



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

POSIBLE PAPEL DEL TRANSPORTADOR ABC DE  
GLUTAMINA EN LA RESISTENCIA A  
NITROFURANTOINA EN *Salmonella enterica* Serovar  
*Typhimurium* LT2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ERIC GERARDO GONZALEZ SEGOVIA



DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. RAFAEL CAMACHO CARRANZA  
2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<p>1.Datos del alumno</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido Materno</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Telefono</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México</p> <p>Facultad de Ciencias</p> <p>Carrera</p> <p>Número de cuenta</p>	<p>1.Datos del alumno</p> <p>González</p> <p>Segovia</p> <p>Eric Gerardo</p> <p>56531482</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México</p> <p>Facultad de Ciencias</p> <p>Biología</p> <p>098197969</p>
<p>2.Datos del tutor</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido Materno</p>	<p>2.Datos del tutor</p> <p>Dr.</p> <p>Rafael</p> <p>Camacho</p> <p>Carranza</p>
<p>3.Datos del sinodal 1</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido Materno</p>	<p>3.Datos del sinodal 1</p> <p>Dr.</p> <p>Jesús Javier</p> <p>Espinosa</p> <p>Aguirre</p>

<p>4.Datos del sinodal 2</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido Materno</p>	<p>4.Datos del sinodal 2</p> <p>Dra.</p> <p>Patricia</p> <p>Ramos</p> <p>Morales</p>
<p>5.Datos del sinodal 3</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido Materno</p>	<p>5.Datos del sinodal 3</p> <p>Dr.</p> <p>Rodolfo Omar</p> <p>Arellano</p> <p>Aguilar</p>
<p>6.Datos del sinodal 4</p> <p>Grado</p> <p>Nombre(s)</p> <p>Apellido paterno</p> <p>Apellido Materno</p>	<p>6.Datos del sinodal 4</p> <p>Biol.</p> <p>Claudia</p> <p>Barajas</p> <p>Lemus</p>
<p>7.Datos del trabajo escrito</p> <p>Título</p> <p>Número de páginas</p> <p>Año</p>	<p>7.Datos del trabajo escrito</p> <p>Posible papel del transportador ABC de glutamina en la resistencia a nitrofurantoina en <u><i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>Typhymurium</i> LT2</u></p> <p>54p</p> <p>2013</p>

## **AGRADECIMIENTOS**

### Académicos

Al Dr. Rafael Camacho Carraza por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por sus ideas, apoyo y los conocimientos brindados para la realización de este trabajo. Aprendí que para realizar ciencia es necesario pensar e imaginar pero también es igual de importante el trabajo duro para llevar a cabo y probar todas estas ideas, además descubrí que me fascinan los temas relacionados a la estructura del genoma.

A la Dra. Patricia Ramos Morales por todo el conocimiento brindado y por la inspiración para trabajar en temas relacionados con la genética, temas en los cuales espero seguir trabajando toda la vida.

Al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por brindarme un espacio de trabajo y el intercambio de ideas y opiniones en seminarios. Aprendí la importancia de enfocarse en algo y avanzar paso a paso.

Al Dr. Rodolfo Omar Arellano Aguilar por la revisión de esta tesis y sus valiosos comentarios.

A la Biol. Claudia Barajas por la revisión de esta tesis, por su trabajo previo que dio lugar a la realización de esta tesis y por todo su apoyo y conocimientos brindados para la realización de la misma. Muchas gracias.

A todos mis profesores de la Facultad de Ciencias

### Técnicos

A la Biol. Sandra Luz Hernández Ojeda por el apoyo técnico brindado y por resolver mis dudas, gracias a ella el trabajo del laboratorio fue siempre más simple y muy agradable.

A la M. en C. Blanca Estela Hernández Guadarrama por todo su apoyo técnico y ayudarme con mis dudas.

A la Biol. Claudia Barajas Lemus por su apoyo técnico, resolución de dudas e intercambio de ideas.

Al Dr. Alfonso León del Río y a su técnico el Biol. José Rafael Cervantes Roldán por ayudarnos en la secuenciación.

### Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la excelente formación académica y humana que recibí desde el nivel bachillerato y por el maravilloso acceso al conocimiento que me fue brindado.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por instruirme como Biólogo y por todos los conocimientos que adquirí siendo estudiante de esta facultad.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México donde tuve la oportunidad de trabajar en un centro de investigación de primer nivel.

## **Agradecimientos**

A mis padres Alicia Segovia Urbano y Alfredo González Vega que me han apoyado en todo y me han dado la oportunidad de tener acceso a una excelente educación, por siempre estar ahí muchísimas gracias, todos mis logros se los debo a ustedes.

A mis hermanos Omar David González Segovia e Ivonne Isabel González Segovia, muchas gracias por todo su apoyo en las buenas y en las malas, el hecho de que estén cerca y me apoyen me ayuda muchísimo a seguir adelante.

A todos mis compañeros y colegas del laboratorio, a Sitlali, Claudia, Sandra, Blanca, Gaby, Netzi, Cynthia, Nestor, Ulises y un especial agradecimiento a Mariana.

A mis amigos Erica, El Valerio, El Chino, Pancho, Lilo, Kimba, Marco, Mariana, Sitlali, Rocio, el Pajaro, la Bola y Tzintia. Muchas gracias por estar ahí carnales.

A mi hija Elisa

## **Dedicatorias**

Les dedico esta tesis a mis padres, Alicia y Alfredo, sin su apoyo no habría podido lograrlo, les estoy muy agradecido por haberme dado la educación que me recibí y por su cariño incondicional, todos mis logros son gracias a ustedes.

A mis hermanos Omar e Ivonne que siempre me han apoyado y brindado su cariño y apoyo.

A mis amigos amigos Erica, El Valerio, El Chino, Pancho, Lilo, Kimba, Marco, Mariana, Sitlali, Rocio, el Pajaro, la Bola y Tzintia. Muchas gracias por su amistad.

Y sobre todo dedico esta tesis a mi hija Elisa, tú me inspiraste a seguir en todo momento sobre todo en los momentos más difíciles, muchas gracias hija.

# **Posible papel del transportador ABC de glutamina en la resistencia a nitrofurantoina en *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* LT2**

## RESUMEN

El estudio de la evolución de la resistencia a antibióticos por parte de organismos patógenos nos permite diseñar estrategias para prevenir el surgimiento de tales resistencias, combatir a los organismos resistentes y el uso adecuado de concentraciones y tipos de antibióticos. En la actualidad se recomienda el uso de nitrofuranos como la nitrofurantoina para tratar infecciones genitourinarias, se piensa que las concentraciones de acción de este fármaco que se dan por encima de los 200 mg/L no permiten el establecimiento de cepas resistentes, por lo que se espera que este antibiótico continúe usándose. Debido a ello, el estudio de los fenómenos de evolución de resistencia a este antibiótico que es ampliamente recomendado, permitirá prevenir problemas a futuro relacionados con su uso. Con el fin de descubrir mecanismos de resistencia a nitrofurantoina, previamente a este trabajo, se realizaron mutaciones aleatorias en el genoma de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Str. LT2 mediante el uso de transposones lográndose mapear una de las inserciones del transposon *Mud-cam* en la región intergénica que existe entre los genes *glnP* y *glnH* que codifican respectivamente para la permeasa y la proteína de unión periplasmática del transportador ABC de glutamina. En este trabajo se logró afinar el sitio de la inserción en la posición 896240 del genoma de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Str. LT2 y mediante ensayos de competencia se correlaciona la resistencia a nitrofurantoina con la pérdida de actividad de importación por parte del transportador ABC de glutamina, además se sugiere que no es el único sistema de entrada de este antibiótico a *Salmonella*.

## SUMMARY

The study of the evolution of antibiotic resistance allows to prevent the emergence of resistance, how to cope with resistant organisms and the proper use of types and concentrations of antibiotics. At the present time nitrofurans as nitrofurantoin are recommended for treating urogenital infections, it is believed that the concentration of action of this drug, above 200 mg/L does not allow the establishment of resistant strains, however studying the evolution of resistance to this widely recommended antibiotic could help to prevent future problems associated with its use. Prior to this work, the mechanisms of nitrofurantoin

resistance were studied by transposon insertions in the genome of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Str. LT2, achieving a *Mud-cam* transposon insertion in the intergenic region of the ABC transporter of glutamine between *glnP* and *glnH* genes encoding the permease and periplasmic binding protein respectively. In this work a refinement of the insertion site at position 896240 of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Str. LT2 genome was done, and competition assays allowed us to relate the resistance to nitrofurantoin to its transportation inside the cell by the glutamine ABC transporter; evidence was also found suggesting that there could be another import system for this antibiotic in *Salmonella*.

## ABREVIATURAS

ABC	Adenosine triphosphate-Binding Cassette
ATP	Adenosín trifosfato
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DNA	Acido desoxyrribonucleico (Desoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
gln	Glutamina
IHF	Factor de integración del hospedero (Integration Host Factor)
MIC	Concentración mínima inhibitoria (minimum inhibitory concentration)
MFS Superfamily)	Principal Superfamilia de facilitadores (Major Facilitator Superfamily)
Mg	Magnesio
MM	Medio mínimo
MSO	metionina sulfoximina
NADH	$\beta$ -nicotinamida adenindinucleotido
NADPH	$\beta$ -nicotinamida adenindinucleotido fosfato
NB	Nutrient Broth
Nf	Nitrofurantoína
nm	Nanometros
Ntr	Regulación por nitrógeno (Nitrogen regulated)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimeraza
RND	Bombas de flujo de salida a multiples farmacos de la familia de resistencia-nodulación-división (Multidrug Efflux Pumps of Resistance-Nodulation-Division Family)
<i>S. enteriditis</i>	<i>Salmonella enteriditis</i>
<i>S. hadar</i>	<i>Salmonella hadar</i>
<i>S. johannesburg</i>	<i>Salmonella Johannesburg</i>
<i>S. oranienburg</i>	<i>Salmonella oranienbur</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S. virchow</i>	<i>Salmonella virchow</i>
<i>S. wien</i>	<i>Salmonella wien</i>
SMR	Familia de pequeña multirresistencia a fármacos (Small Multidrug Resistance Family)
spp	Varias especies (several species)
UV	Luz Ultravioleta
Wt	Cepa Silvestre (Wild Tipe)

# CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1.1 Resistencia a antibióticos en bacterias</b> .....	13
1.1.1 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	13
1.1.2 Fuentes de genes de resistencia a antibióticos.....	15
1.1.3 Bombas de flujo fuera de la célula de resistencia a múltiples fármacos.....	16
1.1.4 Resistencia a múltiples fármacos por estados fisiológicos alterados.....	16
<b>1.2 Resistencia a antibióticos en <i>Salmonella</i></b> .....	17
1.2.1 Resistencia a Nitrofuranos.....	18
1.2.2 Resistencia a Nitrofurantoína.....	19
1.2.3 Resistencia a antibióticos y el transportador de glutamina en <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2.....	20
<b>1.3 Glutamina</b> .....	21
1.3.1 Síntesis de glutamina.....	21
1.3.2 Regulación.....	21
1.3.3 Transporte.....	21
1.3.4 Estructura del operon glnHPQ.....	22
<b>1.4 El transporte de metionina</b> .....	25
<b>1.5 Metionina sulfoximina</b> .....	26
1.5.1 Transporte de metionina sulfoximina en <i>Salmonella</i> .....	26
<b>2. HIPOTESIS</b> .....	27
<b>3. OBJETIVO</b> .....	27
3.1 Objetivos particulares.....	27
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b> .....	28
4.1 Mapeo de la inserción de un transposón <i>Mud-cam</i> en la región del transportador ABC de glutamina.....	28
4.2 Cepas utilizadas.....	29
4.3 Transducción.....	30
4.4 Medios.....	30
4.5 Concentración mínima inhibitoria.....	30
4.6 Ensayos de competencia.....	31
<b>5. RESULTADOS</b> .....	33
5.1 Sitio de inserción del transposón <i>Mud-cam</i> .....	33
5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	41
5.3 Ensayos de competencia.....	42
<b>6. DISCUSION</b> .....	45
6.1 Mapeo de la inserción.....	45

6.2 Concentración mínima inhibitoria.....	46
6.3 Ensayos de competencia.....	47
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	50
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	51

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Resistencia a antibióticos en bacterias

El concepto de resistencia bacteriana a antibióticos tiene que ver con la noción de resistencia clínica, este es un concepto complejo que depende del tipo de bacteria que infecta, su localización en el cuerpo, la distribución de los antibióticos en el cuerpo y su concentración en el sitio de la infección, así como el estatus del paciente. Así, por poner un ejemplo, una bacteria puede ser muerta o inhibida por cualquier antibiótico a una concentración lo suficiente mente alta, pero quizá el paciente no pueda tolerar esta dosis (Hawkey 1998).

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, numerosos hallazgos han derivado en la comercialización de distintos tipos de antibióticos. Se estima que se producen alrededor de 100,000 toneladas anuales de antibióticos alrededor del mundo y su uso ha tenido un profundo impacto en la vida de las bacterias sobre la tierra (de Lencastre, Oliveira et al. 2007). Muchas cepas se han vuelto resistentes a uno o varios antibióticos, este último fenómeno es denominado multiresistencia a antibióticos. De hecho, algunas cepas se han vuelto resistentes a prácticamente todos los fármacos que están comúnmente disponibles, algunas de la cuales son bacterias gran negativas.

Esta resistencia a múltiples fármacos se debe a la acumulación de plásmidos de resistencia o transposones con genes que codifican, para resistencia a un agente específico, o mediante la acción de bombas de flujo para múltiples fármacos, cada una de las cuales puede bombear más de un tipo de fármaco(Nikaido 2009).

### 1.1.1 Mecanismos de resistencia bacteriana

Existen varios mecanismos comunes de resistencia y se mencionan a continuación:

**Mutaciones que alteran a la proteína blanco:** Las bacterias pueden volverse resistentes a través de mutaciones que vuelven las proteínas blanco menos susceptibles al antibiótico. Existen varios ejemplos, como la resistencia a fluoroquinonas debido a mutaciones de las enzimas blanco, las DNA topoisomerasas (Hooper 2000). Una mutación ribosomal que normalmente se encuentra en las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a amino glucósidos, o la resistencia asociada al gen *erm*, el cual está codificado normalmente en plásmidos y produce la metilación de una adenina en la posición 2058 del rRNA 50S, causando resistencia a macrólidos (eritromicina y muchos otros), lincosamida y estreptograminas del grupo B del fenotipo MLS(Weisblum 1995).

**Inactivación enzimática del fármaco:** este es un mecanismo común de resistencia a antibióticos de origen natural como los aminoglucósidos (kanamicina,

tobramicina, y amikacina) que son inactivados por: fosforilación enzimática (por la fosforiltransferasa), acetilación (por la aminoglucósido acetiltransferasa) ó adenilación (por la aminoglucósido adeniltransferasa ó nucleotidiltransferasa) y los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems) que son inactivados por la hidrólisis enzimática de las  $\beta$ -lactamasas, normalmente en el periplasma. Los genes que codifican para estas enzimas pueden ser componentes de plásmidos (Nikaido 2009).

**Adquisición de genes de otras especies de proteínas blanco menos susceptibles:** La secuenciación de genes que codifican para los blancos de la penicilina, DD-transpeptidasa o las proteínas de unión a penicilina, ha revelado que la resistencia a penicilina en *Streptococcus pneumoniae* (organismo capaz de integrar DNA foráneo y transformarse de manera natural) se debe a la producción de un mosaico de proteínas, parte de las cuales vienen de otros organismos (Spratt 1994). Se han hallado mecanismos similares de resistencia a penicilina en *Neisseria meningitidis* que es otro organismo capaz de transformarse naturalmente. Incluso también se ha encontrado una secuencia foránea de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*, siendo que este organismo no es transformable naturalmente (Kuroda, Ohta et al. 2001; de Lencastre, Oliveira et al. 2007).

**Evasión del blanco:** La vancomicina tiene un modo inusual de acción, en vez de inhibir una enzima, se une a un sustrato, el pentapéptido disacárido de unión a lípidos que es un precursor de la pared celular de peptidoglicanos. En enterococos, el estudio de la resistencia a vancomicina, ha demostrado que el final del pentapéptido, D-Ala-D-Ala, donde se une la vancomicina, es remplazado por una estructura ester, D-Ala-D-ácido láctico que no se une a vancomicina (Courvalin 2006). La producción de esta estructura alterada requiere la participación de varios genes importados.

**Prevención del acceso del fármaco a los blancos:** El acceso de los fármacos a sus blancos puede ser reducida localmente, por ejemplo, las proteínas Tet(M) ó Tet(S) que se encuentran codificadas en plásmidos en bacterias gram positivas, se unen a los ribosomas con alta afinidad y al parecer cambian su conformación, previniendo así la asociación de las tetraciclinas a los ribosomas (Connell, Tracz et al. 2003). También puede ser reducido por un proceso de transporte activo, este fue descubierto inicialmente con la proteína TetA de resistencia a tetraciclina en bacterias gram negativas, la cual cataliza el bombeo fuera de la célula del complejo tetraciclina-Mg mediante el uso de fuerza dependiente de un gradiente de protones (Tamura, Konishi et al. 2003). En las bacterias gram negativas, el acceso puede ser reducido mediante la disminución ó la reducción del flujo hacia dentro de la célula a través de la membrana externa, por ejemplo, se utilizan antibióticos  $\beta$ -lactámicos para seleccionar mutantes deficientes en porinas (Harder, Nikaido et al. 1981).

### 1.1.2 Fuentes de genes de resistencia a antibióticos

Existen diversas fuentes de genes de resistencia a antibióticos, algunos de ellos pueden provenir de los mismos organismos productores de antibióticos. Por ejemplo, se encontró que los genes relacionados con resistencia a vacomicina, en aislados clínicos de enterococos, son homólogos de aquellos hallados en los estreptomicetos que producían la vacomicina, organizados de la misma manera. (Marshall, Lessard et al. 1998). Se han hallado genes de resistencia a antibióticos en los cromosomas de bacterias de vida libre. Por ejemplo, en una muestra tomada al azar de una colección de streptomyces que viven en el suelo se encontró que del 60 al 100% eran resistentes a varios antibióticos que se probaron, esto sugiere que los genes de resistencia a antibióticos parecen estar presentes de manera abundante en este hábitat (D'Costa, McGrann et al. 2006). De hecho, la mayoría de los antibióticos están presentes en el suelo en muy bajas concentraciones y se han encontrado organismos que utilizan estos antibióticos como nutrientes (Dantas, Sommer et al. 2008). También se han encontrado comúnmente genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales como resultado de las grandes cantidades de antibióticos que son desechados en estas aguas, provenientes tanto de antibióticos si usar como derivados del metabolismo incompleto de antibióticos por parte de humanos (Bouki, Venieri et al. 2013).

Muchos de los genes de resistencia se encuentra presentes en plásmidos, a menudo en un solo plásmido R, de manera que la resistencia a múltiples fármacos puede transferirse en un solo evento de conjugación (Nikaido 2009). En las secuencias de los plásmido R, podemos ver que la mayoría de los genes de resistencia son componentes de transposones. El descubrimiento de que muchos genes de resistencia en los plásmidos R poseen una secuencia bandera de 59 pares de bases en el extremo 3' llevó al descubrimiento de los integrones (Hall and Stokes 1993). Un integrón contiene la secuencia codificadora de una integrasa, la cual cataliza la inserción de genes de resistencia en un sitio predeterminado río debajo de un promotor fuerte. Una vez que se integra el gen de resistencia es marcado por la secuencia bandera de tal manera que puede ser integrado en otro integrón, que a su vez puede contener su propio conjunto de genes de resistencia. Los genes de resistencia que se agrupan en un solo integrón se organizan como un sólo operón, con la misma orientación para la transcripción bajo un sólo promotor fuerte provisto por la misma estructura del integrón. Así un integrón puede contener arriba de ocho genes de resistencia (Rowe-Magnus and Mazel 2002), muchos de estos integrones cargan con su propia maquinaria de transposición. Así, estos integrones normalmente suelen insertarse en transposones más grandes como Tn21, esto le permite al arreglo completo de genes de resistencia saltar entre distintos plásmidos y entre los plásmidos y los cromosomas (Nikaido 2009).

### **1.1.3 Bombas de flujo fuera de la célula de resistencia a múltiples fármacos**

Los plásmidos, aparte de codificar para enzimas que generan resistencia a fármacos, también pueden codificar para transportadores de múltiples fármacos que le dan a las bacterias resistencia a múltiples bactericidas catiónicos, como los transportadores QacA (ó QacB), que pertenecen a la superfamilia MFS (por sus siglas en inglés de Major Facilitator Superfamily). Estos fueron los primeros transportadores descubiertos (Paulsen, Brown et al. 1996); desde entonces se han identificado varios transportadores que pertenecen a varias familias.

Dentro de las familias de transportadores podemos encontrar a los SMR (por sus siglas en inglés de Small Multidrug Resistance Family) (Paulsen, Skurray et al. 1996) y los de especial importancia en bacterias gram negativas que pertenecen a la súper familia RND (por sus siglas en inglés de Multidrug Efflux Pumps of Resistance-Nodulation-Division Family) porque suelen estar codificados por genes que pertenecen a los cromosomas y pueden ser fácilmente sobre expresados, además algunos de ellos pueden bombear fuera de la célula a la mayoría de los antibióticos que se usan actualmente (Poole and Srikumar 2001).

Se considera que estos transportadores que pertenecen a la familia RND no aparecieron en respuesta al uso de antibióticos, sino que poseen actividades fisiológicas que las bacterias requieren y han requerido antes de su uso. Por ejemplo se ha encontrado que la proteína AcrB en *E. coli*, que pertenece a esta familia, posee una alta afinidad por sales biliares y por tanto protege a la bacteria de las mismas (Zgurskaya and Nikaido 1999).

En la Superfamilia de Casetes de Unión a ATP, se ha asociado su sobreexpresión con un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. Por ejemplo, la sobreexpresión de LmrA en *E. coli* le confiere a la bacteria resistencia a tintes catiónicos, daunomicina y trifetilfosfonio (Nikaido 2009).

Por último este tipo de mecanismos de bombeo de antibióticos fuera de la célula puede verse aumentado por la disminución en la permeabilidad de la membrana externa, mediante mutaciones de genes de porinas.

### **1.1.4 Resistencia a múltiples fármacos por estados fisiológicos alterados**

En algunas ocasiones la persistencia de microorganismos patógenos no tiene que ver con la presencia o ausencia de genes de resistencia, si no con el estado fisiológico de la bacteria que le permite desarrollar ciertos fenotipos resistentes a antibióticos sin necesidad de alguna alteración de su genoma (Lewis 2005). Por ejemplo, cuando las bacterias forman un biofilm, suelen ser más resistentes a los antibióticos a pesar de tener la misma constitución genética que las mismas bacterias que no se encuentran formando un biofilm y son susceptibles a los mismos antibióticos (Lewis 2005).

## 1.2 Resistencia a antibióticos en *Salmonella*

En países desarrollados, la resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella* no tifoideas es una consecuencia inevitable del abuso de fármacos antimicrobianos en animales para el consumo humano. En Europa y Estados Unidos, los serotipos más importantes son *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. virchow* y *S. hadar*, el método de dispersión es a través de comida contaminada como productos de aves de corral, cerdos y ocasionalmente ovejas. En general, la transmisión persona-persona no es de mayor importancia en la propagación de estos serotipos. En la mayoría de los casos se presenta una enteritis de media a moderada y el tratamiento con antibióticos no se indica.

En países en desarrollo existe también un incremento en la resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp. tanto tifoidea como no tifoidea. Sin embargo, tal resistencia se asocia más con el uso de antibióticos en humanos, algunas de las variedades implicadas son *S. wien*, *S. typhimurium*, *S. johannesburg*, y *S. oranienburg*. En estos países, las infecciones causadas por las mismas cepas o similares a las de los países desarrollados se asocian con una incidencia de enfermedades invasivas, las cuales a menudo resultan en septicemia con una alta mortalidad subsecuente. Una característica adicional de estas cepas es la posesión de plásmidos de resistencia a antibióticos, a menudo con resistencias a siete o más antibióticos, por lo que la epidemiología de estas cepas es muy distinta de las cepas de los mismos serotipos en países desarrollados. Así, los brotes de estas enfermedades en países en desarrollo se asocian con agua contaminada, y transmisión persona-persona.

Al pasar los años, la resistencia a antibióticos de distintos serotipos de *Salmonella* además de estar integrada en plásmidos y transposones con una resistencia asociada a: ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim, ha pasado a estar integrada en los cromosomas bacterianos con el surgimiento de la cepa MRS typhimurim DT 104 del tipo R ACSSuT en Reino Unido, con resistencias asociadas a: ampicilina, cloranfenicol, streptomina, sulfonamidas y tetraciclinas. Su transmisión se asoció con el consumo de pollo, res, puerco y contacto con comida de animales, queso, ovejas, etc. en todo el mundo. La resistencia asociada a ACSSuT, pudo relacionarse a la presencia de integrones con los mismos casetes, independientemente de su origen (animal o humano). El complejo genético completo comprende una secuencia de aproximadamente 14kb, y contiene dos integrones (A, SSp) y secuencias derivadas de plásmidos. Al pasar los años se ha generado resistencia adicional a trimetoprim y un decremento a la susceptibilidad de ciprofloxacina. Poco después se encontró la asociación de cepas multiresistentes con productos vegetales, en especial lechuga, con resistencia a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclinas, trimetoprim y ácido nalidixico con menor susceptibilidad a ciprofloxacina en *S. typhimurium* DT 204b tipo R ACGKSSuTTmNx CpL (Threlfall 2002).

Aunque se ha incrementado la resistencia a muchos agentes antibacterianos entre la mayoría de los patógenos, se dice que siguen siendo susceptibles a los nitrofuranos después de muchas décadas de su uso clínico.

Debido a la buena biodisponibilidad oral de la nitrofurantoina y su alto grado de excreción renal junto con su baja actividad antibacteriana intrínseca, la verdadera actividad antibacteriana relevante sucede únicamente en el tracto urinario, por lo que la presión selectiva para el desarrollo de resistencia en otras partes del cuerpo puede ser despreciable, así el uso de nitrofuranos para el tratamiento de enfermedades infecciosas es comúnmente recomendado (Guay 2001).

De este modo, en una era en la que la preocupación sobre el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos se ha incrementado, los nitrofuranos permanecen activos contra organismos que han desarrollado resistencia a otros agentes (Guay 2001) y es de esperarse que continúen usándose, por lo que el estudio de la resistencia a estos fármacos debe cobrar importancia para prevenir el surgimiento de cepas resistentes y/o saber cómo erradicarlas.

### 1.2.1 Resistencia a Nitrofuranos

Los fármacos nitroheterocíclicos han estado disponibles desde los años 60s. Su mecanismo de acción depende de la reducción del grupo nitro a radicales tóxicos cuya actividad es muy amplia, uniéndose tanto al DNA como a proteínas. Existen dos familias de compuestos nitroheterocíclicos, los nitroimidazoles y los nitrofuranos. Los nitroimidazoles se reducen principalmente por las ferredoxinas de los microorganismos mientras que los nitrofuranos se reducen por otros sistemas enzimáticos (Townson, Boreham et al. 1994).

Los nitrofuranos son un grupo grande de compuestos caracterizados por poseer un grupo nitro en la posición cinco del anillo furano. Entre los miembros más importantes de este grupo se encuentran la furaltadona, nitrofurantoina, nitrofurazona y furazolidona. Estos antibióticos se usan frecuentemente en la medicina veterinaria debido a su amplia actividad microbiana así como en medicina humana para indicaciones específicas.

La nitrofurazona y la nitrofurantoina son los únicos nitrofuranos que se han establecido para uso clínico y se han mantenido útiles en el tratamiento a una amplia variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo muchas cepas que comúnmente causan infecciones urinarias. Hoy en día, el uso principal de la nitrofurantoina es como tratamiento oral antibacteriano para infecciones genitourinarias (Guay 2001).

*Salmonella* es naturalmente susceptible a los nitrofuranos, sin embargo en varias partes del mundo se han hallado y continúan encontrándose cepas de *Salmonella* resistentes a nitrofurantoina (Antunes, Machado et al. 2006; Castaneda-Ramirez, Cortes-Rodriguez et al. 2011). En muchos de los casos, la resistencia a

nitrofurantoina viene asociada a múltiple resistencia a otros fármacos (Dione, Ikumapayi et al. 2011; Singh, Agarwal et al. 2012). En Portugal se encontró relación entre la resistencia a nitrofurantoína y el uso ilegal de nitrofuranos en la industria agropecuaria, dando como resultado el surgimiento de dos cepas multiresistentes de *S. typhimurium*, cuya resistencia se encontró relacionada a integrones (Antunes, Machado et al. 2006).

### 1.2.2 Resistencia a Nitrofurantoína

Aunque el modo específico de acción de la nitrofurantoína se desconoce, estudios con extractos de *Escherichia coli* han mostrado que las cepas resistentes y susceptibles a los nitrofuranos difieren en su habilidad para reducir estos compuestos (Asnis 1957), sugiriendo que los nitrofuranos necesitan ser activados mediante esta actividad reductora para mostrar su efecto antibiótico. Además se ha mostrado que existen dos tipos de nitroreductasas en *E. coli*: una insensible al oxígeno (tipo I) y otra que se inhibe por el oxígeno (tipo II).

Análisis químicos indican que en la nitroreducción de tipo I, la parte nitró del compuesto parental es reducida vía una secuencia de intermediarios, incluyendo los estados nitroso y nitrosilamina, a un producto final biológicamente inactivo donde uno de los intermediarios se piensa que es responsable de la toxicidad. La identidad específica del intermediario bioactivo no se conoce, pero se sabe que se une a DNA y a proteínas bacterianas, se ha propuesto que este intermediario es la hidroxilamina (Peterson, Mason et al. 1979).

En *E. coli* se ha calculado que la frecuencia de mutaciones que generan resistencia a nitrofurantoína para la cepa DA10708 es de  $\sim 10^{-7}$  /células y generación. Se halló que la resistencia se gana en dos pasos, en el primero solo se encuentran mutantes para *nfsA* con una resistencia media a nitrofurantoina de 8 mg/L, en el segundo paso la mayoría de los mutantes poseen mutaciones en el gen *nfsB* con una media de resistencia de 96 mg/L, encontrándose también mutantes resistentes que no pudieron ser atribuidos a mutaciones en las nitroreductasas (Sandegren, Lindqvist et al. 2008).

Se han encontrado mutantes resistentes debido a plásmidos (con una Concentración Mínima Inhibitoria de entre 50 y 70 mg/L). Sin embargo, el mecanismo de resistencia se desconoce. Además, también se ha demostrado resistencia sin pérdida de función de las nitroreductasas (Breeze and Obaseiki-Ebor 1983; Breeze and Obaseiki-Ebor 1983).

En general los efectos terapéuticos de la nitrofurantoína que se dan por encima de los 200 mg/L (Richards, Riss et al. 1955) no permiten que incluso mutantes con resistencias de 96 mg/L puedan proliferar y no se han encontrado mutantes de un tercer paso (Sandegren, Lindqvist et al. 2008)

En *Salmonella enterica* subespecie I, serotipo Typhimurium (*S. typhimurium*) se reconocieron los genes *snrA* y *cnr* con base en su homología con las

nitroreductasas de *E. coli nfsA* y *nfsB*, respectivamente (Mermelstein, Kiriázides et al. 1981; Nokhbeh, Boroumandi et al. 2002). Estas enzimas han sido agrupadas dentro del grupo I de nitroreductasas insensibles al oxígeno (tipo I)(Peterson, Mason et al. 1979) y catalizan la reducción dependiente de nucleótidos de piridina de compuestos nitroaromáticos tanto a hidroxilamina como la amina aromática mediante dos pasos de electrones (Koder, Haynes et al. 2002). Utilizando NAD(P)H o NADH como fuente de reductores equivalentes (Tatsumi, Doi et al. 1982).

Las nitroreductasas bacterianas son de interés toxicológico debido a su participación en la resistencia a nitroimidazol, como el metronidazol (Asnis 1957; Townson, Boreham et al. 1994; Whiteway, Koziarz et al. 1998; Race, Lovering et al. 2005; Martínez-Julvez, Rojas et al. 2012), la degradación de xenobióticos (Spain 1995; French, Nicklin et al. 1998) y su utilidad en la activación de fármacos (Knox, Friedlos et al. 1992; Grove, Searle et al. 1999).

En *S. typhimurium* las nitroreductasas *snrA* y *cnr* son capaces de reducir nitrofurantoina, nitrofurazona, metrodinazol, y 4-nitroquinilona-1-óxido (Salamanca-Pinzon, Camacho-Carranza et al. 2006).

Previamente en *E. coli* se encontró que la actividad de nitroreducción insensible al oxígeno se debe a un componente principal *nfsA* y dos menores *nfsB* y un gen no identificado responsable de la producción de una proteína descrita como NR IB2 (Bryant, McCalla et al. 1981; Whiteway, Koziarz et al. 1998). En *S. typhimurium* al mutar los genes *snrA* y *cnr* sigue existiendo una actividad de nitroreductasa permanente (Salamanca-Pinzon, Camacho-Carranza et al. 2006) debido a ello Barajas C. (2007) realizó la búsqueda de esta posible tercera nitroreductasa mediante mutagénesis con transposones, para poder mapear inserciones en cepas que mostrarán una actividad de nitroreductasa alterada, detectándose mediante un fenotipo de resistencia a nitrofurantoina mayor al de la cepa wt. El mapeo de estas inserciones arrojó genes relacionados con la actividad de nitroreducción, pero también inserciones no relacionadas con los genes de nitroreducción. Se logró mapear una de las inserciones en la región que comprende el transportador ABC de glutamina en *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium*, la cual genera un fenotipo de resistencia a nitrofurantoina de 8 µg/ml (Barajas-Lemus 2007) inserción que es confirmada en el presente trabajo sugiriendo una relación directa del transporte de nitrofurantoina mediante este transportador.

### 1.2.3 Resistencia a antibióticos y el transportador de glutamina en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2

Previamente se ha relacionado la resistencia parcial a 5µg/ml de metionina sulfoximina (MSO) en una cepa de *S. typhimurium* LT2 axótrofa para metionina y mutante para el gen *glnP* que codifica para la permeasa del transportador ABC de glutamina, una resistencia total se alcanza mutando también al locus *metP*

(Betteridge and Ayling 1975) más recientemente llamando metD relacionado con el transporte de metionina (Shaw and Ayling 1991; Grundy and Ayling 1992).

### 1.3 Glutamina

El glutamato y la glutamina (gln) sirven como donadores primarios de nitrógeno para todos los metabolitos celulares en *S. typhimurium* y otras bacterias entéricas, así la gln es una señal de suficiencia de nitrógeno y permite el crecimiento como única fuente de nitrógeno (Neidhardt 1996)

#### 1.3.1 Síntesis de glutamina

La enzima glutamina sintetasa (codificada por el gen *glnA*) es el único medio para la síntesis de glutamina y es responsable de toda la asimilación de amonio bajo condiciones de baja concentración externa de nitrógeno (Stadtman, Hohman et al. 1980); *glnA* está bajo el control del sistema de regulación de nitrógeno Ntr (Porter 1995).

#### 1.3.2 Regulación

En *E. coli* se conocen la mayoría de los genes Ntr y se han identificado cerca de 100 genes que son afectados por la limitación de nitrógeno. La gln tiene un papel central en la regulación de la respuesta Ntr, controlando la cascada regulatoria. Como única fuente de nitrógeno la glutamina induce la respuesta Ntr, probablemente como resultado del rápido catabolismo intracelular de glutamina, que a su vez causa una baja relación de glutamina a  $\alpha$ -cetoglutarato (Reitzer 2003).

La expresión de los genes Ntr dependen del factor  $\sigma^{54}$  el cual requiere de un activador transcripcional y éste a su vez de una proteína que doble al DNA como un IHF (por sus siglas en inglés de Integration Host Factor) o una curvatura de DNA. Este control permite un amplio rango de actividad, desde baja hasta alta expresión (Reitzer 2003).

#### 1.3.3 Transporte

Los sistemas de *E. coli* han sido los más intensivamente estudiados. Se distinguen al menos dos sistemas independientes, debido a su afinidad a la glutamina y el transporte de la misma en *E.coli* (Weiner, Furlong et al. 1971; Willis, Iwata et al. 1975) y *S. typhimurium* (Betteridge and Ayling 1976).

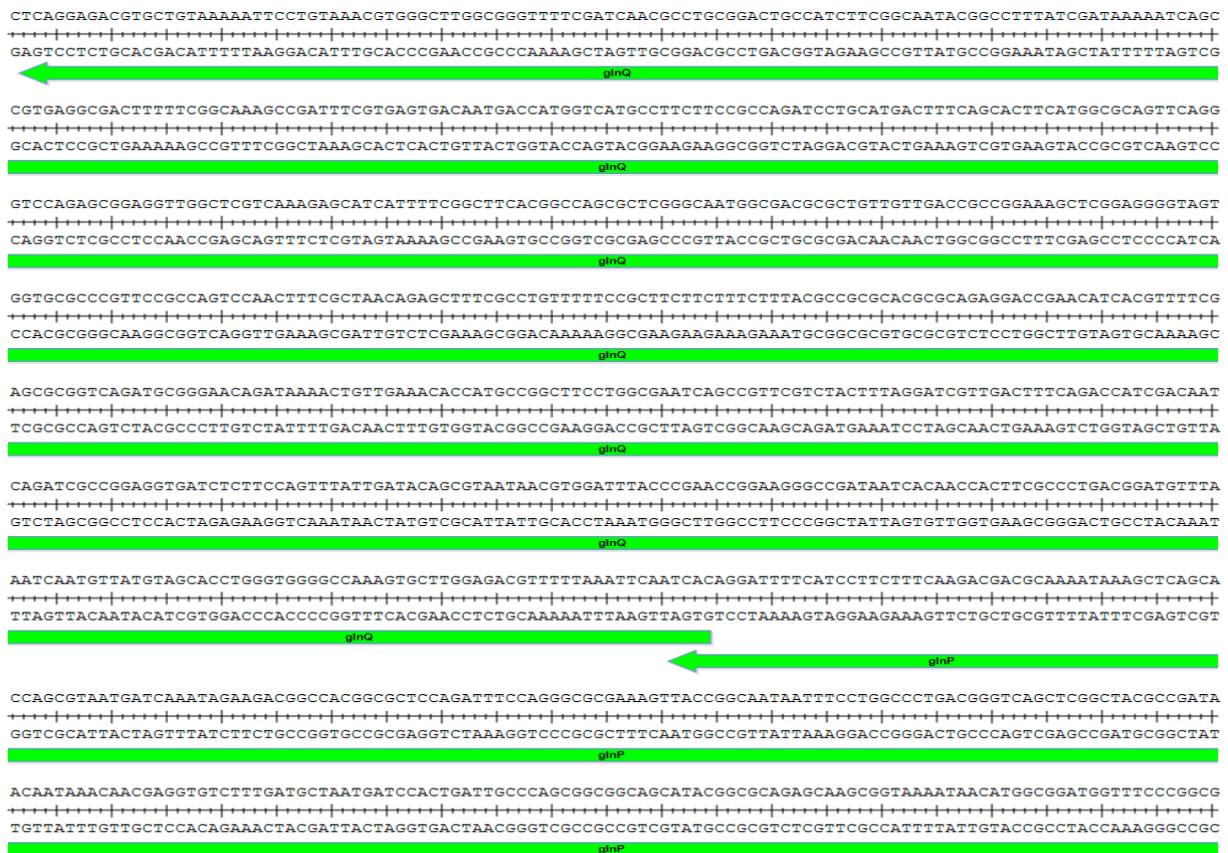
El sistema de transporte de alta afinidad para glutamina sensible a choque osmótico (Weiner, Furlong et al. 1971; Willis, Iwata et al. 1975), está codificado por el operon *glnHPQ* que se encuentra bajo el control del sistema Ntr: los niveles de la proteína de unión periplasmática (*glnH*) están regulados coordinadamente con los niveles de la glutamina sintetasa (Weiner, Furlong et al. 1971; Betteridge and

Ayling 1976; Kustu, McFarland et al. 1979), así como por aquellas proteínas de transporte para glutamato, aspartato, histidina y lisina-arginina-ornitina (Kustu, McFarland et al. 1979).

El sistema de baja afinidad no ha sido bien caracterizado debido a que solo se detecta en ausencia del sistema de alta afinidad (Weiner, Furlong et al. 1971; Willis, Iwata et al. 1975). El glutamato inhibe su actividad (Weiner, Furlong et al. 1971) lo que sugiere que tal vez pueda ser uno de los sistemas de toma de glutamato. Así el transporte de baja afinidad para la L-glutamina parece ser llevado a cabo por el sistema de transporte sensible a shock osmótico L-glutamato-L-aspartato, además, su proteína de unión posee baja afinidad por L-glutamina. *metD* también funciona como transporte de baja afinidad para glutamina.

### 1.3.4 Estructura del operon *glnHPQ*

Los genes *glnQ*, *glnP* y *glnH* se localizan en este orden en el mapa del genoma completo de *Salmonella*. *glnQ* codifica para la proteína de unión a ATP y va de la posición 894742 a 895464, *glnP* codifica para la permeasa y va de la posición 895461 a 896120 y *glnH* que codifica para la proteína de unión peri plasmática y va de la posición 896264 a 897010. La Figura 1 muestra la secuencia del operón *glnHPQ*.



AGAAAGGCCAGCGCCAGACCGCTTCGCGAAAACCTTGTGAATGGATAGTACTGCGCCGCGAGTAATTCGCGATATAAGCGCCGAGTAAATCATAATGTACGGA  
TCITTCGGGTGCGGCTGGCGAAGCGCTTTGGAAACACTTACCTATCATGACGCGGCTCATTAAAGCGCTATATTGCGGCCTCAATTAGTATTAACAGTGT

*glnP*

CCGCTGCGCTGAACGGATCAATACGCAAAATCATTAAATGCCATCGGCAGGGCAAAGTAGATAAAACATGACCTGGACACGATGGCGGTGCCGGAATAATTTCAATGAAA  
GGCGACGCGACTTGCTTAGTTATGCGTTTAGTAATTTACGGTAGCCGTCCTGTTTTCATCTATTTGACTGGACCTGTTGCTACCCGACGGCGCTTATTAAGTTACTTT

*glnP*

ACCAGGGCGATGTGGTTGGCGAACCGCGCAAACGTACGGGCAAACCTGCCGCCAGTCCAAATACCAGGCGCCAGCCAGACCGAGGACCGAGATCCACAGGGTCAT  
TGGTCCCGCTACCAACCGCTTGGTCGGCGGTTGATGCCCCGTTTGGACGGCGGTGAGGTTATTGGTCCGGCGGTGCGTCTGGCTCTAGGTGTCAGGTC

*glnP*

TTTAGCGCCTCAAGCAAAGCGGAATGGCGGGCAGATGGCGCTCCAGTCAAACCTGCATATGTCGTTTCTGTTACCGTGGTGTAAATAGTCAAATGCTCTATCCGGCGC  
AAATCGCGGAGTTCGTTTTCGCTTACCGCCCGGTCTACCGGAGGTCAGTTTACGATACAGCAAGGACAATGGCACCATTTATCAGTTTACGAGATAGGCCGCG

*glnP*

GGAAATGGCGAAGGTGTCTTATCCGTCACGGAAGAGCTGTAGGCCGTTGAGCGTCTCTACTACCGGGCCACAAGCCAACATCAGGTCGTTTTATTTAGGTTCTGTAC  
CCTTACCGCCTTTCACAGAATAGGAGTGCCTTCTCGACATCCGGCCACTCGCAGGAGTATGGCCCGGTGTTGGTTGTAGTCCAGCAAAATAAATCCAAGACATG

*glnH*

CGAACCATTTTTGTAGATTTGTTATAGGTGCCATTTCTACGCAGCGTTTTTCAGCGCGCGTTGACTTTCTCGCGCAGTTCATCGTGCCTTTCGGGAAGGCAACTCCG  
GCTTGGTAAAAACATCTAAAGCAATATCCAGGTAAGAGTGCCTCGCAAAAGTTCGCGGGCAACTGAAAGAGCGCGTCAAGTAGCGACGGAAAGCCCTTCCGTTGAGGC

*glnH*

TATTGCTGTGCTCCAGCGATTGCGCTACCGCCTTGAACCTGGCCGTTGCTTGGCGTTTTGATAAAGTACAGGATGTTGCGCGTATCGTGCAGAACGGCGTCTGCGCGGT  
ATAACGACACGAAGGTGCTAAGCGGATGGCGGAACCTGACCGGCACGACGCAAAACTATTTTCATGCTTACAAGCGCATAGCACGCTTTCGCGCAGACGCGCCAA

*glnH*

GGTGCCTAATCCATGTACGCGTTTCAATGTTGCGGAACTGACGCGAGTCTTTGGTTTTGATATTCGCTTTCGCGTAATCCACCGACCCGGTTCGCTCTTCACGGCAA  
CCACGGATTAAGGTACATGCGCAATAGTTACAAGCCCTTGACTGCTCCAGAAACCAAACTATAAGCGAAAGCGCATTAGGTGGCTGGGCAAGGCGAGAGTGCCTT

*glnH*

CGACTTTGCCATCGAGTCTTTAATACGCTTTAATATCGTTATTGTTGGCTTTTACCATCACGAGCAGACCGCTTTTGTAAAGCCATCGGAAAAGTCGATCGCTTTTTTA  
GCTGAAACGGTAGCTCCAGAAATTCGAAAATATAGCAATAACACCGAAAGTGGTAGTGCCTGCTGGCGAAAACATTATCGGTAGCCTTTTCAGCTAGCGAAAATA

*glnH*

CGTCTCGCTAATCGTAATACCGCCAGCGCCAGATCGATATTTTTGGTTTGTAAATGCCGGAATAATGCCGCTGAAATCCATCGGTTTTCAGGGTGTAGTCCAGCTTCAG  
GGAGCAGGCATTAGCATTATGGGCGGTGCGGCTTAGCTATAAAAACCAACATTAACGGCCTTATTACGGCGACTTTCAGTACGCAAAAGTCCACATCAGGTCGAAATC

*glnH*

TTCTTTCGCGATAGCGTCCACAGATCAACATCAAACCGACGATTTTTCGCGCTGTTTAAATTCAAACGGAAACGAAACCGGATCGGTTGCCACAACGAGTTTCTTAT  
AAGAAACGCTATCGCAGGGTGTCTAGTTGTAGTTTGGCTGCATAAACAGCGGGACAATTTAAGTTGCTTTCGCTGCGGCATAGCCACCGGTTGCTCAAGAATA

*glnH*

CCGACGCTGCGAAGACCCGCAAAAGCCAGGTAAGTGCAGCCAGTGAACCTTTAATAGAGACTTCATAGCATTTCCTTTTCTATCCAGGGGCGATCCCTTGCAGAA  
GGCGTCGCACGCTTCTGTGCGTTTTTCGCTCCATTACGTCGCTACTTTGAAAATATCTCTGAAGTATCGTAAAGGAAAAGATAGGTGCCCGCTAGGGGACGCTCT

*glnH*

ACATGTAGCGTAATGAAAAATCATGCCAATTATGTAACCTATTGTTTTAACAGAAGCGTGAACATTCCTGTGCACAATAAGTCGGGCAAAACAGTATGCCGCACCGT  
TGTACATCGCATTACTTTTTTAGTACGGTTAATACATTGAGTAACAAAATTGCTTTCGCACTTTGTAAGGACAGGTTTATTCAGCCCGTTTTGGTCATACGGCGTGGCA

▲

s54

IHF

1

2

TTTGGGCACTGATTTAGTGCATGAATAACAAAAGTAGAGATACAGGGTCTATTTAGCGTAAAAATCGTTGTTAAAAAATCTTTAATTAACGATGTGTGATGAATTA  
AAACCCGCTGACTAAATCAGTACTTATTGTTTCTATCTATGTCCAGATAAATCGCATTTTTAGCAACAATTTGTTAGAAATTAATGCTAACACACTACATTAATA

2

3

4

TACAAAATAATCACTTTTGTGCGAGGGAGTACAAGACGTGTCACATTTAAGTGAACAAACCCCTGTGCCAGGCGAGGGTATAGGGATGACTTATATACCTGTGTACAT  
ATGTTTATTAAGTGAACAGCCTCCCTCATGTTCTGCACACGTGATAAATTCACGTTTTGGGACACGGTCCGTCGCCATATCCCTACTGAATATATGGACACATGTA

CAAGTTGCAGGTCGCTTCGCTTTCAGTGCAGCAGGAAAGTCAAGCTTCTGCGGATTCGCTGCGTTTGTACCTTCTGCAACTCGAAGTATTCAGGGTAGAGATAGATT  
GTTCAACGTCACGCAAGCGAAGTCACTGGCTGCCTTTCAGTCCGAGACGCTAAGCGACGCAACATGGAAGGACGTTGAGCTTCATAAGTCCCCTCTCTATCTAAA

Figura 1. Secuencia del operon *glnHPQ*. En la imagen se marca con barras de color verde claro los genes *glnH*, *glnP* y *glnQ*: se marcan con flechas negras los dos sitios de inicio de transcripción que contiene este operón, el sitio de unión del IHF como una línea verde delgada, el sitio propuesto de unión a la holoenzima  $\sigma^{54}$  en color verde oscuro, los sitios de unión de alta afinidad a la proteína C reguladora de nitrógeno (NtrC) marcados con los números 2 y 3 en las barras de color rojo y los sitios de baja afinidad a NtrC marcados con 1 y 4 en las barras color naranja

En *E. coli* la región *glnHPQ* contiene dos promotores (Nohno, Saito et al. 1986) Uno tiene una secuencia de iniciación  $\sigma^{70}$  y aparentemente se expresa de forma constitutiva. El otro contiene una secuencia consenso de iniciación  $\sigma^{54}$  y un sitio consenso de reconocimiento para el regulador de nitrógeno NR1. Este último promotor interactúa con el factor  $\sigma^{54}$  para formar un complejo cerrado y la transición a complejo abierto se incrementa por el fosfato-NR1 y un IHF (Claverie-Martin and Magasanik 1991).

Nohno y Saito (1986) nombraron a estos dos promotores *glnHp1* y *glnHp2*, el primero es dependiente de  $\sigma^{70}$  tiene sitios de unión para la RNA polimerasa entre -243 y -213 bases río arriba del inicio de la transcripción de *glnH* y mencionan que parece expresarse constitutivamente, el segundo es dependiente de  $\sigma^{54}$  y parece regular la expresión de *glnHPQ* bajo condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno, este promotor tiene el siguiente consenso: CTGGYAYR(N)4TTGCA entre las bases -71 y -55. También encuentran una secuencia entre estos dos promotores que parece ser un sitio de regulación para NRI. Mencionan que la secuencia palindrómica en la región intersistrónica que se encuentra entre *glnH* y *glnP* parece jugar un papel de regulación al reducir la expresión de los genes distales, relativos a *glnH*, *glnP* y *glnQ*. Entre *glnP* y *glnQ* no existe región intercistrónica y el primer codón de *glnQ* se sobrepone al codón terminal de *glnP*, lo que sugiere que *glnQ* se expresa en la misma medida que *glnP*.

Mekalanos y Klose (1997) comprueban que la secuencia del promotor de *glnH* de *S. typhimurium* es homóloga a la de *E. coli* y comparte un sitio de unión consenso de la holoenzima  $\sigma^{54}$  así como varios sitios aparentes de unión a NtrC, además con un ensayo de medición transcripcional con la fusión del promotor de *glnHp-lacZ* observan que altos niveles de transcripción del promotor *glnH* requiere tanto  $\sigma^{54}$  como NtrC.

El promotor *glnH* de *E. coli* ha mostrado contener un sitio de unión IHF; IHF facilita el contacto entre la unión del enhancer NtrC y la unión del promotor a la holoenzima  $\sigma^{54}$  (Claverie-Martin and Magasanik 1991). Melanos y Klose (1997) observan que el sitio de unión a IHF del promotor *glnH* de *E. coli* y su secuencia correspondiente en *S. typhimurium* comparten solo de 14 a 27 nucleótidos, aunque la secuencia consenso de unión es (WATCAAN4TTR, donde W representa A o T y R representa A o G (Craig and Nash 1984; Klose and Mekalanos 1997), así el sitio potencial de unión a este factor de la secuencia de *S. typhimurium* solo tiene un desajuste con respecto al sitio consenso de *E. coli*,

además también encuentran que mutaciones en los genes *ntrA* y *ntrC* resultan en menos transcripción del operon *glnHPQ* y se considera, que funcionan como activadores sobre la expresión del *glnH* (Klose and Mekalanos 1997)

#### 1.4 El transporte de metionina

La metionina es tomada por *E. coli* y *S. typhimurium* por el sistema de transporte de alta afinidad (Km de ~0.1 mM) y uno o más sistemas de baja afinidad (Km de ~20 a 40 mM) (Ayling and Bridgeland 1972; Kadner 1974; Kadner and Watson 1974; Ayling, Mojica-a et al. 1979). El locus para el sistema de transporte de alta afinidad de *E. coli* fue llamado metD ya que los mutantes deficientes en este sistema son incapaces de utilizar D-metionina (Kadner 1974). El locus comparable de *S. typhimurium* ha sido designado metP por Ayling y Bridgel (1972) debido a una confusión desde que Kadener (1974) utilizó metP para el sistema de transporte de baja afinidad de *E. coli*. Ayling y colaboradores (1992, 1991) aceptaron la nomenclatura de *E. coli* para su uso en *S. typhimurium*.

Ayling y sus colaboradores (1989,1992) han construido un fino mapa estructural del locus metD. Ellos han encontrado evidencia de la existencia de cuatro o más grupos complementarios (Shaw and Ayling 1991; Grundy and Ayling 1992). Si estos resultados son indicativos de la presencia de al menos cuatro secuencias codificantes, el sistema de transporte de alta afinidad para metionina es probablemente un complejo multiproteico.

Resultados de Kadner y Winkler (1975) sugieren que el ATP es la principal fuente de energía para el transporte en *E. coli*. Estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que el sistema de transporte de alta afinidad de metionina es un transportador ABC pero se carece de evidencia convincente que pueda asegurarlo. Kadner (1974, 1975, 1977) mostró que las condiciones de crecimiento pueden causar varias veces cambios en la cantidad y actividad del sistema de alta afinidad de *E. coli*. Sin embargo, excepto por la observación de que la expresión de metD no está directamente controlada por el sistema metJ, poco se sabe sobre los mecanismos regulatorios, así como del sistema(s) de baja afinidad, excepto la observación de que el transporte de metionina se sigue llevando a cabo en los mutantes metD (Kadner 1975; Ayling, Mojica-a et al. 1979). Parte de dicha toma parece resultar del transporte de metionina por el transportador de leucina (Ayling, Mojica-a et al. 1979). Kadner y Watson (1974) han descrito una cepa deficiente en ambos sistemas de transporte. Esta cepa ha mostrado ser metD pero las otras mutaciones no han sido bien caracterizadas.

El sistema metD también funciona como transportador de baja afinidad para glutamina en *S. typhimurium* (Neidhardt 1996) y el transportador de leucina parece funcionar como sistema de transporte de baja afinidad para metionina (Ayling, Mojica-a et al. 1979).

## 1.5 Metionina sulfoximina

La metionina sulfoximina (MSO) inhibe a la enzima glutamina sintetasa aparentemente en una secuencia de dos pasos, la cual inicialmente envuelve una unión reversible al sitio activo que compite con el glutamato. Subsecuentemente, en presencia de ATP y metales divalentes, ocurre la fosforilación, causando una inhibición irreversible con Metionina sulfoximina y ADP remanente unidos fuertemente a la enzima. Se ha sugerido la existencia de  $\gamma$ -glutamil fosfato como el estado transitorio o el intermediario. Además se ha demostrado que la unión de metionina sulfoximina afecta los dos sitios de unión metálicos en el sitio de modificación covalente para la adenilación en cada subunidad (Miller and Brenchley 1981).

### 1.5.1 Trasporte de metionina sulfoximina en *Salmonella*

Mediante ensayos de competencia con MSO en presencia de glutamina o metionina Ayling y Bridgeland (1975) mencionan que es posible que la MSO entre a *S. typhimurium* mediante los sistemas de transporte de metionina y glutamina.

En esta tesis se describe el estudio de una mutante de *Salmonella entérica* Serovar typhimurium, con un fenotipo de resistencia a Nf de 8 $\mu$ g/ml, generada mediante la inserción de un transposon *Mud-cam* en la posición 896240 de su genoma, correspondiente a la región intergénica que existe entre *glnH* y *glnQ*, componentes del transportador ABC de glutamina. Mediante ensayos de competencia entre los aminoácidos gln y met y los antibióticos Nf y MSO se demuestra que la inserción provoca la pérdida de función del transportador ABC de glutamina y se relaciona la pérdida de esta función al fenotipo de resistencia a Nf, muy probablemente debido a que este transportador ingresa Nf a la célula.

## 2. HIPOTESIS

En *Salmonella enterica* Serovar typhimurium el transportador ABC para glutamina, también juega un papel en la incorporación de nitrofurantoina.

## 3. OBJETIVO

Determinar la relación entre la resistencia a nitrofurantoina y la mutación causada por la inserción de un transposón *Mud-cam* en la región intergénica de los genes codificantes para el transportador ABC de glutamina en *Salmonella enterica* Serovar typhimurium con la resistencia a nitrofurantoina.

### 3.1 Objetivos particulares

- Afinar la localización de la inserción del transposón *Mud-cam* mediante PCRs en la zona que se sabe se encuentra la inserción (Barajas 2007).
- Corroborar la pérdida de actividad del transportador ABC de glutamina en la cepa mutante con la inserción *Mud-cam* en la región intercistronica de los genes codificantes para este transportador, observando si tiene un fenotipo similar de resistencia a MSO como el de una mutante en este transportador previamente descrita por Betteridge y Ayling (1975).
- Comprobar si el transportador ABC de glutamina es afín a Nf mediante ensayos de competencia.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Mapeo de la inserción de un transposón *Mud-cam* en la región del transportador ABC de glutamina

En el laboratorio se realizó la inserción del transposon *Mud-cam* en la región intergénica entre *glnP* y *glnH*, genes que forman parte del operón *glnHPQ* y que codifican para el transportador ABC de glutamina (Barajas-Lemus 2007). Para afinar la localización del sitio de inserción, fue diseñado un par de primers, uno de estos primers para la región que comprende 53 pb de *glnP* antes del inicio de la región intergénica entre *glnH* y *glnP* y otro para anclarse a 73pb, en *glnH*, antes del inicio de la región intergénica entre *glnH* y *glnP*, generando así un amplicón de 271pb en la cepa wt, que abarca parte de *glnP*, parte de *glnH* y la región intergénica que existe entre estos genes. Para la cepa con la inserción se utilizaron primers dirigidos al exterior de los dos extremos del elemento *Mud-cam* en combinación con los primers diseñados para amplificar la región intergénica entre *glnH* y *glnP* que fueron mencionados con anterioridad, así se espera un amplicón de menor tamaño, al de la cepa wt, para la cepa portadora de la inserción del transposón en esa región.

Los primers diseñados fueron nombrados EGS1 cuya secuencia de 20pb es: GCCCTCAAGCAAAGCGGAA y abarca de la posición 896067 a 896086 en el genoma de referencia para *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Str. LT2 y EGS2 cuya secuencia de 21 pares de bases es: GCTGAAAACGCTGCGTGAGAA y abarca de la posición 896336 a 896316 en el genoma de referencia para *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Str. LT2. Los primers anteriores, en el caso de la cepa con la inserción, fueron usados en combinación con oligos diseñados para anclarse en el transposón en dirección del exterior del elemento, ORC4 cuya secuencia es ATCCCGAATAATCCAATGTCC y ORC5 con la secuencia GAAACGCTTTTCGCGTTTTTCGTGC. El primero está dirigido hacia el exterior del elemento en la región izquierda en la posición 37 en el 3' del oligo antes de terminar Mu y el segundo está dirigido hacia el exterior del elemento en la región 5', a 33 bases antes del final de Mu. Las combinaciones de los primers utilizadas fueron EGS1 con EGS2, EGS1 con ORC4, EGS1 con ORC5, EGS2 con ORC4 y EGS2 con ORC5.

Se realizaron Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) con estos primers en las combinaciones mencionadas.

El programa utilizado para el PCR fue:

Temperatura de desnaturalización	94°C 1'	
Temperatura de desnaturalización	94° C 30''	} 35 ciclos
Temperatura de alineamiento	50° C 30''	
Temperatura de elongación	72 °C 2'	
Temperatura de elongación	72 °C 5'	

Con una rampa de 9.9°/min utilizando un termociclador Idaho Technologies® Las mezclas para las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 10µl, conteniendo 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 10ng de DNA genómico bacteriano, 10pmol de cada oligonucleótido y 0.25mM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfatados. Al final se agregó la Taq DNA polimerasa Promega® junto con el anticuerpo AntiTaq ClonTech®, el cual inactiva a la Taq DNA polimerasa hasta el momento de la amplificación, en la cual se separa de ésta al ser sometida a temperaturas de 72°C, dejando libre a la Taq DNA polimerasa y permitiendo así la extensión de la cadena.

Las muestras amplificadas por PCR se corrieron en geles de agarosa Sigma® al 1%, con buffer TAE, durante 30 minutos a 100 Volts. Posteriormente los geles fueron teñidos con una solución de 0.5µgml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio Sigma®. Las bandas fueron visualizadas con luz UV utilizando un transiluminador (BioRad®). La banda del tamaño esperado embebida en el gel de agarosa fue cortada y se extrajo el amplicón utilizando un kit de Qiagen®, para después mandarse a secuenciar en la compañía Laragen, Inc. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa BLAST de NCBI (Zhang, Schwartz et al. 2000)

## 4.2 Cepas utilizadas

La tabla 1 muestra las cepas utilizadas en este trabajo

Tabla 1. Cepas utilizadas

Cepa	Descripción
RC1488	sty(LT2) <i>glnPH</i> :: <i>Mud-cam</i> Tx RC1 <i>Mud-cam</i> pool. La inserción genera resistencia a 8µg/ml de Nitrofurantoina; Barajas Lemus (2007) ubica la inserción entre <i>glnP</i> y <i>glnH</i> .
RC1562	TR10000 sty(LT2) wt. Cepa utilizada

	por John Roth como silvestre desde 2002.
RC1673	sty(LT2) <i>glnPH</i> :: <i>Mud-cam</i> Tx RC1562 RC 1488. No tiene el plásmido críptico. Esta construcción RC1673 fue realizada en esta tesis.

La nomenclatura RC es propia de las cepas utilizadas en nuestro laboratorio

### 4.3 Transducción

Para asegurar que el fenotipo observado de resistencia a nitrofurantoína se debió únicamente a la inserción del transposon *Mud-cam* en la región ya mencionada, y no a otras mutaciones acumuladas, se movió la inserción a un fondo fresco, de la cepa RC 1488 (Barajas C., 2007 Tesis) a la cepa RC 1562 mediante transducción con fagos P22 pool ( $\Phi$ Pool RC69/RC302), seleccionándose posteriormente las bacterias transductantes capaces de crecer en medio NB con 20µg/ml de cloranfenicol, y posteriormente seleccionando las bacterias resistentes a 8 µg/ml de nitrofurantoína.

### 4.4 Medios

Se utilizó medio Nutrient Broth (NB) y medio mínimo como el descrito por Smith (1961), ambos medios se utilizaron líquidos y también sólidos con 1.5% de agar.

### 4.5 Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés de Minimum Inhibitory Concentration) se define como la concentración más baja de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación de toda la noche. En diagnósticos de laboratorio, cuando se complica definir el límite de resistencia a antibióticos por otros métodos, la MIC se utiliza para dar respuestas definitivas (Andrews 2001).

Se dejó crecer una cepa toda la noche (ON = over night) en medio líquido NB, para obtener a la cepa en fase exponencial se tomaron 200 µl de este cultivo ON y se pusieron en un matraz con 10 ml de NB en agitación a 37°C, dejándose crecer hasta una densidad óptica (DO) de 0.4 a 600 nm, equivalente a aproximadamente 10<sup>8</sup> células por mililitro y se diluyó en solución salina hasta poder sembrar 100 bacterias por cada 20 µl. Si la cepa iba a ser sembrada en MM se repitió el mismo procedimiento pero creciéndose en medio mínimo líquido ON para después pasarse a un matraz con 10 ml de MM en agitación a 37°C hasta una DO de 0.25.

Además las cepas mutantes fueron crecidas en cloranfenicol a 20 µg/ml para seleccionar las cepas portadoras de la inserción *Mud-Cam*, para a las cepas wt no se realizó algún tipo de selección.

Se utilizó MSO en concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/ml en medio NB y en medio mínimo se utilizaron concentraciones de 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 µg/ml .

La nitrofurantoína (Nf) se empleó en concentraciones de 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 µg/ml en medio NB. En medio mínimo se utilizaron concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 µg/ml.

#### 4.6 Ensayos de competencia

Para los ensayos de competencia se eligió glutamina (Gln) y metionina en concentraciones de 100 µg/ml con base en lo reportado por Betteringe y Ayling (1975), además de 100 µg/ml de Histidina (His) y Leucina (Leu) como controles. Estos aminoácidos fueron probados con los antibióticos utilizados para determinar la MIC en todas las concentraciones utilizadas, en las combinaciones que muestra la tabla 2.

Tabla 2. Combinaciones en que fueron probados los antibióticos para los que previamente se determinó la MIC con los aminoácidos cuyos sistemas de transporte se piensa son los responsables de ingresar a los antibióticos dentro de la célula (Met y Gln) y aminoácidos control (His y Leu).

Ensayos de competencia para metionina sulfoximina	Ensayos de competencia para nitrofurantoína
MSO + Gln	Nf + Gln
MSO + Met	Nf + Met
MSO + Gln + Met	Nf + Gln + Met
MSO + His	Nf + His
MSO + Leu	Nf + Leu

También se llevaron a cabo ensayos de competencia entre Nf y Metx en las combinaciones que muestra la tabla 3, se espera que compitan entre ellos y la MIC se eleve.

Tabla 3. Combinaciones en que fueron utilizados los antibióticos para los que previamente se determinó la MIC.

		Concentraciones de Nf		
		1 µg/ml	2 µg/ml	6 µg/ml
Concentraciones de MSO	1 µg/ml	X		
	2 µg/ml		X	X

6 µg/ml		X	
---------	--	---	--

Para la determinación de la MIC, solo se tomaron en cuenta crecimientos visibles de bacterias, no se tomaron en cuenta crecimientos escasos o un finos tapetes bacterianos como crecimientos (Andrews 2001)

La figura 2 muestra cómo se llevó a cabo la determinación de crecimiento o inhibición de crecimiento

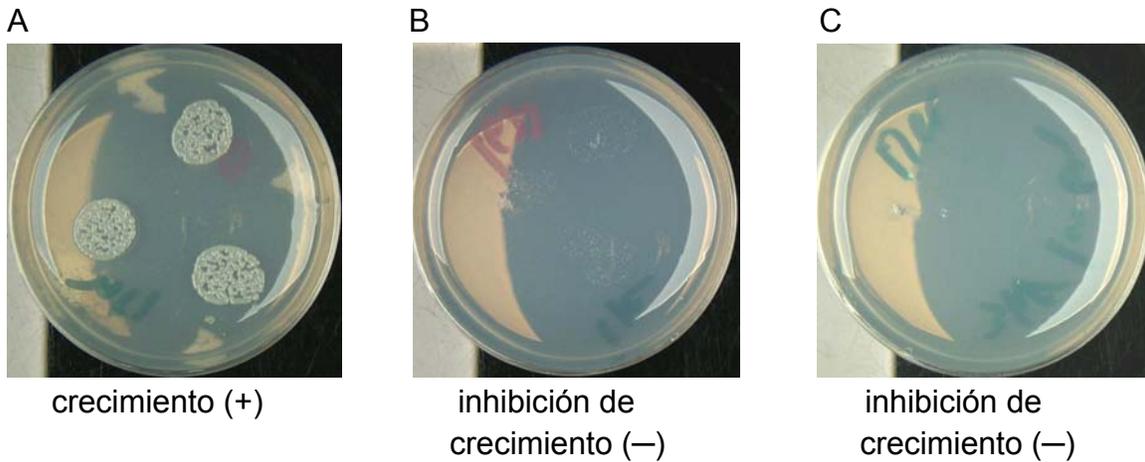


Figura 2. Fotografías de cajas petri de 20 ml con medio mínimo, En cada caja se sembraron 3 gotas de 20µl de medio líquido cada una conteniendo alrededor de 100 bacterias y se incubaron a 37°C ON. La fotografía A es un ejemplo de las cajas observadas que fueron tomadas en cuenta como crecimientos bacterianos visibles. La fotografía B muestra un fino tapete bacteriano en cada una de las 3 gotas de 20µl, crecimientos de este tipo fueron tomados en cuenta como inhibiciones de crecimiento, la fotografía C muestra una total inhibición de crecimiento. En este ejemplo sólo la caja A es tomada como crecimiento bacteriano.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Sitio de inserción del transposón *Mud-cam*

Para afinar la localización de la inserción del transposón *Mud-cam* se diseñaron primers para amplificar la región intergénica que existe entre *glnP* y *glnH* (ver materiales y métodos), estos primers fueron utilizados en las cepas RC 1562 (wt) y RC 1673 (cepa mutante portadora de la inserción *Mud-cam* en la región intergénica entre *glnH* y *glnP* que genera resistencia a nitrofurantoína).

Para la cepa wt se amplificó la región completa que existe entre estos dos genes, y se obtuvo un amplicón de aproximadamente 300 pb (Fig. 3), coincidiendo así con el fragmento esperado de 271 pb (véase materiales y métodos).

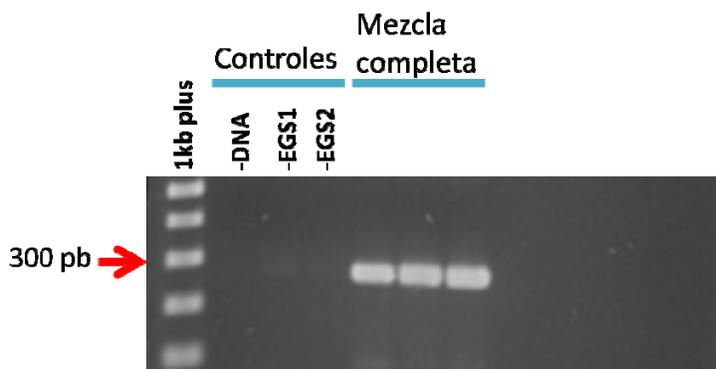


Figura 3. Amplificación utilizando como templado DNA de la cepa RC1562. En la imagen se marca la banda correspondiente a 300 pb. En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular 1kb plus, los carriles del dos a cuatro son controles con la mezcla para realizar las reacciones para PCR pero sin templado (carril 2), sin primer EGS1 (carril 3) y sin el primer EGS2 (carril 4). Los carriles 5, 6 y 7 corresponden a la mezcla completa repetida por triplicado y puede observarse una banda que corresponde con el tamaño esperado de 271pb.

Las bandas que se observan en la Fig. 3 fueron purificadas y mandadas a secuenciar. Al realizarse la reacción de secuenciación con el primer EGS1se obtiene:

```
NNNNNNTCNNNNNTGNATATGNNNTTTCNNNTTTNNGTGNNNNAANTCNTCNA
NTNCTCTANNCGGCGCGGANNTGGCGGANNGNGNCNTATNCGTACACGGAAA
NAGCNNTAGGCCCGGNGAGCGTCTCACNNCCGGGCCACAAGCCAACATCA
GGTCGTTTTATTAGGTTCTGTACCGAACCATTTTTNGTAGATTTTCGTTATAGG
TGCCATTCTCACGCNCNNATTTTCANNAN
```

Al alinearse contra el genoma completo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2 se obtuvo lo siguiente:

```

Score = 246 bits (133), Expect = 5e-62
Identities = 150/167 (90%), Gaps = 0/167 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 57      CTCTANNCGGCGCGGANNTGGCGGANNGNMCNTATNCGTACGGAAANAGCNNTAGGCC 116
|||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 896158    CTCTATCCGGCGCGGAAATGGCGGAAAGTGTCTTATCCGTACGGAAAGAGCTGTAGGCC 896217

Query 117     CGGNGAGCGTCTCTACNNCCGGGCCACAAGCCAACATCAGGTCGTTTTATTAGTTCTG 176
|||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 896218    CGGTGAGCGTCTCTACTACCGGGCCACAAGCCAACATCAGGTCGTTTTATTAGTTCTG 896277

Query 177     TACCGAACCATTTTTNGTAGATTTTCGTTATAGGTGCCATTCTCACGC 223
|||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 896278    TACCGAACCATTTTTGTAGATTTTCGTTATAGGTGCCATTCTCACGC 896324

```

Al realizarse la reacción de secuenciación con el primer EGS2 se obtuvo la secuencia:

```

NNNNNNNNNNNNNNATGGTTTCGGNNNNGAACCTTANNTTNAACGACCTTGA
TGTNTGGCTCNNTGGCCCGGTAGTGAGGACGCTCACCGGGCCTACAGCTCN
TTCCGTGACGGATAAGANACTTCCGCCATTTCCGCGCCGGATAGAGCATT
GACTATTTACACCACGGTAACAGGAACGACATATGCAGTTTGACTGGAGCGC
CAT CTGGCCCGCCATTCCGCTTCGNNTTGAGGGCN

```

Al alinearse contra el genoma completo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2 se obtuvo lo siguiente:

```

Score = 315 bits (170), Expect = 2e-86
Identities = 182/189 (96%), Gaps = 3/189 (2%)
Strand=Plus/Minus

Query 41      AAACGACCTTGATGNTGGCTCNNTGGCCCGGTAGTGAGGACGCTCACCGGGCCTACAGC 100
|||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 896264    AAACGACC-TGATGT-TGGCT-TGTGGCCCGGTAGTGAGGACGCTCACCGGGCCTACAGC 896208

Query 101     TCNFTCCGTGACGGATAAGANACTTCCGCCATTTCCGCGCCGGATAGAGCATTTGACTA 160
|||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 896207    TCTTCCGTGACGGATAAGACACTTCCGCCATTTCCGCGCCGGATAGAGCATTTGACTA 896148

Query 161     TTTACACCACGGTAACAGGAACGACATATGCAGTTTGACTGGAGCGCCATCTGGCCCGCC 220
|||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 896147    TTTACACCACGGTAACAGGAACGACATATGCAGTTTGACTGGAGCGCCATCTGGCCCGCC 896088

Query 221     ATTCCGCTT 229
|||||  |||||
Sbjct 896087    ATTCCGCTT 896079

```

La secuencia mostrada a continuación (Fig. 4) representa la región que abarca los genes *glnH*, *glnP* y *glnQ* y la región secuenciada con ambos primers, que alineó con *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2, con los genes en verde y el resultado de la secuenciación en naranja



```

GTGCCTAATTCCATGTACGCGTTTCAATGTTGCGGAACTGACGCAGGCTTTGGTTTTGATATTCGCTTTCGCGTAATCCACCGACCCGGTTCGGCTTCACGGCAAC
+-----+
CACGGATTAAGGTACATGCCAATAGTTACAAGCCCTTGACTGCGTCCAGAAACCAAACCTATAGCGAAAGCGCATTAGGTGGCTGGCCAAAGCGAGAAGTGCCGTTG
+-----+
glnH
+-----+
GACTTTGCCATCGAGTCTTTAAACGCTTTTAAATATCGTTATGTTGGCTTTCACCATCAGAGCAGACCGCTTTTGTAAATAGCCATCGGAAAAGTCGATCGCTTTTTTAC
+-----+
CTGAAACGGTAGCTCCAGAAATTGCGAAAATTATAGCAATAACAACCGAAAGTGGTAGTCTGCTCTGGCGAAAACATTATCGGTAGCCTTTTCAGCTAGCGAAAAATG
+-----+
glnH
+-----+
GCTCGTCCGTAATCGTAATACCCGCCAGCGCAGATCGATATTTTTGGTTTTGTAATGCCGGAATATGCCGCTGAAATCCATCGGTTTCAGGGTGTAGTCCAGCTTCAGT
+-----+
CGAGCAGCATTAGCATTATGGGCGGTGCGGCTAGCTATAAAAACCAAACATTACGGCCTTATTACGGCGACTTTAGTAGCCAAAGTCCCACATCAGGTGAAAGTCA
+-----+
glnH
+-----+
TCTTTCGGATAGCTCCACAGATCAACATCAAACCGACGATTTTGTGCGCCTGTTTAAATCAAACGGAACGAAACGCGTATCGGTTGCCACAACGATTTCTTATC
+-----+
AGAAAGCGCTATCGCAGGGTGTCTAGTTGTAGTTTTGGCTGCATAAACAGCGGGACAAATTTAAGTTTGCTTGCCTTGGCGCATAGCCAACGGTGTGCTCAAAGAAATG
+-----+
glnH
+-----+
CGCAGCGTGCGAAGACACCCGAAAAGCCAGGGTAAGTGCAGCCAGTAAAACCTTTTAAATAGAGACTTCAT
+-----+
GGTGCACGCTTCTGTGGGTTTTGCGTCCATTACGTCGGTCACTTTGAAAATTATCTCTGAAGTA
+-----+
glnH
+-----+

```

Figura 4. Secuencia que contiene los genes del transportador ABC de glutamina marcados en verde y la zona de la amplificación de los primer EGS1 y EGS2 en naranja.

A continuación (Fig. 5) se muestra el mapa lineal de la secuencia mostrada arriba, con las posiciones de inicio y término de los genes en el genoma de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2 y la posición y término de la secuencia obtenida.



Figura 5. Imagen que representa a los genes del transportador ABC de glutamina en color verde, la zona de la amplificación de los primer EGS1 y EGS2 en naranja y su posición en el genoma de *Salmonella entérica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2.

Para la cepa mutante se probaron todas las combinaciones de primers mencionadas en los materiales y métodos, y se obtuvieron resultados de amplificación positiva con los primers EGS1 y ORC4, como puede observarse en la Fig. 6.



Al alinearse contra el genoma completo de *Salmonella enterica* subsp. *serovar Typhimurium* str. LT2 se obtuvo:

```

Score = 292 bits (158), Expect = 5e-76
Identities = 167/171 (98%), Gaps = 3/171 (2%)
Strand=Plus/Minus

Query 30      GGTAGTGAGGANGCTCACC-GG--TACAGCTCTTTCGCTGACGGATAAGACACTTCCGC 86
                |||
Sbjct 896237    GGTAGTGAGGACGCTCACCAGGCTACAGCTCTTTCGCTGACGGATAAGACACTTCCGC 896178

Query 87      CATTTCGCGCCGGATAGAGCATTGACTATTTACACCACGGTAACAGGAACGACATATG 146
                |||
Sbjct 896177    CATTTCGCGCCGGATAGAGCATTGACTATTTACACCACGGTAACAGGAACGACATATG 896118

Query 147     CAGTTTGACTGGAGCGCCATCTGGCCCGCCATTCCGCTTTTGCTTGAGGGC 197
                |||
Sbjct 896117    CAGTTTGACTGGAGCGCCATCTGGCCCGCCATTCCGCTTTTGCTTGAGGGC 896067

```

A continuación se muestra la secuencia del inicio de Mu del lado 3´

```

TGTATTGATTCACCTTGAAGTACGAAAAAACC GGGAGGACATTGGATTATTCGGGATCTGATGGGAT
TAGATTTGGTGGGGCTTGCAAGCCTGTAGTGCAAATTTTAGTCGTTAATCAATGAAACGCGAAAGAT
AGTAAA AAATTGCTTT TGTTTCATTGAAAATACGAA AACAAAAAC

```

La secuenciación obtenida con el primer EGS1 en esta cepa mutante muestra una región que no alinea con *Salmonella* y muestra parecido con la secuencia del transposón *Mud-Cam*, esta secuencia es:

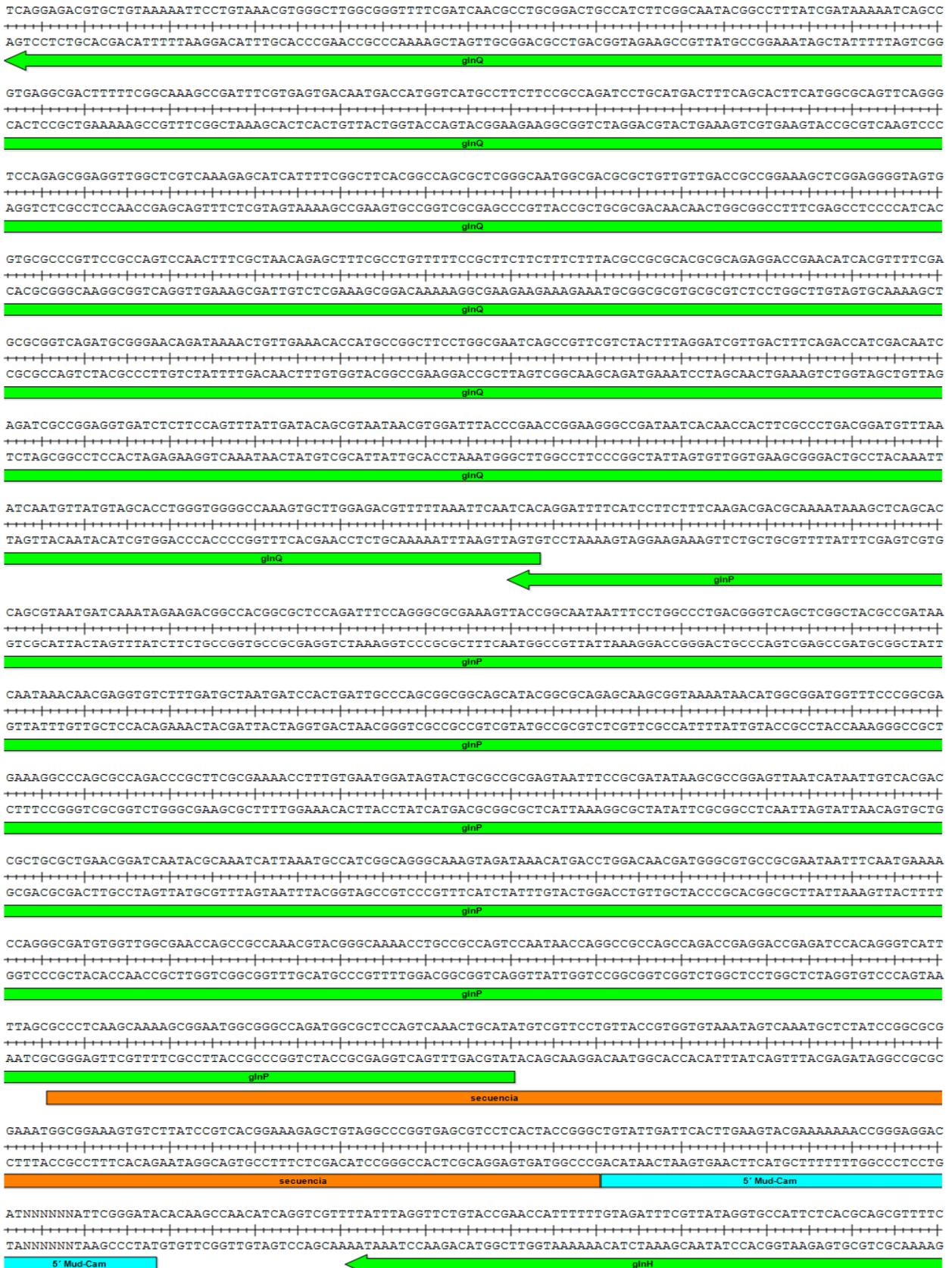
```

TGTATTGATTCACCTTGAAGTACGAAAAAACC GGGAGGACATNNNNNNNATTCG
GGATA

```

Así tenemos parte del extremo 3´ del transposon secuenciado junto con parte de la región intergénica entre *glnH* *glnP* y *glnQ*.

A continuación se muestra la secuencia que contiene a los genes *glnH* *glnP* y *glnQ*, y su región intergénica (Fig. 7), los genes se muestran en verde y se indica el sentido en el que se transcriben. La zona en que alinea la secuencia obtenida de la secuenciación de las bandas de la Fig.6 se marca en naranja y en azul la secuencia de parte del transposón que logro obtenerse.



```

AGCGCGCGTTGACTTTCTCGCGCAGTTCATCGCTGCCTTTCGGGAAGGCAACTCCGTATTGCTGTGCTTCCAGCGATTCCGCTACCGCCTTGAAGTGGCCGTTGCCTGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCGCGCGGCAACTGAAAGAGCGCGTCAAGTAGCGAGCGAAAGCCCTTCCGTTGAGGCATAACGACACGAAGGTCGCTAAGCGGATGGCGGAACTTGACCGGCAACGGACG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
glnH
GTTTTGATAAAGTACAGGATGTTTCGGCGTATCGTGCAGAACGGCGTCTGCGCGGTTGGTGCCTAATTCATGTACGCGTTATCAATGTTTCGGGAACTGACGCAGGTCTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAAAACATTTTCATGTCCTACAAGCCGCATAGCACGCTTTCGCCGAGACGCGCAACCACGGATTAAGGTACATGCGCAATAGTTACAAGCCCTTGACTGCGTCCAGAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
glnH
TGGTTTTGATATTTCGCTTTCGCGTAATCCACCGACCCGGTTCGGCTCTTCACGGCAACGACTTTGCCATCGAGGTCTTTAACGCTTTTAATATCGTTATTGTTGGCTTTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCAAACATAAAGCGAAAGCGCATTAGGTGGCTGGGCCAAGGCGAGAAGTGCCGTTGCTGAAACGGTAGCTCCAGAAATTGCGAAAATTATAGCAATAACAACCGAAAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
glnH
ACCATCACGAGCAGACCGCTTTTGTAAATAGCCATCGGAAAAGTCGATCGCTTTTTTACGCTCGTCCGTAATCGTAATACCCGCCAGCGCCAGATCGATATTTTTGGTTTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGTAGTGTCTGCTGCGGAAAACATTATCGGTAGCCTTTTCAGCTAGCGAAAATGCGAGCAGGCATTAGCATTATGGGCGGTGCGGGTCTAGCTATAAAAACCAAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
glnH
TAATGCCGAATAATGCCGCTGAAATCCATCGGTTTCAGGGTGTAGTCCAGCTTCAGTTCTTTTCGCGATAGCGTCCACAGATCAACATCAAACCGACGTATTTGTCGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTACGGCCTTATTACGGCGACTTAGGTAGCCAAAGTCCACATCAGGTGCAAGTCAAGAAAGCGCTATCGCAGGGTGTCTAGTTGTAGTTTTGGCTGCATAAACAGCG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
glnH
CGTGTTTAAATTCAAACGGAACGAAACCGCGTATCGGTTGCCACAACGAGTTTCTTATCCGCGAGCGTGCGAAGACACCGCAAAAGCCAGGGTAAGTGCAGCCAGTGAAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGACAAATTTAAGTTGCGCTGCTGCGGCATAGCCAAACGGTGTGCTCAAAGAAATAGGCGTCGCACGCTTCTGTGGCGTTTTTCGGTCCCATTACGTCGGTCACTTTGA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
glnH
TTAATAGAGACTTCAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATTATCTGGAAGTA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
glnH

```

Figura 7. Secuencia que contiene los genes del transportador ABC de glutamina marcados en verde y la zona de la amplificación de los primer ORC4 y EGS1 dividida de tal manera que en naranja se muestra la secuencia obtenida correspondiente al genoma de Salmonella y en azul la secuencia obtenida correspondiente al transposón Mud-cam.

A continuación (Fig. 8) se muestra el mapa lineal de la secuencia mostrada arriba, con las posiciones de inicio y término de los genes en el genoma de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2 y la posición y término de la secuencia obtenida, así como, la zona donde se encuentra la secuencia obtenida que forma parte del transposón Mud-cam.

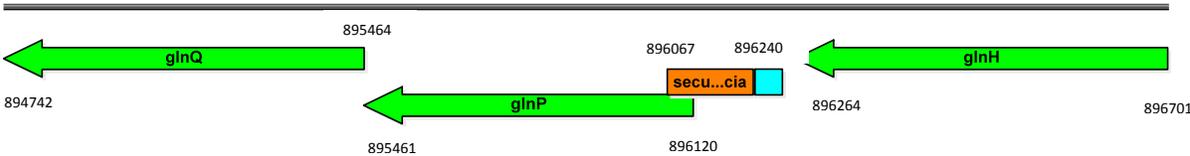


Figura 8. Imagen que representa a los genes del transportador ABC de glutamina en color verde, la zona de la amplificación de los primer EGS1 y ORC4 en naranja y azul representando la secuencia obtenida correspondiente al genoma de Salmonella y la secuencia obtenida correspondiente al transposón Mud-cam, respectivamente. Además de su posición en el genoma de Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium str. LT2.

Así podemos constatar que el sito de la inserción es la posición 896240.

## 5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de Nf para corroborar los resultados de Barajas C (2007 Tesis) en medio NB (Tabla 4) obteniéndose el mismo resultado, la cepa con la inserción del transposón en la región del transportador ABC de glutamina fue capaz de crecer hasta 8 µg/ml. La MIC se reporta como la concentración mínima en la que un antibiótico inhibe el crecimiento, podemos constatar en este experimento que la MIC es de  $\geq 9$  µg/ml para la cepa mutante RC1673 con el transposon en la región intergénica entre *glnH* y *glnP* y la de la cepa wt es de  $\geq 5$  µg/ml

Tabla 4. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Nf en medio NB para determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a Nf

Cepas	Concentración en µg/ml de Nf en medio NB										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RC1562	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RC1673	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

Previamente se reportó una resistencia parcial de 5 µg/ml a MSO (Betteridge and Ayling 1975) en MM asociada con una mutación en el gen *glnP* que codifica para la permeasa del transportador ABC de glutamina, debido a esto se probó si la mutante RC1673 producía un fenotipo similar de resistencia a MSO (Tabla 5) dándose como resultado una resistencia de hasta 5 µg/ml para la cepa mutante mientras que para la cepa wt la resultado de hasta 2 µg/ml, obteniéndose así MICs de  $\geq 3$  y  $\geq 6$  para las cepas wt y mutante respectivamente.

Tabla 5. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de MSO en MM para determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a MSO

Cepas	Concentración en µg/ml de MSO en medio mínimo															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
RC1562	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1673	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

También se determinó la MIC de Nf en MM tanto para la cepa wt como la mutante (Tabla 6) ambas cepas tienen una MIC de  $\geq 1$  µg/ml en MM.

Tabla 6. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Nf en MM para determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a Nf

Cepas	Concentración en µg/ml de Nf en medio mínimo					
	0	1	2	3	4	5
RC1562	+	-	-	-	-	-
RC1673	+	-	-	-	-	-

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

### 5.3 Ensayos de competencia

Betteridge y Ayling (1975) realizaron ensayos de competencia con Gln y Met para demostrar que los sistemas de transporte para metionina y glutamina transportan a la MSO. Una resistencia total (50 µg/ml) a este antibiotico se alcanza mutando ambos genes o en concentraciones altas tanto de Met como Gln (100 µg/ml), debido a esto se decidió probar si estos aminoácidos a las mismas concentraciones (100 µg/ml) son capaces de aumentar la resistencia a Nf tanto en la cepa mutante como wt, además se realizaron ensayos de competencia con MSO para comparar.

La tabla 7 muestra los resultados de determinación de MIC en presencia de 100 µg/ml de Gln, Met y Gln con Met para MSO tanto en la cepa mutante RC1673 como la cepa wt RC1562

Tabla 7. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de MSO en combinación con 100µg/ml de Gln, Met y Gln con Met, en MM para la determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a MSO.

Cepas	Aminoácido (100 µg/ml)	Concentración en µg/ml de MSO							
		0	5	10	15	20	25	30	
RC1562	Gln	+	+	+	+	+	+	+	
RC1673		+	+	+	+	+	+	+	
RC1562	Met	+	+	+	+	+	+	+	
RC1673		+	+	+	+	+	+	+	
RC1562	Met + Gln	+	+	+	+	+	+	+	
RC1673		+	+	+	+	+	+	+	

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

Es claro que ambas cepas aumentan su MIC a MSO en presencia de estos aminoácidos de  $\geq 3$  y  $\geq 6$  µg/ml en las cepas wt y mutante respectivamente (Tabla 5) a más de 30 µg/ml (Tabla 7).

Para corroborar que esta resistencia es específica de la competencia con Gln y/o Met se utilizaron Leu e Hist como controles y se determinó la MIC en presencia de 100 µg/ml de cada uno estos aminoácidos y MSO, los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de MSO en combinación con 100µg/ml de His, y Leu, en MM para determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a MSO.

Cepas	Aminoácido (100 µg/ml)	Concentración en µg/ml de MSO															
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
RC1562	His	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1673		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1562	Leu	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1673		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

En presencia de His la MIC no cambió con respecto al ensayo realizado sin antibióticos. En presencia de leucina la MIC de la cepa RC1562 se mantuvo igual que el ensayo sin antibióticos. Sin embargo, la MIC de la cepa RC1673 aumenta de  $\geq 6$  a  $\geq 10$   $\mu\text{g/ml}$ , aun así este aumento se encontró muy por debajo de los más de 30  $\mu\text{g/ml}$  que se obtuvo con Gln y/o Met.

Los resultados de los ensayos de competencia entre Nf con Gln, Met y Glu + Met Nf se encuentran en la Tabla 9. Puede observarse un incremento en la MIC de Nf en la cepa wt de  $\geq 1$  a  $\geq 2$  en presencia tanto de Gln y Met + Gln, no se observa aumento de la MIC en presencia de Met para la cepa wt, la cepa mutante aumenta su MIC de  $\geq 1$  a  $\geq 3$  en presencia de Gln y Met + Gln y de 1 a  $\geq 2$  en presencia de Met.

Tabla 9. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Nf en combinación con 100 $\mu\text{g/ml}$  de Gln, Met y Gln con Met, en MM para determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a Nf.

Cepas	Aminoácido (100 $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración en $\mu\text{g/ml}$ de Nf					
		0	1	2	3	4	5
RC1562	Gln	+	+	-	-	-	-
RC1673		+	+	+	-	-	-
RC1562	Met	+	-	-	-	-	-
RC1673		+	+	-	-	-	-
RC1562	Met + Gln	+	+	-	-	-	-
RC1673		+	+	+	-	-	-

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

Para corroborar que esta MIC se genera específicamente por la competencia con Gln y/o Met se utilizaron Leu e Hist como controles y se determinó la MIC en presencia de 100  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno estos aminoácidos y Nf. Los resultados se muestran en la Tabla 10. La MIC no se modificó para la cepa wt pero para la cepa mutante aumentó a  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  en presencia de Leu.

Tabla 10. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Nf en combinación con 100 $\mu\text{g/ml}$  de Hist y Leu, en MM para determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a Nf.

Cepas	Aminoácido (100 $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración en $\mu\text{g/ml}$ de Nf					
		0	1	2	3	4	5
RC1562	His	+	-	-	-	-	-
RC1673		+	-	-	-	-	-
RC1562	Leu	+	-	-	-	-	-
RC1673		+	+	-	-	-	-

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

Con el fin de evaluar si los antibióticos Nf y MSO se transportan mediante los mismos mecanismos y pudieran competir y excluirse, se llevaron a cabo ensayos

de competencia entre los mismos antibióticos, los resultados pueden observarse en la Tabla 11.

Tabla 11. Datos de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Nf en combinación con MSO en MM para determinación de la MIC de la cepa wt y mutante a Nf.

	Concentración en $\mu\text{g/ml}$ de Nf /MSO			
Cepas	0	1/1	2/2	6/2
1562	+	-	-	-
1673	+	-	-	-

Simbolos: (+) crecimiento (-) inhibición de crecimiento

## 6. DISCUSION

### 6.1 Mapeo de la inserción

Se pudo constatar que la inserción se ubica en la posición 896240 del genoma completo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2, y que el transposón, al obtenerse una amplificación con el par de primers EGS1 y ORC4, se encuentra orientado con su región izquierda hacia el lado de *glnP* en el genoma de *Salmonella* (Fig. 9), ya que el primer EGS1 como se menciona en los materiales y los métodos, se ancla en *glnP* antes de la región intergénica entre *glnP* y *glnH* y está diseñado para amplificar hacia el extremo 3' donde se encuentra *glnH*, por otro lado ORC4 se ancla en la región izquierda del transposón *Mud-cam* y está diseñado para amplificar hacia el exterior del elemento hacia el lado 3'.

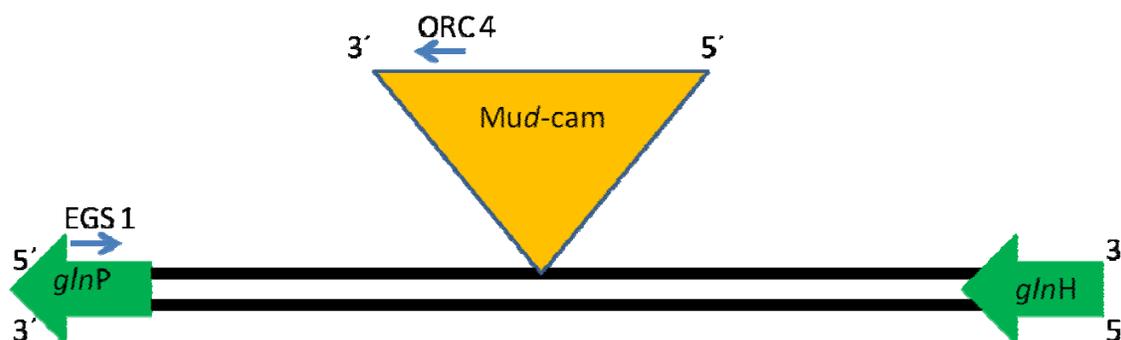


Figura 9. Imagen que representa la orientación que debe de tener el transposón *Mud-cam* inserto en el mutante con fenotipo de resistencia a NF, para permitir la amplificación entre los primers EGS1 y ORC4.

No se pudo amplificar el otro extremo del transposón utilizando el par de primers EGS2 y ORC5 bajo varias condiciones de amplificación. Para saber si el resultado negativo de la amplificación se debe a cambios en la secuencia, ya sea del extremo del transposón donde ancla el primer ORC5 o de la secuencia donde ancla el primer EGS2, se tendría que diseñar otro par de primers, donde uno ancle más hacia el interior del transposon y el otro en una región distinta de donde ancla EGS2 probablemente hacia al extremo 3' en *glnH*, de esta manera si se lograra la amplificación y esta fuese secuenciada se podría analizar si existen cambios en la secuencia que impidan su amplificación por los primers EGS2 y ORC5. Por ejemplo, se logró identificar en maíz, una delección de 10pb en un transposón *Ac* en su extremo izquierdo y se asoció a un rearrreglo de todo el sitio blanco debido a un evento aberrante de transposición (Conrad and Brutnell 2005).

El sitio blanco donde se inserta el transposón es concorde al pentámero propuesto C-Py-(G/C)-Pu-G (Mizuuchi and Mizuuchi 1993), con la secuencia GGGCC que se encuentra dentro de las secuencias de inserción que se predicen para el bacteriófago Mu (Haapa-Paananen, Rita et al. 2002) y concorde con el trinucleótido CGG propuesto como sitio blanco preferencial para el bacteriófago Mu (Manna, Deng et al. 2005). También se han propuesto regiones de control transcripcional río arriba y secuencias que se superponen con promotores como zonas preferenciales de inserción para el bacteriófago Mu (Wang and Higgins 1994; Manna, Wang et al. 2001). La región intercistromica que existe entre *glnH* y *glnP* es una secuencia palindrómica que parece tener una función de regulación reduciendo la expresión de los genes distantes, *glnP* y *glnQ* con respecto a *glnH* (Nohno, Saito et al. 1986). Hasta no obtener una amplificación del otro extremo del transposón, no se podrá saber por qué este transportador ha dejado de ser funcional, como lo demuestran los experimentos con MSO. Existe la posibilidad de que la región intercistromica juegue un papel regulatorio para la expresión del transportador ABC de glutamina y que la mutarla se afecte su transcripción; otra posibilidad es que debido a un efecto aberrante en la transposición de *Mud-cam* se haya producido un rearrreglo mayor que haya afectado la expresión de *glnH* o la funcionalidad de la proteína.

## 6.2 Concentración mínima inhibitoria

Los resultados de CMI obtenida para Nf en medio NB muestran que la cepa mutante tiene una CMI de  $\geq 9\mu\text{g/ml}$  y la cepa wt una de  $\geq 5\mu\text{g/ml}$ , mostrándose así que el transposón que se encuentra en la región intercistromica entre *glnH* y *glnP* provoca aumentando la resistencia a Nf en *Salmonella*. Para saber si esta resistencia se debe a que el transportador ABC de glutamina fue afectado, se comparó con los resultados obtenidos por Betteridge y Ayling (1975) que trabajaron con una mutante en *glnP* y observaron una resistencia a MSO de  $5\mu\text{g/ml}$  en MM, determinándose la MIC para MSO tanto de la cepa RC1562 (wt) como RC1673 (mutante) los resultados muestran una MIC de  $\geq 6\mu\text{g/ml}$  para la cepa mutante y de  $\geq 3\mu\text{g/ml}$  para la cepa wt, por lo tanto la mutación en la región intercistromica entre *glnH* y *glnP* tiene un fenotipo similar al de la mutante en *glnP* probablemente a que el transportador ABC de glutamina en ambos casos ha sido afectado y por lo tanto se disminuye el transporte hacia dentro de la célula, tanto de Nf como de MSO.

En el caso de la determinación de MIC a Nf en MM, ambas cepas no son capaces de tolerar  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  de Nf. Se observa un poco de crecimiento de la cepa mutante en la concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  de Nf en forma de un fino tapete de colonias muy pequeñas, mientras que la cepa wt no crece en absoluto. Sin embargo en la determinación de la MIC se recomienda sólo tomar en cuenta crecimientos

visibles, ignorando crecimientos tenues o crecimientos aislados de sólo unas cuantas colonias (Andrews 2001) por lo que se establece como  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  la MIC para ambas cepas. Tendrían que probarse concentraciones entre 0 y  $1\mu\text{g/ml}$  para saber si existe una diferencia clara en el crecimiento de estas cepas a concentraciones más bajas que permitan mostrar o no una mayor resistencia de la cepa mutante, el hecho de que en NB se observen diferencias claras y en MM no, puede deberse a que la Nf entra por más de un sistema de transporte.

### 6.3 Ensayos de competencia

Para soportar la teoría de que el transportador ABC de glutamina se encarga del transporte de Gln y Nf se realizaron ensayos de competencia. Previamente Betteridge y Ayling (1975) demostraron que una resistencia total a MSO ( $50\mu\text{g/ml}$ ) se obtiene tanto con una doble mutante en *glnP* y *metD*, así como en presencia de  $100\mu\text{g/ml}$  de Met y/o Gln, demostrando así que la MSO entra a *Salmonella* por dos sistemas de transporte de alta afinidad, el de Gln y el de Met. Por lo tanto, en este trabajo se decidió probar estos aminoácidos a la misma concentración utilizada por Betteridge y Ayling ( $100\mu\text{g/ml}$ ) tanto en presencia de MSO como Nf en el mismo medio utilizado por los autores, MM. Los resultados muestran una alta tolerancia a MSO,  $> 30\mu\text{g/ml}$  tanto en presencia de Met, Gln y Met + Gln, tanto en la cepa wt como mutante, corroborando que el transportador ABC de glutamina junto con el transporte de alta afinidad para Met se encargan de transportar MSO al interior de la célula.

En los ensayos de competencia utilizando Nf en combinación con Met y/o Gln puede observarse que la MIC aumenta de  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  a  $\geq 2\mu\text{g/ml}$  en la cepa wt y de  $\geq 1\mu\text{g/ml}$  a  $\geq 3\mu\text{g/ml}$  en la cepa mutante, una posible explicación a esto, es que la Nf entra por más de un sistema de transporte a la célula, entre los cuales están los sistemas de alta afinidad de Gln y Met. El observar una resistencia mayor en un medio rico como lo es NB, puede deberse a que estos sistemas de transporte están ocupados transportando sustancias para los cuales son más afines y debido a esto se requieren concentraciones más altas de Nf para poder competir contra todas estas sustancias.

Los ensayos de competencia entre antibióticos (MSO y Nf) muestran una MIC igual a la de Nf en MM sin ningún aminoácido. Existe la posibilidad de que la afinidad a la Nf sea mayor que a MSO y por lo tanto sea la Nf la que determine la MIC, sin embargo faltan experimentos más enfocados a determinar dicha afinidad.

Se escogieron Leu e His como controles para realizar ensayos de competencia. Al utilizar His junto con MSO o Nf no se observa algún cambio en la respuesta de las cepas wt y la mutante con la inserción a MSO. Sin embargo, la Leu aumenta la

resistencia de la cepa mutante. En *E. coli* la proteína reguladora Lrp de respuesta a leucina es una proteína de unión a DNA que se requiere para la expresión de Ntr. La expresión de Lrp se activa en condiciones de poco crecimiento y elevado guanosin tetrafosfato. Lrp parece ser un factor que coordina la asimilación de amonio y el catabolismo de aminoácidos en ambientes pobres de aminoácidos (o sin leucina) y la leucina funciona entonces como señal de suficiencia de aminoácidos. Lrp controla positivamente la síntesis de la glutamato sintasa (genera glutamato de glutamina y  $\alpha$  ketoglutarato), la cual afecta los niveles de glutamina, el efector más importante de la respuesta a Ntr. Finalmente los reguladores de la respuesta Ntr controlan la asimilación de amonio (Reitzer 2003), por lo tanto en los experimentos de competencia en que se utilizó leucina como control y se observa crecimiento de *Salmonella* en concentraciones a las que los antibióticos (nitrofurantoina y metionina sulfoximina) normalmente inhiben su crecimiento; quizá se deba a que la leucina promovió que se apaguen los genes Ntr y por lo tanto el transporte de aminoácidos, así el transporte de los antibióticos probados disminuiría. Sin embargo, habría que probar que esta respuesta es lo suficiente mete rápida como para evitar que *Salmonella* ingrese dichos antibióticos. El transportador de leucina también parece funcionar como sistema de transporte de baja afinidad para metionina (Ayling, Mojica-a et al. 1979). Así, otra posibilidad, es que estos tres sistemas de transporte (metionina, glutamina y leucina) estén ingresando a la nitrofurantoina.

Con estos ensayos, se puede decir que estos dos sistemas de transporte de alta afinidad para Met y Gln no son específicos, al parecer ambos pueden transportar los dos aminoácidos y poseen más afinidad para estos que para MSO, estos resultados no concuerdan con los hallazgos estructurales para la proteína de unión a glutamina en la que se encuentra una conformación cerrada estable con L-glutamina, proponiéndose así una interacción sumamente selectiva, tanto por estudios cristalográficos (Sun, Rose et al. 1998) como por resonancia magnética nuclear (Pistolesi and Tjandra 2012). Los resultados de este trabajo muestran que este transportador ABC de glutamina transporta, al menos, Gln, Met, MSO y muy probablemente también Nf, vale la pena hacer estudios de estructura en presencia de Met, MSO o Nf y evaluar la estructura que adopta la proteína de unión a glutamina. El presente trabajo sugiere que quizá la estructura cerrada sea más flexible de lo que se piensa.

En general, los efectos terapéuticos de nitrofurantoina se dan por encima de los 200  $\mu\text{g/ml}$  y no permiten que incluso mutantes con resistencias de 96  $\mu\text{g/ml}$  puedan proliferar (Sandegren, Lindqvist et al. 2008). Por lo tanto es difícil pensar que un mutante con una resistencia a Nf de  $\geq 9 \mu\text{g/ml}$  (Tabla 4) pueda llegar a tener una ventaja significativa sobre las cepas wt al enfrentarse a estos ambientes. Sin embargo se sabe que la nitrofurantoina, al ser rápidamente excretada por las

vías urinarias presenta concentraciones muy fluctuantes (Ekstrom, Fellner et al. 1979) en las cuales quizá mutantes con resistencias parciales a Nf puedan llegar a sobrevivir más que las cepas wt, se tendrán que hacer más experimentos para saber si este tipo de mutantes con resistencias parciales representan cepas capaces de sobrevivir a los efectos terapéuticos de la nitrofurantoína, o si tiene valor en los procesos adaptativos parciales de la evolución a la resistencia farmacológica con valor terapéutico.

## 7. CONCLUSIONES

- La inserción del transposón *Mud-cam* que genera una resistencia de hasta 8 µg/ml en *Salmonella enterica serovar* Typhimurium LT2 se encuentra en la posición 896240 de su genoma completo y corresponde a la región intercistronica que existe entre los genes *glnH* y *glnP* que codifican respectivamente para la proteína periplasmática y permeasa del transportador ABC de glutamina.
- El trasposón se encuentra orientado con el 3' terminal del lado del gen *glnP*
- Esta mutación en la región intercistronica da un fenotipo de resistencia a MSO igual al de una mutante en *glnP*, por lo que existe la posibilidad de que cualquiera de estas dos mutaciones inactiven al transportador.
- Los ensayos de competencia con Met y/o Gln demuestran que los sistemas de transporte para Met y Gln están involucrados en el fenotipo de resistencia a MSO y Nf.
- Los ensayos de competencia sugieren que Nf ingresa a *Salmonella* al menos por 2 sistemas de transporte, el de Gln y Met.
- Los ensayos de competencia con Leu y el fenotipo de resistencia observado en presencia de este aminoácido sugieren que la Leucina puede estar involucrada en procesos de señalización que apaguen los sistemas de transporte de Gln y Met ó que el sistema de transporte de Leu también ingresa Nf a *Salmonella*.

## 8. PERSPECTIVAS

- Amplificar el otro extremo de la región donde se inserta el transposón y averiguar si la función del transportador ABC de glutamina se ve afectada por mutar un sitio de control de la expresión del transportador o si es debido a un re arreglo de toda la región debido a un efecto de transposición aberrante que haya afectado directamente la secuencia del gen *glnH*.
- Crear una doble mutante para los sistemas de transporte de alta afinidad para Met y Gln y comparar con los ensayos de competencia para ver si se obtiene un fenotipo similar
- Se propone hacer análisis de estructura de la proteína de unión a glutamina y evaluar si puede formar un complejo cerrado en presencia de Met, MSO y Nf para probar que esta proteína puede no ser tan específica como se piensa.
- Evaluar si mutantes en el sistema de transporte para Leu presentan resistencia a Nf.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, J. M. (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations." J Antimicrob Chemother 48 Suppl 1: 5-16.
- Antunes, P., J. Machado, et al. (2006). "Illegal use of nitrofurans in food animals: Contribution to human salmonellosis?" Clin Microbiol Infect 12(11): 1047-1049.
- Asnis, R. E. (1957). "The reduction of Furacin by cell-free extracts of Furacin-resistant and parent-susceptible strains of Escherichia coli." Arch Biochem Biophys 66(1): 208-216.
- Ayling, P. D. and E. S. Bridgeland (1972). "Methionine transport in wild-type and transport-defective mutants of Salmonella typhimurium." J Gen Microbiol 73(1): 127-141.
- Ayling, P. D., T. Mojica-a, et al. (1979). "Methionine transport in Salmonella typhimurium: evidence for at least one low-affinity transport system." J Gen Microbiol 114(2): 227-246.
- Barajas-Lemus, C. (2007). BÚSQUEDA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA NITROFURANTOÍNA EN Salmonella enterica, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Barajas-Lemus, C. (2007). BÚSQUEDA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA NITROFURANTOÍNA EN Salmonella enterica. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. México DF, Universidad Nacional Autónoma de México. Licenciatura: 74.
- Betteridge, P. R. and P. D. Ayling (1975). "The role of methionine transport-defective mutations in resistance to methionine sulphoximine in Salmonella typhimurium." Mol Gen Genet 138(1): 41-52.
- Betteridge, P. R. and P. D. Ayling (1976). "The regulation of glutamine transport and glutamine synthetase in Salmonella typhimurium." J Gen Microbiol 96(2): 324-334.
- Bouki, C., D. Venieri, et al. (2013). "Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review." Ecotoxicol Environ Saf 91: 1-9.
- Breeze, A. S. and E. E. Obaseiki-Ebor (1983). "Nitrofurantoin-resistant strains of Escherichia coli K12: some with chromosomally determined resistance and others carrying R-plasmids." J Antimicrob Chemother 12(6): 543-547.
- Breeze, A. S. and E. E. Obaseiki-Ebor (1983). "Transferable nitrofurantoin resistance conferred by R-plasmids in clinical isolates of Escherichia coli." J Antimicrob Chemother 12(5): 459-467.
- Bryant, D. W., D. R. McCalla, et al. (1981). "Type I nitroreductases of Escherichia coli." Can J Microbiol 27(1): 81-86.
- Castaneda-Ramirez, C., V. Cortes-Rodriguez, et al. (2011). "Isolation of Salmonella spp. from lettuce and evaluation of its susceptibility to novel bacteriocins of Bacillus thuringiensis and antibiotics." J Food Prot 74(2): 274-278.
- Claverie-Martin, F. and B. Magasanik (1991). "Role of integration host factor in the regulation of the glnHp2 promoter of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A 88(5): 1631-1635.
- Connell, S. R., D. M. Tracz, et al. (2003). "Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance." Antimicrob Agents Chemother 47(12): 3675-3681.
- Conrad, L. J. and T. P. Brutnell (2005). "Ac-immobilized, a stable source of Activator transposase that mediates sporophytic and gametophytic excision of Dissociation elements in maize." Genetics 171(4): 1999-2012.
- Courvalin, P. (2006). "Vancomycin resistance in gram-positive cocci." Clin Infect Dis 42 Suppl 1: S25-34.
- Craig, N. L. and H. A. Nash (1984). "E. coli integration host factor binds to specific sites in DNA." Cell 39(3 Pt 2): 707-716.

D'Costa, V. M., K. M. McGrann, et al. (2006). "Sampling the antibiotic resistome." Science 311(5759): 374-377.

Dantas, G., M. O. Sommer, et al. (2008). "Bacteria subsisting on antibiotics." Science 320(5872): 100-103.

de Lencastre, H., D. Oliveira, et al. (2007). "Antibiotic resistant Staphylococcus aureus: a paradigm of adaptive power." Curr Opin Microbiol 10(5): 428-435.

Dione, M. M., U. Ikumapayi, et al. (2011). "Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal Salmonella isolates in The Gambia and Senegal." J Infect Dev Ctries 5(11): 765-775.

Ekstrom, B., H. Fellner, et al. (1979). "Antibacterial activity of co-trimazine in vitro and in vivo." Infection 7(2): 74-80.

French, C. E., S. Nicklin, et al. (1998). "Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by Enterobacter cloacae PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase." Appl Environ Microbiol 64(8): 2864-2868.

Grove, J. I., P. F. Searle, et al. (1999). "Virus-directed enzyme prodrug therapy using CB1954." Anticancer Drug Des 14(6): 461-472.

Grundy, C. E. and P. D. Ayling (1992). "Fine structure mapping and complementation studies of the metD methionine transport system in Salmonella typhimurium." Genet Res 60(1): 1-6.

Guay, D. R. (2001). "An update on the role of nitrofurans in the management of urinary tract infections." Drugs 61(3): 353-364.

Haapa-Paananen, S., H. Rita, et al. (2002). "DNA transposition of bacteriophage Mu. A quantitative analysis of target site selection in vitro." J Biol Chem 277(4): 2843-2851.

Hall, R. M. and H. W. Stokes (1993). "Integrans: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination." Genetica 90(2-3): 115-132.

Harder, K. J., H. Nikaido, et al. (1981). "Mutants of Escherichia coli that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin." Antimicrob Agents Chemother 20(4): 549-552.

Hawkey, P. M. (1998). "The origins and molecular basis of antibiotic resistance." BMJ 317(7159): 657-660.

Hooper, D. C. (2000). "Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones." Clin Infect Dis 31 Suppl 2: S24-28.

Kadner, R. J. (1974). "Transport systems for L-methionine in Escherichia coli." J Bacteriol 117(1): 232-241.

Kadner, R. J. (1975). "Regulation of methionine transport activity in Escherichia coli." J Bacteriol 122(1): 110-119.

Kadner, R. J. and W. J. Watson (1974). "Methionine transport in Escherichia coli: physiological and genetic evidence for two uptake systems." J Bacteriol 119(2): 401-409.

Klose, K. E. and J. J. Mekalanos (1997). "Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates Salmonella typhimurium virulence." Infect Immun 65(2): 587-596.

Knox, R. J., F. Friedlos, et al. (1992). "The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--II. A comparison of an Escherichia coli nitroreductase and Walker DT diaphorase." Biochem Pharmacol 44(12): 2297-2301.

Koder, R. L., C. A. Haynes, et al. (2002). "Flavin thermodynamics explain the oxygen insensitivity of enteric nitroreductases." Biochemistry 41(48): 14197-14205.

Kuroda, M., T. Ohta, et al. (2001). "Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus." Lancet 357(9264): 1225-1240.

- Kustu, S. G., N. C. McFarland, et al. (1979). "Nitrogen control of Salmonella typhimurium: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems." J Bacteriol 138(1): 218-234.
- Lewis, K. (2005). "Persister cells and the riddle of biofilm survival." Biochemistry (Mosc) 70(2): 267-274.
- Manna, D., S. Deng, et al. (2005). "Bacteriophage Mu targets the trinucleotide sequence CGG." J Bacteriol 187(10): 3586-3588.
- Manna, D., X. Wang, et al. (2001). "Mu and IS1 transpositions exhibit strong orientation bias at the Escherichia coli bgl locus." J Bacteriol 183(11): 3328-3335.
- Marshall, C. G., I. A. Lessard, et al. (1998). "Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms." Antimicrob Agents Chemother 42(9): 2215-2220.
- Martinez-Julvez, M., A. L. Rojas, et al. (2012). "Structure of RdxA--an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in Helicobacter pylori." FEBS J 279(23): 4306-4317.
- Mermelstein, R., D. K. Kiriazides, et al. (1981). "The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria." Mutat Res 89(3): 187-196.
- Miller, E. S. and J. E. Brenchley (1981). "L-Methionine SR-sulfoximine-resistant glutamine synthetase from mutants of Salmonella typhimurium." J Biol Chem 256(21): 11307-11312.
- Mizuuchi, M. and K. Mizuuchi (1993). "Target site selection in transposition of phage Mu." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 58: 515-523.
- Neidhardt, F. (1996). Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC, ASM Press.
- Nikaido, H. (2009). "Multidrug resistance in bacteria." Annu Rev Biochem 78: 119-146.
- Nohno, T., T. Saito, et al. (1986). "Cloning and complete nucleotide sequence of the Escherichia coli glutamine permease operon (glnHPQ)." Mol Gen Genet 205(2): 260-269.
- Nokhbeh, M. R., S. Boroumandi, et al. (2002). "Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in Salmonella enterica serovar Typhimurium TA1535." Mutat Res 508(1-2): 59-70.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, et al. (1996). "Proton-dependent multidrug efflux systems." Microbiol Rev 60(4): 575-608.
- Paulsen, I. T., R. A. Skurray, et al. (1996). "The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs." Mol Microbiol 19(6): 1167-1175.
- Peterson, F. J., R. P. Mason, et al. (1979). "Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by Escherichia coli and rat hepatic microsomes." J Biol Chem 254(10): 4009-4014.
- Pistolesi, S. and N. Tjandra (2012). "Temperature dependence of molecular interactions involved in defining stability of glutamine binding protein and its complex with L-glutamine." Biochemistry 51(2): 643-652.
- Poole, K. and R. Srikumar (2001). "Multidrug efflux in Pseudomonas aeruginosa: components, mechanisms and clinical significance." Curr Top Med Chem 1(1): 59-71.
- Porter (1995). Mechanism of transcriptional activation by NTRC (Nitrogen Regulatory Protein C): Requirement for oligomerization and phosphorylation. In Two-component signal transduction. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- Race, P. R., A. L. Lovering, et al. (2005). "Structural and mechanistic studies of Escherichia coli nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme." J Biol Chem 280(14): 13256-13264.
- Reitzer, L. (2003). "Nitrogen assimilation and global regulation in Escherichia coli." Annu Rev Microbiol 57: 155-176.

Richards, W. A., E. Riss, et al. (1955). "Nitrofurantoin; clinical and laboratory studies in urinary tract infections." *AMA Arch Intern Med* 96(4): 437-450.

Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel (2002). "The role of integrons in antibiotic resistance gene capture." *Int J Med Microbiol* 292(2): 115-125.

Salamanca-Pinzon, S. G., R. Camacho-Carranza, et al. (2006). "Nitrocompound activation by cell-free extracts of nitroreductase-proficient *Salmonella typhimurium* strains." *Mutagenesis* 21(6): 369-374.

Sandegren, L., A. Lindqvist, et al. (2008). "Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*." *J Antimicrob Chemother* 62(3): 495-503.

Shaw, N. A. and P. D. Ayling (1991). "Cloning of high-affinity methionine transport genes from *Salmonella typhimurium*." *FEMS Microbiol Lett* 62(2-3): 127-131.

Singh, S., R. K. Agarwal, et al. (2012). "Antibiotic resistance pattern among the *Salmonella* isolated from human, animal and meat in India." *Trop Anim Health Prod* 44(3): 665-674.

Spain, J. C. (1995). "Biodegradation of nitroaromatic compounds." *Annu Rev Microbiol* 49: 523-555.

Spratt, B. G. (1994). "Resistance to antibiotics mediated by target alterations." *Science* 264(5157): 388-393.

Stadtman, E. R., R. J. Hohman, et al. (1980). "Subunit interaction of adenylylated glutamine synthetase." *Mol Biol Biochem Biophys* 32: 144-156.

Sun, Y. J., J. Rose, et al. (1998). "The structure of glutamine-binding protein complexed with glutamine at 1.94 Å resolution: comparisons with other amino acid binding proteins." *J Mol Biol* 278(1): 219-229.

Tamura, N., S. Konishi, et al. (2003). "Mechanisms of drug/H<sup>+</sup> antiport: complete cysteine-scanning mutagenesis and the protein engineering approach." *Curr Opin Chem Biol* 7(5): 570-579.

Tatsumi, K., T. Doi, et al. (1982). "Oxygen-insensitive nitrofurantoin reductases in *Salmonella typhimurium* TA100." *J Pharmacobiodyn* 5(6): 423-429.

Threlfall, E. J. (2002). "Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections." *FEMS Microbiol Rev* 26(2): 141-148.

Townson, S. M., P. F. Boreham, et al. (1994). "Resistance to the nitroheterocyclic drugs." *Acta Trop* 56(2-3): 173-194.

Wang, X. and N. P. Higgins (1994). "'Muprints' of the lac operon demonstrate physiological control over the randomness of in vivo transposition." *Mol Microbiol* 12(4): 665-677.

Weiner, J. H., C. E. Furlong, et al. (1971). "A binding protein for L-glutamine and its relation to active transport in *E. coli*." *Arch Biochem Biophys* 142(2): 715-717.

Weisblum, B. (1995). "Erythromycin resistance by ribosome modification." *Antimicrob Agents Chemother* 39(3): 577-585.

Whiteway, J., P. Koziarz, et al. (1998). "Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 180(21): 5529-5539.

Willis, R. C., K. K. Iwata, et al. (1975). "Regulation of Glutamine Transport in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 122(3): 1032-1037.

Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (1999). "Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7190-7195.

Zhang, Z., S. Schwartz, et al. (2000). "A greedy algorithm for aligning DNA sequences." *J Comput Biol* 7(1-2): 203-214.