio funcionales han demostrado que su extremo C-ter es necesario para soportar la movilización por conjugación (M. Drolet, 1992).

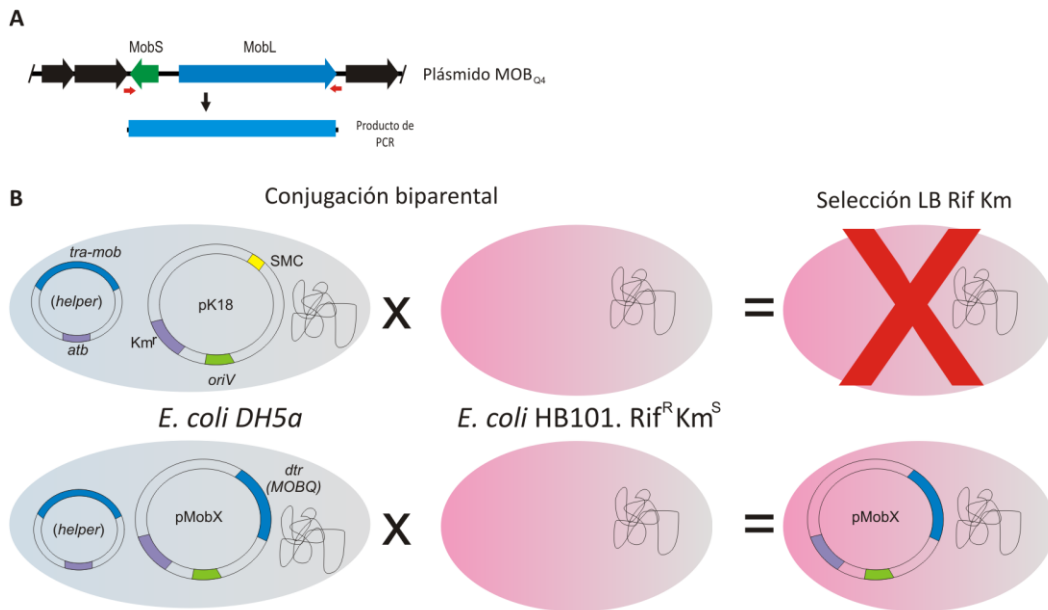


**Figura V.11 Comparación del esqueleto plasmídico entre pTF1 de *T. ferrooxidans*, pIH6 y pIH7 de la colección hospitalaria de *Acinetobacter spp.* Las semejanzas entre las proteínas del Dtr se marcan en color azul oscuro. En particular, pIH6 presentó dos ORFs adicionales que codifican para proteínas pertenecientes al sistema del Mpf, TrbL y TrbJ.**

Estudios previos realizados en pTF1 demostraron que tanto MobS como MobL son necesarias para la movilización por conjugación en presencia de distintos plásmidos conjugativos (M. Drolet, 1992). Para evaluar la funcionalidad de los módulos del Dtr de los plásmidos pIH6, pIH7, se amplificaron por PCR los segmentos conteniendo a las proteínas MobS y MobL flanqueando el posible *oriT* (**Figura V.11**).

Los amplicones fueron clonados en vectores no movilizables con origen de replicación en *E. coli*. Las construcciones fueron transformadas en *E. coli* y se realizaron los ensayos de movilización por conjugación utilizando los plásmidos conjugativos, R571 (IncP1 $\beta$ ) (Jobanputra & Datta, 1974), R388 (IncW) (Llosa *et al.*, 1991) y RN3 (IncN) (Gotz *et al.*, 1996) como plásmidos *helper* (**Tabla V.4**). Los resultados obtenidos indicaron, primer lugar, que las dos construcciones utilizadas en estos ensayos (pMob6, pMob7; Capítulo II, sección II.2) resultaron ser movilizables por al menos un plásmido *helper*, determinando que fehacientemente, los módulos del Dtr clonados son funcionales. En segunda lugar, las frecuencias de conjugación de una misma construcción al utilizarse distintos plásmidos *helper*, presentaron variaciones, infiriendo que la maquinaria en *trans* de los plásmidos conjugativos estaría reconociendo diferencialmente al relaxosoma conformado por los elementos MobS - MobL asociados al *oriT* del ADN de transferencia (ADN-t). Esto puede deberse a las diferencias entre las proteínas acopladoras (CP) de cada sistema del Mpf, y consiguientemente, a diferencias en la interacción relaxosoma-CP-proteínas del poro secretor. Interesantemente, al comparar las frecuencias de conjugación para distintas construcciones en presencia de un mismo plásmido *helper*, se encontraron diferencias contundentes de varios órdenes de magnitud (**Tabla V.4**).

En particular, cuando los módulos de pIH6 y pIH7 fueron enfrentados al mismo plásmido conjugativo R388, las diferencias fueron más drásticas, debido a que la maquinaria en *trans* de este último no logró movilizar al vector conteniendo el Dtr de pIH7. Cabe destacar que el estudio filogenético para la clasificación de plásmidos, mostró que las relaxasas correspondientes a pIH6 y pIH7 compartían una alta similitud de secuencia en su extremo N-ter y por ello se las encontró formando un nuevo subgrupo dentro de la familia MOB<sub>Q</sub>.



**Figura V.11** Ensayo funcional de Dtr de plásmidos MOB<sub>Q4</sub>. **A)** Detalle del fragmento amplificado por PCR que contiene todo el Dtr de los plásmidos pIH6 y pIH7. **B)** Los fragmentos fueron clonados en vectores no movilizables. Las construcciones (pMobX, X = 6 y 7) fueron transformadas en cepas que contenían plásmidos helper de distintos grupos de incompatibilidad. Las cepas resultantes fueron evaluadas en su capacidad de movilización del pMobX en un ensayo de conjugación donde la cepa *E. coli* HB101 libre de plásmidos fue utilizada como receptora. Se seleccionaron aquellas bacterias que recibieron una copia de los vectores por su resistencia a los antibióticos correspondientes.

Un alineamiento de las proteínas relaxasas completas de pIH6 y pIH7 (**Figura V.12**), reveló que los extremos C-ter presentan diferencias importantes en su secuencia. Esta desigualdad podría explicar el comportamiento diferencial en la frecuencia de movilización si se considera que la proteína acopladora se encuentra interactuando y reconociendo el segmento C-ter de las relaxasas para guiar el complejo hacia el poro secretor del Mpf. En este marco, la proteína acopladora del Mpf del plásmido R388 no sería capaz de reconocer y/o unirse al extremo C-ter de la relaxasa del plásmido pIH7 y consecuentemente al relaxosoma completo, explicando así, la ausencia de movilización del vector.

**Tabla V.4** Frecuencias de conjugación\*

	Plásmido Helper		
	R751 (IncPβ)	RN3 (IncN)	R388 (IncW)
pMob6	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
pMob7	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-1</sup>	ND

\*Los valores corresponden a los órdenes magnitud de las frecuencias calculadas como el cociente entre las UFC/ml de transconjugantes y las UFC/ml de las bacterias receptoras





**Figura V.12. Alineamiento de las relaxasas de pIH6 y pIH7.** La figura muestra el alineamiento realizado para las proteínas relaxasas completas de los plásmidos pIH6 y pIH7. En color se detallan los aminoácidos idénticos. El recuadro encierra el segmento N-ter conservado para estas proteínas que constituyen los primeros 240 residuos. Las diferencias sobre el segmento C-ter de ambas proteínas podrían explicar el comportamiento diferencial encontrado en las frecuencias de conjugación utilizando un mismo plásmido helper.

En este capítulo se han estudiado los módulos de conjugación, replicación y mantenimiento plasmídico que surgieron de la asignación de funciones *in silico* de los plásmidos secuenciados de la colección hospitalaria de *Acinetobacter* spp.

Con respecto a los módulos de replicación, un análisis que incluyó a todas las Reps de plásmidos de *Acinetobacter* spp. en base de datos determinó que las proteínas con dominio Rep<sub>3</sub> son las más frecuentemente encontradas en plásmidos de bacterias de este género y esto fue congruente con lo hallado en esta colección plasmídica. Para determinar la cercanía entre estas proteínas se llevó a cabo un estudio filogenético de las proteínas completas utilizando el mejor modelo de evolución encontrado para estas secuencias. El árbol resultante graficó la relación filogenética entre estas proteínas y determinó que existen 13 grupos bien diferenciados y soportados. Las secuencias de proteínas Rep<sub>3</sub> fueron utilizadas para buscar homólogos en base de datos y los resultados indicaron que proteínas muy emparentadas se encontraron no sólo en bacterias del género *Acinetobacter*, sino

también en otros géneros distantes. Esta información permite predecir el rango de huésped en donde estas proteínas podrían potencialmente ser funcionales y consecuentemente permitir la replicación y permanencia de los plásmidos.

A partir de la búsqueda de proteínas involucradas en mantenimiento plasmídico se pudieron identificar proteínas involucradas en al menos dos mecanismos bien conocidos: partición activa y muerte post-segregacional. Estas proteínas encontraron sus homólogos más cercanos tanto en enterobacterias como en distintas especies del género *Acinetobacter*.

El análisis bioinformático de los plásmidos también permitió reconocer proteínas pertenecientes a los sistemas del Dtr y Mpf involucrados en el proceso de conjugación. Sólo en uno de los plásmidos, el pIH2, pudieron encontrarse todos los elementos del Mpf completo acompañando al Dtr, por lo cual constituyó el único plásmido potencialmente conjugativo de la colección. Las proteínas restantes involucradas en conjugación se encontraron formando parte de sistemas de Dtr de 5 plásmidos distintos, pIH6, pIH7, pIH8, pIH13 y pIH16, todos ellos potencialmente movilizables en presencia de plásmidos conjugativos.

El análisis filogenético de las relaxasas permitió clasificar a todos los plásmidos dentro de distintas familias, descritas en trabajos anteriores (Francia *et al.*, 2004, Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Así, el plásmido pIH2 mostró pertenecer a la gran familia MOB<sub>F</sub>, en particular a la subfamilia MOB<sub>F11</sub>, acompañado de plásmidos IncN, reforzando el análisis realizado previamente en el Capítulo IV. El plásmido pIH13 demostró pertenecer a la familia MOB<sub>HEN</sub>, estrechamente relacionado nuevamente al plásmido pRAY, como había sido demostrado en el análisis nucleotídico de su esqueleto en el capítulo IV. Los relaxasas de los plásmidos pIH6, pIH7, pIH8 y pIH16 permitieron clasificar a sus plásmidos portadores dentro de la familia MOB<sub>Q</sub>, cuyos miembros son tanto plásmidos conjugativos como movilizables. Los plásmidos pIH6, pIH7 y pIH16 se encontraron formando un subclado robusto y bien definido. El análisis de las secuencias de las relaxasas de este subclado permitió identificar características específicas-únicas de estas proteínas dentro de los 3 motivos que forman parte del dominio funcional N-ter. Debido a esto, este nuevo subclado fue nombrado como el nuevo subgrupo MOB<sub>Q4</sub>.

El análisis experimental de los Dtr de los plásmidos de esta colección pertenecientes al subgrupo MOB<sub>Q4</sub>, reveló que todos fueron funcionales. Sin embargo, presentaron diferencias en las frecuencias de conjugación cuando un mismo Dtr se enfrentó a distintos plásmidos conjugativos, como así también, cuando distintos Dtr se enfrentaron a un mismo plásmido con funciones *helper*. Este comportamiento diferencial indicó que, en primer lugar, los sistemas del Mpf de los plásmidos conjugativos reconocen diferencialmente a un mismo relaxosoma. Por otra parte, la diferencia en la frecuencia de movilización de plásmidos con distintos Dtr enfrentados a un mismo plásmido *helper* demuestra que existen diferencias en el reconocimiento de un mismo Mpf por los relaxosomas. El alineamiento de las proteínas relaxasas completas demostró que las proteínas difirieron en su extremo C-ter y que esta podría haber sido la razón de las diferencias encontradas, si este segmento tuviese relevancia en el reconocimiento y/o transporte llevado a cabo por el Mpf.

El análisis filogenético de las proteínas relaxasas en general fue congruente con lo hallado en el análisis nucleotídico de los esqueletos plásmídicos de estos replicones, sin embargo, el análisis funcional para miembros de un mismo grupo demostró que el método para la clasificación de plásmidos no es suficiente para explicar el comportamiento de estos últimos en la transferencia por conjugación en presencia de distintos plásmidos conjugativos.

Un análisis funcional más exhaustivo deberá llevarse a cabo de manera de dilucidar el comportamiento diferencial hallado en este grupo nuevo de plásmidos MOB<sub>Q4</sub>.



## CAPÍTULO VI

**Obtención y secuenciación de una  
colección ambiental de plásmidos de  
*Acinetobacter* spp.**

## VI.1 Introducción

Actualmente se aceptan 42 especies diferentes dentro del género *Acinetobacter* según la lista de nombres procarióticos con nomenclatura establecida (LPSN) (*List of Procariotic names with Standing in Nomenclature*). En la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se encuentran disponibles 2246 genomas de *Acinetobacter* spp., en su gran mayoría incompletos, sin embargo, existen sólo 212 plásmidos completos. Del total de la información depositada en base de datos, el 79,7% corresponde a secuencias de *Acinetobacter baumannii*, seguido lejanamente por especies no identificadas con un 7,3% y por secuencias de *Acinetobacter pittii* con un escaso 4,5%. Del total de los genomas plasmídicos, el 70,7% corresponden a plásmidos de *A. baumannii*, seguidos por especies sin identificar con un 9,9%, *A. pittii* con un 4,2% y *A. Johnsonii* con un 3,8%. Es importante destacar el hecho de que la gran mayoría de las secuencias provienen de bacterias de origen intrahospitalario. Las pocas excepciones, consisten en general, en secuencias correspondientes a bacterias medioambientales de interés biotecnológico.

Debido a la relevancia clínica que cobraron las bacterias de este género en los últimos años, existe una tendencia muy marcada al estudio de genomas de *Acinetobacter* spp. enfocado principalmente a la búsqueda de nuevas variantes de genes de resistencia a antibióticos y al estudio epidemiológico de cepas clonales responsables de brotes intrahospitalarios (Adams *et al.*, 2010, Yoon *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016). Por otra parte, los pocos estudios realizados sobre cepas ambientales se centran en escasas cepas en particular aisladas por poseer actividades de interés biotecnológico como la degradación de compuestos xenobióticos o por poseer resistencia a diferentes metales pesados (Mishra *et al.*, 2016, Regar *et al.*, 2016, Sharma & Lin, 2016, Tian *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2016). Por esta razón, en esta segunda parte del trabajo de Tesis, se propuso estudiar plásmidos de *Acinetobacter* spp aislados de suelos y aguas de ambientes no prístinos y en ausencia de presión de selección de agentes antimicrobianos, con el fin de contribuir a aumentar la información plasmídica en general y poder hacer inferencia acerca de la transmisión de la información entre especies de este género provenientes de nichos ambientales completamente diferentes.

## VI.2 Características fisiológicas del género *Acinetobacter*

Según el manual de bacteriología sistemática de Bergey (Murray *et al.*, 1984), las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* consisten en bacilos de 0,9–1,6 × 1,5–2,5 µm que adoptan una morfología cocoide conforme se encuentren ingresando a fase estacionara. De acuerdo a su pared celular, corresponden a bacterias Gram negativas, aunque en la práctica son bacterias que resisten a la decoloración en la tinción de Gram, por lo tanto, el fenotipo muchas veces es considerado Gram “variable”. En fase sólida, las bacterias forman colonias no pigmentadas y mucosas en presencia de cápsula. Las bacterias pertenecientes a este género, son incapaces de moverse en medio líquido (desplazamiento natatorio o *swimming*) y debido a ello fueron nombradas como tales (del griego, *Akineto* no-móvil), sin embargo, estudios posteriores han demostrado que pueden trasladarse por translocación en superficies (movimiento pulsante o *Twitching*). Estas bacterias son aerobias estrictas, no fermentadoras y mesófilas, presentando un rango óptimo de temperatura de crecimiento entre 33 - 35°C. En condiciones de laboratorio estas cepas resultan oxidasa negativas y catalasa positivas y pueden crecer fácilmente en medios ricos nutritivos tanto en soporte sólido como líquido bajo buena agitación. No obstante, las bacterias de este género tienen la capacidad de crecer en medio definidos minerales en presencia de una única fuente de carbono y energía tales como acetato, lactato, succinato y etanol, entre otras (Baumann, 1968). Además, estos microorganismos son capaces de crecer en un amplio rango de valores de pH (5,5- 8) y resistentes a la desecación. Estas características fisiológicas le proporcionan a las bacterias de este género la posibilidad de habitar distintos nichos ecológicos bajo condiciones sumamente diferentes. Por este motivo, es posible encontrar naturalmente a *Acinetobacter* spp. en suelo, agua, barros, animales, vegetales, humanos y superficies abióticas (Murray *et al.*, 1984).

## VI.3 Obtención de la colección ambiental de bacterias del género *Acinetobacter* portadoras de plásmidos

Debido a su amplia versatilidad metabólica y a la capacidad de adquirir información exógena, es posible encontrar a bacterias del género *Acinetobacter* en múltiples y diversos ambientes naturales. Existen numerosos estudios que indican que

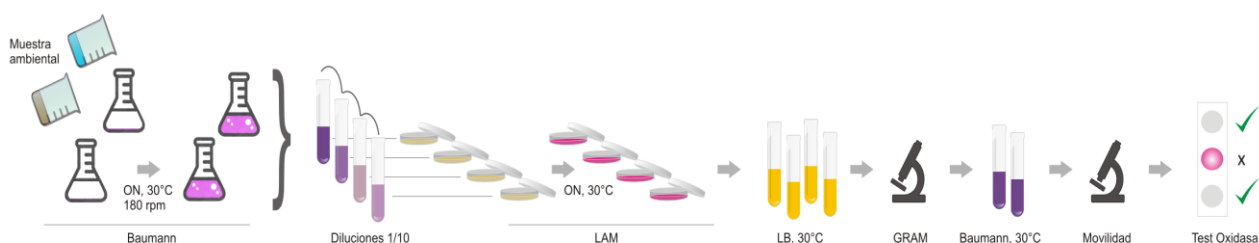
es posible encontrar y aislar distintas especies desde suelo, aguas, barros y animales entre otros (Campos-Guillén *et al.*, 2014, Chang *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015, Radolfova-Krizova *et al.*, 2016). Por esta razón, se eligieron 4 zonas distintas de la ciudad de La Plata elegidas por su proximidad a actividades humanas, pero alejados de fuentes de contaminación de desechos hospitalarios y/o industriales.

Las muestras recolectadas de agua y tierra fueron enriquecidas en medio líquido Baumann (Baumann, 1968) utilizando acetato de sodio como única fuente de carbono y energía, suplementado con cicloheximida para eliminar la presencia de levaduras. En este medio, bajo condiciones de agitación intensa, el cultivo se enriquece en bacterias que son capaces de duplicarse en medios minerales con requerimientos mínimos, como lo son las pertenecientes al género *Acinetobacter*. La incubación de una noche (ON del Inglés *Over Night*) a 30°C permitió el crecimiento de la totalidad de los cultivos ensayados. En este punto, se tomaron pequeñas alícuotas de cada cultivo y distintas diluciones fueron sembradas en placas conteniendo medio sólido diferencial para *Acinetobacter* (LAM) e incubadas ON a 30°C. El medio LAM, fue desarrollado por Jawad *et al.*, 1994 para el crecimiento selectivo y diferencial de *Acinetobacter* spp. de origen clínico. Este medio, originalmente se suplementa con los antibióticos vancomicina, cefsulodina y cefradina, sin embargo, debido a que las muestras ensayadas no tuvieron origen clínico, se decidió no suplementar el medio con estos antibióticos. La presencia de azúcares fermentables tales como fructosa o sacarosa en presencia del indicador de pH Rojo Neutro, permite la diferenciación de las colonias basados en los productos liberados durante la utilización de las fuentes de carbono y energía. En este medio, *Acinetobacter* spp. crece formando colonias rosadas, mucosas, circulares, lisas, convexas y opacas de entre 1 a 2 mm de diámetro luego de 24 horas de incubación. Aquellas colonias que evidenciaron dicho fenotipo, fueron repicadas en medio LB para posterior análisis y selección. Del total de las muestras ensayadas fueron seleccionadas 346 colonias con morfología característica de *Acinetobacter* spp. en estas condiciones.

Debido a que el método de enriquecimiento elegido permite también el crecimiento de otras bacterias con pocos requerimientos de crecimiento como lo son varias especies del género *Pseudomonas* y al hecho de que bacterias como

*Burkholderia cepacea* crecen formando colonias muy similares a *Acinetobacter* en medio LAM (Jawad *et al.*, 1994), se realizaron más pruebas sobre los aislamientos obtenidos con el fin de eliminar a la flora acompañante no deseada.

Cada una de las colonias seleccionadas fue cultivada ON en medio LB líquido para luego ser sometidas a tinción de Gram y observación de coloración, morfología y agrupación al microscopio óptico. Aquellas bacterias cocobacilares, Gram negativas, agrupadas en ocasiones formando duplas, fueron nuevamente seleccionadas. Se realizaron nuevamente cultivos líquidos ON en medio mineral Baumann y alícuotas de los cultivos en fase exponencial y exponencial tardía se observaron en fresco al microscopio óptico para determinación de movilidad natatoria. Los cultivos de bacterias móviles fueron descartados (**Figura VI.1**). En este punto, del total de 346 candidatos, 146 fueron descartados debido a su morfología, agrupación y/o movilidad. Los cultivos candidatos, fueron utilizados para determinar su comportamiento ante la prueba de oxidasa. Del total de los 200 aislamientos candidatos, sólo 21 desarrollaron color durante el *test* (Oxidasa positivos) y fueron descartados. Al finalizar esta etapa, fueron seleccionados 179 aislamientos, posibles candidatos de *Acinetobacter* spp. ambientales.



**Figura VI.1 Protocolo de aislamiento de *Acinetobacter* spp. desde muestras ambientales.** En la figura se detallan paso a paso la estrategia seguida para el aislamiento de las bacterias de la colección ambiental de *Acinetobacter* spp.

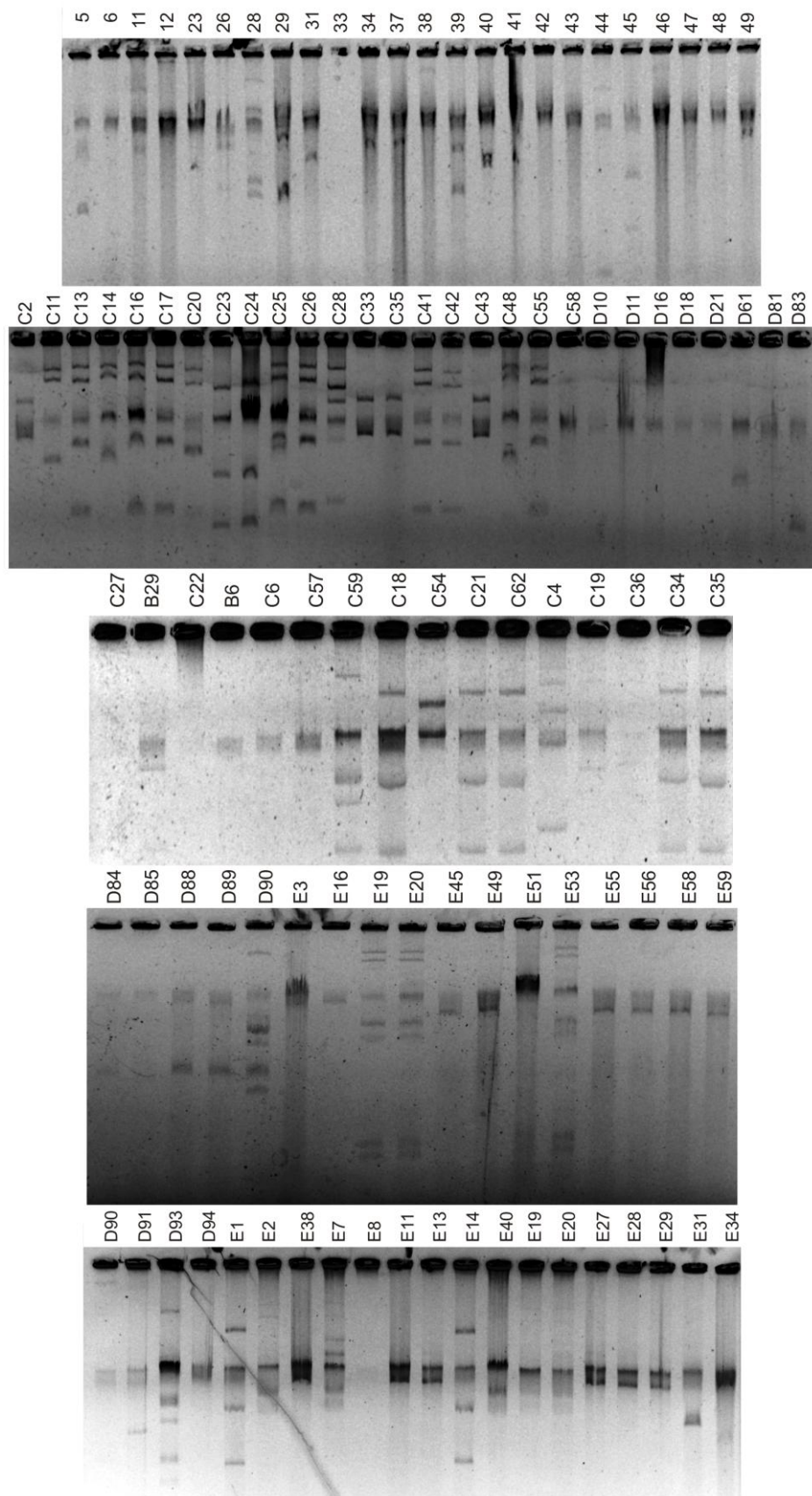
El siguiente paso consistió en la determinación de la presencia de plásmidos en los aislamientos seleccionados. Para ello, cada uno fue sometido a lisis *in situ* en geles de agarosa. Debido al origen ambiental de las bacterias, fue necesario incluir etapas de lavado previas a la siembra de los geles, como así también realizar modificaciones para llevar a cabo la lisis (Capítulo II, sección II.7.3.2). Posterior a la puesta a punto de la técnica, fue posible identificar a aquellos aislamientos portadores de plásmidos



evidenciados por la presencia de una o más bandas en los geles en diferentes perfiles (**Figura VI.2**). El análisis permitió inferir la existencia de al menos un replicón extracromosomal en el 85% de los aislamientos ensayados. El 15% de las bacterias que no presentaron plásmidos por este método, fue descartado. Aquellos aislamientos que mostraron tener igual perfil plasmídico en geles, fueron agrupados y representantes de cada uno de los grupos se seleccionaron para corroborar su identidad por espectrometría de masa MALDI-TOF mediante comparación de perfiles proteicos con base de datos (MALDI Biotyper Systems) (Capítulo II, sección II.10). Los resultados de este último análisis revelaron que alrededor del 95% de los aislamientos portadores de plásmidos seleccionados correspondieron a alguna especie del género *Acinetobacter*, dentro de las cuales encontramos representantes de *A. johnsonii*, *A. radioresistens*, *A. calcoaceticus*, *A. townneri* y *A. junni* entre otros, determinando que el protocolo seguido para el enriquecimiento, aislamiento, selección y caracterización de *Acinetobacter* elegido en este trabajo fue exitoso. De la totalidad de los aislamientos portadores de plásmidos identificados como pertenecientes a alguna especie del género *Acinetobacter*, se seleccionaron 58 para continuar trabajando.

#### **VI.4 Extracción y purificación de plásmidos de la colección ambiental de *Acinetobacter* spp.**

Una vez obtenidos los aislamientos portadores de plásmidos correctamente identificados como pertenecientes al género *Acinetobacter*, el siguiente paso consistió en la extracción y purificación de los replicones para su posterior secuenciación. En esta oportunidad no fue posible utilizar el método de Kieser (1984) como fue hecho para la colección hospitalaria (Capítulo III, sección III.4). Los aislamientos ambientales se mostraron resistentes a dicho método de lisis y en consecuencia, los rendimientos obtenidos no fueron satisfactorios. Por este motivo, se realizó un método de extracción de ADN enriquecido en ADN plasmídico en gran escala a partir de lisis enzimática en condiciones alcalinas. El método elegido fue el de la desnaturalización alcalina descrito por Jouanin *et al*, 1981 (Capítulo II, sección II.7.2.2).



**Figura VI.2** Perfiles plasmídicos de los aislamientos de la colección ambiental de *Acinetobacter spp.* La figura muestra los perfiles de plásmidos por medio de la técnica de geles de lisis in situ de una fracción de los aislamientos bacterianos de la colección ambiental de *Acinetobacter spp.*

El ADN obtenido de los distintos aislamientos fue concentrado y mezclado formando 4 muestras compuestas que fueron seguidamente sometidas a purificación por ultracentrifugación en un gradiente isopícnico de CsCl-bromuro de etidio (J Sambrook). Las bandas correspondientes al ADN circular covalentemente cerrado fueron extraídas del tubo de ultracentrifugación, colectadas en una única muestra y luego acondicionadas para la posterior secuenciación.

### **VI.5 Secuenciación masiva de la muestra compuesta de ADN plasmídico de la colección ambiental de *Acinetobacter* spp.**

La muestra enriquecida en ADN plasmídico se secuenció utilizando nuevamente la plataforma Illumina MiSeq en el CeBiTec, Universidad de Bielefeld, Alemania. En este caso, la secuenciación generó un total de 1.340.077 lecturas que correspondieron a un total de 384.534.478 bases secuenciadas. De todas las bases secuenciadas, 2.066.367 fueron alineadas en *contigs*, alcanzando de esta forma una cobertura de 186. Las lecturas fueron ensambladas en *contigs* y *scaffolds* utilizando nuevamente el programa GS de novo Assembler software (gs Assembler, version 2.8, Roche). En esta oportunidad, se obtuvieron 158 *scaffolds* de un tamaño promedio de 12 Kb, y un tamaño máximo de 205 Kb. El total de *contigs* fue de 846 con una longitud promedio de 3 Kb, y tamaño máximo de 40 Kb.

En esta nueva secuenciación, no fue posible obtener *in silico* ningún plásmido ambiental en forma circular cerrado. Por esta razón, el análisis se enfocó en aquellos contigs que presentaron al menos un ORF homólogo a proteínas asociadas a funciones de la biología de plásmidos. Del total de los 846 *contigs*, fueron seleccionados 77 para su posterior análisis.

---

Debido a la extraordinaria capacidad que tienen las bacterias del género *Acinetobacter* a sobrevivir aun en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, desecación, y bajo presiones continuas de selección, es que se la puede aislar desde nichos ecológicos muy diferentes pudiendo considerar a las bacterias de este género como ubicuas. Sin embargo, debido al creciente interés derivado de brotes hospitalarios a causa de la multi/pan resistencia adquirida por *Acinetobacter* spp., la

gran mayoría de los estudios se ven enfocados sobre aislamientos hospitalarios, disponiendo de poca información acerca de los genomas, en general y plásmidos, en particular de *Acinetobacter* spp. de origen ambiental. Dada la importancia de la transferencia horizontal en la evolución bacteriana y en la capacidad de adquirir información de *Acinetobacter* spp., resulta de interés estudiar a los vectores asociados a este género para determinar si existe o no un reservorio natural de la información que puede diseminarse naturalmente o por la actividad humana. Por este motivo, en este capítulo se dio énfasis en las características fisiológicas de bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter*, con el fin de determinar un protocolo eficiente de aislamiento, e identificación de bacterias de este género a partir de muestras medioambientales para luego extraer y secuenciar la información asociada a sus plásmidos.

El protocolo utilizado incluyó técnicas de microbiología clásica de enriquecimiento y diferenciación de colonias que luego fueron sometidas a distintas pruebas de manera de poder seleccionar fenotípicamente a los aislamientos bacterianos. Las bacterias candidatas, portadoras de plásmidos fueron finalmente analizadas por espectrometría de masa MALDI-TOF para corroborar su identificación a nivel de género. Los resultados demostraron que el protocolo seguido fue verdaderamente eficiente para la búsqueda de bacterias *Acinetobacter* spp., teniendo en cuenta que posterior a todos los pasos de selección, sólo un pequeño porcentaje de los aislamientos resultaron pertenecer a otros géneros bacterianos.

La datos obtenidos luego de la secuenciación de la nueva muestra plasmídica fueron indicativos de una buena cobertura, aunque no fue posible completar ningún replicón. En el capítulo siguiente se presenta el análisis de los marcos abiertos de lectura identificados asociados a funciones plasmídicas encontradas *in silico* en los *contigs* seleccionados.



## CAPÍTULO VII

**Descripción bioinformática de los  
módulos plasmídicos de la colección  
ambiental de plásmidos de  
*Acinetobacter* spp.**

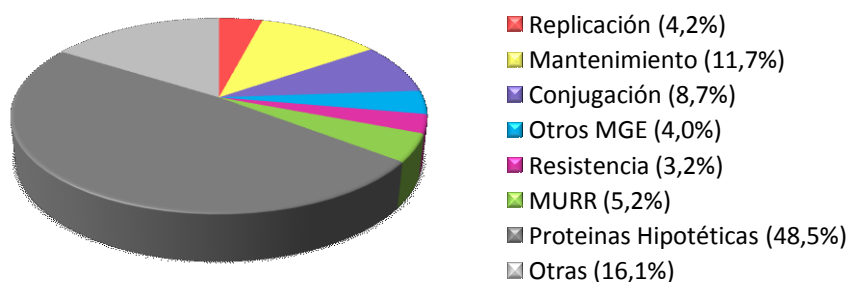
## VII.1 Introducción

Las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* son encontradas en una amplia variedad de nichos ecológicos, muy posiblemente debido a la gran versatilidad metabólica que presentan. De esta forma, muchas especies de este género han sido aisladas de suelos, barros, aguas, animales, y ambientes hospitalarios entre otros. Los estudios realizados sobre aislamientos ambientales (considerando ambiental todo nicho distinto al hospitalario) (Campos-Guillén *et al.*, 2014, Chang *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015, Radolfova-Krizova *et al.*, 2016), se centran sobre las propiedades degradativas de estas bacterias debido a la importancia biotecnológica asociada a la utilización de estos aislamientos con fines de biorremediación (Iyer & Damania, 2016, Regar *et al.*, 2016, Sharma & Lin, 2016, Zhang *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2017). Consecuentemente, los estudios realizados sobre plásmidos de *Acinetobacter* spp. ambientales se basan en la búsqueda de genes del metabolismo de compuestos xenobióticos, aunque también es posible encontrar estudios sobre aparición de resistencia a antimicrobianos en aislamientos de barros activados o efluentes tanto de actividades industriales como domésticas. Debido a que la información disponible acerca de la biología de plásmidos de *Acinetobacter* spp. ambientales es escasa, en esta parte del trabajo de Tesis se propuso abordar el estudio de los módulos plasmídicos hallados en aislamientos de *Acinetobacter* spp. de origen ambiental con el fin de aumentar el conocimiento de estos vectores ambientales y dilucidar si existe o no relación con la biología de plásmidos hospitalarios pertenecientes al mismo género.

## VII. 2 Análisis general de los *contigs* plasmídicos de la colección ambiental de *Acinetobacter* spp.

Como se indicó en el capítulo anterior, la secuenciación masiva de la muestra compuesta de plásmidos ambientales permitió obtener 846 *contigs*. Debido a la presencia de contaminación cromosomal en la muestra, sumado al hecho de que no se pudo obtener *in silico* ningún replicón cerrado, se seleccionaron para continuar trabajando sólo aquellos *contigs* en cuyas secuencias se encontrara al menos un ORF con homología a proteínas exclusivamente plasmídicas. De esta forma, fueron seleccionados 77 *contigs* cuyas características generales se resumen en la **Tabla A.3 (ANEXO)**. Dentro de los *contigs* plasmídicos, fueron posible reconocer 596 ORFs que

incluyeron, como era esperable, proteínas de replicación (Reps), proteínas de conjugación y proteínas de mantenimiento plasmídico (partición activa y toxina-antitoxina, TA). Además, fueron reconocidos otros elementos genéticos móviles (MGE, del inglés *Mobile Genetic Elements*) como transposasas y Secuencias de Inserción (IS); proteínas involucradas en resistencia a antimicrobianos, metales pesados; proteínas relacionadas al metabolismo general de bacterias y de proteínas hipotéticas. La distribución de estas funciones se muestra en la **Figura VII.1**. Posteriormente a la selección de los *contigs*, se analizaron los módulos de replicación, conjugación y mantenimiento del mismo modo utilizado para la colección plasmídica hospitalaria.



**Figura VII.1 Distribución de funciones en la colección ambiental de plásmidos de *Acinetobacter* spp.** MGE, elemento genético móvil; MURR, modificación unión restricción y recombinación del ADN.

### VII. 3 Análisis de las proteínas de inicio de replicación (Reps) de la colección ambiental de plásmidos

La búsqueda en base de datos de proteínas haciendo uso del algoritmo BlastP permitió reconocer 25 Reps en 25 *contigs* distintos. En su totalidad, las proteínas tuvieron sus homólogos en distintas especies del género *Acinetobacter* (**Tabla VII.2**). Nuevamente en este análisis, el dominio más representado en este conjunto de datos fue la Familia Rep\_3 (PF0151), con 21 representantes guardando consistencia con lo hallado en el Capítulo V tanto en la colección hospitalaria como en la base de datos. De las proteínas restantes, tres de ellas mostraron poseer los dominios Replicase (PF09090) y PriC-T1 (PF08708) y sólo en una de ellas (Rep del *contig* C290), no fue posible detectar ningún dominio conservado funcional, debido al hecho de que se encontró troncada con respecto a su homólogo más cercano.

**Tabla VII.1 Proteínas de inicio de replicación de la colección ambiental de plásmidos de *Acinetobacter* spp.**

CONTIG	NOMBRE	GÉNERO/ESPECIE	N° ACCESO	CODIGO PFAM	NOMBRE PFAM	% IDENTIDAD
C002	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_067869884.1	PF01051	Rep_3	96
C069	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_064095420.1	PF01051	Rep_3	95
C072	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EKA68794.1	PF01051	Rep_3	100
C095	Replicasa plasmídica *	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_010591570.1	PF09090 PF08708 PF13384	Replicase PriCT-1 HTH	86
C096	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_057692638.1	PF01051	Rep_3	72
C102	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_004967300.1	PF01051	Rep_3	70
C109	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter harbinensis</i>	WP_039624411.1	PF01051	Rep_3	91
C122	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_064095420.1	PF01051	Rep_3	96
C148	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_064095420.1	PF01051	Rep_3	93
C158	Proteína involucrada en iniciación de replicación plasmídica	<i>Acinetobacter kyonggiensis</i>	SDY87313.1	PF01051	Rep_3	99
C171	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	WP_004641847.1	PF01051	Rep_3	72
C179	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter parvus</i>	WP_004676211.1	PF01051	Rep_3	91
C190	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_005166868.1	PF01051	Rep_3	83
C211	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_004734502.1	PF01051	Rep_3	97
C230	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_005244554.1	PF01051	Rep_3	100
C241	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_067724374.1	PF01051	Rep_3	100
C250	Replicasa plasmídica	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_068538202.1	PF03090 PF13384	Replicase PriCT-1	68
C272	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_035270863.1	PF01051	Rep_3	99
C289	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	WP_005022088.1	PF01051	Rep_3	98
C290	Proteína de inicio de replicación RepB*	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_004845629.1	-	-	100
C294	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_065996348.1	PF01051	Rep_3	100
C334	Replicasa plasmídica	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_034597285.1	PF09090 PF08708 PF13384	Replicase PriCT-1 HTH	74
C342	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_004845629.1	PF01051	Rep_3	76
C426	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	WP_005022088.1	PF01051	Rep_3	99
C525	Proteína de inicio de replicación RepB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_067724374.1	PF01051	Rep_3	100



Para avanzar en la clasificación de las Reps más representadas en plásmidos de este género, todas las Rep\_3 de la colección ambiental fueron utilizadas para determinar su relación filogenética con las correspondientes en la colección hospitalaria y base de datos. El análisis nuevamente implicó el alineamiento de todas las secuencias aminoacídicas y la construcción de un árbol filogenético del mismo modo que en el Capítulo V: elaboración del alineamiento múltiple (Muscle), determinación del mejor modelo de evolución LG+F (Prottest), construcción del árbol filogenético por Máxima Verosimilitud (PhyML). El árbol resultante, en general, mantuvo la topología original soportada con valores de *bootstrap* mayores al 60%, sin embargo, la presencia de nuevas secuencias generaron nuevos grupos (AR3G14 -16) como así también la inclusión en grupos de secuencias que originalmente no formaban parte de ninguno, como se detalla a continuación:

- AR3G14: conformado por dos Reps encontradas en los plásmidos pA1-1 y pAB3 de base de datos, este grupo queda definido al bajar el valor de *cut-off* desde un valor del 70% en el análisis del Capítulo V, sección V.2.1, a un valor del 60%. Como puede verse en la **Figura VII.2**, este nuevo grupo queda muy bien soportado con un valor de 97% de *bootstrap*.
- AR3G15: conformado por tres Reps obtenidas de la colección ambiental de este trabajo (C096, C289, C426) y una Rep perteneciente al plásmido pXBB1-9 de base de datos.
- AR3G16: conformado por una Rep del *contig* C190 de la colección ambiental y la Rep del plásmido pAB1 de base de datos.
- A diferencia del análisis anterior, en este nuevo árbol, debido a los nuevos valores obtenidos de *bootstrap* las Reps de los plásmidos pAV3(a) y pD36-4(b) que no se encontraban formando parte de ningún grupo, pudieron ser clasificadas dentro del grupo AR3G9. Del mismo modo, la Rep del plásmido de la colección hospitalaria pIH6, se encontró formando parte del grupo AR3G5.

Sólo con la excepción de la Rep del *contig* C102, todas las Rep\_3 de la colección ambiental pudieron ser incluidas en los grupos definidos en este análisis filogenético. Es importante destacar que todos los grupos definidos en este análisis contienen Reps de plásmidos tanto de origen ambiental como hospitalario. Este hecho refuerza la

hipótesis de que no existiría una barrera al intercambio de la información genética mediada por plásmidos entre bacterias que habitan distintos nichos debido a que las proteínas que soportan su replicación autónoma se encuentran estrechamente relacionadas filogenéticamente y son, en consecuencia, potencialmente funcionales en las bacterias hospedadoras.



**Figura VII.2** *Árbol filogenético de Rep\_3 de Acinetobacter spp.* En la figura se muestran los grupos definidos en distintos colores. Con flechas se indica la posición de las Rep\_3 de la colección ambiental de plásmidos de Acinetobacter spp. Las líneas más gruesas en los grupos AR3G5 y AR3G9 indican la incorporación de nuevos miembros.

## VII.4 Análisis de las proteínas de movilización de la colección ambiental de plásmidos

El análisis bioinformático realizado sobre los *contigs* plasmídicos de la colección ambiental permitió reconocer proteínas relacionadas a la movilización de material genético en 36 *contigs* distintos. En total, fueron reconocidos 76 ORFs con homología a proteínas involucradas en la mencionada función. La mayoría (87%) de los homólogos pertenecieron a especies del género *Acinetobacter* y en segundo lugar (9%) a especies del género estrechamente relacionado *Moraxella*.

Las proteínas de movilización encontradas en los *contigs* plasmídicos incluyeron proteínas de conjugación y otros MGEs (**Tabla VII.2**). Estos últimos correspondieron a 24 ORFs con homología a 24 transposasas, de las cuales, a 12 de ellas se las encontró formando parte (entera o parcialmente) de las ISs denominadas *ISAb*18, *ISAb*19, *ISAb*22, *ISAb*27, *ISAb*31, *IS1006*, *ISAc*1 e *IS18* todas ellas encontradas en distintas especies del género *Acinetobacter*. Los 52 ORFs restantes, estuvieron distribuidos en 25 *contigs* y fueron homólogos a proteínas de conjugación plasmídica, incluyendo proteínas pertenecientes tanto al Dtr como al Mpf. Dentro del conjunto de estas proteínas, se encontraron 14 ORFs con homología a relaxasas de *Acinetobacter* spp. contenidas en 13 *contigs*. Excluyendo a los dos ORFs correspondientes al *contig* C122 por tratarse de proteínas truncadas, se utilizó, para todas las proteínas, la secuencia de los 300 aminoácidos del extremo N-ter para clasificar a los plásmidos como se realizó en el Capítulo V (sección V.4.2).

El análisis filogenético permitió de esta forma clasificar a 10 de las relaxasas dentro de las tres grandes familias  $MOB_F$ ,  $MOB_P$  y  $MOB_Q$ . La relaxasa del *contig* C059 formó parte de la familia  $MOB_F$ , más específicamente a la subfamilia  $MOB_{F1}$  y se encontró estrechamente relacionada a las proteínas de la familia  $MOB_{F11}$ , la cual fue previamente descrita cuando se analizó la relaxasa del plásmido pIH2 (Capítulo V, sección V.4.2). En la **Figura VII.3** se muestra el árbol filogenético correspondiente a la familia  $MOB_F$  y el alineamiento de la relaxasa C059 junto a las proteínas más relacionadas en donde se destacan las similitudes y diferencias entre dicha proteína y las características típicas de esta familia.

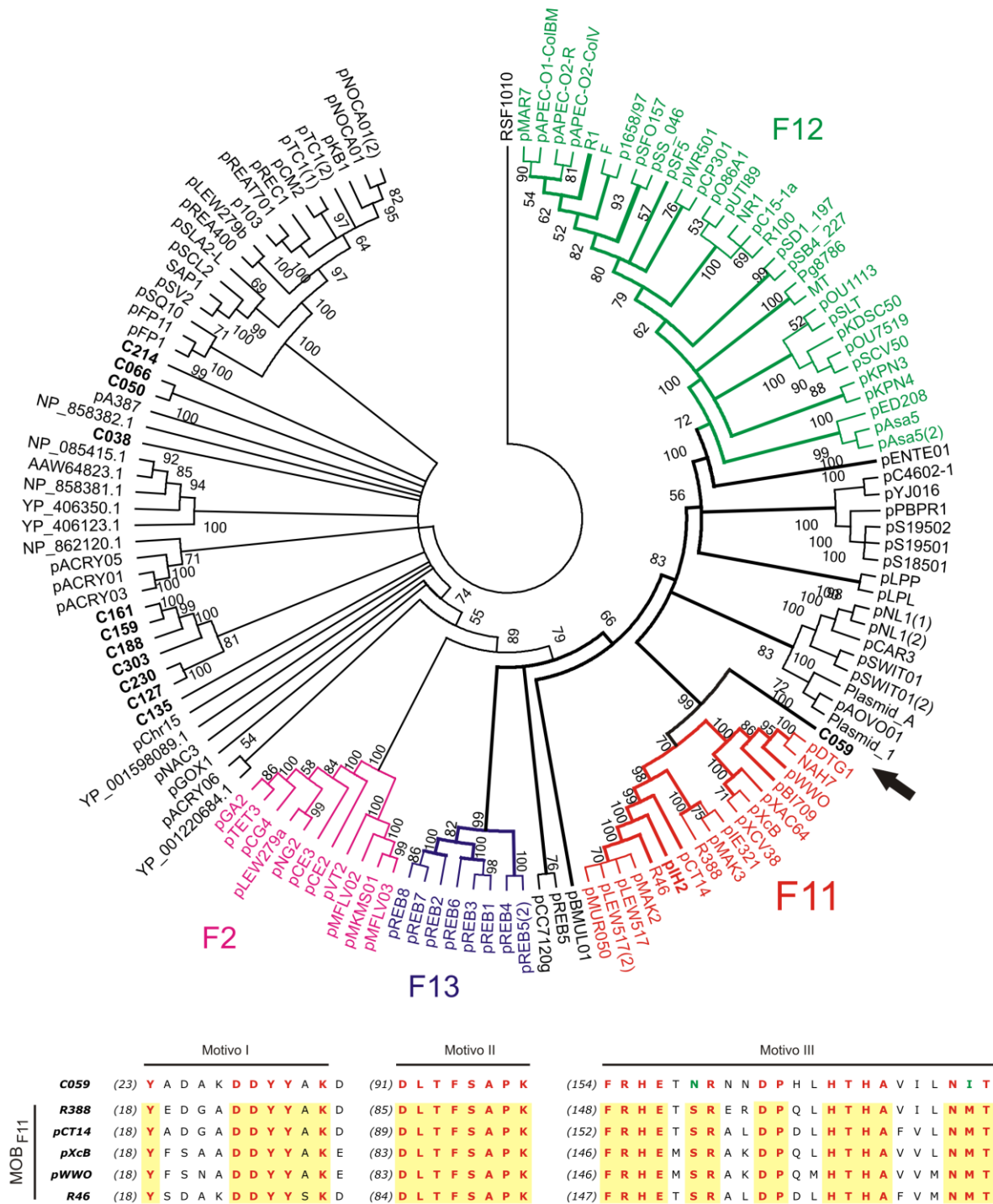
**Tabla VII.2 Proteínas de conjugación y MGEs asociados a la colección ambiental de plásmidos de *Acinetobacter* spp.**

CONTIG	NOMBRE	GÉNERO/ ESPECIE	N° ACCESO	NOMBRE PFAM	CODIGO PF	% IDENTIDAD	IS ASOCIADA
C002	Transposasa	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_034435913.1	DDE_Tnp_4	PF13359	100	ISAb $\alpha$ 27
	Transposasa	<i>Acinetobacter</i>	WP_004279038.1	HTH_Tnp_4	PF13613	100	ISAb $\alpha$ 27
C006	Transposasa	<i>Acinetobacter</i>	WP_001003818.1	DDE_3	PF13358	98	
	Transposasa	<i>Acinetobacter</i>	WP_000122230.1	HTH_Tnp_IS630	PF01710	100	
C052	Transposasa *	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	WP_017398059.1			86	
C069	Proteína con dominio <i>Helix-turn-helix</i> encontrado en transposasas *	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_025470125.1	HTH_28	PF13518	83	
C070	Transposasa familia IS6 *	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_060492357.1	DDE_Tnp_IS240	PF13610	93	IS1006*
C072	Transposasa	<i>Acinetobacter</i>	WP_004914889.1	HTH_Tnp_1	PF01527	99	
	Transposasa	<i>Acinetobacter junii</i>	APU50003.1	rve rve_3	PF00665 PF13683	100	ISAc $\alpha$ 1
C095	Transposasa	<i>Gammaproteobacteria</i>	WP_000037487.1	HTH_Tnp_1	PF01527	100	ISAb $\alpha$ 22
C096	Transposasa familia IS5	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_004645384.1	Putative transposase of IS4/5 family (DUF4096) DDE_Tnp_1	PF13340 PF01609	100	ISAb $\alpha$ 31
	Transposasa *	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_002059445.1	Transposase_mut	PF00872	94	
	Transposasa familia IS256	<i>Acinetobacter indicus</i>	WP_075168270.1	ransposase_mut	PF00872	97	
C122	Transposasa *	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ELW78007.1	ransposase_mut	PF00872	91	
	Transposasa familia IS66	<i>Acinetobacter</i> sp.	EXD31890.1	DDE_Tnp_IS240	PF13610	84	IS1006*
	Transposasa familia IS6 *	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_032032335.1	DDE_Tnp_IS240	PF13610	96	
C135	Transposasa familia IS30	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	WP_005095842.1	HTH_38 rve	PF13936 PF00665	100	IS18
C214	Transposasa*	<i>Acinetobacter</i> sp.	EXB05422.1	DDE_Tnp_IS66_C	PF13817	84	
	Transposasa con dominio DDE *	<i>Acinetobacter</i> sp.	EXC21112.1	DDE_Tnp_1_5	PF13737	90	
	Transposasa con dominio DDE	<i>Acinetobacter</i> sp.	EXH74449.1	DDE_Tnp_1	PF01609	99	
C226	Transposasa	<i>Acinetobacter calcoaceticus / baumannii</i>	WP_004832805.1	HTH_Tnp_1	PF01527	94	ISAb $\alpha$ 18*
	Transposasa*	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_032064430.1	rve rve_3	PF00665 PF13683	100	ISAb $\alpha$ 19*
C304	Transposasa*	<i>Erwinia tracheiphila</i>	EOS96326.1	-	-	98	
	Transposasa familia IS6	<i>Acinetobacter</i> sp. 1	WP_032032301.1	DDE_Tnp_IS240 rve	PF13610 PF00665	91	

\*Secuencia parcial

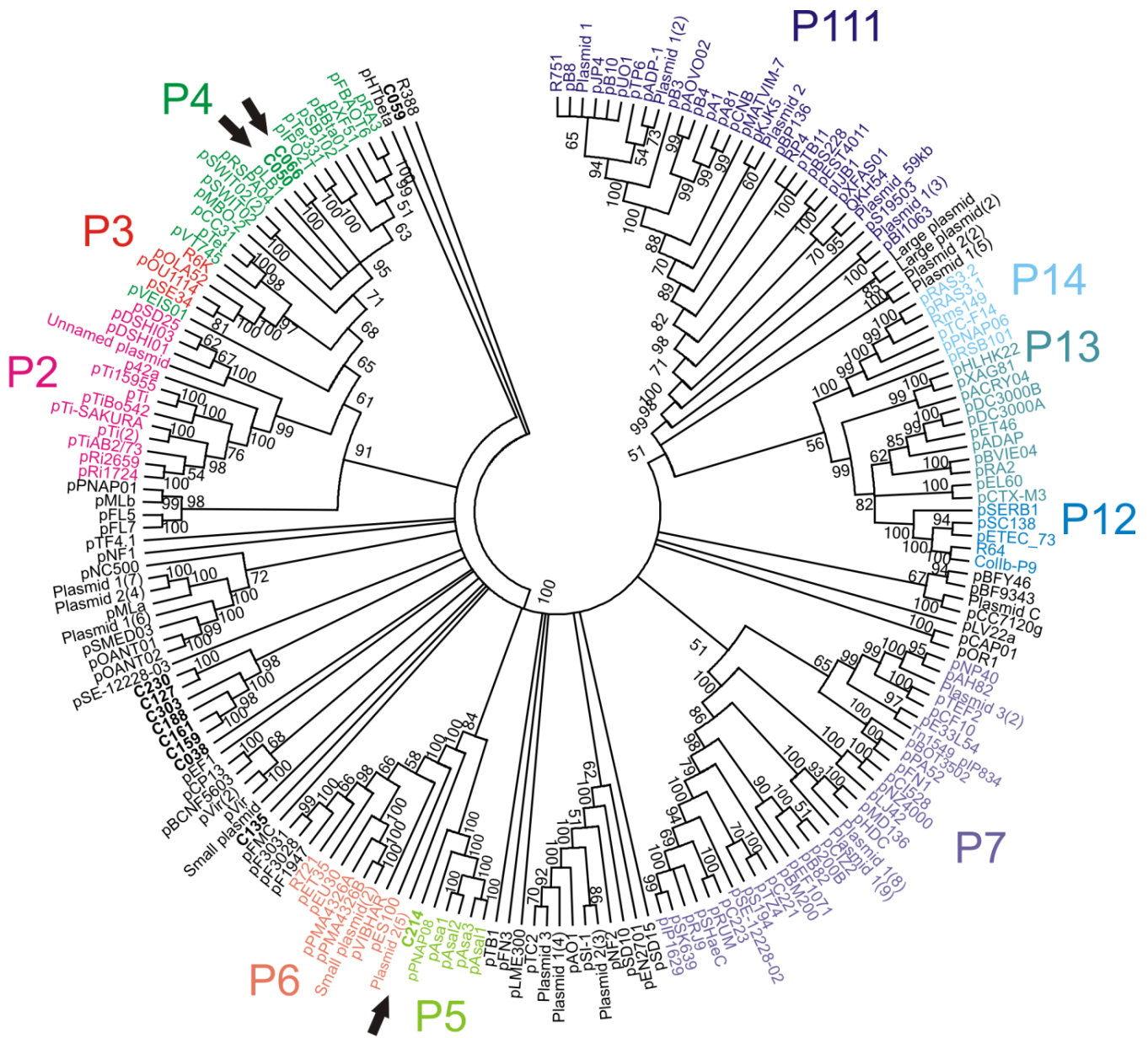
Las relaxasas de los *contigs* C050, C066 y C214 formaron parte de la familia MOB<sub>p</sub>, la más grande en la clasificación propuesta por Garcillan-Barcia *et al.*, 2009. En particular, las relaxasas pertenecientes a esta colección formaron parte de los subgrupos MOB<sub>p4</sub> (C050 y C066) y MOB<sub>p5</sub> (C214) (**Figura VII.4**). El clado MOB<sub>p4</sub> incluye una gran variedad de plásmidos con características variables y orígenes distintos. Entre ellos, podemos encontrar plásmidos de amplio rango de huésped pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncU, los cuales han sido asociados a especies de *Aeromonas* y han cobrado importancia por ser vectores de dispersión de genes de resistencia a quinolonas (Picão *et al.*, 2008, Dobiasova *et al.*, 2014, Dobiasova *et al.*, 2016). El clado MOB<sub>p5</sub>, incluye a la subfamilia MOB<sub>HEN</sub>, con la característica distintiva de los aminoácidos invariables HEN en el Motivo III. Sin embargo, son miembros de este grupo también los plásmidos pAsa1, pAsa3, pAsal1, pAsal2, pNAP08 y la relaxasa del *contig* C214 de esta colección ambiental. Estas últimas, sin bien son consideradas miembros del grupo MOB<sub>p5</sub>, no tienen conservados los aminoácidos HEN en el Motivo III, sino el típico 3H descrito en el Capítulo V (sección V.4.2).

Dentro de la gran familia MOB<sub>Q</sub>, pudieron ser clasificadas las relaxasas correspondientes a los *contigs* C127, C159, C161, C188, C230 y C303. (**Figura VII.5**). En particular, las relaxasas C127 y C230 fueron incluidas en la subfamilia MOB<sub>Q1</sub> estrechamente vinculadas con la relaxasa del plásmido pIH8 de la colección hospitalaria y las correspondientes a los plásmidos de *A. baumannii* pAV2 y pMAC. Las relaxasas de los *contigs* C159, C161, C188 aparecieron formando parte del nuevo subclado propuesto en este trabajo, MOB<sub>Q4</sub>. El análisis de los alineamientos demostró que los aminoácidos invariantes propuestos en el Capítulo V para describir a miembros de este grupo se hallan conservados en el segmento N-ter de todas las relaxasas, como se muestra en la **Figura VII.5**. Este hallazgo refuerza la propuesta para la clasificación de las relaxasas en un nuevo subgrupo con características únicas dentro de la familia MOB<sub>Q</sub>. En el alineamiento de la relaxasa correspondiente al *contig* C303 con las correspondientes a todos los subgrupos MOB<sub>Q</sub>, demostró que a pesar de estar estrechamente relacionada a MOB<sub>Q4</sub>, no contiene los motivos distintivos de este subgrupo.

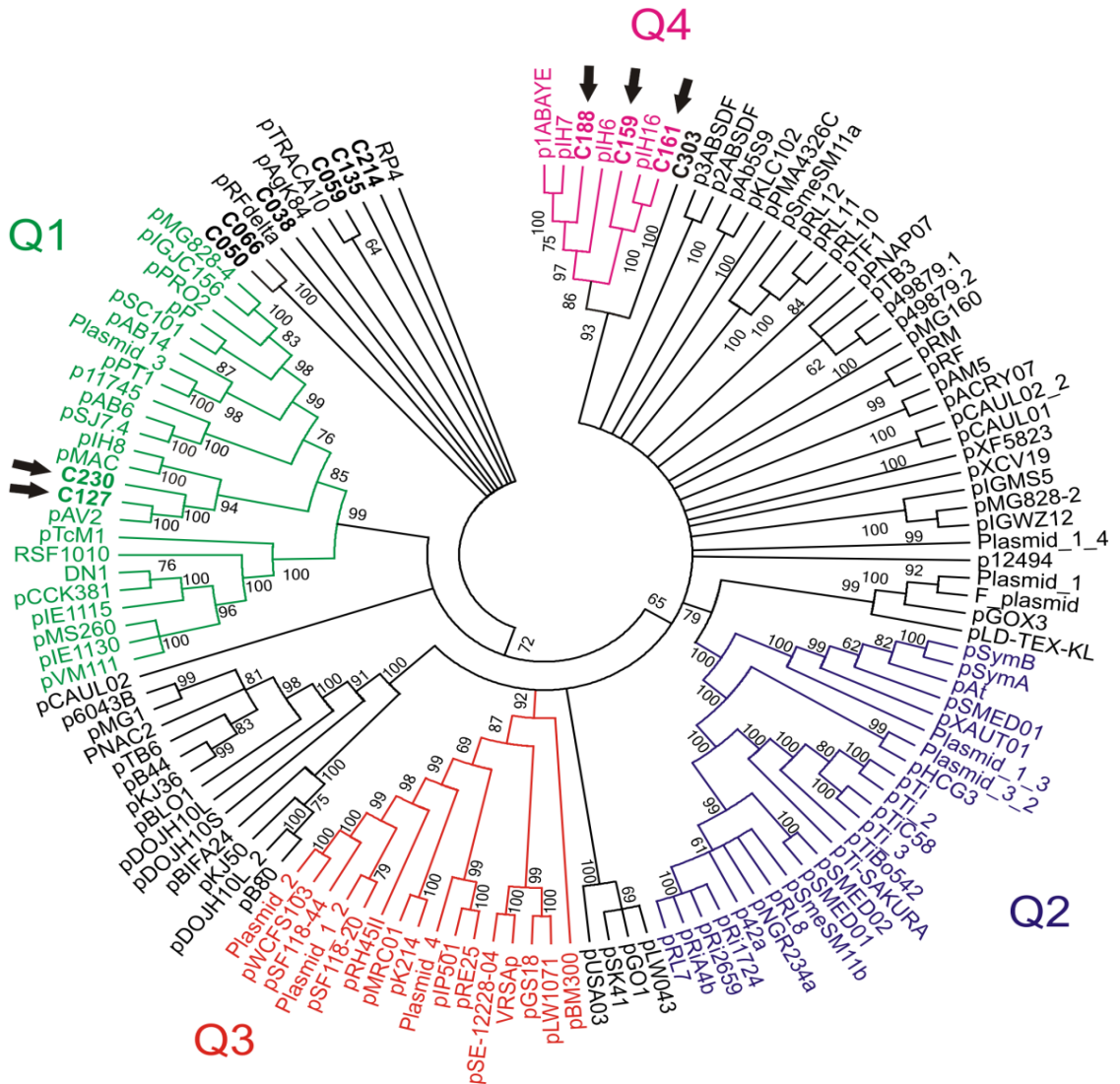


**Figura VII.3** **Árbol filogenético de relaxasas MOB<sub>F</sub>.** **A)** La figura muestra la disposición de los plásmidos de la familia MOB<sub>F</sub>. Los distintos subgrupos se muestran en colores. Los contigs de la colección ambiental se hallan resaltados en negrita. Las líneas gruesas corresponden a la subfamilia MOB<sub>F1</sub>. La flecha negra indica la posición de la relaxasa del contig C059. **B)** Alineamiento de la relaxasa del contig C059 con relaxasas de la familia MOB<sub>F11</sub>. Los aminoácidos invariantes se encuentran en rojo sobre amarillo. En verde se muestran los residuos de C059 que no respetan los motivos característicos del grupo.

Por último, las relaxasas correspondientes a los *contigs* C038 y C135 no pudieron ser clasificadas utilizando este método, debido a que no mostraron una relación filogenética soportada por valores de *bootstrap* con ninguna de las relaxasas de los grupos descriptos por (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).



**Figura VII.4** **Árbol filogenético de relaxasas *MOB<sub>p</sub>*.** La figura muestra la disposición de los plásmidos de la superfamilia *MOB<sub>p</sub>*. Los distintos subgrupos se muestran en colores. Los contigs de la colección ambiental se hallan resaltados en negrita. Las flechas negras indican la posición de las relaxasas de los contigs C050, C066 (*MOB<sub>p4</sub>*) y C214 (*MOB<sub>p5</sub>*).



	Motivo I	Motivo II	Motivo III
MOB <sub>Q1</sub>	<b>C230</b> (20) F H <b>Y</b> L T R	(78) <b>A</b> L P K <b>E</b> L	(110) A V H N H P S E L T G E D Q P <b>H</b> L H L M Y S E R S L S <b>D</b> G I E R
	<b>C127</b> (31) F H <b>Y</b> I T R	(91) <b>A</b> L P K <b>E</b> L	(123) A I H N H V G S L G G Q E Q P <b>H</b> L H F M Y S E R - H V <b>D</b> G I D R
	<b>pIH8</b> (20) Y L <b>Y</b> I S R	(80) <b>A</b> L P N <b>E</b> F	(112) A I H N V K S R I S G E D Q P <b>H</b> C H L M F S L K - A D <b>D</b> G I E R
	<b>pMAC</b> (20) Y L <b>Y</b> I S R	(80) <b>A</b> L P N <b>E</b> F	(112) A I H N V K S R I S G E D Q P <b>H</b> C H L M F S L K - A D <b>D</b> G I E R
	<b>pAV2</b> (30) F H <b>Y</b> I T R	(90) <b>A</b> L P K <b>E</b> L	(122) A I H N H A G A L A G Q D Q P <b>H</b> L H L I Y S E R - H V <b>D</b> G I E R
	<b>pAB6</b> (23) N D <b>Y</b> I N R	(79) <b>A</b> L P R <b>E</b> L	(113) A I H T D K N N H N - - - P <b>H</b> C H L I F S E R - Q L <b>D</b> G I D R
	<b>pP</b> (20) A D <b>Y</b> I S R	(78) <b>A</b> L P R <b>E</b> L	(109) A I H N P P G A I D G K E Q P <b>H</b> A H I M F C E R - I N <b>D</b> G I E R
	<b>pPT1</b> (13) A A <b>Y</b> I V R	(72) <b>A</b> L P R <b>E</b> L	(103) A I H T P - N A A D G G E Q P <b>H</b> V H L M F S E R - Q C <b>D</b> G I E R
	<b>pAB14</b> (20) A E <b>Y</b> I D R	(80) <b>A</b> L P R <b>E</b> M	(111) A I H N P - K A M D G N D Q P <b>H</b> V H L M F N E R - L Q <b>D</b> G I E R
	MOB <sub>Q4</sub>	<b>pIH16</b> (16) <b>G</b> R S A T A A I <b>A</b> Y R A G E <b>K</b>	(45) <b>K</b> T G V E Y (90) I <b>A</b> F P S E L N Q
<b>pIH6</b> (16) <b>G</b> R S A V A C A <b>A</b> Y R S G E <b>K</b>		(45) <b>K</b> T G I E F (90) V <b>A</b> F P C E L N Q	(128) <b>H</b> T A G G S D D <b>R</b> N Y H A H I
<b>pIH7</b> (16) <b>G</b> R S A V A C A <b>A</b> Y R S S E <b>K</b>		(45) <b>K</b> T G V E F (90) I <b>A</b> F P S E L N A	(128) <b>H</b> T D S G S D E <b>R</b> N Y H A H I
<b>p1ABAYE</b> (64) <b>G</b> R S A V A C A <b>A</b> Y R S G E <b>K</b>		(93) <b>K</b> T G V E F (138) I <b>A</b> F P G E L N A	(176) <b>H</b> T D S G S D E <b>R</b> N Y H A H I
<b>C188</b> (16) <b>G</b> R S A V A C A <b>A</b> Y R S G E <b>K</b>		(45) <b>K</b> T G V E F (90) I <b>A</b> F P H E L N A	(128) <b>H</b> T Q S G S D E <b>R</b> N Y H A H I
<b>C159</b> (16) <b>G</b> R S A T A A I <b>A</b> Y R A G E <b>K</b>		(45) <b>K</b> T G V E H (90) I <b>A</b> F P S E L N Q	(128) <b>H</b> T G S G S D E <b>R</b> N Y H A H I
<b>C161</b> (25) <b>G</b> R S A T A S I <b>A</b> Y R A G E <b>K</b>		(54) <b>K</b> T G V E Y (99) I <b>A</b> F P S E L N Q	(137) <b>H</b> T G S G S D E <b>R</b> N Y H A H I
<b>C303</b> (15) <b>K</b> T G I E Y (66) I <b>A</b> L P H E L D <b>K</b>		(104) <b>H</b> V H G G S D E <b>R</b> N H H A H I	

**Figura VII.5 Árbol filogenético de relaxasas MOB<sub>Q</sub>.** A) La figura muestra la disposición de los plásmidos de la familia MOB<sub>Q</sub>. Los distintos subgrupos se muestran en colores. Los contigs de la colección ambiental se hallan resaltados en negrita. Las flechas negras indican la posición de las relaxasas de los contigs C127, C159, C161, C188, C230 y C303. B) Alineamientos de las relaxasas MOB<sub>Q1</sub> (arriba) y MOB<sub>Q4</sub> (abajo). Los aminoácidos invariantes se encuentran en rojo sobre amarillo. En verde se muestran los residuos de la relaxasa C303 que no respetan los motivos característicos del grupo MOB<sub>Q4</sub>.



## VII.5 Descripción de las proteínas de mantenimiento plasmídico de la colección ambiental de plásmidos de *Acinetobacter* spp.

La búsqueda en base de datos haciendo uso del algoritmo BlastP, permitió identificar a 70 ORFs con homología a proteínas de mantenimiento plasmídico en 43 contigs, los cuales, casi en su totalidad, pertenecieron a distintas especies del género *Acinetobacter* (**Tabla VII.3**). Del total de las proteínas identificadas, 22 correspondieron a sistemas de partición activa, en donde pudieron encontrarse las proteínas motoras (ParA-like) y de unión a ADN centromérico (ParB-like) conformando potencialmente el operón completo *parAB* en los *contigs* C002, C050, C066 y C272. En el resto de los *contigs*, en todos los casos, pudieron encontrarse sólo proteínas motoras del tipo ParA. Los 48 ORFs restantes, correspondieron a proteínas de sistemas de muerte post-segregacional o TA, y fueron encontrados en 27 *contigs*. Las proteínas encontradas pertenecieron en su totalidad a los sistemas del tipo II, en donde ambos componentes (la toxina y la antitoxina) tienen naturaleza proteica, aunque no siempre comparten su mecanismo de acción. Teniendo en cuenta la similitud secuencial con proteínas homólogas en base de datos y la presencia de dominios conservados, fue posible reconocer a componentes de los sistemas RelE/B, VapB/C, HicA/B, Yoeb/YefM, MazF/E entre otros. (**Tabla VII.3**)

## VII.6 Descripción de módulos plasmídicos accesorios de la colección ambiental de *Acinetobacter* spp.

Como se ha mencionado anteriormente, además de codificar genes de proteínas exclusivamente plasmídicas que permiten la autonomía replicativa y asegurar la dispersión y herencia estable dentro de una comunidad microbiana, los plásmidos pueden contener genes denominados “accesorios” que codifican para proteínas con funciones secundarias que muchas veces le dan al microorganismo portador una ventaja adaptativa frente a las condiciones medioambientales.

**Tabla VII.3 Proteínas de mantenimiento plasmídico de la colección ambiental de *Acinetobacter* spp.**

CONTIG	NOMBRE	GENERO/ESPECIE	N° ACCESO	NOMBRE PFAM	CODIGO PFAM	% IDENTIDAD
C002	Proteína de partición	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_067869890.1	ParBc	PF02195	97
	Proteína de partición	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	WP_074947363.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	98
C003	Módulo de adición, antitoxina	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OIG81307.1	HTH_3	PF01381	99
	Módulo de adición, toxina	<i>Acinetobacter pittii</i>	KQD29442.1	----	----	96
C033	Proteína de partición ParA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AOB42321.1	CbiA	PF01656	99
C034	Proteína de partición ParB *	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	WP_004282012.1	---	----	98
C039	Toxina YoeB	<i>Acinetobacter parvus</i>	WP_004683136.1	YoeB_toxin	PF06769	91
	Antitoxina	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_010111585.1	PhdYeFM_antitox	PF02604	90
C050	Proteína de partición	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_071212513.1	CbiA	PF01656	96
	Proteína de partición ParB	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_068550223.1	KorB- ParBc	PF08535 PF02195	84 - 83
C052	Módulo de adición, antitoxina	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_005021147.1	ParE_toxin	PF05016	95
	Proteína de estabilización de plásmidos	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_053578851.1	PhdYeFM_antitox	PF02604	96
C058	Proteína de partición	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_071212513.1	CbiA	PF01656	69
C060	ATPasa	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000807825.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	45
	Toxina YoeB	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	SFT25128.1	YoeB_toxin	PF06769	97
	YefM (antitoxina de YoeB)	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	EPH32698.1	PhdYeFM_antitox	PF02604	92
C066	Proteína de partición ParB	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_068550223.1	KorB_C ParBc	PF06613 PF02195	97
	Proteína de partición	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_071212513.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	98
C069	Proteína de partición ParA	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_008306811.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	98
C070	YefM (antitoxina de YoeB)	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	EPH32698.1	PhdYeFM_antitox	PF02604	91
	Toxina Txe/YoeB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_005264103.1	YoeB_toxin	PF06769	89
C072	ParA	<i>Acinetobacter junii</i>	EEY91718.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	100
C075	Proteína con dominio PIN	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	EET81748.1	PIN	PF01850	97
	Proteína asociada a virulencia B	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_034700678.1	MazE_antitoxin	PF04014	96
C096	Proteína de partición ParA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KRJ26257.1	---	----	98
C097	HicA	<i>Acinetobacter</i> sp.	EZQ01110.1	HicA_toxin	PF07927	99
	Antitoxina HicB	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_010117354.1	HicB	PF05534	97
C099	Módulo de adición, toxina	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_044109848.1	---	----	100
	Módulo de adición, antitoxina	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_060875721.1	HTH_3	PF01381	99

(Continuación **Tabla VII.3**)

CONTIG	NOMBRE	GENERO/ESPECIE	N° ACCESO	NOMBRE PFAM	CODIGO PFAM	% IDENTIDAD
C100	Módulo de adicción, antitoxina	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	EFF84300.1	HTH_3	PF01381	100
C101	Toxina RelE	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	EEY85385.1	ParE_toxin	PF05016	100
	Regulador transcripcional	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_000369781.1	HTH_3 MqsA_antitoxin	PF01381 PF15731	100
C108	Toxina	<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i>	EIG27648.1	HigB-like_toxin	PF05015	68
	Módulo de adicción, antitoxina familia HigA	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_067724800.1	HTH_3	PF01381	93
C122	Proteína de partición ParA	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_008306811.1	CbiA - MipZ	PF01656 PF09140	99
	Módulo de adicción, antitoxina RelB	<i>Acinetobacter pittii</i>	ODI90385.1	---	---	94
	Módulo de adicción, antitoxina	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_068912099.1	HTH_3	PF01381	98
C135	CobQ/CobB/MinD/ParA	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	WP_004641746.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	47
C136	Antitoxina	<i>Acinetobacter</i> sp.	WP_067731965.1	---	---	71
C148	ParA	<i>Acinetobacter</i> sp. HA	EIM38468.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	98
	VapB	<i>Acinetobacter</i> sp.	YP_009070348.1	MazE_antitoxin	PF04014	99
	VapC	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_012268403.1	PIN	PF01850	95
C159	Antitoxina igA-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KZA76063.1	MqsA_antitoxin HTH_3	PF15731 PF01381	95
	Regulador transcripcional	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KHW80295.1	---	---	97
C178	Toxina YafQ	<i>Acinetobacter gerneri</i>	EPR82854.1	YafQ_toxin	PF15738	97
	Antitoxina RelB/DinJ	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_005254175.1	RelB	PF04221	100
C180	Toxina RelE	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	EEY85385.1	ParE_toxin	PF05016	100
C212	Represor transcripcional RelB	<i>Acinetobacter bohemius</i>	WP_074947748.1	RelB	PF04221	99
	Proteína de estabilización plasmídica	<i>Acinetobacter bohemius</i>	WP_074947749.1	ParE_toxin	PF05016	
C214	Proteína hipotética	<i>Acinetobacter townneri</i>	WP_004977497.1	RelE	PF06296	100
	Regulador transcripcional	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_000369782.1	HTH_3	PF01381	100
	Proteína de partición ParA	<i>Acinetobacter gerneri</i>	EPR85282.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	100
C226	HicA	<i>Acinetobacter gerneri</i>	EPR85295.1	HicA_toxin	PF07927	100
	Antitoxina HicB	<i>Acinetobacter</i> spp.	WP_004812232.1	HicB	PF05534	100
C239	Proteína de partición	<i>Acinetobacter bohemius</i>	WP_074947363.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	99

(Continuación **Tabla VII.3**)

CONTIG	NOMBRE	GENERO/ESPECIE	N° ACCESO	NOMBRE PFAM	CODIGO PFAM	% IDENTIDAD
C252	Proteína con dominio PIN	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	EFF84337.1	PIN	PF01850	99
	Proteína asociada a virulencia B	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP_046737959.1	MazE_antitoxin	PF04014	99
C272	Proteína de partición	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP_035270317.1	ParBc	PF02195	98
	Proteína de partición	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP_035270320.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	99
C281	Módulo de adicción, antitoxina	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP_068912099.1	HTH_3	PF01381	99
	Módulo de adicción, toxina	<i>Acinetobacter spp.</i>	WP_000286964.1	---	----	99
C300	VapB	<i>Acinetobacter venetianus</i>	WP_012268402.1	MazE_antitoxin	PF04014	91
	VapC toxina. ribonucleasa con dominio PIN	<i>Acinetobacter sp.</i>	OJU89597.1	PIN	PF01850	93
C303	Antitoxina. Proteína con dominio <i>ribbon-helix-helix</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	ELW84420.1	---	----	72
C304	Antitoxina AbrB	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	EFF84336.1	MazE_antitoxin	PF04014	91
C309	YefM (antitoxina de YoeB)	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	EPH32698.1	PhdYeFM_antitox	PF02604	94
	Toxina Txe/YoeB	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP_005264103.1	YoeB_toxin	PF06769	90
C338	Proteína de partición	<i>Acinetobacter sp.</i>	WP_067724373.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	98
C465	Proteína de partición ParA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AOB42321.1	CbiA	PF01656	99
C681	Módulo de adicción, antitoxina	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	EFF84300.1	HTH_3	PF01381	100

\*Secuencia parcial

Dentro de este gran grupo de genes, podemos encontrar aquellos relacionados al metabolismo secundario microbiano; a proteínas de unión y modificación de ADN, dentro de las cuales encontramos factores de transcripción, proteínas de restricción, metilación, y recombinación entre otras; y factores de resistencia a estrés ambiental como radiación, antimicrobianos, desinfectantes y metales pesados, sólo por nombrar algunos. Thomas (2000), propuso que los plásmidos pueden ser considerados como la unión de los distintos módulos de replicación, movilización, y mantenimiento conformando un esqueleto común capaz de sostener su propia existencia y

permanencia. La incorporación de la información accesoria a este esqueleto se puede considerar como un módulo adaptativo que se encuentra sujeto a cambios continuos determinados exclusivamente por la comunidad microbiana y los factores ambientales.

El análisis bioinformático realizado sobre los *contigs* plasmídicos, permitió asignar funciones accesorias por homología a 132 ORFs, las cuales incluyeron 28 proteínas de Modificación, Unión, Restricción y Recombinación de ADN (MURR), 19 de Resistencia (R), y otras relacionadas al metabolismo secundario que incluyeron, entre otras, enzimas pertenecientes a la vía degradativa de compuestos xenobióticos.

Las proteínas del grupo MURR consistieron, mayoritariamente, en enzimas de recombinación de ADN (Ser-recombinasas), seguidas por factores de transcripción, y proteínas de metilación/ restricción del ADN, entre otras (**Tabla A.4, ANEXO**). Con respecto a las proteínas relacionadas a resistencia, fueron reconocidos componentes del sistema de reparación del ADN por daño inducido por UV, componentes de bombas de eflujo para cationes de metales pesados y otros compuestos (bombas multidroga), un gen de resistencia al aminoglicósido estreptomina, y proteínas relacionadas a mecanismos de resistencia a metales pesados y peróxidos (**Tabla A.5, ANEXO**).

---

En este capítulo se abordó el análisis bioinformático de la información asociada a la colección ambiental de plásmidos de aislamientos del género *Acinetobacter*. La presencia de módulos plasmídicos de replicación, movilización y mantenimiento permitió identificar *contigs* exclusivamente plasmídicos a pesar de no haber completado *in silico* la estructura cerrada de ningún replicón.

Se llevó a cabo el análisis de los módulos de replicación, conjugación y mantenimiento del mismo modo al utilizado para los plásmidos de la colección hospitalaria. El análisis sobre las proteínas de inicio de replicación indicó una vez más la contundente presencia de la familia Rep\_3 en replicones de *Acinetobacter* spp. El análisis filogenético realizado sobre las proteínas de esta familia permitió identificar a nuevos grupos y clasificar a casi la totalidad de las Rep\_3 conocidas al momento.

El estudio filogenético realizado sobre las relaxasas reconocidas en las secuencias de la colección permitió no solo clasificar potencialmente a sus plásmidos portadores en los grupos definidos por Garcillan-Barcia *et al.*, 2009, sino también que reforzó la propuesta de la existencia del nuevo subgrupo MOB<sub>Q4</sub> aportando secuencias nuevas con las características distintivas descritas en el Capítulo V.

Con respecto a los módulos de mantenimiento, se reconocieron proteínas de sistemas de partición activa y muerte post-segregacional en múltiples *contigs*.

En general, todas las proteínas de funciones exclusivamente plasmídicas halladas en los *contigs* fueron homólogas a proteínas de bacterias del género *Acinetobacter*, tanto de origen clínico como ambiental. Las relaciones filogenéticas encontradas entre los módulos de replicación y movilización de este conjunto de datos con los depositados en base de datos demuestran también la estrecha relación existente entre estos módulos plasmídicos indistintamente su origen sea hospitalario o ambiental, reforzando la hipótesis de que existe un intercambio genético entre bacterias pertenecientes a distintos nichos ecológicos mediado por plásmidos.



# **CAPÍTULO VIII**

## **Discusión general y conclusiones**

En el presente trabajo de Tesis doctoral se abordó el estudio bioinformático, comparativo y funcional de secuencias plasmídicas asociadas al género *Acinetobacter*. Estos microorganismos ubicuos presentan una extraordinaria cantidad de recursos genéticos que le confieren la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales muy variables (Campos-Guillén *et al.*, 2014, Chang *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015, Radolfova-Krizova *et al.*, 2016), muchas veces bajo una intensa presión de selección (Bergogne-Berezin & Towner, 1996). Las bacterias pertenecientes a este género han sido blanco de estudio en las últimas décadas debido a la creciente aparición de infecciones nosocomiales asociadas a la presencia de cepas multi/pan resistentes. Por este motivo, gran parte de los estudios realizados sobre estos microorganismos se ven enfocados en la genómica comparativa de cepas clonales, en nuevas variantes de genes de resistencia a antimicrobianos y en la epidemiología de microorganismos asociados a brotes intrahospitalarios (Gan *et al.*, 2012, Hamidian *et al.*, 2012, Lopes & Amyes, 2012, Hamidian & Hall, 2014, Hamidian *et al.*, 2014, Hamidian *et al.*, 2014, Nigro & Hall, 2014, Hamidian *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2015, Nigro & Hall, 2015, Nigro *et al.*, 2015, Ou *et al.*, 2015, Yoon *et al.*, 2015, Da Silva & Domingues, 2016, Nigro & Hall, 2016, Rao *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016).

Los miembros de esta especie se caracterizan por tener un pequeño genoma *core* y un gran genoma accesorio que contiene, entre otras funciones, los genes responsables de la resistencia a diferentes antimicrobianos (Vallenet *et al.*, 2008, Imperi *et al.*, 2011). Este genoma accesorio se encuentra en dinámica constante y consiste, además de genes localizados en el cromosoma, en información asociada a distintos elementos genéticos móviles, como plásmidos. Las bacterias de este género suelen contener uno o más plásmidos (Murray *et al.*, 1984) tanto de bajo como de alto peso molecular, que pudieron haber sido adquiridos por mecanismos de transferencia horizontal de genes (HGT). El hecho de que estas bacterias contengan una gran cantidad de plásmidos y un pangenoma (Fondi *et al.*, 2010, Imperi *et al.*, 2011) extenso sugiere fuertemente que la información accesorio adquirida y la evolución hacia la multi/pan resistencia ha sido producto de la HGT, en la que los plásmidos han sido elementos sumamente importantes y responsables de transportar la información.



Los estudios publicados que involucran a plásmidos de *Acinetobacter* spp. tienen, en general, un interés clínico, donde el enfoque está establecido en los genes de resistencia que portan y en las variantes del esqueleto plasmídico asociado a estas últimas (Zarrilli *et al.*, 2008, Hamidian *et al.*, 2012, Gifford *et al.*, 2014, Hamidian & Hall, 2014, Hamidian *et al.*, 2014, Hamidian *et al.*, 2014, Nigro & Hall, 2014, Huang *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2015, Nigro *et al.*, 2015, Nigro & Hall, 2016, Rao *et al.*, 2016). Por otra parte, estudios comparativos detallados de los plásmidos de *Acinetobacter* spp. completamente secuenciados y disponibles en bases de datos públicas como el realizado por Fondi *et al.*, 2010, se enfocan en la dinámica y “conversación” evolutiva entre ellos y los cromosomas de las cepas de *Acinetobacter* spp., sin avanzar en la caracterización de la biología de los plásmidos en general. En este trabajo, por el contrario, se pretendió realizar un estudio integral de genomas de plásmidos enfocado casi exclusivamente en la biología de los módulos meramente plasmídicos. El objetivo de este estudio se basó en la búsqueda, descripción, caracterización y evaluación de estos vectores como vehículos de la información; bajo la hipótesis de que son los responsables de la gran variabilidad genética de estos microorganismos y que funcionan como “transportadores especializados de genes” desde reservorios determinados, gracias a la dinámica de los ecosistemas y a la actividad humana.

Para el desarrollo de este estudio, en primera instancia se evaluó en dos colecciones de aislamientos, una de origen hospitalario y otra ambiental, si los mismos eran portadores de plásmidos. Los resultados obtenidos demostraron que la mayoría de los aislamientos de ambas colecciones fueron portadores de plásmidos, tanto de alto como bajo peso molecular, no pudiendo inferir si existe o no una predominancia entre el tamaño de plásmidos y el nicho que ocupa la bacteria.

La caracterización sirvió como punto de partida para abordar el estudio genómico a partir de la purificación y posterior secuenciación de las colecciones plasmídicas. Los resultados de la secuenciación de la colección hospitalaria de plásmidos mostraron escasa contaminación cromosomal que pudo ser eliminada *in silico* utilizando genomas de *A. baumannii* como referencia; los *scaffolds* plasmídicos restantes pudieron ser completados *in silico* haciendo uso de herramientas informáticas. Esto se vio facilitado debido al pequeño tamaño de los plásmidos

secuenciados y una baja cantidad de secuencias repetitivas y secuencias de inserción presentes en la muestra. También, la eliminación de la información cromosomal haciendo uso de genomas de referencia fue posible debido a la relativa homogeneidad de la muestra, que consistió en su mayoría, en aislamientos de la especie *A. baumannii*. La secuenciación de los plásmidos de la colección ambiental permitió obtener mayor longitud y cantidad de secuencias. Los tamaños promedio de los *contigs* superaron ampliamente a los hospitalarios, indicando en primera instancia que se obtuvieron plásmidos de mayor peso molecular. La filtración de la información cromosomal *in silico* haciendo uso de genomas de referencia no dio un resultado, totalmente satisfactorio. Esto se debió a la heterogeneidad de la muestra, compuesta por varias especies del género *Acinetobacter* y al hecho de que no se encuentran disponibles en base de datos suficientes genomas de especies distintas a *A. baumannii*. Debido a esto, la elección de los *contigs* plasmídicos debió llevarse a cabo manualmente haciendo uso de una búsqueda por similitud de secuencia a genes exclusivamente plasmídicos. Si bien, esta estrategia permitió recuperar una cantidad aceptable de *contigs* plasmídicos, es posible haber descartado información plasmídica. El hecho de haber obtenido plásmidos de bajo peso molecular en la colección hospitalaria y de no haber podido cerrar ningún replicón *in silico* de la colección ambiental, no es indicativo de que exista una tendencia acerca del tamaño de los replicones con el origen de la muestra, sino que podría deberse exclusivamente al método de extracción y purificación utilizado en las muestras.

Existe una relación lógica y proporcional respecto al tamaño de los replicones y la cantidad de genes y módulos que pueden encontrarse codificados. Los plásmidos más pequeños pueden presentar sólo un gen de proteína de inicio de replicación, y pueden aumentar su tamaño conforme vayan adquiriendo en su estructura más ORFs que pueden o no codificar para proteínas de funciones reconocidas (Thomas, 2000). La presencia de plásmidos crípticos pequeños no parecería tener una función específica y beneficiosa para la bacteria portadora, por el contrario cabría esperar que le impriman al huésped de una carga energética extra para su mantenimiento. ¿Por qué entonces encontramos estas estructuras en las bacterias, incluso cuando éstas se encuentran bajo intensa presión de selección y precisan optimizar sus recursos energéticos para

prevalecer sobre otras? Una explicación a esta incógnita fue sugerida por San Millan *et al.*, 2014 quienes afirman ciertos plásmidos son capaces de imprimir un “costo cero” dentro del huésped celular, permitiéndole permanecer y transitar de forma inadvertida. Pero aún así, ¿cuál es el sentido biológico de estos elementos? Para entender la existencia de estos plásmidos crípticos, hay que pensar a estas estructuras como lo que en verdad son: potenciales transportadores de información a la espera de ser “cargados” para luego poder moverse entre microorganismos, pudiendo o no “descargar” su contenido dentro de un nuevo huésped celular. Encontrar plásmidos de variado tamaño con diferente cantidad de ORFs podría significar diferentes “estadios evolutivos” que fueron adquiriendo o liberando información desde su esqueleto molecular. En este camino parecería, además, que existe una “especialización” posiblemente hacia la estructura más eficiente y estable (Khan, 1997). Por ejemplo, los plásmidos crípticos de bajo peso molecular descritos contienen todos Reps que permiten la replicación mediante el mecanismo de círculo rodante. Conforme el plásmido va aumentando su tamaño, esta Rep parecería no poder “sostener” la replicación y debe, entonces, adquirir otro sistema replicativo. La adquisición de nuevos ORFs y nuevas funciones van acompañadas de un aumento en el tamaño y en el costo energético que el plásmido le imprime al huésped celular. El costo energético puede controlarse por la propia proteína de inicio de replicación (disminuyendo su número de copias), pero conforme el tamaño del plásmido aumente por adquisición de nuevos genes, parecería necesitar de otros mecanismos que le permita permanecer y heredarse teniendo en cuenta el costo energético que le significa al microorganismo huésped. La estrategia de los plásmidos consiste entonces en adquirir sistemas del tipo TA, partición activa y resolución de multímeros, pudiéndose a encontrar a varios sistemas en un mismo replicón (Jurénaitė *et al.*, 2013, Fernández-García *et al.*, 2016).

El análisis realizado en el Capítulo IV evidenció la presencia de los plásmidos crípticos pIH17 y pIH19 que presentaron una Rep involucrada en la replicación por círculo rodante y pequeñas proteínas hipotéticas sin ninguna función asignada. Es interesante destacar que el pIH14 presentó una proteína Rep relacionada a la de los mencionados plásmidos, pero además, tiene sobre su esqueleto parte de un fago que se encuentra integrado en el cromosoma de la cepa de *A. baumannii* AB0057. Más

aún, se pudo determinar que pIH14 está relacionado al pequeño plásmido críptico pM131-10 de *Acinetobacter* sp. M13. Estas observaciones ilustran perfectamente la hipótesis de la evolución estructural de los plásmidos, sosteniendo que el pIH14, originalmente un plásmido críptico, pudo haber adquirido recientemente la información fágica sobre su estructura molecular.

Conforme los plásmidos de la colección van aumentando su tamaño, encontramos también genes de proteínas relacionadas al mantenimiento. Esto se puede observar en los plásmidos más grandes de la colección hospitalaria (pIH1 y pIH2), como así también en los *contigs* de la colección ambiental. En este camino evolutivo de la estructura molecular se pueden encontrar arquitecturas modulares eficientes muy conservadas que refuerzan lo mencionado anteriormente. En este trabajo existen dos claros ejemplos de que ciertas estructuras plasmídicas parecerían ser exitosas en su función como transportadores de información y por ello se encuentran fuertemente conservadas. En el Capítulo IV se mostró cómo el plásmido pIH2 conserva una estructura modular típica de plásmidos IncN, pero no así de la información accesoria. Los plásmidos IncN tienen, frecuentemente, además de los módulos conservados de movilización y mantenimiento, genes de resistencia a muchas clases de antimicrobianos. La conservación de la estructura modular de las proteínas de movilización y mantenimiento hicieron de estos vectores vehículos de preferencia para la transmisión de genes de resistencia en enterobacterias (Carattoli, 2009, Poirel *et al.*, 2011, Wai-U Lo, 2012). La sola incorporación de distintas proteínas de replicación dentro del esqueleto conservado le da al vector la oportunidad de modificar y, muchas veces, ampliar el rango de huésped y transmitir horizontalmente la información accesoria que adquirió. Otro ejemplo claro de la conservación de la estructura genómica lo constituyen los plásmidos de la familia pRAY (Segal & Elisha, 1999, Hamidian *et al.*, 2012). El plásmido pIH13 fue aislado de bacterias clínicas de la ciudad de Buenos Aires en el año 2006 y resultó ser muy similar a los encontrados en aislamientos de *Acinetobacter* de permafrost ártico (Kurakov *et al.*, 2016). Este hallazgo constituye una evidencia muy fuerte de que la estructura de estos plásmidos pRAY es lo suficientemente estable y eficiente para la vehiculización de genes de resistencia a aminoglicósidos, fundada en el hecho de que plásmidos sumamente

similares secuencial y estructuralmente fueron hallados en bacterias distantes física y temporalmente.

Los plásmidos pueden ir entonces adquiriendo información y especializarse no sólo en la función que cumplen, sino también en dónde la van a cumplir. Los plásmidos pueden alcanzar potencialmente a cualquier microorganismo mediante transferencia horizontal, pero para permanecer dentro de un nuevo huésped celular, debe asegurarse, en principio, su propia replicación. Para que esto ocurra, la maquinaria de replicación del plásmido debe ser compatible con las correspondientes encontradas en los replicones del nuevo huésped (cromosomales y plasmídicos). Además, un plásmido podrá mantenerse en un determinado microorganismo si su propia maquinaria replicativa es funcional en el nuevo entorno. De este modo, una Rep que es funcional en una amplia variedad de microorganismos, le conferirá al plásmido portador un amplio rango de potenciales de huéspedes. Del mismo modo, un plásmido aumentará sus probabilidades de poder permanecer en distintos microorganismos, si adquiere múltiples y distintas Rep. En el estudio de genómica comparativa de los plásmidos hospitalarios del Capítulo IV, se hallaron distintas estructuras genómicas nuevas, en su mayoría asociadas a Rep\_3. La búsqueda y asociación de funciones realizada sobre los *contigs* plasmídicos en el Capítulo VII y en plásmidos de bases de datos, demostró también la presencia mayoritaria de Rep\_3 en plásmidos de *Acinetobacter* spp. Proteínas homólogas a éstas se han encontrado en plásmidos aislados de otros géneros y especies distantes indicando que estas Reps le proporcionarían a los vectores que las transportan un amplio rango de huéspedes. El hecho de que la mayoría de los plásmidos de *Acinetobacter* tengan Rep\_3, indica que han podido ser adquiridos desde bacterias muy distantes, trayendo consigo información variable, aportando y siendo responsables del gran pangenoma característico de este género.

La presencia de Reps pertenecientes a otras familias (pIH1) y la ausencia de una Rep en algunos plásmidos (pIH12, pIH13, pIH15; indicando la existencia de otro mecanismo de replicación no asociado a proteínas de inicio plasmídica conocidas), son indicativos de que *Acinetobacter* spp. puede soportar la replicación de otras familias de plásmidos, aumentando la posibilidad de adquirir más información desde otros replicones.

Debido al papel que juegan los plásmidos en la evolución de estas bacterias, el estudio de las proteínas responsables de la replicación plasmídica es de considerable importancia, no sólo para entender cómo las bacterias han adquirido información, sino también para establecer potencialmente el alcance que estos vectores pueden tener cuando se transfieren desde *Acinetobacter* spp. a otros microorganismos. Teniendo en cuenta que especies hospitalarias de *Acinetobacter* spp. han evolucionado hacia la pan resistencia, es esperable que los plásmidos de estas bacterias puedan incorporar, por ejemplo, genes de resistencia a antimicrobianos y diseminar esta información hacia otros microorganismos no relacionados. Desde este punto de vista, *Acinetobacter* puede considerarse como un reservorio importante de recursos genéticos. Esto lleva a la necesidad de crear un sistema de clasificación de familia de plásmidos para poder rastrear su origen y estudiar la epidemiología de los vectores como entes propagadores de resistencia. Bertini *et al.* 2010, tomaron un conjunto de plásmidos de origen clínico, muchos de ellos de *Acinetobacter* spp., y crearon un sistema de clasificación basado en la identidad de secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas de inicio de replicación. Dicho sistema, es actualmente aceptado en la comunidad científica; sin embargo, carece de sustento evolutivo. Debido a esto, en este trabajo de Tesis, se profundizó el análisis de las proteínas Rep\_3 exclusivas de *Acinetobacter* spp. y se logró clasificar a casi la totalidad de las Rep\_3 de plásmidos de *Acinetobacter* spp, dentro de un árbol filogenético, teniendo en cuenta el mejor modelo evolutivo que se adaptó a las secuencias proteicas. El árbol filogenético obtenido fue sustentado por valores altos de *bootstrap* y, si bien fueron identificados 16 grupos distintos de proteínas, no existió una tendencia poblacional de acuerdo al origen de las bacterias portadoras. Este resultado refuerza la hipótesis de que no existiría una “separación espacial” entre los plásmidos de distinto origen del género *Acinetobacter*, sino que existe un intercambio genético mediado por plásmidos entre bacterias de este género que se encuentran habitando nichos diferentes.

Cuando se desea estudiar y determinar el rango de huésped de un plásmido, también es importante tener en cuenta la presencia de módulos de mantenimiento. Como se mencionó anteriormente, si bien un plásmido puede ser replicativo en un determinado entorno, este elemento extracromosomal constituye un nuevo gasto

energético para la bacteria que lo hospeda y, este gasto, aumenta proporcionalmente con el tamaño del plásmido. Por este motivo, es frecuente encontrar distintos sistemas que aseguren su permanencia y correcta herencia. En este trabajo, se pudieron identificar proteínas asociadas a mantenimiento en los plásmidos más grandes de la colección hospitalaria y, en particular, una gran cantidad en los *contigs* de la colección ambiental, indicando que en la segunda etapa del trabajo, la información obtenida en la secuenciación correspondería a plásmidos ambientales de alto peso molecular. Es importante tener en cuenta que, si bien todas las proteínas de los sistemas TA y de partición activa halladas en la colección ambiental fueron homólogas de otras encontradas en plásmidos, no puede descartarse que puedan ser de naturaleza cromosomal. En este trabajo no se ha avanzado en la identificación *in silico* de proteínas relacionadas al sistema de mantenimiento plasmídico por resolución de multímeros, ya que las mismas pertenecen a la gran familia de recombinasas junto a las presentes en otros MGE como ISs, transposones e integrones, hecho que dificulta su identificación.

Debido al importante papel que juegan los plásmidos en la transferencia de la información y la evolución en las bacterias en general, es esperable encontrar en estos vectores, módulos que le confieran la capacidad de moverse eficientemente entre microorganismos. Si bien todos los plásmidos son potencialmente transferibles por transformación, el mecanismo de transferencia horizontal de plásmidos que más ha aportado a la evolución bacteriana, es la conjugación. Por esta razón, es de esperar que aquellos vectores que puedan moverse a través de este mecanismo de HGT sean más eficientes en la transferencia de la información. En efecto, tanto en la colección hospitalaria como en la ambiental se han encontrado genes que codifican para proteínas de movilización plasmídica por conjugación. En general existe una relación lógica entre el tamaño de los plásmidos y su naturaleza movilizable o autotransmisible: los plásmidos autotransmisibles, que requieren de una maquinaria conjugativa completa (Dtr y Mpf) son más grandes y los pequeños, son movilizables (Smillie *et al.*, 2010). Esto también pudo verse reflejado en los plásmidos de la colección hospitalaria ya que pIH2 de 42 Kb fue el único posiblemente autotransmisible. El resto de los vectores en los que fueron reconocidas proteínas de conjugación, fueron todos de

índole movilizable y de bajo peso molecular. En el caso de la colección ambiental, se han podido reconocer genes pertenecientes tanto al Mpf como al Dtr en varios *contigs*. La presencia de genes de proteínas del sistema de secreción tipo 4 (Mpf), indican potencialmente que se trata de plásmidos conjugativos, y por lo tanto, de plásmidos de mayor peso molecular.

Debido a la función que cumple durante la transferencia conjugativa y su universalidad en todos los plásmidos que pueden moverse por conjugación, la proteína relaxasa ha sido utilizada para idear un criterio de clasificación plasmídica. Francia *et al.*, 2004 y luego Garcillan-Barcia *et al.*, 2009 propusieron un método basado en la similitud encontrada en el dominio funcional de estas proteínas relaxasas. Haciendo uso de las secuencias N-ter, la gran mayoría de las relaxasas identificadas en este trabajo permitieron clasificar a los plásmidos que la codifican. Sin embargo, no se pudo inferir ninguna tendencia asociada al origen de los plásmidos y los grupos del que formaron parte, de la misma forma que ocurrió en la clasificación según sus Reps. No obstante, de la totalidad de relaxasas clasificadas, existió un sesgo hacia el grupo MOB<sub>Q</sub>. Esta gran familia se compone de plásmidos de múltiples y variados orígenes como así también de plásmidos conjugativos y movilizables (Francia *et al.*, 2004). En general, las relaxasas se ubicaron formando parte del subgrupo MOB<sub>Q1</sub> (exclusivo de plásmidos movilizables y amplio rango de huésped), o fueron encontradas estrechamente relacionadas conformando un nuevo grupo definido en este trabajo MOB<sub>Q4</sub>, en donde todos los miembros lo constituyen plásmidos del género *Acinetobacter*. Si bien es necesario incorporar más secuencias a este análisis para darle mayor robustez, es evidente la conservación de estas proteínas en plásmidos de *Acinetobacter* que provienen de ambientes distantes. Sorprendentemente, al caracterizar al nuevo grupo MOB<sub>Q4</sub> en sus propiedades de movilización se observó que a pesar que las relaxasas se encuentran estrechamente relacionadas, existe un comportamiento diferencial en la frecuencia de conjugación dependiendo del plásmido *helper* utilizado. Hechos similares han sido previamente descriptos para plásmidos de bacterias del suelo conocidas como rizobios, donde el fenotipo de transferencia conjugativa de un plásmido particular depende no sólo de los genes que codifica, sino también del entorno genómico (es decir, otros replicones co-residentes)



(Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Este hecho, demuestra que la clasificación de plásmidos según sus proteínas de conjugación no debe tomarse a la ligera y es necesario realizar ensayos funcionales paralelos que garanticen las propiedades de movilización desde distintos entornos.

Los resultados mostrados en este trabajo de Tesis en conjunto demuestran que los plásmidos de *Acinetobacter* spp. han evolucionado para convertirse en vectores especializados en la transferencia de la información. Se pudo demostrar que existen estructuras modulares eficientes y muy conservadas que son responsables de la herencia estable y propagación de los plásmidos como entidades independientes y que la información accesoria se encuentra en dinámica constante, pudiendo ser adquirida dentro de estas estructuras especializadas para luego transferirse horizontalmente.

El estudio realizado en este trabajo de Tesis sobre los módulos plasmídicos de bacterias del género *Acinetobacter* se espera contribuya al aumento de la información sobre la biología de estos vectores, abriendo camino a la comprensión de la dinámica evolutiva de *Acinetobacter* hacia su establecimiento como un patógeno nosocomial. Así también, se espera que aporte conocimiento a la biología de los plásmidos en general como entidades independientes especializadas en la propagación de la información.



# ANEXO

## Tablas

Tabla A.1 Proteínas homólogas a los ORFs de los plásmidos de la colección hospitalaria de *Acinetobacter* spp.

locus	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	Nº Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
pIH1_4_909	two-component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS	<i>Enterobacter</i> sp.	EUM09156.1	HATPase_c HisKA	PF02518 PF00512	100
pIH1_1128_991	hypothetical protein SEEKN312_16340	<i>Salmonella enterica</i>	ERN76790.1			96
pIH1_1127_1561	PcoE	<i>Proteobacteria</i>	WP_000723069.1			100
pIH1_2082_1786	plasmid stabilization protein ParE	<i>Enterobacter hormaechei</i>	KJP73628.1	ParE_toxin	PF05016	100
pIH1_2329_2069	CopG transcripcional regulator	<i>Proteobacteria</i>	WP_013087106.1	ParD_antitoxin	PF03693	100
pIH1_2504_2995	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_072203230.1			100
pIH1_3362_4132	conjugal transfer protein TraX	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_032638097.1	TraX	PF05857	100
pIH1_4263_4589	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_032638096.1			100
pIH1_5370_4564	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045328474.1	DUF4225	PF13988	100
pIH1_5598_5392	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045328475.1			100
pIH1_6088_6240	CDS					
pIH1_7333_6320	Replication initiation protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045328476.1	IncFII_repA	PF02387	100
pIH1_7756_7923	hypothetical protein*	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_075211935.1			89
pIH1_8705_7917	DSBA oxidoreductase	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_047716262.1	Thioredoxin_4	PF13462	100
pIH1_8979_8734	conjugal transfer protein Tral*	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_069597126.1			99
pIH1_9467_9270	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_047716053.1			100
pIH1_9927_9517	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325832.1	DUF1380	PF07128	100
pIH1_10397_9969	antirestriction protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325833.1	Antirestrict	PF03230	100
pIH1_10525_10394	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i>	YP_003602574.1			100
pIH1_10721_10590	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_072250059.1			100
pIH1_11174_10752	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325835.1	DUF1380	PF07128	100
pIH1_11451_11230	hypothetical protein	<i>Proteobacteria</i>	WP_013087144.1			100
pIH1_12140_11448	DNA methylase	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325837.1	N6_N4_Mtase	PF01555	100
pIH1_12926_12546	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325839.1			100
pIH1_13424_13221	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325841.1			100
pIH1_13716_13453	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325844.1			100
pIH1_14382_13720	Mediator of plasmid stability	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045325846.1	Plasmid_stab_B	PF10784	100
pIH1_15356_14385	StbA family protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045328477.1	StbA	PF06406	100
pIH1_15588_16019	protein impA	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_045328478.1	Peptidase_S24	PF00717	100
pIH1_16019_17290	DNA polymerase V subunit UmuC	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328479.1	IMS	PF00817	100
pIH1_17799_18503	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_029403849.1	Rep_3	PF01051	100
pIH1_18732_18580	hypothetical protein*	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_072051075.1			100
pIH1_19516_19289	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	WP_032663682.1			100
pIH1_20202_19561	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328446.1	CbiA MipZ	PF01656 PF09140	100
pIH1_20394_21677	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328449.1	DUF1173	PF06666	100
pIH1_22464_21682	Resolvase	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328451.1	Phage_integrase	PF00589	100
pIH1_22808_22461	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_047718842.1			100

**Tabla A.1 Continuacion**

<i>locus</i>	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
plH1_23625_22861	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328454.1			100
plH1_23986_23669	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328455.1			100
plH1_24129_24016	CDS					
plH1_24295_24420	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_065118216.1			100
plH1_24547_25638	repC-like protein%2C plasmid replication	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SAU96169.1			85
plH1_25640_27865	exclusion suppressor FxsA	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_040119771.1	KAP_NTPase	PF07693	100
plH1_28812_27913	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328458.1	TIR-like	PF10137	100
plH1_29092_28802	hypothetical protein	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_040119769.1			100
plH1_32504_29379	hypothetical protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_047718840.1			100
plH1_32850_33080	Virulence-associated protein vagC	<i>Enterobacter sp.</i>	EUM08956.1	MazE_antitoxin	PF04014	100
plH1_33077_33487	PilT protein domain-containing protein	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_032662169.1	PIN	PF01850	100
plH1_33561_35123	ATP-dependent endonuclease	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_040119797.1	AAA_23 AAA_15	PF13476 PF13175	100
plH1_35108_36130	helicase UvrD	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328463.1	UvrD-helicase Viral_helicase1	PF00580 PF01443	100
plH1_36202_36324	hypothetical protein*	<i>Klebsiella</i>	WP_014343466.1			97
plH1_36487_36368	CDS					
plH1_36679_37587	HNH endonuclease	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328465.1	HNH	PF01844	100
plH1_38123_37773	putative exported protein	<i>Proteobacteria</i>	WP_000647571.1	DUF305	PF03713	100
plH1_38819_38271	SiIE	<i>Escherichia coli</i>	EIL53026.1			100
plH1_40428_38953	sensor kinase CusS	<i>Enterobacter sp</i>	EUM08949.1	HATPase_c HisKA	PF02518 PF00512	100
plH1_41101_40421	transcriptional regulatory protein CusR	<i>Enterobacter sp.</i>	EUM08948.1	Response_reg Trans_reg_C	PF00072 PF00486	100
plH1_41316_41161	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001759380.1			100
plH1_41291_42676	copper/silver efflux system outer membrane protein CusC	<i>Enterobacter sp</i>	EUM08947.1	OEP_HlyD	PF02321 PF00529	100
plH1_42705_43058	cation efflux system protein CusF	<i>Atlantibacter hermannii</i>	GAB52613.1	CusF_Ec	PF11604	100
plH1_43172_44464	ation efflux system protein CusB	<i>Atlantibacter hermannii</i>	GAB52612.1	HlyD_D23	PF16576	100
plH1_44475_47621	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328469.1	ACR_tran	PF00873	100
plH1_47707_48147	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000720618.1	DUF411	PF04214	100
plH1_48275_50716	copper-translocating P-type ATPase	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328471.1	E1-E2_ATPase YHS HAD Hydrolase	PF00122 PF04945 PF12710 PF00702	100
plH1_50757_50954	hypothetical protein	<i>Gammaproteobacteria</i>	WP_000843494.1	DUF2933		100
plH1_51725_50988	peptidase M23	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000287499.1	Peptidase_M23	PF01551	
plH1_52463_52014	copper resistance protein	<i>Enterobacter hormaechei</i>	KLP77607.1			100
plH1_52698_54515	copper oxidase	<i>Enterobacter hormaechei</i>	WP_045328472.1	Cu-oxidase_3 Cu-oxidase Cu-oxidase_2	PF07732 PF00394 PF07731	100
plH1_54515_55411	copper resistance protein B	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_032662221.1	CopB	PF05275	100
plH1_55451_55831	copper resistance protein CopC	<i>Enterobacter</i>	WP_032662224.1	CopC	PF04234	100
plH1_55836_56765	copper resistance protein CopD	<i>Enterobacter</i>	WP_032662227.1	CopD	PF05425	100
plH1_56820_57500	Transcriptional regulatory protein pcoR	<i>Enterobacter sp.</i>	EUM09157.1	Response_reg Trans_reg_C	PF00072 PF00486	100
plH1_57497_57997	histidine kinase*	<i>Salmonella enterica</i>	KUD00754.1			98
plH1_58644_58039	DNA resolvase	<i>Gammaproteobacteria</i>	WP_000509966.1	Resolvase HTH_23	PF00239 PF13384	100
plH1_58739_61636	Tn3 family transposase	<i>Enterobacteriales</i>	WP_001553819.1	DDE_Tnp_Tn3	PF01526	100

**Tabla A.1 (continuación)**

locus	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
plH2						
plH2_433_972	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001567334.1			100
plH2_983_1432	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_039021304.1			100
plH2_1416_1958	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001567332.1			100
plH2_2030_2437	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001567331.1			100
plH2_2859_2671	hypothetical protein*	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KFJ78412.1	Resolvase	PF00239	95
plH2_6193_3071	Type I restriction-modification system restriction subunit R	<i>Salmonella enterica</i>	EHC71308.1	ResIII_HSDR_N EcoR124_C	PF04851 PF04313 PF12008	100
plH2_7586_6315	restriction endonuclease	<i>Escherichia coli</i>	WP_063114630.1	Methylase_S HsdM_N	PF01420 PF12161	100
plH2_9139_7583	type I restriction-modification system subunit M	<i>Escherichia coli</i>	WP_060617849.1	Methyltransf_26 N6_Mtase	PF13659 PF02384	100
plH2_9955_9545	transposase	<i>Escherichia coli</i>	AMX43345.1			100
plH2_10613_9948	FipA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80230.1			100
plH2_13828_10610	Tral relaxase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80231.1	TrwC_AAA_30 UvrD_C_2 Viral_helicase1	PF08751 PF13604 PF13538 PF01443	100
plH2_15305_13833	conjugal transfer protein TraJ	<i>Escherichia coli</i>	WP_063131939.1	TraG-D_C TrwB_AAD_bind	PF12696 PF10412	100
plH2_15841_15365	TraK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80233.1			100
plH2_16257_16688	StbA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80235.1			100
plH2_16697_17413	StbB	<i>Enterobacteriaceae</i>	YP_004765036.1			100
plH2_17416_17784	StbC	<i>Escherichia coli</i>	YP_004765035.1			100
plH2_17846_18196	OrfD	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_014014961.1			100
plH2_18437_18255	CgA protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	EHC71319.1			100
plH2_18755_18501	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_000705249.1			100
plH2_18984_18778	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000809161.1	DUF905	PF06006	100
plH2_19431_19315	hypothetical protein*	<i>Salmonella enterica</i>	EHC71316.1			100
plH2_20029_19532	ROS/MUCR transcriptional regulator domain protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_063131941.1	ROS_MUCR	PF05443	100
plH2_20284_20084	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_000668241.1			100
plH2_20595_20326	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001108408.1			100
plH2_21556_20765	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_000210215.1			100
plH2_21755_21871	hypothetical protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80248.1			100
plH2_22282_22452	hypothetical protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80250.1			100
plH2_22912_22502	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_000254015.1			100
plH2_23456_22905	ArdR-like protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AEY80251.1			100
plH2_23750_23460	hypothetical protein	<i>Salmonella enterica</i>	KJU69821.1			100
plH2_24190_23768	ArdB protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001642212.1	Antirestrict	PF03230	100
plH2_24370_25155	Mpr family protein	<i>Pantoea stewartii</i>	EHU01457.1	SprT-like	PF10263	100
plH2_25962_25633	ArdK protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_014014957.1	KORA	PF16509	100
plH2_27521_26637	RepA	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000807122.1	RepA_C	PF04796	100
plH2_27661_27993	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_000140165.1			100
plH2_28159_28767	Resolvase	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000275218.1	Resolvase	PF00239	100
plH2_28949_28764	ribbon-helix-helix domain-containing protein	<i>Enterobacteriales</i>	WP_024562121.1	RHH_3	PF12651	100
plH2_29542_29234	hypothetical protein	<i>Enterobacteriales</i>	WP_000733764.1	DUF3373	PF11853	100
plH2_29770_29546	hypothetical protein	<i>Enterobacteriales</i>	WP_024152270.1			100
plH2_30231_29881	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_000528713.1			100
plH2_30588_30235	KorB	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	AKJ21350.1	Histone_HNS	PF00816	100
plH2_30787_31434	TraL	<i>Escherichia coli</i>	YP_004765023.1			99
plH2_31394_31669	KorA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	YP_006959332.1			100
plH2_31636_31977	TraM	<i>Escherichia coli</i>	WP_001121032.1	TrbC	PF04956	100
plH2_32017_32334	TraA	<i>Escherichia coli</i>	YP_004765021.1	VirB3	PF05101	100
plH2_32335_34908	TraB	<i>Enterobacter hormaechei</i>	KTK22616.1	CagE_TrbE_VirB AAA_10	PF03135 PF12846	100
plH2_34924_35637	Minor pilin of type IV secretion VirB5	<i>Salmonella enterica</i>	EHC71373.1	T4SS_DUF3373 DUF947	PF07996 PF11853 PF06102	100
plH2_35647_35889	Exe	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000858958.1			100

**Tabla A.1( continuación)**

locus	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
plH2_35906_36943	TraD	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_014014948.1	TrbL	PF04610	100
plH2_37162_37857	TraE	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001208352.1	VirB8	PF04335	100
plH2_37868_38755	TraO	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000758230.1	CagX	PF03524	100
plH2_38755_39888	TraF	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000101920.1	TrbI	PF03743	100
plH2_39939_40940	TraG	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_001076634.1	T2SSE	PF00437	100
plH2_40937_41464	Nuc	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_000715148.1	PLDc_2	PF13091	100
plH2_41461_41772	hypothetical protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_000570332.1			100
plH2_41777_41998	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_015060073.1			100
plH2_42191_42448	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	WP_071977869.1			100
<b>plH3</b>						
plH3_74_280	Phage tail protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_072618703.1	NLPC_P60	PF00877	100
plH3_274_852	Tail assembly protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000959559.1			100
plH3_876_12104	Phage tail fiber protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_046693283.1	Phage-tail_3 Baculo_PEP_C MscS_porin	PF13550 PF04513 PF12795	100
plH3_12098_12364	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_050574964.1			100
plH3_13404_12568	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_000192217.1			100
plH3_14014_13496	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_024432572.1	ABC_tran SMC_N	PF00005 PF02463	100
plH3_15435_14005	recombinase RecF	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_059284277.1	AAA_23 Ax_dynein_ligh	PF13476 PF10211	100
plH3_16550_15435	serine/threonine protein phosphatase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KQD34458.1	Metallophos	PF00149	100
plH3_16805_16584	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_002027139.1			100
plH3_17273_16893	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_000234226.1			100
plH3_17734_17273	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_005134373.1			100
plH3_18090_17731	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_000680035.1			100
plH3_20376_18175	RecA-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_052751897.1	RecA	PF00154	100
plH3_21416_20379	exonuclease	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_000429229.1	5_3_exonuc	PF01367	100
plH3_22339_21479	putative regulator	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_001099771.1			100
plH3_23570_22482	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_046693300.1			100
plH3_27115_23660	DNA polymerase III alpha subunit	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KQK35285.1	DNA_pol3_alpha	PF07733	100
plH3_27841_27161	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_000840050.1			100
plH3_28557_27892	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_046693302.1			100
plH3_29826_28582	porphyrin biosynthesis protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000063931.1	AAA_5	PF07728	100
plH3_31893_29971	cobalamin biosynthesis protein CobT	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_046693286.1	CobT_C	PF11775	100
plH3_32328_32134	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_000047261.1			100
plH3_32750_33169	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000833466.1	HTH_3	PF01381	100
plH3_33509_34093	Integrase	<i>Acinetobacter</i>	WP_000124734.1	Phage_integrase	PF00589	100
plH3_34506_34090	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_001180911.1			100

**Tabla A.1 (continuación)**

<i>locus</i>	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	Nº Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
plH3_34709_35386	partition protein A	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_000770709.1	ParA	PF10609	100
plH3_35383_35811	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_000016664.1			100
plH3_36419_35799	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_000925127.1			100
plH3_37064_36492	Guanylate kinase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_042757665.1	Guanylate_kin	PF00625	100
plH3_37565_37104	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_042757666.1			100
plH3_38998_37583	DNA ligase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_032035719.1	DNA_ligase_A_M	PF01068	100
plH3_39520_39011	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_000063348.1			100
plH3_40125_39517	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_000256859.1			100
plH3_40571_40119	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EJG16228.1			100
plH3_41098_40610	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_064904445.1			100
plH3_42322_41228	Primase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_046693285.1	Toprim_N	PF08275	100
plH3_43813_42410	DNA helicase	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_000102028.1	DnaB_C	PF03796	100
plH3_44281_43850	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_000005905.1			100
plH3_45100_44369	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000084439.1			100
plH3_46338_45217	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_000818856.1	Rep_3	PF01051	100
plH3_48353_47988	lysozyme	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000097414.1	Phage_lysozyme	PF00959	100
plH3_48181_48396	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EXB05700.1			
<b>plH3_48504_48707</b>	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_005130226.1			100
plH3_49483_48752	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_005134396.1			100
<b>plH4</b>						
plH4_945_1064	CDS					
plH4_1030_1170	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KCW35506.1			100
plH4_1263_1376	CDS					
plH4_4503_3298	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_002000389.1			100
plH4_5552_4506	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000027064.1	NA37	PF04245	100
plH4_7507_6065	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000003535.1			100
plH4_7846_7730	Single-stranded DNA-binding protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_001992235.1	SSB	PF00436	100
plH4_10645_8180	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_001022397.1	DUF927	PF06048	100
plH4_10951_10658	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CAM87719.1			100
plH4_11055_10939	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ACJ40757.1			100
plH4_11363_11058	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000787150.1			100
plH4_11753_11373	conserved hypothetical protein from bacteriophage	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CAM87721.1			100
plH4_12288_11734	BRO family protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EGJ68514.1	Bro-N	PF02498	100
plH4_12494_12285	DNA-binding protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_001016479.1	HTH_39	PF14090	100
plH4_12712_12497	hypothetical protein from bacteriophage	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000153154.1			100

**Tabla A.1 (continuación)**

<i>locus</i>	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
phiH4_13713_12922	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CAM87725.1			100
phiH4_995_13840	site-specific recombinase, phage integrase family	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ELW88869.1			99
<b>phiH5</b>						
phiH5_1249_1485	prophage CP4-57 regulatory family protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EXG30388.1	Phage_Alpa	PF05930	100
phiH5_1488_1697	DNA-binding protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KOP84886.1	HTH_39	PF14090	100
phiH5_1694_2203	BRO family, N-terminal domain protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KOP84887.1	Bro-N	PF02498	100
phiH5_2196_2564	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_004745127.1			100
phiH5_2575_2898	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_004745129.1			100
phiH5_3268_3576	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_004745131.1			100
phiH5_3569_5998	helicase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KOP84890.1	DUF927	PF06048	100
phiH5_6070_6213	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_070130023.1			100
phiH5_6252_6578	Single-stranded DNA-binding protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_002126519.1	SSB	PF00436	100
phiH5_7844_9100	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_004745119.1	DUF4102 Phage_integrase	PF13356 PF00589	100
phiH5_9172_528	kilA-N domain protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EXG30389.1	KilA-N	PF04383	100
<b>phiH6</b>						
phiH6_105_824	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_065996348.1	Rep_3	PF01051	99
phiH6_825_1073	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_004918992.1			100
phiH6_2291_1095	P-type conjugative transfer protein TrbL	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_004918993.1	TrbL	PF04610	100
phiH6_2440_2294	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ENV52429.1			100
phiH6_3188_2442	conjugal transfer protein TrbJ	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_068564382.1			100
phiH6_3467_3192	mobilization protein	<i>Acinetobacter pittii</i>	OCY51628.1			100
phiH6_3678_5096	hypothetical protein	<i>Acinetobacter junii</i>	WP_004919014.1	MobA_MobL	PF03389	100
phiH6_5744_5175	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_004676221.1	Kfra_N	PF11740	100
<b>phiH7</b>						
phiH7_3048_1396	mobilization protein (MobL-like)	<i>Acinetobacter</i>	WP_068913314.1	MobA_MobL	PF03389	99
phiH7_3260_3562	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_046128218.1			100
phiH7_4137_3580	TetR family transcriptional regulator	<i>Acinetobacter</i>	WP_016165572.1	TetR_N	PF00440	100
phiH7_4482_4138	quaternary ammonium transporter	<i>Acinetobacter indicus</i>	KJV38656.1	Multi_Drug_Res	PF00893	100
phiH7_5027_4740	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_004870774.1			100
phiH7_5027_692	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter parvus</i>	WP_050042213.1	Rep_3	PF01051	100
<b>phiH8</b>						
phiH8_1688_528	MobA/MobL family protein	<i>Acinetobacter</i>	EFF84546.1	MobA_MobL	PF03389	100
phiH8_1687_1836	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	EFF84547.1			100
phiH8_1995_2771	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_000191151.1			100
phiH8_3050_4195	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_002072939.1			100
phiH8_4510_4268	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter</i>	EFF84550.1			100
phiH8_4611_4883	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	EFF84551.1			100
phiH8_4987_5166	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EXE70656.1			100
phiH8_5171_5446	addiction module antitoxin	<i>Acinetobacter</i>	WP_005140357.1	RelB	PF04221	100
phiH8_5430_5720	addiction module toxin RelE	<i>Acinetobacter</i>	WP_000176412.1	YafQ_toxin	PF15738	100
phiH8_5914_5768	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	KCX86360.1			100
phiH8_6432_5911	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	KCX95670.1			100
phiH8_7274_6957	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_005065053.1			100
phiH8_8191_7625	hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_000858429.1			100
phiH8_9136_8255	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter</i>	WP_005804946.1	Rep_3	PF01051	100
<b>phiH9</b>						
phiH9_23_232	initiator Replication family protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EYC96371.1			99
phiH9_225_800	DNA replication protein	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_068553181.1	HTH_17	PF12728	98



**Tabla A.1 (continuación)**

<i>locus</i>	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
plH9_813_956	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EKP36803.1			98
plH9_1359_1141	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ELW93512.1			98
plH9_1916_1647	hypothetical protein	<i>Moritella dasanensis</i>	WP_017221374.1			44
plH9_2096_2425	CDS					
plH9_3066_2527	hypothetical protein	<i>Acinetobacter tandoii</i>	WP_026441250.1			96
plH9_4625_3762	transposase	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	WP_017397145.1	DDE_Tnp_1_3	PF13612	99
plH9_5545_4718	CDS					
plH9_5766_5620	CDS					
plH9_5765_6088	hypothetical protein					
plH9_6094_6996	CDS					
plH9_7018_7833	hypothetical protein	<i>Pelodictyon luteolum</i>	WP_011357468.1	AbiEii	PF08843	34
plH9_8314_7946	serine protease	<i>Acinetobacter schindleri</i>	WP_004889734.1	Trypsin_2	PF13365	99
plH9_10168_9404	DNA replication protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ADX94286.1	Rep_3	PF01051	99
<b>plH10</b>						
plH10_831_1115	Phage-related protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CAM86719.1	DUF2523	PF10734	100
plH10_1108_2352	zonula occludens toxin	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_059264785.1	Zot	PF05707	100
plH10_2519_2743	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000166401.1			100
plH10_2745_2975	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000153604.1			100
plH10_2972_3109	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ACJ41444.1			100
plH10_3453_3259	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000301761.1			100
plH10_3504_3785	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EKK17327.1			100
plH10_3785_4942	replication protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000505023.1	Rep_trans	PF02486	100
plH10_4945_5241	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000983197.1			100
plH10_5559_5753	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CAM86735.1			100
plH10_5765_5983	alpha/beta hydrolase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_001093107.1	CoatB	PF10389	100
plH10_6076_825	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000996661.1			
<b>plH11</b>						
plH11_728_871	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>	WP_032042744.1			93
plH11_1239_1358	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter</i>	ODN53020.1			92
plH11_1561_2490	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	WP_075041377.1	Rep_3	PF01051	98
plH11_2569_3087	DNA replication protein	<i>Wuchereria bancrofti</i>	EJW84558.1			98
plH11_4036_3401	hypothetical protein	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	WP_048258584.1			66
plH11_4463_4759	hypothetical protein	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	EEY94627.1	BrnT_toxin	PF04365	93
plH11_4752_5060	toxin-antitoxin system, antitoxin component	<i>Acinetobacter</i>	WP_061855757.1	BrnA_antitoxin	PF14384	94
plH11_5350_5144	hypothetical protein	<i>Acinetobacter indicus</i>	WP_016658911.1			88
plH11_7139_5355	hypothetical protein	<i>Acinetobacter indicus</i>	WP_016658912.1	ResIII_HSDR_N EcoR124_C Helicase_C	PF04851 PF00271	100
<b>plH12</b>						
plH12_924_772	transposase, IS4 family*	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	EEY88252.1	DDE_Tnp_1	PF01609	96
plH12_1395_1048	transposase, IS4-like family protein	<i>Acinetobacter</i>	EKU58513.1	DDE_Tnp_1_5	PF13737	95
plH12_1808_2059	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_046693319.1			100
plH12_2433_2597	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EJP40296.1			100
plH12_2584_3099	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_042053012.1			100
plH12_3385_3137	transcriptional regulator	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_042053014.1	HTH_3	PF01381	100

**Tabla A.1 (continuación)**

locus	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
pH12_3547_3663	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_042073964.1			82
pH12_4110_3892	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000906142.1			100
pH12_4509_4174	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_046693316.1			100
pH12_5850_6056	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_001121874.1			100
<b>pH13</b>						
pH13_770_1558	adenylyltransferase	<i>Acinetobacter parvus</i>	WP_050041693.1	NTP_transf_2	PF01909	100
pH13_3418_1604	relaxase/mobilisation nuclease domain protein, MobA	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	CTQ57091.1	Relaxase	PF03432	100
pH13_3809_3408	mobilization protein	<i>Acinetobacter parvus</i>	WP_050041694.1	MobC	PF05713	100
<b>pH14</b>						
pH14_309_112	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_057694191.1			98
pH14_1282_857	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_057694189.1			100
pH14_1689_1333	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_057694189.1	Zot	PF05707	100
pH14_2100_1825	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000527310.1			100
pH14_2485_2150	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000962997.1			96
pH14_3211_2609	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KQK32679.1			99
pH14_3655_3401	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_057694195.1			100
pH14_3854_3660	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000214842.1			100
pH14_4187_3942	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_057694194.1			100
pH14_4314_4502	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000622371.1			100
pH14_5484_4495	rolling circle replication protein, Rep63 protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KQK32674.1			99
<b>pH15</b>						
pH15_612_908	nucleotidyltransferase	<i>Gammaproteobacteria</i>	WP_006812575.1	NTP_transf_2	PF01909	100
pH15_905_1306	DUF86 domain-containing protein	<i>Proteobacteria</i>	WP_001293886.1	DUF86	PF01934	100
pH15_1296_1652	hypothetical protein	<i>Enterobacteriaceae</i>	WP_013279394.1	Cupin_2	PF07883	100
pH15_1907_2233	hypothetical protein	<i>Proteobacteria</i>	WP_003100858.1			100
pH15_2230_2730	hypothetical protein	<i>Proteobacteria</i>	WP_003100856.1			100
pH15_2727_3098	hypothetical protein	<i>Proteobacteria</i>	WP_003100853.1			100
pH15_3092_3649	DNA invertase	<i>Proteobacteria</i>	WP_003100847.1	Resolvase	PF00239	100
pH15_3686_4654	magnesium transporter	<i>Enterobacteriales</i>	WP_032640602.1	CorA	PF01544	100
pH15_4746_5318	hypothetical protein	<i>Proteobacteria</i>	WP_004099040.1			100
<b>pH16</b>						
pH16_764_231	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_033107830.1			100
pH16_1772_849	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_033107831.1	Rep_3	PF01051	100
pH16_3784_2348	Nickase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_033107832.1	MobA_MobL	PF03389	100
pH16_3955_4260	mobilization protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KQD09980.1			100
pH16_4278_4709	hypothetical protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii complex</i>	WP_000390052.1			100
pH16_5467_5006	septicolysin	<i>Acinetobacter baumannii</i>	YP_003208314.1			100
pH16_6059_5772	tonB dependent receptor family protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EXD79136.1	TonB_dep_Rec	PF00593	100
pH16_6498_6145	tonB dependent receptor family protein*	<i>Acinetobacter</i>	EXH20573.1	TonB_dep_Rec	PF00593	99
pH16_7818_6667	hypothetical protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_073885355.1	Plug	PF07715	100
pH16_8254_7946	toxin-antitoxin system, antitoxin component	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EKK14970.1	BrnA_antitoxin	PF14384	100
pH16_8534_8247	membrane protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii complex</i>	WP_000438826.1	BrnT_toxin	PF04365	100

**Tabla A.1 (continuación)**

<i>locus</i>	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
<b>pH17</b>						
pH17_548_718	CDS					
pH17_796_921	CDS					
pH17_8678_200	Rolling circle replication protein, Rep63 protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EMT93808.1			86
<b>pH18</b>						
pH18_212_21	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CAP02975.1			100
pH18_1622_2551	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	WP_005133531.1	Rep_3	PF01051	100
pH18_2630_3154	DNA replication protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KQK32652.1			100
pH18_3432_3950	Sel1 repeat protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EKK18212.1	Sel1	PF08238	100
<b>pH19</b>						
pH19_488_1675	rolling circle replication protein, Rep63 protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_057078279.1			100
pH19_1665_1910	hypothetical protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_003115283.1			100

\*Secuencia parcial

**Tabla A.2 Scaffolds remanentes no ensamblados**

<i>Scaffold</i>	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	N° Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
Remaining_Scaffolds_1	resolvase/site-specific recombinase	<i>Acinetobacter</i>	WP_015060246.1	Resolvase	PF00239	100
Remaining_Scaffolds_2	Mph(E) family macrolide 2'-phosphotransferase	<i>Gammaproteobacteria</i>	WP_000155092.1	APH	PF01636	100
Remaining_Scaffolds_3	macrolide efflux protein	<i>Citrobacter freundii</i>	NP_775053.1	ABC_tran ABC_tran_Xtn	PF00005 PF12848	100
Remaining_Scaffolds_6	Beta-lactamase class D	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AGQ08547.1	Transpeptidase	PF00905	100
Remaining_Scaffolds_8	Transcriptional regulator, AraC family	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ABO33300.1	AraC_binding	PF02311	100
Remaining_Scaffolds_9	Transporter, LysE family	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KKD17561.1	LysE	PF01810	100
Remaining_Scaffolds_10	integrase core domain protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	EKU50693.1	rve	PF00665	100
Remaining_Scaffolds_11	Transposase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_008942598.1			100
Remaining_Scaffolds_12	Phosphoglucosamine mutase	<i>Bacteria</i>	WP_000251875.1	PGM_PMM_I	PF02878	100
Remaining_Scaffolds_14	Dihydropteroate synthase	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ACE62788.1	Pterin_bind	PF00809	100
Remaining_Scaffolds_19	Tn3 family Transposase	<i>Enterobacterales</i>	WP_001553819.1	DDE_Tnp_Tn3	PF01526	100
Remaining_Scaffolds_24	DNA replication protein*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KNX83973.1			100
Remaining_Scaffolds_25	RepB family plasmid replication initiator protein	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_071243275.1	Rep_3	PF01051	100
Remaining_Scaffolds_32	IS630 family transposase	<i>Enterobacterales</i>	WP_040113301.1	DDE_3	PF13358	100
Remaining_Scaffolds_33	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase	<i>Proteobacteria</i>	WP_004099035.1	SelR	PF01641	100
Remaining_Scaffolds_35	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	<i>Proteobacteria</i>	WP_004099036.1	PMSR	PF01625	100
Remaining_Scaffolds_34	Glutathione S-transferase	<i>Citrobacter freundii</i>	WP_071697937.1	GST_N	PF02798	100
Remaining_Scaffolds_37	Aminoglycoside N(3')-acetyltransferase*	<i>Citrobacter freundii</i>	OIZ48375.1	Antibiotic_NAT	PF02522	98
Remaining_Scaffolds_36	Aminoglycoside N(3')-acetyltransferase*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KOA01622.1	Antibiotic_NAT	PF02522	99
Remaining_Scaffolds_38	TEM family class A beta-lactamase	<i>Escherichia coli</i>	AMM70781.1	Beta-lactamase2	PF13354	100

\*Secuencia parcial

**Tabla A.2 (continuación)**

Scaffold	Nombre de homólogo mas cercano	Familia/Género/Especie	Nº Acceso	Nombre Pfam	Código Pfam	% Identidad
Remaining_Scaffolds_39	Transposase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_072071487.1	HTH_7	PF02796	96
Remaining_Scaffolds_40	IS6 family transposase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_031964908.1	DDE_Tnp_IS240	PF13610	100
Remaining_Scaffolds_48	transposase for transposon Tn21	<i>Enterobacter</i>	EUM83599.1	DDE_Tnp_Tn3	PF01526	100

\*Secuencia parcial

**Tabla A.3 Contigs plasmídicos de secuenciación ambiental**

Contig	Tamaño (pb)	ORFs	R	M	C	MGE	RS	MURR	HP	OTRAS
C002	30093	27	1	2		2			6	16
C003	20868	22		2					3	17
C006	889	2				2				
C030	11721	12			8				4	
C033	1136	1		1						
C034	1004	2		1					1	
C038	8644	5			2				2	1
C039	16756	21		2			2	2	8	7
C046	13445	16			2				11	3
C047	2466	1			1					
C048	3206	3			3					
C049	4065	4			2				2	
C050	13843	17		2	1		1		12	1
C052	19265	23		2		1	5		9	6
C057	20866	21			8		4		8	1
C058	6359	5		1					4	
C059	13881	11			2			3	5	1
C060	10049	14		3				1	10	
C063	3891	4			2				2	
C064	3201	3			3					
C065	2469	1			1					
C066	30076	29		2	3		2	3	17	2
C069	4361	6	1	1		1			3	
C070	6566	10		2		1			4	3
C072	4321	6	1	1		2			2	
C075	2414	3		2						1
C095	6847	9	1			1		1	6	
C096	8773	8	1	1		1			5	
C097	1387	3		2						1
C099	4849	8		2				1	5	
C100	1725	3		1					1	1
C101	6068	9		2				1	4	2
C102	9053	7	1						5	1
C108	8600	13		2				1	4	6
C109	10491	11	1						9	1
C112	5427	8			2				4	2
C122	19378	23	1	3		5		3	6	5
C127	12284	13			1			3	8	1
C135	14368	10		1	1	1			6	1
C136	929	1		1						
C148	5757	7	1	3					2	1

R:Replicación; M:Mantenimiento (PAR-TA); C:Conjugación; MGE:otros MGE (IS-Transposasas); RS:Resistencia; MURR:Modificación /Unión /Restricción /Recombinación de ADN; HP:Proteínas Hipotéticas

**Tabla A.3 (continuación)**

Contig	Tamaño (pb)	ORFs	R	M	C	MGE	RS	MURR	HP	OTRAS
C158	10731	12	1					2	8	1
C159	6609	11		2	1			1	6	1
C161	5860	7			1				4	2
C171	6403	6	1					1	4	
C178	2038	5		2					3	
C179	8018	11	1						10	
C180	1992	4		1				1	2	
C188	6347	5			1				3	1
C190	9238	11	1						10	
C211	4718	6	1					1	3	1
C212	4881	8		2					5	1
C214	9126	10		3	1	2			3	1
C226	6412	9		2		3	2		1	1
C230	10183	10	1		1				7	1
C231	7597	11			2				9	
C239	2092	1		1						
C241	779	1	1							
C250	5856	7	1					1	5	
C252	2190	3		2					1	
C272	5162	5	1	2					1	1
C281	3810	7		2					2	3
C289	8300	12	1					1	9	1
C290	2213	2	1						1	
C294	5433	6	1		1		1		3	
C300	2395	6		2					3	1
C303	4550	6		1	1				4	
C304	4076	7		1		2	2		1	1
C309	4002	9		2					6	1
C334	5523	7	1					1	5	
C338	2093	1		1						
C342	2583	2	1						1	
C360	1298	2			1				1	
C426	1491	1	1							
C465	1136	1		1						
C525	780	1	1							
C681	335	1		1						

R:Replicación; M:Mantenimiento (PAR-TA); C:Conjugación; MGE:otros MGE (IS-Transposasas); RS:Resistencia; MURR:Modificación /Unión /Restricción /Recombinación de ADN; HP:Proteínas Hipotéticas

**Tabla A.4 Proteínas MURR homólogas en contigs plasmídicos ambientales**

CONTIG	NOMBRE	GENERO/ESPECIE	Nº ACCESO	PFAM	NºPFAM	% IDENTIDAD
C039	DNA replication primase*	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	WP_004282024.1			94
	Hypothetical protein	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	WP_005105839.1	Resolvase	pfam00239	97
C059	N-6 DNA methylase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_017817001.1	N6_Mtase	pfam02384	46
	Hypothetical protein	<i>Methylosarcina fibrata</i>	WP_020565900.1	Topoisom_bac Toprim	pfam01131 pfam01751	40
	DNA-binding protein*	<i>Acinetobacter sp. MDS7A</i>	WP_019838112.1	Histone_HNS	pfam00816	61
C060	Resolvase	<i>Acinetobacter sp. Ver3</i>	EZQ01475.1	Resolvase HTH_7	pfam00239 pfam02796	94

\*Secuencia parcial

**Tabla A.4 (continuación)**

CONTIG	NOMBRE	GENERO/ESPECIE	N° ACCESO	PFAM	N°PFAM	% IDENTIDAD
C066	Adenine specific DNA methylase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_000379077.1	N6_N4_Mtase TypeIII_RM_meth	pfam01555 pfam12564	60
	Hypothetical protein	<i>uncultured bacterium</i>	WP_015060299.1	ResIII	pfam04851	95
	Resolvase	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	CEI50949.1	Resolvase	pfam00239	98
C095	Resolvase	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	WP_004827232.1	Resolvase HTH_7	pfam00239 pfam02796	97
C099	AraC family Transcriptional regulator	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	WP_004637133.1	DJ-1_Pfpl HTH_AraC	pfam01965 pfam00165	100
C101	CinH (plasmid)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ABQ23515.1	Resolvase HTH_7	pfam00239 pfam02796	99
C108	Transcriptional regulator	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_005129404.1	HTH_31	pfam13560	86
C122	Hypothetical protein	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	WP_005105839.1	Resolvase	pfam00239	98
	Hypothetical protein	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	WP_065343442.1	UvrD-helicase	pfam00580	66
	ATP-dependent endonuclease	<i>Acinetobacter junii</i>	WP_004908599.1	AAA_15	pfam13175	76
C127	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase	<i>Providencia sneebia</i>	WP_008916983.1	DNA_methylase	pfam00145	87
	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase	<i>Providencia sneebia</i>	WP_008916985.1	DNA_methylase	pfam00145	91
	Retron-type reverse transcriptase (plasmid)	<i>Acinetobacter baumannii ACICU</i>	ACC59006.1	RVT_1	pfam00078	88
C158	Integrase	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_068547255.1	ntegrase_1 Phage_int_SAM_2	pfam12835 pfam12834	99
	Hypothetical protein	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	WP_004648508.1	Exo_endo_phos	pfam03372	96
C159	Transcriptional regulator*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_032051878.1	-	-	71
C171	Resolvase	<i>Acinetobacter</i>	WP_004641851.1	Resolvase	pfam00239	86
C180	Resolvase	<i>Acinetobacter sp. NIPH 713</i>	WP_034608914.1	Resolvase HTH_7	pfam00239 pfam02796	100
C211	Transcriptional regulator*	<i>Thauera</i>	WP_002925881.1	HTH_3	pfam01381	93
C250	Resolvase	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	WP_004827232.1	Resolvase HTH_7	pfam00239 pfam02796	94
C289	Transcriptional regulator	<i>Acinetobacter</i>	WP_005175518.1	HTH_19	pfam12844	71
C334	Resolvase	<i>Acinetobacter</i>	WP_005404813.1	Resolvase HTH_38	pfam00239 pfam13936	72

Tabla A.5 Proteínas de resistencia homólogas en contigs plasmídicos ambientales

CONTIG	NOMBRE	GENERO/ESPECIE	N° ACCESO	NOMBRE PFAM	N° PFAM	% IDENTIDAD
C039	MFS transporter	<i>Paraburkholderia andropogonis</i>	WP_046152696.1	MFS_1	pfam07690	41
	Membrane fusion protein, multidrug efflux system	<i>Rhizobium loessense</i>	SCW46798.1	HlyD	pfam00529	34
C050	DNA-directed DNA polymerase* (UmuC)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	WP_005407466.1	DUF4113	pfam13438	86
C052	Arsenical resistance protein ArsH	<i>Acinetobacter</i>	WP_034583466.1	FMN_red	pfam03358	97
	Cation transporter (Co, Zn, Cd efflux)	<i>Acinetobacter towneri</i>	WP_070153973.1	Cation_efflux	pfam01545	80
	Cd(II)/Pb(II)-responsive transcriptional regulator	<i>Acinetobacter calcoaceticus /baumannii complex</i>	WP_024436134.1	MerR_1	pfam13411	79
	MarR family transcriptional regulator	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	WP_014914353.1	MarR	pfam01047	97
	TetR family transcriptional regulator	<i>Halotalea alkalilenta</i>	WP_052364809.1	TetR_N	pfam00440	57
C057	Hypothetical protein (EmrA)	<i>Acinetobacter schindleri</i>	WP_004894705.1	HlyD	pfam00529	99
	MFS transporter (EmrB)	<i>Acinetobacter schindleri</i>	WP_004894703.1	MFS_1	pfam07690	99
	Multidrug transporter	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_046813591.1	OEP	pfam02321	98
	TetR family transcriptional regulator	<i>Acinetobacter pittii</i>	WP_046813592.1	TetR_N TetR_C_7 TetR_C_11	pfam00440 pfam14246 pfam16859	99
C066	DNA polymerase V (UmuD)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_050049562.1			99
	ImpB/MucB/SamB family protein (UmuC)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	EJO33795.1	IMS	pfam00817	97
C226	Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator	<i>Acinetobacter sp.</i>	YP_009067222.1	MarR	pfam01047	100
	Organic hydroperoxide resistance protein	<i>Acinetobacter gernerii</i>	EPR85294.1	OsmC	pfam02566	100
C294	Streptomycin 3-adenylyltransferase	<i>Acinetobacter sp.</i>	SEP07623.1	NTP_transf_2	pfam01909	100
C304	Copper resistance protein B	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	WP_017395661.1	CopB	pfam05275	99
	Copper oxidase	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	WP_017395660.1	Cu-oxidase_2	pfam07731	96

\*Secuencia parcial

Tabla A.6 Proteínas Rep\_3 de *Acinetobacter* spp. de base de datos utilizadas para construcción del árbol filogenético

Proteína	Nº Acceso	Plásmido	Género/especie	Proteína	Nº Acceso	Plásmido	Género/especie
Rep_3	WP_000818857.1	p6200-114.848	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000987942	pNaval17-13	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_038350249	p6200-9.327	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_002011482.1	pNaval18-8.4	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_001208776.1	pCS01C	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000185726.1	pNaval81-26(a)	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_001208776.1	IV(CR17)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_001208779	pNaval81-26(b)	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_000534216.1	pIOMTU433	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000987942	pNaval81-13	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_001205343	pA1-1	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000818857	pOIFC032-101	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_001205343.1	p2AB5075	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000711927.1	pOIFC143-2.3	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_000818857.1	pAB386	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000845851	pOIFC143-6.2	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_000534216.1	pAB04-1	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000818857	pOIFC189-111	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_000743064.1	pAB3	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_001205343	pPKAB07	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_000845851.1	pCMC8300(a)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	CAP02936.1	p1ABSDF	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_005804946.1	pCMC8300(b)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	CAP02944.1	p2ABSDF(a)	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_213946.1	pMAC	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	CAP02966	p2ABSDF(b)	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_001736296.1	pABIR	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	CAP02976	p3ABSDF(a)	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_002967453.1	pABVA01	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	CAP02983.1	p3ABSDF(b)	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_003293957	pMMCU2	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	CAP02992	p3ABSDF(c)	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_006960403	pMMCU3	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	ADX94286	p1ABTCD0715	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_006961790.1	pMMD	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000095317	pABUH5-114	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_006964864	pAB120	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_032021082.1	pABUH2a-5.6	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_008090880.1	pAB-NCGM253	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_005804946.1	pABUH3b-7.8	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_008658574	p1ABIBUN	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000818857	pABUH4-111	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_009066530	pA85-2cloneGC1	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_001208778.1	pABUH6b-10	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_009066626	pAB-G7-1	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_005804946.1	pABUH3a-8.2	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	YP_009070331.1	AbATCC329	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_004282236.1	pABUH2b-5.4	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_001205343	pD36-3	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_001205343.1	pABUH6a-8.8	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_000140303	pD36-4(a)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000818856	ZW85p2	<i>A. baumannii</i>
Rep_3	WP_000786839	pD36-4(b)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_003090213.1	pMMCU1	<i>A. calcoaceticus</i>
Rep_3	WP_002124966	II(CIP70.10)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000064928.1	pXM2	<i>A. calcoaceticus</i>
Rep_3	WP_002124966	II(R2091)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_049068997.1	pXBB1-9	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	WP_001205343	p1ABST78	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_058952620.1	pXBB1-1	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	WP_001205343	p2ABST2(a)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_058952625	pXBB1-2	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	WP_000845976.1	p2ABST2(b)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_058952636	pXBB1-3	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	WP_001205343	pAB0057	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_001205341	pXBB1-4	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	WP_001205343	pAB5075	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_006582659.1	pXBB1-5	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	AHX30527	pAC12	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_058952649.1	pXBB1-6	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	AHX67213	pAC30a	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_004637173.1	pXBB1-8	<i>A. johnsonii</i>
Rep_3	WP_001205343	pACICU1(a)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_000064928	p6411-89.111	<i>A. nosocomialis</i>
Rep_3	WP_000845976	pACICU1(b)	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_050049553	p6411-66.409(a)	<i>A. nosocomialis</i>
Rep_3	ABO13860.1	pAB1	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_050049564	p6411-66.409(b)	<i>A. nosocomialis</i>
Rep_3	ABO13861	pAB2	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_009068008	pMS32-3	<i>A. pittii</i>
Rep_3	WP_001031297	p1ABAYE	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_009070446	pMS32-1	<i>A. pittii</i>
Rep_3	WP_001205343	p2ABAYE	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_005407388	pWCA157-7.5	<i>A. radioresistens</i>
Rep_3	WP_000064928	p3ABAYE	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_005108939	pWCA157-71(a)	<i>A. radioresistens</i>
Rep_3	WP_000534216	p2BJAB07104	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_004782596.1	pWCA157-71(b)	<i>A. radioresistens</i>
Rep_3	WP_001205343	p1BJAB0868	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_005407445	pWCA157-53	<i>A. radioresistens</i>
Rep_3	WP_000534216	p3BJAB0868	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_009067182	pM131-8	<i>Acinetobacter</i> sp.
Rep_3	WP_001205343	pCanadaBC5-8.7	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_009067189	pM131-6	<i>Acinetobacter</i> sp.
Rep_3	WP_000845851	pD1279779	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_009067213	pM131-3	<i>Acinetobacter</i> sp.
Rep_3	WP_001208779	pI5123-12	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_009070345	pM131-5	<i>Acinetobacter</i> sp.
Rep_3	WP_000185725	pI5123-18	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_009070355	pM131-2	<i>Acinetobacter</i> sp.
Rep_3	WP_000845851	pABLAC1	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_001661463	pAV1	<i>A. venetianus</i>
Rep_3	WP_000818857	pABTJ2	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	YP_001661474	pAV2	<i>A. venetianus</i>
Rep_3	WP_000534216	pMDR-ZI06	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_002046604	pAV3(a)	<i>A. venetianus</i>
Rep_3	WP_001205343	pMRSN58-8.7	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_019383599	pAV3(b)	<i>A. venetianus</i>
Rep_3	WP_001205343	pMRSN7339-8.7	<i>A. baumannii</i>	Rep_3	WP_005155758.1	pAV3(c)	<i>A. venetianus</i>





# **Referencias Bibliográficas**

1. Abascal F, Zardoya R & Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105.
2. Actis LA, Tolmasky ME & Crosa JH (1999) Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci* **4**: D43-D62.
3. Adams MD, Chan ER, Molyneaux ND & Bonomo RA (2010) Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 3569-3577.
4. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, MacDonald IJ, Martin KM, Russo T & Campagnari AA (2008) Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology* **190**: 8053-8064.
5. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403-410.
6. Alvarez-Martinez CE & Christie PJ (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808.
7. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM & Kubal M (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics* **9**: 1.
8. Banfalvi Z, Sakanyan V & Koncz C (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Molecular and General Genetics* **184**: 318-325.
9. Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, *et al.* (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9883-9888.
10. Basta T, Keck A, Klein J & Stolz A (2004) Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *Journal of Bacteriology* **186**: 3862-3872.
11. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S & Sonnhammer EL (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* **32**: D138-D141.
12. Baumann P (1968) Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *Journal of bacteriology* **96**: 39-42.
13. Baxter JC & Funnell BE (2014) Plasmid partition mechanisms. *Microbiology spectrum* **2**.
14. Bay DC & Turner RJ (2012) Small multidrug resistance protein EmrE reduces host pH and osmotic tolerance to metabolic quaternary cation osmoprotectants. *Journal of bacteriology* **194**: 5941-5948.
15. Bergogne-Berezin E & Towner K (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews* **9**: 148.
16. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P & Carattoli A (2010) Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 4168-4177.
17. Blower TR, Short FL, Rao F, Mizuguchi K, Pei XY, Fineran PC, Luisi BF & Salmond GP (2012) Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic acids research* **40**: 6158-6173.
18. Bouet JY, Nordström K & Lane D (2007) Plasmid partition and incompatibility—the focus shifts. *Molecular microbiology* **65**: 1405-1414.
19. Boyer HW & Roulland-dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **41**: 459-472.

20. Brantl S (2012) Bacterial type I toxin-antitoxin systems. p.^pp. Taylor & Francis.
21. Brantl S (2014) Plasmid replication control by antisense RNAs. *Microbiology spectrum* **2**.
22. Campos-Guillén J, Pérez JC, Medina JAC, Vera CM, Rosas LMS, Gutiérrez CL, Salinas IG, Ramírez MRH, Alonso GS & Hernández AC (2014) Draft genome sequence of the mercury-resistant bacterium *Acinetobacter idrijaensis* strain MII, isolated from a mine-impacted area, Idrija, Slovenia. *Genome announcements* **2**: e01177-01114.
23. Carattoli A (2009) Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 2227–2238.
24. Carattoli A (2013) Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* **303**: 298-304.
25. Carraro N, Rivard N, Ceccarelli D, Colwell RR & Burrus V (2016) IncA/C conjugative plasmids mobilize a new family of multidrug resistance islands in clinical *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolates from Haiti. *MBio* **7**: e00509-00516.
26. Chan WT, Espinosa M & Yeo CC (2016) Keeping the wolves at bay: antitoxins of prokaryotic type II toxin-antitoxin systems. *Frontiers in molecular biosciences* **3**.
27. Chang D-H, Rhee M-S, Jeong H, Kim S & Kim B-C (2015) Draft Genome Sequence of *Acinetobacter* sp. HR7, Isolated from Hanwoo, Korean Native Cattle. *Genome announcements* **3**: e01358-01314.
28. Chang H-H, Cohen T, Grad YH, Hanage WP, O'Brien TF & Lipsitch M (2015) Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**: 101-116.
29. Chen L, Hu H, Chavda KD, Zhao S, Liu R, Liang H, Zhang W, Wang X, Jacobs MR & Bonomo RA (2014) Complete sequence of a KPC-producing IncN multidrug-resistant plasmid from an epidemic *Escherichia coli* sequence type 131 strain in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**: 2422-2425.
30. Christie PJ & Cascales E (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* **22**: 51-61.
31. Chuang Y-C, Cheng C-Y, Sheng W-H, Sun H-Y, Wang J-T, Chen Y-C & Chang S-C (2014) Effectiveness of tigecycline-based versus colistin-based therapy for treatment of pneumonia caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a critical setting: a matched cohort analysis. *BMC infectious diseases* **14**: 102.
32. Clark NM, Zhanel GG & Lynch III JP (2016) Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat. *Current opinion in critical care* **22**: 491-499.
33. Crozat E, Fournes F, Cornet F, Hallet B & Rousseau P (2015) Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, p.^pp. 157-173. American Society of Microbiology.
34. Da Silva GJ & Domingues S (2016) Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms* **4**: 29.
35. Datta N & Hedges R (1972) Host ranges of R factors. *Microbiology* **70**: 453-460.
36. de la Cruz F & Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* **8**: 128-133.
37. de la Cruz F, Frost LS, Meyer RJ & Zechner EL (2009) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*
38. de la Cruz NB, Weinreich MD, Wiegand TW, Krebs MP & Reznikoff WS (1993) Characterization of the Tn5 transposase and inhibitor proteins: a model for the inhibition of transposition. *J Bacteriol* **175**: 6932-6938.

39. Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M & Díaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews* **62**: 434-464.
40. Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O & Salzberg SL (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic acids research* **27**: 4636-4641.
41. Dib JR, Wagenknecht M, Hill RT, Farías ME & Meinhardt F (2010) Novel linear megaplasmid from *Brevibacterium* sp. isolated from extreme environment. *Journal of basic microbiology* **50**: 280-284.
42. Dobiasova H, Videnska P & Dolejska M (2016) Complete sequences of IncU plasmids harboring quinolone resistance genes qnrS2 and aac (6')-Ib-cr in *Aeromonas* spp. from ornamental fish. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**: 653-657.
43. Dobiasova H, Kutilova I, Piackova V, Vesely T, Cizek A & Dolejska M (2014) Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Veterinary microbiology* **171**: 413-421.
44. Dorsey CW, Tomaras AP & Actis LA (2006) Sequence and organization of pMAC, an *Acinetobacter baumannii* plasmid harboring genes involved in organic peroxide resistance. *Plasmid* **56**: 112-123.
45. Drolet M, Zanga P & Lau P (1990) The mobilization and origin of transfer regions of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid: relatedness to plasmids RSF1010 and pSC101. *Molecular microbiology* **4**: 1381-1391.
46. Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
47. Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* **5**: 113.
48. Eldholm V, Monteserin J, Rieux A, Lopez B, Sobkowiak B, Ritacco V & Balloux F (2015) Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. *Nature communications* **6**.
49. Farrugia DN, Elbourne LD, Hassan KA, Eijkelkamp BA, Tetu SG, Brown MH, Shah BS, Peleg AY, Mabbutt BC & Paulsen IT (2013) The complete genome and phenome of a community-acquired *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* **8**: e58628.
50. Fernández-García L, Blasco L, Lopez M, Bou G, García-Contreras R, Wood T & Tomas M (2016) Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins* **8**: 227.
51. Fondi M, Bacci G, Brillì M, Papaleo MC, Mengoni A, Vanechoutte M, Dijkshoorn L & Fani R (2010) Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC evolutionary biology* **10**: 59.
52. Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C & De La Cruz F (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 79-100.
53. Frost LS, Leplae R, Summers AO & Toussaint A (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.
54. Fulsundar S, Harms K, Flaten GE, Johnsen PJ, Chopade BA & Nielsen KM (2014) Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Applied and environmental microbiology* **80**: 3469-3483.
55. Gan HM, Lean S-S, Suhaili Z, Thong K-L & Yeo CC (2012) Genome sequence of *Acinetobacter baumannii* AC12, a polymyxin-resistant strain isolated from Terengganu, Malaysia. *Journal of bacteriology* **194**: 5979-5980.
56. Garcillán-Barcia MP, Francia MV & de la Cruz F (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 657-687.

57. Garcillán-Barcia MP & de la Cruz F (2013) Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation. *Mobile genetic elements* **3**: e40438.
58. Gaudin M, Gauliard E, Schouten S, Houel-Renault L, Lenormand P, Marguet E & Forterre P (2013) Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA. *Environmental microbiology reports* **5**: 109-116.
59. Gerdes K, Møller-Jensen J & Jensen RB (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Molecular microbiology* **37**: 455-466.
60. Getino M, Fernández-López R, Palencia-Gándara C, Campos-Gómez J, Sánchez-López JM, Martínez M, Fernández A & de la Cruz F (2016) Tanzawaic acids, a chemically novel set of bacterial conjugation inhibitors. *PLoS one* **11**: e0148098.
61. Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK & Ahn Y (2016) Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in Microbiology* **7**.
62. Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, Amato G, Brisse S, Triassi M & Utili R (2010) Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *Journal of clinical microbiology* **48**: 1223-1230.
63. Gifford B, Tucci J, McIlroy SJ & Petrovski S (2014) Isolation and characterization of two plasmids in a clinical *Acinetobacter nosocomialis* strain. *BMC research notes* **7**: 732.
64. Gonzalez-Perez B, Lucas M, Cooke LA, Vyle JS, de la Cruz F & Moncalian G (2007) Analysis of DNA processing reactions in bacterial conjugation by using suicide oligonucleotides. *EMBO J* **26**: 3847-3857.
65. Gordon D, Abajian C & Green P (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research* **8**: 195-202.
66. Gotz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R, Tschape H, van Elsas JD & Smalla K (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2621-2628.
67. Guasch A, Lucas M, Moncalián G, Cabezas M, Pérez-Luque R, Gomis-Rüth FX, De la Cruz F & Coll M (2003) Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nature Structural & Molecular Biology* **10**: 1002-1010.
68. Guindon S, Delsuc F, Dufayard J-F & Gascuel O (2009) Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Bioinformatics for DNA sequence analysis* 113-137.
69. Guynet C, Cuevas A, Moncalián G & de la Cruz F (2011) The *stb* operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS Genet* **7**: e1002073.
70. Halachev MR, Chan JZ, Constantinidou CI, Cumley N, Bradley C, Smith-Banks M, Oppenheim B & Pallen MJ (2014) Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Birmingham, England. *Genome medicine* **6**: 70.
71. Hale TL (1991) Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiological reviews* **55**: 206-224.
72. Hamidian M & Hall RM (2014) pACICU2 is a conjugative plasmid of *Acinetobacter* carrying the aminoglycoside resistance transposon TnaphA6. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**: 1146-1148.
73. Hamidian M, Nigro SJ & Hall RM (2012) Variants of the gentamicin and tobramycin resistance plasmid pRAY are widely distributed in *Acinetobacter*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* dks318.
74. Hamidian M, Hawkey J, Holt KE & Hall RM (2015) Genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain D36, an antibiotic-resistant isolate from lineage 2 of global clone 1. *Genome announcements* **3**: e01478-01415.

75. Hamidian M, Kenyon JJ, Holt KE, Pickard D & Hall RM (2014) A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* dku188.
76. Hamidian M, Holt KE, Pickard D, Dougan G & Hall RM (2014) A GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate carrying AbaR3 and the aminoglycoside resistance transposon TnaphA6 in a conjugative plasmid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**: 955-958.
77. Hanif F, Sattar A, Ahmed Z, Abbasi SA, Ikram A & Sattar A (2016) INVESTIGATION OF A NOSOCOMIAL OUTBREAK BY PAN-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*. *Pakistan Journal of Pathology* **21**.
78. Hayakawa T, Tanaka T, Sakaguchi K, Otake N & Yonehara H (1979) A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics. *The Journal of General and Applied Microbiology* **25**: 255-260.
79. Heaton BE, Herrou J, Blackwell AE, Wysocki VH & Crosson S (2012) Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin-antitoxin system of *Brucella abortus*. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 12098-12110.
80. Herigstad B, Hamilton M & Heersink J (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods* **44**: 121-129.
81. Hernández-Arriaga AM, Chan WT, Espinosa M & Díaz-Orejas R (2014) Conditional activation of toxin-antitoxin systems: postsegregational killing and beyond. *Microbiology spectrum* **2**.
82. Hishinuma F & Hirai K (1991) Genome organization of the linear plasmid, pSKL, isolated from *Saccharomyces kluyveri*. *Molecular and General Genetics MGG* **226**: 97-106.
83. Huang T-W, Lauderdale T-L, Liao T-L, Hsu M-C, Chang F-Y, Chang S-C, Khong WX, Ng OT, Chen Y-T & Kuo S-C (2015) Effective transfer of a 47 kb NDM-1-positive plasmid among *Acinetobacter* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**: 2734-2738.
84. Iguchi A, Nagaya Y, Pradel E, Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Kurokawa K, Oshima K, Hattori M & Parkhill J (2014) Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome biology and evolution* **6**: 2096-2110.
85. Imperi F, Antunes L, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P & Carattoli A (2011) The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB life* **63**: 1068-1074.
86. Iyer R & Damania A (2016) Draft genome sequence of alkane-degrading *Acinetobacter venetianus* JKSF02, isolated from contaminated sediment of the San Jacinto River in Houston, Texas. *Genome announcements* **4**: e00286-00216.
87. J Sambrook DR Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition).
88. Jain A & Srivastava P (2013) Broad host range plasmids. *FEMS microbiology letters* **348**: 87-96.
89. Jawad A, Hawkey P, Heritage J & Snelling A (1994) Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *Journal of clinical microbiology* **32**: 2353-2358.
90. Jean S-S & Hsueh P-R (2011) Current review of antimicrobial treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant pathogens. *Expert opinion on pharmacotherapy* **12**: 2145-2148.
91. Jobanputra R & Datta N (1974) Trimethoprim R factors in enterobacteria from clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology* **7**: 169-177.
92. Johnsborg O, Eldholm V & Håvarstein LS (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in microbiology* **158**: 767-778.
93. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P & Claverys J-P (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 181-196.

94. Jouanin L, De Lajudie P, Bazetoux S & Huguet T (1981) DNA sequence homology in *Rhizobium meliloti* plasmids. *Mol Gen Genet* **182**: 189-195.
95. Jurėnaitė M, Markuckas A & Sužiedėlienė E (2013) Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology* **195**: 3165-3172.
96. Kasimatis G, Fitz-Gibbon S, Tomida S, Wong M & Li H (2013) Analysis of complete genomes of *Propionibacterium acnes* reveals a novel plasmid and increased pseudogenes in an acne associated strain. *BioMed research international* **2013**.
97. Kempf M & Rolain J-M (2012) Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International journal of antimicrobial agents* **39**: 105-114.
98. Kessler B, de Lorenzo V & Timmis KN (1992) A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
99. Khan SA (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 442-455.
100. Kieser T (1984) Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**: 19-36.
101. Kim M, Kim S & Ryu S (2012) Complete genome sequence of bacteriophage SSU5 specific for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* rough strains. *Journal of virology* **86**: 10894-10894
102. Kittell BL & Helinski DR (1993) Plasmid incompatibility and replication control. *Bacterial conjugation*, p. 223-242. Springer.
103. Kondorosi A, Kondorosi E, Pankhurst CE, Broughton WJ & Banfalvi Z (1982) Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet* **188**: 433-439.
104. Konieczny I, Bury K, Wawrzycka A & Wegrzyn K (2014) Iteron plasmids. *Microbiology spectrum* **2**.
105. Krüger NJ & Stingl K (2011) Two steps away from novelty—principles of bacterial DNA uptake. *Molecular microbiology* **80**: 860-867.
106. Kurakov A, Mindlin S, Beletsky A, Shcherbatova N, Rakitin A, Ermakova A, Mardanov A & Petrova M (2016) The ancient small mobilizable plasmid pALWED1. 8 harboring a new variant of the non-cassette streptomycin/spectinomycin resistance gene *aadA27*. *Plasmid* **84**: 36-43.
107. Langdon WB (2015) Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData mining* **8**: 1.
108. Lanka E & Wilkins BM (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu Rev Biochem* **64**: 141-169.
109. Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A & Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics* **23**: 2947-2948.
110. Lederberg J (1952) Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol Rev* **32**: 403-430.
111. Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CKD, Guimarães T, Rizek C, Levin AS & Costa SF (2016) Antimicrobial combinations against pan-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with different resistance mechanisms. *PloS one* **11**: e0151270.
112. Li P, Yang C, Xie J, Liu N, Wang H, Zhang L, Wang X, Wang Y, Qiu S & Song H (2015) *Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring bla NDM-1 on a widely distributed plasmid. *BMC infectious diseases* **15**: 131.
113. Lilly J & Camps M (2015) Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiology spectrum* **3**.

114. Liu L-L, Ji S-J, Ruan Z, Fu Y, Fu Y-Q, Wang Y-F & Yu Y-S (2015) Dissemination of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. in China: main roles of conjugative plasmid pAZJ221 and transposon Tn2009. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**: 1998-2005.
115. Llosa M, Bolland S & Cruz F (1991) Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Molecular and General Genetics MGG* **226**: 473-483.
116. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M & Cruz Fdl (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular microbiology* **45**: 1-8.
117. Lopes B & Amyes S (2012) Role of ISAbal and ISAbal25 in governing the expression of blaADC in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* strains resistant to cephalosporins. *Journal of medical microbiology* **61**: 1103-1108.
118. M. Drolet PCKL (1992) Mobilization protein-DNA binding and divergent transcription at the transfer origin of the *Thiobacillus ferrooxidans* pTF1 plasmid. *Molecular Microbiology* **6**: 1061-1071.
119. M. Drolet PZaPCKL (1990) The mobilization and origin of transfer regions of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid: relatedness to plasmids RSF1010 and pSC101. *Molecular Microbiology* **4**: 1381-1391.
120. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, Harbarth S, Hindler J, Kahlmeter G & Olsson-Liljequist B (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection* **18**: 268-281.
121. Maier T, Klepel S, Renner U & Kostrzewa M (2006) Fast and reliable maldi-tof ms-based microorganism identification. *Nature Methods| Application Notes*.
122. Masuda H, Tan Q, Awano N, Wu KP & Inouye M (2012) YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **84**: 979-989.
123. Matsumura Y, Tanaka M, Yamamoto M, Nagao M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ogawa K, Yoshizawa A & Fujimoto Y (2015) High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during outbreaks in liver transplantation units. *International journal of antimicrobial agents* **45**: 33-40.
124. Mell JC & Redfield RJ (2014) Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *Journal of bacteriology* **196**: 1471-1483.
125. Mengoni A, Ricci S, Brillì M, Baldi F & Fani R (2007) Sequencing and analysis of plasmids pAV1 and pAV2 of *Acinetobacter venetianus* VE-C3 involved in diesel fuel degradation. *Annals of Microbiology* **57**: 521-526.
126. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F & Bou G (2010) OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 2724-2727.
127. Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O & Giegerich R (2003) GenDB—an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic acids research* **31**: 2187-2195.
128. Miller SC, Porcella SF, Raffel SJ, Schwan TG & Barbour AG (2013) Large linear plasmids of *Borrelia* species that cause relapsing fever. *Journal of bacteriology* **195**: 3629-3639.
129. Million-Weaver S & Camps M (2014) Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* **75**: 27-36.
130. Mishra SR, Ray L, Panda AN, Sahu N, Xess SS, Jadhao S, Suar M, Adhya TK, Rastogi G & Pattnaik AK (2016) Draft genome sequence of *Acinetobacter* sp. strain BMW17, a cellulolytic and



plant growth-promoting bacterium isolated from the rhizospheric region of *Phragmites karka* of Chilika Lake, India. *Genome Announcements* **4**: e00395-00316.

131. Mruk I & Kobayashi I (2013) To be or not to be: regulation of restriction–modification systems and other toxin–antitoxin systems. *Nucleic acids research* gkt711.

132. Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, *et al.* (2007) New developments in the InterPro database. *Nucleic Acids Res* **35**: D224-228.

133. Murray Re, Brenner DJ & Bryant MP (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins.

134. Nigro S & Hall RM (2015) Distribution of the blaOXA-23-containing transposons Tn2006 and Tn2008 in Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**: 2409-2411.

135. Nigro SJ & Hall RM (2014) Amikacin resistance plasmids in extensively antibiotic-resistant GC2 *Acinetobacter baumannii* from two Australian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**: 3435-3437.

136. Nigro SJ & Hall RM (2016) Loss and gain of aminoglycoside resistance in global clone 2 *Acinetobacter baumannii* in Australia via modification of genomic resistance islands and acquisition of plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* dkw176.

137. Nigro SJ, Holt KE, Pickard D & Hall RM (2015) Carbapenem and amikacin resistance on a large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**: 1259-1261.

138. Nishida H (2012) Comparative analyses of base compositions, DNA sizes, and dinucleotide frequency profiles in archaeal and bacterial chromosomes and plasmids. *International journal of evolutionary biology* **2012**.

139. Norman A, Hansen LH & Sørensen SJ (2009) Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 2275-2289.

140. Okonechnikov K, Golosova O & Fursov M (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **28**: 1166-1167.

141. Ou H-Y, Kuang SN, He X, Molgora BM, Ewing PJ, Deng Z, Osby M, Chen W & Xu HH (2015) Complete genome sequence of hypervirulent and outbreak-associated *Acinetobacter baumannii* strain LAC-4: epidemiology, resistance genetic determinants and potential virulence factors. *Scientific reports* **5**.

142. Pan T, Liu X, Xiang S & Ji W (2016) Treatment for patients with multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. *Experimental and therapeutic medicine* **11**: 1345-1347.

143. Partridge SR, Paulsen IT & Iredell JR (2012) pJIE137 carrying blaCTX-M-62 is closely related to p271A carrying blaNDM-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**: 2166-2168.

144. Picão RC, Poirel L, Demarta A, Silva CSF, Corvaglia AR, Petrini O & Nordmann P (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **62**: 948-950.

145. Poirel L, Bonnin RA & Nordmann P (2011) Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 4224-4229.

146. Pridmore RD (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**: 309-312.

147. R. Fernández-López MPG-B, C. Revilla, M. Lázaro, L. Vielva & F. de la Cruz (2006) Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 942–966.

148. Radolfova-Krizova L, Maixnerova M & Nemeč A (2016) *Acinetobacter pragensis* sp. nov., found in soil and water ecosystems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**: 3897-3903.
149. Ramirez MS, Don M, Merquier AK, Bistué AJS, Zorreguieta A, Centrón D & Tolmasky ME (2010) Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of clinical microbiology* **48**: 1488-1490.
150. Ramírez MS, Merquier AK, Quiroga MP & Centrón D (2012) *Acinetobacter baumannii* is able to gain and maintain a plasmid harbouring Inc35 found in Enterobacteriaceae isolates from Argentina. *Current microbiology* **64**: 211-213.
151. Ramsay JP, Kwong SM, Murphy RJ, Yui Eto K, Price KJ, Nguyen QT, O'Brien FG, Grubb WB, Coombs GW & Firth N (2016) An updated view of plasmid conjugation and mobilization in *Staphylococcus*. *Mobile genetic elements* **6**: e1208317.
152. Rao J, Susanti D, Mitkos M, Brima J, Baffoe-Bonnie A, Cotarelo M, Kerkering T & Mukhopadhyay B (2016) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*–plasmid-borne carbapenem and aminoglycoside co-resistance causing outbreak in Southwest Virginia. *International Journal of Infectious Diseases* **45**: 112-113.
153. Rawlings DE & Tietze E (2001) Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews* **65**: 481-496.
154. Razavi Nikoo H, Ardebili A & Mardaneh J Systematic Review of Antimicrobial Resistance of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates in Iran: An Update. *Microbial Drug Resistance*.
155. Regar RK, Gaur VK, Mishra G, Jadhao S, Kamthan M & Manickam N (2016) Draft genome sequence of *Acinetobacter baumannii* IITR88, a bacterium degrading indoles and other aromatic compounds. *Genome announcements* **4**: e00065-00016.
156. Rit K & Saha R (2012) Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection and their susceptibility patterns in a tertiary care hospital. *Nigerian Medical Journal* **53**: 126.
157. Rosenthal A, Coutelle O & Craxton M (1993) Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research* **21**: 173-174.
158. Ruiz-Masó JA, Machón C, Bordanaba-Ruiseco L, Espinosa M, Coll M & Del Solar G (2015) Plasmid rolling-circle replication. *Microbiology spectrum* **3**.
159. San Millan A, Peña-Miller R, Toll-Riera M, Halbert Z, McLean A, Cooper B & MacLean R (2014) Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nature communications* **5**.
160. Santajit S & Indrawattana N (2016) Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international* **2016**.
161. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
162. Scholz P, Haring V, Wittmann-Liebold B, Ashman K, Bagdasarian M & Scherzinger E (1989) Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* **75**: 271-288.
163. Schroder G & Lanka E (2005) The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* **54**: 1-25.
164. Schumacher MA (2008) Structural biology of plasmid partition: uncovering the molecular mechanisms of DNA segregation. *Biochemical Journal* **412**: 1-18.
165. Schumacher MA (2012) Bacterial plasmid partition machinery: a minimalist approach to survival. *Curr Opin Struct Biol* **22**: 72-79.

166. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, Fishbain J, Craft D, Riddell S & Lindler L (2007) An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clinical Infectious Diseases* **44**: 1577-1584.
167. Segal H & Elisha BG (1999) Characterization of the *Acinetobacter* plasmid, pRAY, and the identification of regulatory sequences upstream of an *aadB* gene cassette on this plasmid. *Plasmid* **42**: 60-66.
168. Sengupta M & Austin S (2011) Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infection and immunity* **79**: 2502-2509.
169. Sharma V & Lin J (2016) Draft genome sequence of phenol degrading *Acinetobacter* sp. Strain V2, isolated from oil contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*.
170. Shintani M, Sanchez ZK & Kimbara K (2015) Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology* **6**.
171. Simon R, Priefer U & Puhler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech* **1**: 784-791.
172. Smalla K, Haines AS, Jones K, Krogerrecklenfort E, Heuer H, Schloter M & Thomas CM (2006) Increased abundance of IncP-1beta plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1beta plasmids with a complex mer transposon as the sole accessory element. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7253-7259.
173. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP & de la Cruz F (2010) Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**: 434-452.
174. Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N & Wuertz S (2005) Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nat Rev Microbiol* **3**: 700-710.
175. Spaková T, Fecskeová LK, Javorský P & Pristas P (2013) Two Rep Genes in Small Cryptic Plasmid pKST21 of *Escherichia coli*. *Current microbiology* **67**: 437-441.
176. Sullivan MJ, Petty NK & Beatson SA (2011) Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **27**: 1009-1010.
177. Summers DK, Beton CW & Withers HL (1993) Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Molecular microbiology* **8**: 1031-1038.
178. Szmolka A, Lestár B, Pászti J, Fekete PZ & Nagy B (2015) Conjugative IncF and IncI1 plasmids with tet (A) and class 1 integron conferring multidrug resistance in F18+ porcine enterotoxigenic *E. coli*. *Acta Veterinaria Hungarica* **63**: 425-443.
179. Tabone M, Lioy VS, Ayora S, Machón C & Alonso JC (2014) Role of toxin  $\zeta$  and starvation responses in the sensitivity to antimicrobials. *PLoS one* **9**: e86615.
180. Torres Tejerizo G, Pistorio M, Althabegoiti MJ, Cervantes L, Wibberg D, Schlüter A, Pühler A, Lagares A, Romero D & Brom S (2014) Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background. *FEMS microbiology ecology* **88**: 565-578.
181. Thomas CM (2000) Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiology* **37**: 485-491.
182. Tian S, Ali M, Xie L & Li L (2016) Genome-sequence analysis of *Acinetobacter johnsonii* MB44 reveals potential nematode-virulent factors. *SpringerPlus* **5**: 986.
183. Townsend J, Park AN, Gander R, Orr K, Arocha D, Zhang S & Greenberg DE (2015) *Acinetobacter* infections and outcomes at an academic medical center: a disease of long-term care. Vol. 2 p.^pp. ofv023. Oxford University Press.
184. Tung WL & Chow KC (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**: 128-129.

185. Unterholzner SJ, Poppenberger B & Rozhon W (2013) Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile genetic elements* **3**: e26219.
186. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A & Lenoble P (2008) Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PloS one* **3**: e1805.
187. Verroken A, Bauraing C, Deplano A, Bogaerts P, Huang D, Wauters G & Glupczynski Y (2014) Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clinical Microbiology and Infection* **20**: 44-50.
188. Villegas MV & Hartstein AI (2003) *Acinetobacter* Outbreaks, 1977–2000. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **24**: 284-295.
189. Visca P, Seifert H & Towner KJ (2011) *Acinetobacter* infection—an emerging threat to human health. *IUBMB life* **63**: 1048-1054.
190. Wai-U Lo Y-YC, Eileen Lai, David Lung, Tak-Lun Que, Pak-Leung Ho (2012) Complete Sequence of an IncN Plasmid, pIMP-HZ1, Carrying blaIMP-4 a Klebsiella pneumoniae Strain Associated with Medical Travel to China. *ASM* **57**: 1561-1562.
191. Wang H, Wang J, Yu P, Ge P, Jiang Y, Xu R, Chen R & Liu X (2016) Identification of antibiotic resistance genes in the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain, MDR-SHH02, using whole-genome sequencing. *International journal of molecular medicine*.
192. Wang J, Chen Y, Wu L, Chen Y & Xu L (2016) Draft genome sequence of a multidrug-resistant beta-lactamase OXA-357-producing *Acinetobacter pittii* ST865 clinical isolate from China. *Brazilian Journal of Microbiology*.
193. Wang X, Zhang Z, Hao Q, Wu J, Xiao J & Jing H (2014) Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* ZW85-1. *Genome announcements* **2**: e01083-01013.
194. Wang X, Lord DM, Cheng H-Y, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, Quiroga C, Zheng K, Herrmann T & Peti W (2012) A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature chemical biology* **8**: 855-861.
195. Wijetunge DSS, Karunathilake KHEM, Chaudhari A, Katani R, Dudley EG, Kapur V, DebRoy C & Kariyawasam S (2014) Complete nucleotide sequence of pRS218, a large virulence plasmid, that augments pathogenic potential of meningitis-associated *Escherichia coli* strain RS218. *BMC microbiology* **14**: 203.
196. Woodford N, Turton JF & Livermore DM (2011) Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews* **35**: 736-755.
197. Yang F, Jiang Q, Zhu M, Zhao L & Zhang Y (2017) Effects of biochars and MWNTs on biodegradation behavior of atrazine by *Acinetobacter lwoffii* DNS32. *Science of The Total Environment* **577**: 54-60.
198. Yoon E-J, Goussard S, Nemeč A, Lambert T, Courvalin P & Grillot-Courvalin C (2015) Origin in *Acinetobacter gyllenbergii* and dissemination of aminoglycoside-modifying enzyme AAC (6')-Ih. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **dkv390**.
199. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M & Tsakris A (2013) Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International journal of antimicrobial agents* **41**: 11-19.
200. Zarrilli R, Vitale D, Di Popolo A, Bagattini M, Daoud Z, Khan AU, Afif C & Triassi M (2008) A plasmid-borne blaOXA-58 gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**: 4115-4120.
201. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J & Nation RL (2007) Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **60**: 1206-1215.

202. Zhang G, Chen T, Chang S, Zhang W, Wu X, Wu M, Wang Y, Long H, Chen X & Wang Y (2016) Complete genome sequence of *Acinetobacter* sp. TTH0-4, a cold-active crude oil degrading strain isolated from Qinghai-Tibet Plateau. *Journal of biotechnology* **226**: 54-55.
203. Zhang H, Li X, Zhang B & Liu C (2015) Draft Genome Sequence of *Acinetobacter* sp. Strain YZS-X1-1, a Denitrifying Bacterium Isolated from Freshwater Pond Sludge in China. *Genome announcements* **3**: e01579-01514.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ & Wishart DS (2011) PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic acids research* gkr485.