

Tesis Doctoral

Dispersión del gen de resistencia a amikacina aac (6')-Ib y estrategias para su inhibición por tecnología antisentido

Soler Bistué, Alfonso Juan de la Cruz

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Soler Bistué, Alfonso Juan de la Cruz. (2010). Dispersión del gen de resistencia a amikacina aac (6')-Ib y estrategias para su inhibición por tecnología antisentido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Soler Bistué, Alfonso Juan de la Cruz. "Dispersión del gen de resistencia a amikacina aac (6')-Ib y estrategias para su inhibición por tecnología antisentido". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Dispersión del gen de resistencia a amikacina *aac(6')*-Ib y estrategias para su inhibición por tecnología antisentido

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Autor: Alfonso Juan de la Cruz Soler Bistué.

Directores de Tesis: Angeles Zorreguieta y Marcelo Eduardo Tolmasky

Consejeros de Estudio: Luis Alberto Quesada-Allué y Angeles Zorreguieta

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir/IIBBA-CONICET

BUENOS AIRES, 2010

RESUMEN

Dispersión del gen de resistencia a amikacina *aac(6')*-Ib y estrategias para su inhibición por tecnología antisentido

Los antibióticos fueron uno de los grandes logros de la medicina del siglo pasado. Sin embargo, el (ab)uso intensivo de los mismos en los últimos 50 años ha generado la emergencia de bacterias de fenotipo resistente a varios antibióticos conocidas como cepas multirresistentes. Su aparición es causa de complicaciones y muertes de otra manera evitables y constituye un problema de salud gravísimo a nivel nacional y global debido a que las pocas opciones de tratamiento existentes se están agotando. Por otro lado, los escasos antibióticos nuevos que se desarrollan al poco tiempo generan la emergencia de resistencias preexistentes en el metagenoma. En particular, es preocupante la creciente frecuencia de aparición en la clínica del gen *aac(6')*-Ib que genera resistencia a aminoglicósidos, entre ellos la amikacina. Una opción a explorar es el silenciamiento de genes de resistencia mediante tecnologías antisentido con el fin de prolongar la vida útil de los antibióticos existentes.

En esta Tesis por un lado se exploran las plataformas genéticas en las que este gen se ha dispersado a nivel molecular y celular. Por otro lado se muestra que la expresión de pequeños ARNs antisentido, llamados secuencias guiadas externamente (EGS), es capaz de inhibir la expresión del gen de resistencia a aminoglicósidos *aac(6')*-Ib. Sin embargo, estas moléculas de ARN son sumamente susceptibles a las nucleasas. Se explora entonces también el uso de análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables como EGSs. Se muestra cómo la administración exógena de EGSs de cooligómeros de ácidos nucleicos cerrados (LNA) y ADN es también capaz de convertir un fenotipo resistente a un antibiótico a uno susceptible por un mecanismo mediado por ARNasa P. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de genes de resistencia con cooligómeros de ADN y LNA podría servir para prolongar la utilidad de los antibióticos existentes.

Palabras clave:

plásmidos, transposones, integrones, InV117, pMET1, Amikacina, ARN, *aac(6')*-Ib, ARNasa P, EGS, LNA, tecnologías antisentido, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Dispersion of the amikacin resistance gene *aac(6')*-Ib and strategies for its inhibition using antisense technologies

Antibiotic discovery was one of the main achievements in medicine in the last century. However, their intensive (ab)use in the last 50 years has led to the emergence of bacteria resistant to multiple drugs known as multiresistant strains. These strains cause treatment complications and avoidable deaths constituting a serious health issue at national and global level as the scarce treatment options are getting exhausted. On the other hand, the few new antibiotics generate resistance shortly after released as they act as selecting agents of the preexistent resistance genes present on the metagenome. Notably, the increasing prevalence of *aac(6')*-Ib in the clinical setting is a serious concern as it generates resistance to several aminoglycosides including amikacin. Silencing of antimicrobial resistance genes using antisense techniques is a good alternative for the rational design of drugs that may permit to prolong the usefulness of the currently employed antibiotics.

In this Thesis work, the genetic platforms that allow *aac(6')*-Ib dispersion at the cellular and molecular level are explored. On the other hand, it is shown that expression of small antisense RNAs called external guide sequences (EGS) is capable of inhibiting the expression of this gene, rendering resistant strains, susceptible to amikacin. However, small RNA molecules such as EGSs are rapidly degraded by cellular nucleases. Hence, the use of non-hydrolysable nucleic acid analogs cooligomers as EGS is explored. The exogenous administration of a Locked Nucleic Acid (LNA)/DNA cooligomer as EGS is capable of converting an amikacin resistant phenotype to a susceptible one by an RNase P mediated mechanism. These results suggest that gene silencing using LNA/DNA cooligomers might be useful to prolong the use of amikacin.

Keywords:

Plasmids, transposons, integrons, amikacin, InV117, pMET1, RNA, *aac(6')*-Ib, RNase P, LNA, EGS, antisense technologies, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*

AGRADECIMIENTOS

A mis directores **Angeles Zorreguieta** y **Marcelo Tolmasky**, por su generosidad, por su dedicación, por enseñarme el camino de la ciencia. Por darme guía pero también libertad. Por confiar en mí. Me siento muy afortunado de haber podido trabajar con ustedes y de haber compartido tantos momentos. Espero que el futuro nos depare más capítulos de trabajo compartido.

A **tooodos mis compañeros** de laboratorio a lo largo de estos años: Daniela, Lorena, Fer, Dia, Matías “el PBT” Kinzurik, Belén, Piku, Nico, Pato, Carol, Walter, Rodri, Gastón, Michelle, Jonathan, Doreen, Gustavo, Graciela Brellez-Mariño y todos los demás que han pasado por el Lab303 y luego el Lab204.

A **Fernando Ariel Martín** por ser un gran compañero, por haberme ayudado y enseñado muchísimo y por todo el trabajo que siempre hizo desinteresadamente para todos. Por ser un ejemplo de constancia, de trabajo duro y de que el esfuerzo a la larga da recompensas. Por todo el trabajo que compartimos, por las charlas, por haberse transformado no sólo en un compañero sino también en un gran, gran amigo.

A **Diana Posadas**, por las risas, las lágrimas, las salidas y las horas compartidas. Sin vos esto no sería posible. Por ser además de una compañía enorme, una gran amiga. ¡Te quiero mucho!

A **Nicolás Vozza** por muchos buenos momentos, sin vos esto no hubiera sido lo mismo. ¡Gracias!

A **Piku** Ruiz, por aguantarme las bromas pesadas y ser compinche. Por perpetuar el legado de Fer. Por ser un ejemplo de trabajo serio y constante. Sos una genia.

A **Patricia Abdián** por tu madurez, por tu ejemplo y tu calidez humana. ¡Gracias por compartir y enseñarme tanto!

A los muy nuevos: **Walter, Gastón, Rodri** no saben lo que les espera. Una de las cosas que lamento de esta etapa que termina es perderme la oportunidad de trabajar con gente como ustedes.

A la gente del grupo de **Adrián Vojnov** en particular a **Luciano “Troglodita” Rigano** y a **Pablo “Pampa” Torres**. Gracias Lucho y Pampa no solo por las charlas de ciencia sino por los momentos compartidos y los asados. ¡Qué bueno tener amigos como ustedes!

A la gente con la que tuve oportunidad de colaborar: **Alejandro Petroni, Marcelo Galas, Daniela Centrón, Sole Ramírez y Juan Fuxman** por enseñarme que la interacción es mucho más que la suma de las partes por separado.

A todos los grandes compañeros que pude hacer en estos años en la FIL a todos los que me ayudaron en particular a la gente del **302, 304, 206, 208, 202 y 201**. A **Luis Quesada-Allué**, mi consejero de estudios. Gracias Ceci, Carlitos, Iván, Vani, Paula, Gato, Gastón, Sebas, Juan Pablo, Marie, Gustavo, Javi, Santiago, Pablo, Maxi, Gabriel, Pocho, Juan, Diego, Claudia, Caro, Maxi y espero no olvidarme de nadie!

A todos los compañeros y amigos en la CalState Fullerton: **Richard, Michelle, Tung, Farnaz, Kelly, José, Keziah, Manisha, Rick** y sobre todo a **Sole Ramirez** por el apoyo (¡aunque todavía me debés un asado!).

A toda la gente del **Malbrán** que siempre me trata muy bien cuando voy para allá, Diego, Fernando, Marcelo, Ale, Patricia, GRACIAS.

Al **CONICET** y la **Fundación Ciencias Exactas y Naturales** que me apoyaron económicamente a lo largo de todos estos años. ¡Gracias!

A la **American Society for Microbiology** por el apoyo para viajar y concederme la Fellowship for Latin America, sin la cual gran parte de este trabajo no hubiera sido posible.

A la **Educación Pública, Laica, gratuita, masiva y de Excelencia**. En particular a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA que no sólo me educó sino que también me formó y le abrió las puertas a mi vocación docente.

A mis alumnos por enseñarme.

A mis compañeros de docencia por la paciencia y por enseñarme mientras la pasamos bien. Gracias a **Lucho Chaneton, Cybele García, Paulita Tribelli, Caro Carrillo, Ceci D'Alessio, Diego Laplagne, Fernando Martín, Fernando Aprile** sin ustedes no sería quien soy como docente.

A toda la gente del área **Microbiología** que me apoyó durante todos estos años de docencia en el **Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA**.

A **mis docentes** por compartirme con generosidad sus conocimientos.

Al enorme esfuerzo que hace toda la gente de la **Fundación Instituto Leloir** para brindar un ambiente de trabajo excepcional y haberme dado el privilegio de poder trabajar con un equipamiento e instalaciones únicos en el país. ¡Gracias a toda la gente sin la cual no podría haber completado este trabajo: administrativos, la gente del droguero, la gente de mantenimiento, los técnicos (autoclave secuenciador y microscopios), biblioteca y espero no olvidarme de nadie! Gracias a aquellos investigadores que invirtieron mucho de su tiempo para que la FIL funcione.

A mis grandes amigos: **Agus, Lucho, Loche, Gurí, Luciano, Pampeano, Nico, Luis, Juan, Darío, Ale, Leo Z, Kiu, Diego L, Juan K, Gato, Diana, Lucas Buk, Javi Z, Cyn, Noe, Isa y Noe L**. (El orden es aleatorio porque Loche debería ir último) ¡Algo tienen que los quiero tanto!

A mi vieja familia, **mamá, papá, Galo, Maxi, Mili; Astru y Caro**; mis sobrinas del alma: **Daphi, Jose, Euge, Juana y Gaia**. ¡¡Gracias por todo lo que me dan!!

A mi nueva familia, **Héctor, Diana, Gabi, Juan y Lauri**. Y a la abu **Nelly** por resignarte a aceptarme en la familia (¡¡jaja!). ¡¡Gracias por tanto afecto!!

A mi familia chiquita **Deni**, mi amor, gracias por estar conmigo siempre, por aguantar mi imparable obsesión por el trabajo, por acompañarme, por lograr distraerme, por mostrarme mundos nuevos y por enseñarme. Gracias por ayudarme a mejorar como persona.

¡Gracias al futuro y los nuevos desafíos que vendrán!

¡¡GRACIAS!!

PUBLICACIONES:

El trabajo presentado en esta Tesis y aspectos relacionados han sido publicados total o parcialmente en:

- Ramirez MS, Don M, Merkier AK, **Soler Bistué AJ**, Zorreguieta A, Centrón D, Tolmasky ME. A naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1488-90
- **Soler Bistué AJ***, Martín FA, Voza N, Ha H, Joaquín JC, Zorreguieta A, Tolmasky ME. Inhibition of *aac(6')-Ib*-mediated amikacin resistance by nuclease-resistant external guide sequences in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13230-5.
- **Soler Bistué AJ***, Birshan D, Tomaras AP, Dandekar M, Tran T, Newmark J, Bui D, Gupta N, Hernandez K, Sarno R, Zorreguieta A, Actis LA, and Tolmasky ME. *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pMET1: similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements. *PLoS ONE* 2008 Mar 19;3(3):e1800
- Quiroga MP*, Andres P*, Petroni A, **Soler Bistué AJ**, Guerriero L, Vargas LJ, Zorreguieta A, Tokumoto M, Quiroga C, Tolmasky ME, Galas M, Centrón D. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Dec;51(12):4466-70.
- **Soler Bistue AJ***, Ha H*, Sarno R, Don M, Zorreguieta A, Tolmasky ME. External guide sequences targeting the *aac(6')-Ib* mRNA induce inhibition of amikacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun;51(6):1918-25.
- **Soler Bistue AJ***, Martin F*, Petroni A, Faccone D, Galas M, Tolmasky ME, Zorreguieta A. *Vibrio cholerae* InV117, a class 1 integron harboring *aac(6')-Ib* and *bla_{CTX-M-2}*, is linked to transposition genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 May;50(5):1903-7.

*Autoría principal

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
PUBLICACIONES.....	6
INDICE GENERAL.....	7
CAPITULO 1: Introducción.....	9
1- Antibióticos: de una panacea a nuevos desafíos.....	10
2- Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	13
a. Impedimento de la llegada al sitio blanco.....	13
b. Modificación del sitio blanco.....	14
c. Modificación del antibiótico.....	14
d. Aminoglucósidos y enzimas modificadoras: el caso de AAC(6')-Ib.....	15
3- Mecanismos de dispersión de genes de resistencia a antibióticos.....	18
a. Dispersión de genes de resistencia a antimicrobianos a nivel celular.....	20
b. La conjugación en la dispersión a nivel celular.....	22
i. Los plásmidos como agentes de dispersión de genes a nivel celular.....	22
ii. Transferencia de plásmidos.....	23
iii. Mantenimiento de plásmidos.....	25
1- Replicación de plásmidos.....	25
2- Estabilización del plásmido.....	26
iv. Los plásmidos y su evolución.....	29
v. Los plásmidos y la adquisición de determinantes de resistencia.....	30
c. Dispersión de genes de resistencia a antimicrobianos a nivel molecular.....	31
i. Integrones: coleccionistas de elementos del metagenoma.....	31
ii. Transposición de genes de resistencia.....	35
d. Dispersión a nivel celular y molecular simultánea: Elementos Integrativos y Conjugativos (ICÉs).....	37
4- Una visión global de la dispersión de genes a antimicrobianos.....	40
5- Técnicas de silenciamiento en bacterias.....	41
a. Estructura del blanco.....	43
b. Metodologías de silenciamiento en sistemas bacterianos.....	44
c. Tecnología de silenciamiento génico basada en ARNs P: uso de EGS.....	45
CAPITULO 2: Antecedentes y Objetivos.....	49
1. Dispersión de <i>aac(6')-Ib</i>	50
2. Silenciamiento de <i>aac(6')-Ib</i> mediante técnicas antisentido.....	53
CAPITULO 3: Dispersión de <i>aac(6')-Ib</i>. Resultados y conclusiones.....	55
1. Integrón InV117.....	56
a. Determinación de los extremos del posible transposón asociado a InV117.....	56
b. Análisis de la secuencia obtenida de InV117 y zonas circundantes.....	59
2. Diseminación de Tn1331.2 a nivel celular: secuenciación y análisis de pMET1.....	64
a. Estudio de la replicación de pMET1.....	69
b. Análisis del posible “centrómero” para la partición de pMET1.	71
c. Conjugación de pMET1.....	72

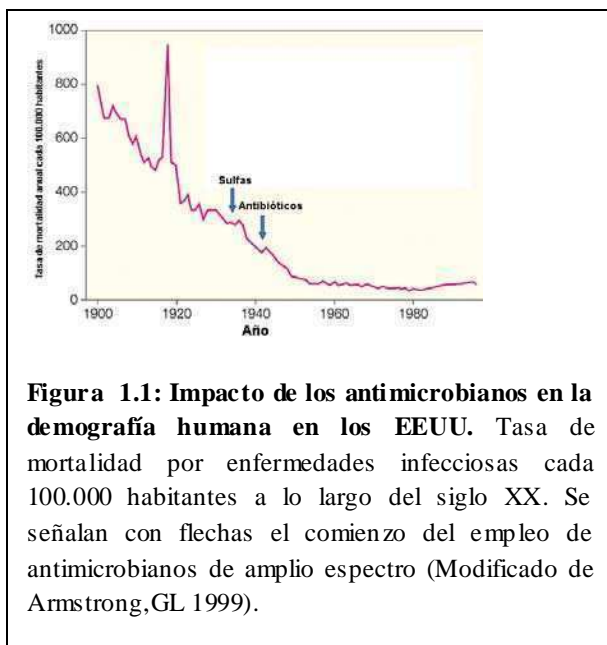
d. °Análisis comparativo de pMET1 y otros elementos genéticos	74
CAPITULO 4: Estrategias de antisentido para el silenciamiento de <i>aac(6')</i>-Ib	
Resultados y conclusiones.....	77
1. Silenciamiento de <i>aac(6')</i> -Ib en un sistema in vivo mediante EGS	78
2. Oligomeros de análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables como EGSs	83
3. Efecto de los reemplazos con LNA en cooligómeros de LNA/DNA empleados como EGSs	87
a. Estudio de los reemplazos con LNA en la secuencia consenso A CCA.....	88
b. Estudio de la secuencia complementaria al mensajero de <i>aac(6')</i> -Ib.....	89
c. Estudio de la afinidad de los EGSs de ADN/LNA al mensajero de <i>aac(6')</i> -Ib.....	91
4. Resistencia a nucleasas bacterianas	92
5. Sistemas de traducción y transcripción in vitro como aproximación a un sistema vivo	93
6. Evaluación del efecto in vivo de los EGS de ADN/LNA sobre el fenotipo de resistencia a Ak	95
CAPÍTULO 5: Discusión.....	99
1. Dispersión de <i>aac(6')</i> -Ib.....	100
a. InV117.....	100
b. pMET1	102
2. Es trategias antisentido contra el gen <i>aac(6')</i> -Ib.....	104
CAPÍTULO 6: Materiales y Métodos.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	129
ABREVIATURAS.....	150

CAPITULO 1

Introducción

1. Antibióticos: de una panacea a nuevos desafíos.

La historia de los quimioterapéuticos nace a principios del siglo pasado cuando el científico alemán Paul Erlich desarrolla el concepto de “toxicidad selectiva”. Buscó sustancias químicas que fueran tóxicas para microorganismos pero no para las células animales. Estos compuestos fueron bautizados “balas mágicas” y tuvieron éxito para tratar algunas enfermedades como la sífilis. Sin embargo, los primeros antimicrobianos de amplio espectro fueron hallados recién en 1930 por Domagk quien descubrió las sulfas, inhibidores de la síntesis del ácido fólico. Por este descubrimiento recibiría el premio Nobel. En 1928, Sir Alexander Fleming descubre que la penicilina, era capaz de lisar estafilococos. Sin embargo,



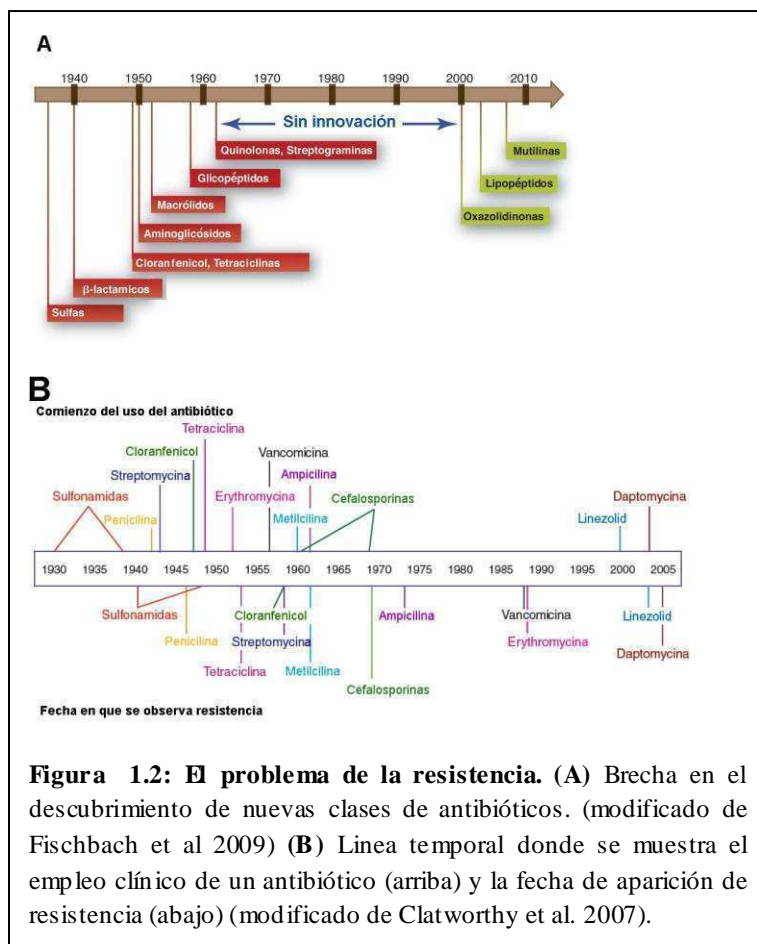
no fue hasta 1940 que Howard Florey y sus colaboradores demostraron que la penicilina podía ser empleada en el tratamiento de enfermedades. Desarrollaron entonces su producción en masa. Su ensayo en humanos demostró la gran eficacia de la penicilina en el tratamiento contra estafilococos, pneumococos y estreptococos. Así comenzó el uso del primer antibiótico, que fue clave en la Segunda Guerra Mundial. Este desarrollo también fue merecedor del Premio Nobel.

En 1944 se descubrió la estreptomina, el primer antibiótico para tratar una enfermedad que hasta entonces causaba gran mortalidad y pánico: la tuberculosis. Este descubrimiento también recibió el Premio Nobel. Estos fueron sólo los primeros pasos de uno de los grandes descubrimientos de la medicina. A lo largo del siglo pasado, los antibióticos permitieron disminuir dramáticamente la mortalidad por enfermedades infecciosas a nivel mundial, dejando éstas de ser una amenaza (Armstrong 1999). Se muestra en la Figura 1.1 el impacto de estos descubrimientos en la tasa de mortalidad por enfermedades infecciosas. Si bien los datos mostrados pertenecen a EE.UU, sus resultados seguramente pueden extrapolarse al resto del mundo.

A pesar de este éxito inicial, en las siguientes décadas se vio cada vez con mayor frecuencia la aparición en la clínica de infecciones que no respondían al tratamiento (Clatworthy et al. 2007; Alekshun & Stuart B Levy 2007; Aminov 2009; Julian Davies & Rownd 1972; Julian Davies 1994). Se observó la emergencia de cepas primero resistentes, luego multirresistentes e incluso panresistentes (es decir, resistentes a todos los antibióticos y por tanto sin opciones de tratamiento) no sólo en la clínica sino también en la comunidad (Fischbach & C. T. Walsh 2009). De hecho, no sólo existen bacterias que resisten todos los antibióticos empleados, sino que estudios recientes muestran que *Streptomyces* de ambientes vírgenes portan resistencia a al menos siete antibióticos, llegando a sobrevivir a veintidós compuestos diferentes, incluso aquellos jamás empleados en la clínica (D'Costa et al. 2006). Esto quiere

decir que el acervo génico ambiental garantiza la emergencia de resistencias a nuevos antibióticos poco después de que se lancen en la clínica.

La amplia e indiscriminada utilización de los antibióticos, es una fuerte presión de selección que ha dirigido la evolución de los microorganismos (Palumbi 2001). La aparición de cepas resistentes desencadenó el inicio de una carrera entre descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos y



el surgimiento de organismos que los toleran. Carrera que por ahora la humanidad parece estar perdiendo (Alekshun & Stuart B Levy 2007). Esta necesidad de nuevas drogas antibacterianas, ha sido paliada mediante la modificación química de antibióticos ya existentes. Es decir, se fue manteniendo la base estructural de los compuestos y se modificaron los sustituyentes a fin de evitar la resistencia bacteriana, aumentar su permeabilidad, etc. (Fischbach & C. T. Walsh 2009). Por ejemplo, la modificación de la

penicilina G (penicilina de primera generación) dio lugar a la amoxicilina (penicilina de segunda generación), o como veremos en detalle más adelante en esta Tesis, una modificación química de la kanamicina dio lugar a la amikacina (Ak). Si bien, esta estrategia es efectiva en el corto plazo no será sustentable en el tiempo. Entre los años 1962 y 2000 no se descubrieron ningún tipo de nuevos antibióticos, es decir que pasaron 40 años sin grandes innovaciones que permitieran tener una estrategia sustentable para combatir las infecciones (Figura 1.2A). Al mismo tiempo, la aparición de resistencias es cada vez más rápida (Figura 1.2B) (Fischbach & C. T. Walsh 2009; Clatworthy et al. 2007; Falconer & E. D. Brown 2009). La falta de innovación en el diseño de nuevos antibióticos se debe a varios factores que desalientan la inversión privada para el desarrollo de antimicrobianos. Por un lado, los antibióticos se usan en poca cantidad y durante unas pocas semanas respecto de otras drogas, como por ejemplo aquellas contra enfermedades crónicas, que pueden emplearse durante años o incluso décadas. Además, una vez descubiertos pueden ser guardados como drogas de reserva que se emplearán sólo en casos extremos disminuyendo aún más su consumo. Por otro lado, una vez que comienza su uso rápidamente generan la emergencia de resistencias (Fischbach & C. T. Walsh 2009). Esto ha conducido a una alarmante falta de interés por parte del sector privado. Las inversiones se dedican a otras drogas o productos cosméticos de mayor rédito independientemente de la urgencia sanitaria de este problema.

En este contexto, y como consecuencia del aumento de la resistencia y la falta de opciones de tratamiento, nuevas amenazas aparecen con gran frecuencia en la clínica aumentando la tasa de mortalidad de los pacientes y los costos de tratamiento en hospitales, por mayores complicaciones y prolongaciones en las internaciones. En primer lugar, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y a vancomicina (MRSA y VRSA) causa grandes problemas en hospitales. Para peor, en los últimos años se observa una creciente frecuencia de infecciones de MRSA adquiridas en la comunidad (Rice 2009). A pesar de su relativa menor frecuencia, en la actualidad es muy preocupante la aparición de cepas Gram negativas multi o panresistentes de *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Taubes 2008; Fischbach & C. T. Walsh 2009; Rice 2009; Alekshun & Stuart B Levy 2007). Siendo que la mayor preocupación en la falta de drogas la ha generado MRSA, existen muy pocos desarrollos de nuevos fármacos contra estos microorganismos, lo cual complica aún más la situación (Taubes 2008). Por último, otra causa de gran preocupación a nivel mundial es el resurgimiento de la *Mycobacterium*

tuberculosis multirresistente y de resistencia extendida. La tuberculosis multirresistente requiere hasta dos años de tratamiento con fuertes efectos secundarios mientras que la cepa de resistencia extendida a menudo es fatal (Fischbach & C. T. Walsh 2009; Aleksun & Stuart B Levy 2007).

La rápida aparición y dispersión de fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas bacterianas ha generado interés en entender los mecanismos genéticos básicos que permiten a las bacterias semejante adaptabilidad.

2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Si bien algunos microorganismos pueden ser naturalmente resistentes a los antimicrobianos, otros son capaces de adquirir horizontalmente esta característica o bien desarrollarla por mutación. En particular, el empleo de antibióticos en la clínica y otras actividades como por ejemplo el uso de bajas dosis para aumentar los rindes en la ganadería, ha generado la inevitable aparición de cepas resistentes a los antibióticos.

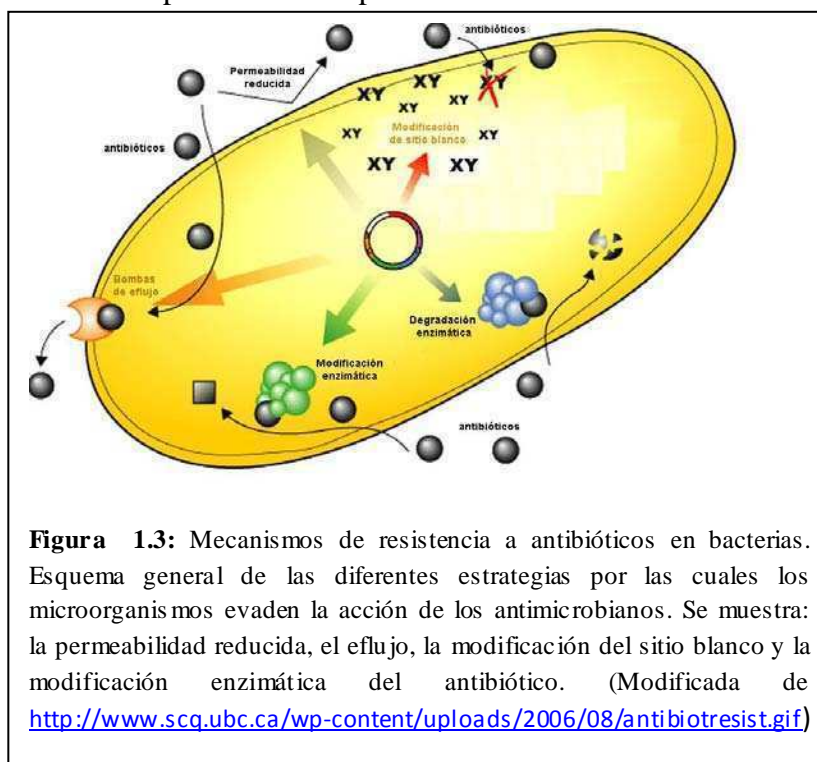


Figura 1.3: Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias. Esquema general de las diferentes estrategias por las cuales los microorganismos evaden la acción de los antimicrobianos. Se muestra: la permeabilidad reducida, el eflujo, la modificación del sitio blanco y la modificación enzimática del antibiótico. (Modificada de <http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/antibiotresist.gif>)

a. Impedimento de la llegada al sitio blanco.

En primer lugar, los microorganismos pueden perder permeabilidad a los antimicrobianos, de modo tal que el compuesto no pueda alcanzar el blanco (H Nikaido 1994). Paralelamente, se puede llegar a esta misma situación si la bacteria es capaz expulsar el antibiótico de su

fisiológicos por los cuales las bacterias pierden la susceptibilidad a los compuestos quimioterapéuticos (Hiroshi Nikaido 2009; G. Wright 2003). Todos ellos se basan en el impedimento de la interacción antibiótico-sitio blanco y se esquematizan en la Figura 1.3.

citoplasma. Esto típicamente ocurre mediante la expresión o sobreexpresión de bombas de eflujo (X.-Z. Li & Hiroshi Nikaido 2004). De este modo, aunque el compuesto sigue siendo tóxico, no es capaz de alcanzar el sitio de acción.

Estos dos mecanismos producen típicamente resistencia media o baja a una amplia variedad de compuestos. En el caso de la impermeabilidad, por la composición química de la membrana y/o pared celular refractaria a varios compuestos. En el caso de los sistemas de eflujo la resistencia simultánea a varios compuestos se debe a que las bombas tienen una especificidad de sustrato relativamente baja (Hiroshi Nikaido 2009; X.-Z. Li & Hiroshi Nikaido 2004; H Nikaido 1994).

b. Modificación del sitio blanco.

Otro mecanismo de resistencia es la modificación del sitio blanco por mutación. Por ejemplo la resistencia a fluorquinolonas, que funcionan por inhibición de la ADN topoisomerasa, se da muchas veces por cambios específicos en la secuencia del gen que codifica para la enzima (*gyrA*). De esta manera se hace imposible el reconocimiento de la enzima por el antibiótico.

La resistencia a antibióticos como consecuencia de la modificación del sitio blanco, al generarse por mutaciones, tiene la particularidad de expandirse por proliferación clonal siendo la dispersión por transferencia horizontal muy rara. Esto se debe a que a que la eventual adquisición del gen mutante no generaría una resistencia completa debido a la presencia del gen silvestre que confiere cierta susceptibilidad al antibiótico (Hiroshi Nikaido 2009).

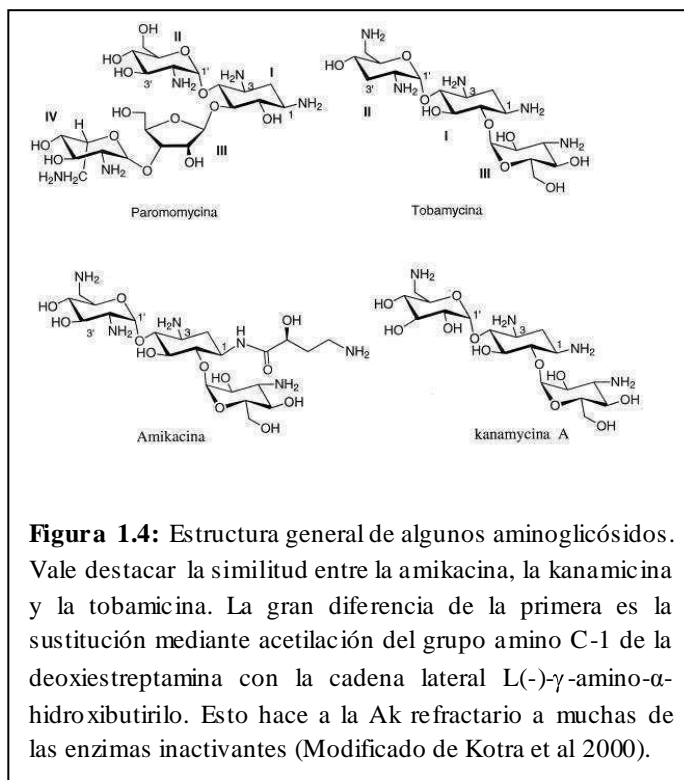
c. Modificación del antibiótico.

Las bacterias también pueden perder sensibilidad a una droga por degradación de la misma o por su modificación enzimática. El primer caso se da por enzimas específicas que destruyen la estructura química del antibiótico. Un ejemplo conocido es la resistencia a β -lactámicos dados por las β -lactamasas. Vale destacar en particular a las β -lactamasas de espectro expandido de la familia CTX-M capaces de degradar cefalosporinas de tercera generación, que en la actualidad están causando grandes problemas en la clínica debido a su gran dispersión por transferencia horizontal (Rice 2009; Hiroshi Nikaido 2009; Rafael Cantón & Coque 2006).

La resistencia a un antibiótico en particular también puede darse por su modificación química en el citoplasma bacteriano. De este modo, si bien el antibiótico no es destruido, pierde especificidad por el sitio blanco perdiéndose o disminuyendo notoriamente su actividad antimicrobiana. La modificación química de los antibióticos se da muy frecuentemente en el caso de bacterias resistentes a los aminoglicósidos (Ags). El mecanismo más frecuente en este grupo de antibióticos es la modificación por acetilación, fosforilación o adenilación del antimicrobiano. Un ejemplo es la aminoglicósido acetil transferasa en 6' Ib (AAC(6')-Ib) que pasaremos a tratar en más detalle en la próxima sección. Tanto las enzimas modificadoras como aquellas que degradan los antibióticos pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano pero más frecuentemente se adquieren por transferencia horizontal.

d. Aminoglicósidos y enzimas modificadoras: el caso de AAC(6')-Ib.

Los Ags son un grupo de moléculas naturales o semisintéticas con acción antimicrobiana. El primer aminoglicósido descubierto fue la estreptomicina en 1944 por Shatz y Waksman

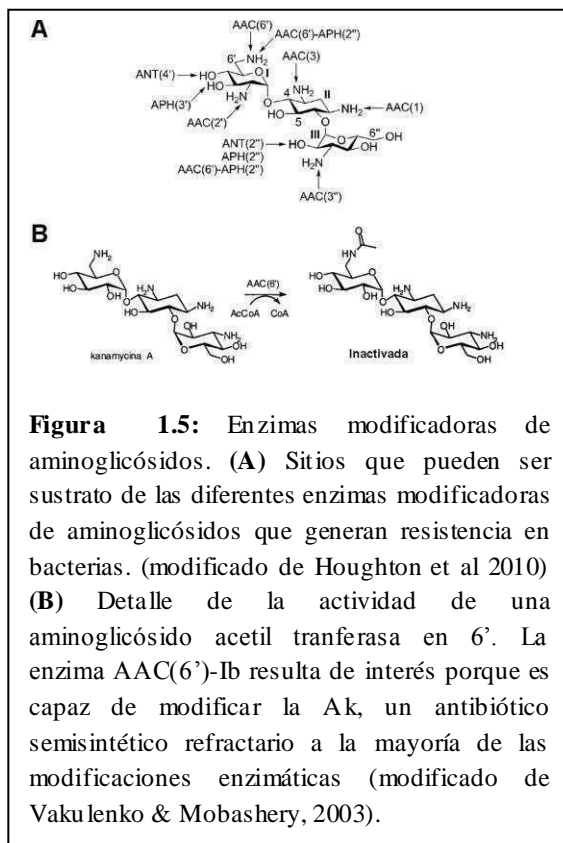


aislado de *Streptomyces* sp. Su estructura consiste en un anillo de aminociclitol que puede ser estreptidina o 2-deoxiestreptamina y dos o más aminoazúcares unidos al núcleo (Figura 1.4). Posteriormente, de la misma fuente se aislaron otros aminoglicósidos como la neomicina, la kanamicina y la tobramicina. Otros compuestos pertenecientes a la misma familia son la gentamicina, la sisomicina, la netilmicina y la amikacina, estos dos últimos de origen semisintético (Vakulenko & Mobashery 2003). Los

aminoglicósidos son los antibióticos más usados después de los β -lactámicos y las tetraciclinas. En algunos casos son los de mayor efectividad contra la peste, la tularemia y la brucelosis. A veces son usados en combinación con β -lactámicos contra bacterias Gram positivas (Vakulenko & Mobashery 2003). Dentro de esta familia de antibióticos, la

amikacina (Ak) resulta de particular interés debido a que su estructura es refractaria a la mayoría de las enzimas modificadoras que confieren a las bacterias resistencia a los Ags. En su estructura, la acetilación del grupo amino C-1 de la deoxiestreptamina con la cadena lateral L(-)-gama-amino- α -hidroxibutirilo, impide a las enzimas acceder a los sustituyentes que habitualmente son modificados (Figura 1.4).

Además de su amplio espectro, los aminoglicósidos poseen algunas propiedades que los hacen muy convenientes como agentes antimicrobianos. Su acción bactericida es dependiente en mayor medida de la concentración administrada que de la duración de la exposición o el tamaño del inóculo bacteriano. Además, muestran un efecto post-antibiótico, es decir, que continúa teniendo efecto antibiótico por un tiempo aún cuando se lo retira del medio de cultivo. También se ha reportado un efecto sinérgico con antibióticos que afectan la síntesis de la pared bacteriana como los β -lactámicos y la vancomicina (Vakulenko & Mobashery 2003).



La acción antimicrobiana de los aminoglicósidos se da principalmente por su capacidad de unirse a ARNs bacterianos y en particular a la subunidad 30s del ribosoma (M E Tolmasky 2000; Vakulenko & Mobashery 2003; Kotra et al. 2000; Houghton et al. 2010). Este efecto es producto de la naturaleza policationica de los aminoazúcares en solución y también de la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los ácidos nucleicos, de tal manera que pueden unirse con alta afinidad al sitio A del ARNr 16s (Kotra et al. 2000; Houghton et al. 2010). Esta interacción genera fallas en el reconocimiento ARNm-ARNt y el consiguiente aumento de la tasa de errores

durante la traducción. Por consiguiente, se generan péptidos truncados y proteínas no funcionales que finalmente llevan a la muerte celular (Houghton et al. 2010).

El mecanismo de resistencia a Ags más importante desde el punto de vista clínico es la modificación enzimática de los grupos amino o hidroxilo (Figura 1.5A). Estos cambios producen la pérdida de interacción con el ARNr 16S (G. Wright 2003; Vakulenko &

Mobashery 2003). Se conocen más de 50 tipos de enzimas modificadoras de Ags que se agrupan en tres principales grupos: las aminoglicósido fosfo-transferasas (APHs), las aminoglicósido acetil-transferasas (AACs) y las aminoglicósido nucleotidil-transferasas (ANTs) (Houghton et al. 2010). A su vez, dentro de cada clase se agrupan de acuerdo al sitio del antibiótico donde se produce la modificación (que se indica entre paréntesis en la Figura 1.5A). El fenotipo de resistencia que confiere la enzima se indica mediante números romanos seguido de una letra para designar las diferentes enzimas con el mismo fenotipo (Figura 1.5A). Cada una de ellas será producto de un gen particular a los que se suele llamar con el mismo nombre que a la enzima (Vanhoof et al. 1998; Vakulenko & Mobashery 2003). Además, se han descrito enzimas bifuncionales producto de la fusión de genes que codifican para enzimas con distinta actividad, como por ejemplo la AAC(6')-Ie-APH(2'')-2 que confiere resistencia a prácticamente todos los aminoglucósidos (Vakulenko & Mobashery. 2003).

Las APHs utilizan ATP como sustrato a partir del cual se transfiere un fosfato a un hidroxilo del Ag. Existen siete clases distintas de fosfotransferasas entre las cuales las más relevantes clínicamente son las APH(3'). A su vez hay siete clases, APH(3')-I a APH(3')-VII. La alta frecuencia de la presencia de APH(3')-I y otras enzimas en aislamientos clínicos han sido la causa de que la kanamicina haya caído en desuso (Vakulenko & Mobashery 2003).

Las ANTs emplean nucleótidos trifosfato (ATP y GTP según la enzima) como sustrato transfiriendo a continuación el nucleósido al antibiótico en lugar del fosfato (Shakya & G. D. Wright 2010).

Las AACs requieren como sustrato acetil-CoA como dador del acetilo que transfieren a las posiciones 1, 3, 2' o 6' del antibiótico (Figura 1.5B). Las AAC(6') son de particular importancia dado el amplio espectro de su substratos y por su alta frecuencia en aislamientos clínicos resistentes. Las AACs del tipo I producen resistencia a Ak, tobramicina, netilmicina, kanamicina, isepamicina, dibekcina y sisomicina. Pese a toda la gama de enzimas AACs descritas, las AAC(6')-I junto con las ANT(2'') son las que producen la mayoría de los casos de resistencia en bacterias Gram negativas. De todas las variantes de AAC(6')-I, la de mayor relevancia clínica es la AAC(6')-Ib codificada por el gen *aac(6')-Ib* ya que se encuentra en el 70% de los aislamientos de enterobacterias con un perfil de resistencia del tipo de las enzimas AAC(6')-I (Vakulenko & Mobashery 2003). Una variante de la AAC(6')-Ib, codificada por *aac(6')-Ib_{cr}*, que posee dos mutaciones puntuales demostró también ser capaz de acetilar quinolonas. Esta variante es la primera enzima modificadora

que puede inactivar dos antibióticos de familias totalmente diferentes simultáneamente (Robicsek et al. 2006).

La localización genética de los elementos que codifican para éstas y otras enzimas de resistencia a antibióticos puede ser cromosómica o plasmídica. A su vez, pueden estar o no asociados a transposones o a integrones. Estas características resultan de suma importancia ya que la localización y la asociación a estructuras genéticas particulares pueden facilitar en gran medida su disseminación y transferencia a diferentes grupos de microorganismos.

3. Mecanismos de dispersión de genes de resistencia a antibióticos.

Plantear cómo se dispersan los genes de resistencia a antimicrobianos lleva implícita la pregunta sobre el origen de los mismos. En un principio se pensó que la diversidad genética presente en grandes poblaciones bacterianas debido a mutaciones al azar era responsable de la amplia variedad de fenotipos resistentes emergentes. De este modo la aparición de resistencia a antibióticos se debería a la mera expansión clonal de los fenotipos seleccionados. Hoy se sabe que el panorama es más complejo, ya que la expansión de clones resistentes que emergen con una frecuencia de 10^{-7} - 10^{-9} , no puede explicar la velocidad de aparición de resistencias. Sin embargo, la mutación de genes intrínsecos es importante en algunos casos. Por ejemplo, la expansión clonal tiene un rol importante en el caso de infecciones crónicas donde además intervienen fenómenos de hipermutación somática (Cirz et al. 2005). De hecho se ha demostrado recientemente que existe una gran cantidad de genes que son capaces de generar resistencia a antibióticos al ser mutados, constituyendo todo un reservorio de resistencias (Breidenstein et al. 2008; Tamae et al. 2008; Fajardo et al. 2008). Pese a todo esto, hoy en día se sabe que en realidad los genes de resistencia a antibióticos observados en la clínica son muy antiguos y poseen un origen polifilético distinto al de los linajes de cepas patógenas (Aminov 2009).

Por un lado, resulta lógico que muchos de los genes de resistencia a antibióticos provengan de organismos que los producen, como por ejemplo *Streptomyces rinosus*, que tienen un origen muy diferente al de las bacterias patógenas. De hecho se observa que los antibióticos de gran pureza producidos para uso clínico o de investigación poseen contaminación con ADN de los microorganismos productores de los mismos (Aminov & Mackie 2007). Esta contaminación podría originar parte de las resistencias que se observan en la clínica. También se sabe que dos grupos de β -lactamasas, las serín- β -lactamasas y las metalo- β -

lactamasas, son muy antiguas y divergieron hace más de 2000 millones de años, muchísimo antes del uso de los antibióticos (Garau et al. 2005; B. G. Hall & Barlow 2004). Otro ejemplo interesante de ello son los determinantes de la resistencia a quinolonas. Cuando se comienza el uso clínico del ácido nalidíxico en 1962, al ser puramente sintético (Andriole 2005), se pensaba que las bacterias se mantendrían susceptibles. Luego en los '70s aparecieron cepas resistentes y finalmente microorganismos con resistencias transferibles (Gay et al. 2006). Más adelante se descubre que las quinolonas no eran en verdad drogas sintéticas solamente. Existían quinolonas naturales en el mecanismo de censado de quórum de *Pseudomonas* (Pesci et al. 1999). *Pseudomonas aeruginosa* produce 55 compuestos muy similares a las quinolonas que, entre otras cosas (Dubern & Diggle 2008), tienen un efecto inhibitor del crecimiento en organismos gran positivos (Camilli & Bassler 2006). Se piensa ahora que los antibióticos en general podrían ser moléculas de señalización en ambientes naturales y se ha comenzado a explorar sus efectos fisiológicos a concentraciones subinhibitorias del crecimiento del microorganismo (Aminov 2009; Yim et al. 2007). Resumiendo, los genes de resistencia son preexistentes al uso de antibióticos, son sumamente antiguos y su origen es además variado y responde a la enorme diversidad metabólica de los microorganismos.

La variedad de mecanismos de resistencia preexistentes a la exposición de antibióticos en el ambiente es enorme (Julian Davies 1994). Se ha llamado a este acervo genético “resistoma” (D’Costa et al. 2006). Muchas revisiones hacen hincapié en la importancia de caracterizar y entender este pool genético (Aminov 2009; Martinez 2009a; Martinez 2009b; R Cantón 2009; Allen et al. 2010). La existencia de este enorme “resistoma” en el ambiente conduce a preguntarse cómo estos genes que confieren tolerancia a los antimicrobianos pueden llegar a las bacterias patógenas. La respuesta a esto son los mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG).

La inagotable fuente de variabilidad genética aún en ambientes prístinos (Stokes et al. 2001) y la THG en un contexto de fuerte presión de selección por antibióticos explican mucho mejor la rápida diseminación de genes de resistencia que la mera expansión clonal de cepas minoritarias seleccionadas a partir de mutantes espontáneos. Sin embargo, aún existe poco trabajo hecho y muchísimo por hacer para entender los mecanismos genéticos de emergencia

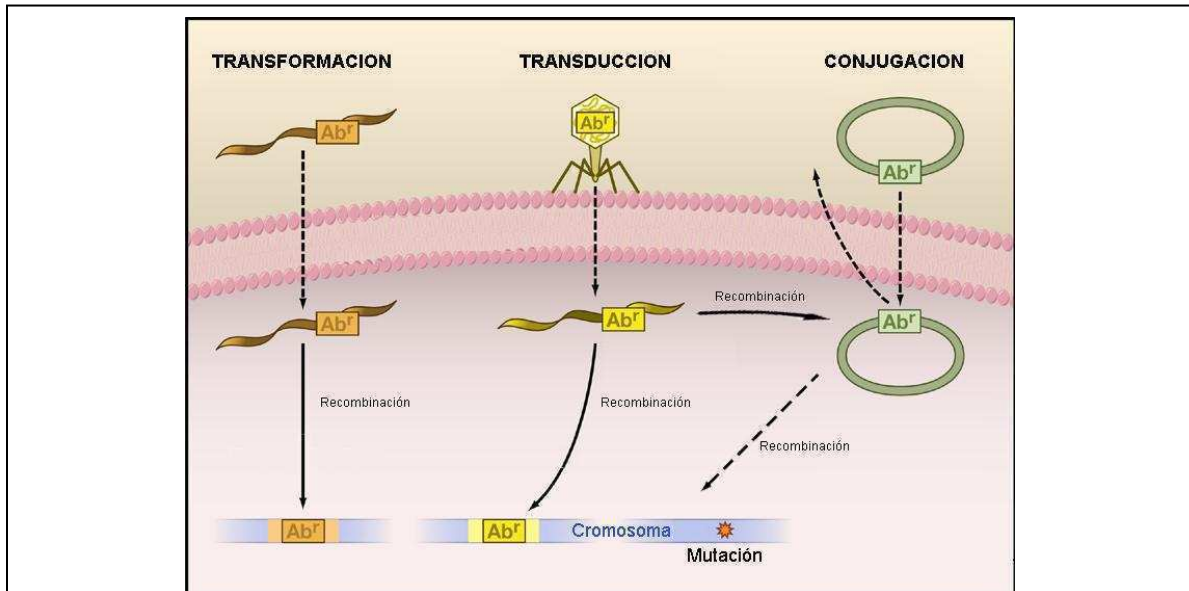


Figura 1.6: Mecanismos de dispersión a nivel celular de genes de resistencia a antibióticos (Ab^r). La transformación es la incorporación de ADN desnudo foráneo desde el exterior de la célula. La transducción es la incorporación al citoplasma celular de ADN exógeno desde un fago que lo inyecta. La conjugación es la entrada de ADN de elementos conjugativos mediante un canal específico, el canal de conjugación, desde el citoplasma de otra bacteria. Para los tres casos, en caso de que el ADN ingresado no sea un replicón, debe ser integrado al genoma mediante eventos de recombinación generalizada o sitio específica.

ambiental de genes de resistencia a antibióticos. Existen nuevas tecnologías de secuenciación que, en un marco conceptual metagenómico, nos permitirán plantear y responder las preguntas adecuadas para entender el origen, la selección, la persistencia, la dinámica poblacional y evolutiva, etc. de los genes de resistencia a antibióticos presentes en el ambiente y su pasaje al ambiente antrópico.

a. Dispersión de genes de resistencia a antimicrobianos a nivel celular.

Por todo lo explicado en las secciones anteriores, es muy importante entender los mecanismos por los cuales los genes de resistencia pueden ser transferidos de una bacteria a otra, es decir los mecanismos de dispersión a nivel celular durante la THG. Clásicamente, se conocen tres mecanismos que permiten el pasaje de genes de una célula a otra: la

transformación, la transducción y la conjugación. Un esquema general de estos tres mecanismos se muestra en la Figura 1.6.

La transformación es la incorporación de ADN desnudo desde el medio extracelular al citoplasma bacteriano. Se llama competencia a la capacidad de llevar a cabo la transformación. Si bien puede ser inducida artificialmente en el laboratorio como herramienta de biología molecular, la competencia es generalmente un fenómeno natural, identificado en al menos 40 estirpes bacterianas de origen filogenético diferente. Existen varios modelos bacterianos en los que se la ha estudiado en profundidad y caracterizado como un estadio fisiológico transitorio regulado por señales como el censado de quórum y el hambreado celular (I. Chen & David Dubnau 2004). En particular, en *Bacillus subtilis* ha sido caracterizada detalladamente. Se cree que este proceso pudo haber surgido para aprovechar el abundante ADN en el medio externo i) como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, ii) como molde para la reparación del ADN y/o iii) como fuente de diversidad genética (I. Chen & David Dubnau 2004). Este último caso es el que más hace al interés de esta Tesis, sin embargo hasta donde se sabe prácticamente no se ha observado (o no se ha podido observar) en la clínica. Históricamente, el interés en el estudio de la transformación se guió más por motivos de investigación básica en fisiología bacteriana (D Dubnau 1991). Sin embargo, la conjugación de plásmidos y su incorporación por transformación podría ser indistinguible a efectos prácticos en la naturaleza. Por ejemplo, *Acinetobacter baumannii* A118 es capaz de incorporar ADN plasmídico desnudo por transformación con relativamente buena eficiencia (Ramirez et al. 2010).

La transducción es el proceso por el cual el ADN de una bacteria puede pasar a otra empleando un fago como intermediario. Esto ocurre durante el proceso de ensamblado de un virus antes de la lisis bacteriana si, accidentalmente, una cápside fágica empaqueta ADN cromosómico de la bacteria en lugar del ADN del fago. Por otro lado, si el fago previamente a la lisis se integró a un sitio específico del genoma bacteriano, puede empaquetarse ADN bacteriano junto al del virus. Si ese fago, defectivo o no, infecta una segunda bacteria, ésta incorporará el ADN de la primera. Existen pocos casos en los que se pueda ver claramente la propagación de genes de resistencia a antibióticos mediado por un fago. Uno de estos ejemplos es el fago de tipo DT104 de *S. enteritica* serovar Typhimurium DT104 que aloja genes de resistencia a tetraciclinas, florfenicol y β -lactámicos (Lan et al. 2009; Witte 2004). En general, la transducción se ha visto más frecuentemente relacionada con la adquisición de genes de virulencia.

Tanto en la transformación como la transducción, el ADN adquirido, aunque contenga los genes apropiados no bastan por sí mismos para la adquisición de un fenotipo. El material genético ingresado al citoplasma debe ser capaz de incorporarse a un replicón estable. Por ello resultan fundamentales, tras la adquisición del ADN, procesos de recombinación que lo incorporen al genoma para su expresión (o mecanismos de dispersión a nivel molecular como veremos más adelante). Esta puede ser una razón por la cual la conjugación sea el medio de dispersión por excelencia de los genes de resistencia a antibióticos a nivel celular (D Mazel & J Davies 1999). Por ello será tratada en un inciso aparte.

b. La conjugación en la dispersión a nivel celular.

La conjugación es el proceso por el cual el ADN es transferido directamente desde un citoplasma bacteriano a otro. La transferencia del ADN está dada a nivel molecular por la generación de un canal ad hoc. La molécula transferida generalmente es un plásmido (ver más adelante), pero existen otros elementos conjugativos como los Elementos Integrativos y Conjugativos (ICE) que veremos en otra sección debido a que en ese caso la dispersión a nivel molecular y celular ocurren al mismo tiempo.

Nada puso tan de manifiesto la THG como la aparición de los factores R. En Japón durante la década de 1950 la multiresistencia comenzó a expandirse rápidamente. Esta propagación primero ocurrió dentro de este país (Nakaya et al. 1960) y luego se expandió a escala global. Los investigadores clínicos observaban la aparición de cepas con el mismo patrón de multiresistencia con muy alta frecuencia. Dedujeron entonces que era mucho más probable que este mismo patrón de resistencias fuese transferido desde otros microorganismos a que se generara de novo una y otra vez. Se los llamó entonces factores R. Luego se pudo caracterizar que se trataba de unidades genéticas autorreplicativas, independientes del cromosoma. Podían además ser transferidas por conjugación dentro de la familia Enterobacteriaceae. Se los llamó plásmidos (Julian Davies & Rownd 1972; Julian Davies 1994; Hiroshi Nikaido 2009; Ochman et al. 2000). Estos fueron los primeros indicios fuertes de THG en el Dominio Bacteria. Los plásmidos parecían tener un rol protagónico en este proceso y hoy en día son un tema de investigación con vida propia en el campo de la microbiología.

i. Los plásmidos como agentes de dispersión de genes a nivel celular.

Hoy se sabe que los plásmidos no son un fenómeno limitado a la resistencia a antimicrobianos. La información genética de las bacterias además de estar codificada en el cromosoma bacteriano, puede estar situada en moléculas de ADN accesorias. Se diferencia a los plásmidos de cromosomas bacterianos por la ausencia de genes vitales. Es decir, que alojan funciones no esenciales y su eliminación no es letal. Estas funciones accesorias les permiten tener ventajas adaptativas en circunstancias particulares como pueden ser la capacidad de aprovechar alguna fuente de carbono particular o conferir resistencia a sustancias tóxicas. De este modo pueden colonizar nuevos nichos ecológicos. Como se dijo antes, a fines de los años 50 se aislaron en Japón los primeros plásmidos que se conocieron a partir de cepas de *Shigella* y *E. coli* resistentes a múltiples antibióticos (Nakaya et al. 1960). Se designaron plásmidos R por su capacidad de conferir múltiples resistencias. Luego aparecieron muchos otros, como por ejemplo el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* llamado de esa manera por su capacidad de inducir tumores en plantas. Se denominaron crípticos a aquellos plásmidos de función desconocida.

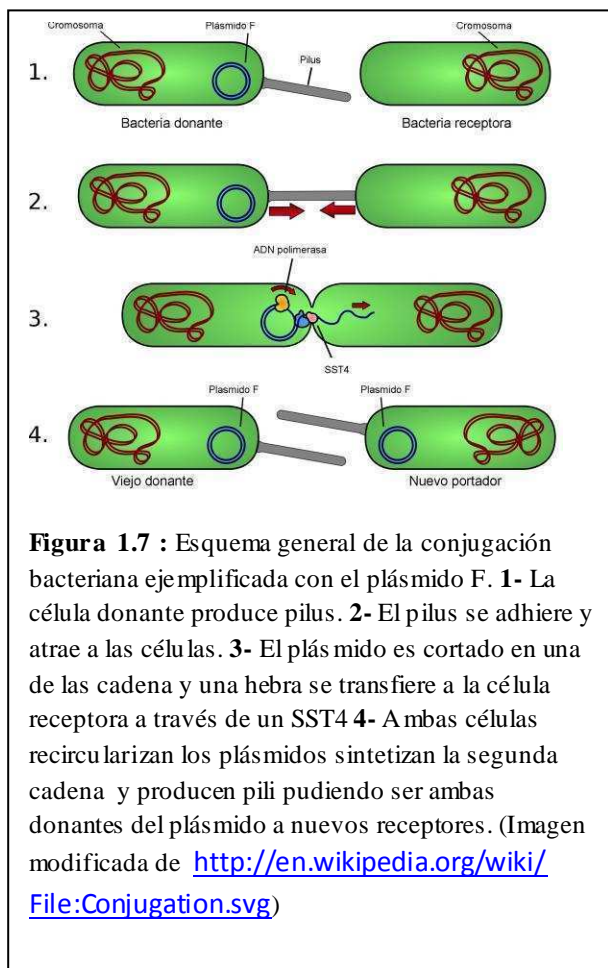
En general, los plásmidos son moléculas de ADN circulares cerradas que pueden duplicarse independientemente del cromosoma ya que poseen su propio sitio de origen de la replicación. En muchos casos, gran parte de las proteínas necesarias para este proceso son de origen cromosómico. Los plásmidos pueden tener desde algunos miles hasta centenares de miles de pares de bases. A su vez, pueden estar en alto o bajo número de copias por célula. Generalmente los plásmidos de mayor tamaño poseen un menor número de copias y viceversa. Asimismo, cada microorganismo puede alojar distintos tipos de plásmidos. Por ejemplo la bacteria *Borrelia burgdorferi* posee 20 plásmidos diferentes. Hoy en día no sólo existen infinidad de ejemplos sino que son una de las herramientas más usadas en biología molecular.

Ahora bien, ¿cómo es que los plásmidos son capaces de transmitir la información genética de una bacteria a otra? La respuesta se basa en dos propiedades muy importantes: la capacidad de transferencia de una célula a otra y la capacidad de duplicarse y mantenerse establemente en la célula que lo aloja.

ii. Transferencia de plásmidos.

La capacidad de transferirse reside en un determinante genético de transferencia, el locus *tra*, y en genes que permiten la movilización, llamados *mob* incluidos en un locus adyacente al anterior y una secuencia consenso llamada *oriT* (por origen de transferencia). Existe cierta

variabilidad en estos factores, pero se intentará ser abarcativo a riesgo de perder algo de



precisión. El locus tra codifica para un canal por donde pasa el ADN, conocido como mpf (por mating pair formation) por un lado. Los genes mob suelen estar asociados a este locus. Hoy se sabe que mpf es un sistema de secreción de proteínas tipo IV (SST4) similar al de *A. tumefaciens* y otros patógenos. Los SST4 se encuentran ampliamente distribuidos y efectúan diversas funciones: secreción de proteínas efectoras en la infección de células eucariotas; secreción de ADN durante la conjugación; liberación de ADN al medio; incorporación de ADN a la célula. Mientras tanto, los genes mob codifican para una proteína que corta en simple cadena el ADN plasmídico en el oriT y se une covalentemente a su extremo junto a sus

cofactores (si los hay). Esta proteína de acoplamiento se llama relaxasa. El conjunto de la relaxasa y sus cofactores se denomina relaxosoma. Éste es el sustrato que es exportado a través del SST4 hacia el citoplasma de la célula receptora (Figura 1.8A). Los genes mob son lo mínimo indispensable para que un plásmido pueda ser movilizad de una bacteria a otra siendo que los genes del mpf pueden administrarse en trans. Entonces, lo mínimo indispensable para que un plásmido pueda ser transferido es la presencia de un oriT y los genes mob. A estos plásmidos se los llama movilizables. Cuando un plásmido posee los dos juegos de genes, el SST4 y los genes mob (es decir todo el conjunto de genes tra asociados a los mob), se los conoce como plásmidos autoconjugativos y son muy importantes en la dispersión de genes ya que pueden pasar de una bacteria a otra sin depender de factores que codifique el hospedador (G. Schröder & Erich Lanka 2005; Christie 2001; Llosa et al. 2002; Lujan et al. 2007; Alvarez-Martinez & Christie 2009). Adicionalmente, suelen ser muy importantes factores de adhesión como los pili que permiten el reconocimiento célula-célula previo a la conjugación (Lawley et al. 2003; Cascales & Christie 2003; Burrows 2005; Alvarez-Martinez & Christie 2009). En la Figura 1.7 se esquematiza de manera general el

proceso de conjugación entre bacterias. Sin embargo, vale destacar que la conjugación puede ocurrir entre organismos de diferentes dominios, como entre bacterias y plantas, algas u hongos. Incluso se sabe que la conjugación es relativamente frecuente en Arqueas del reino de las Crenarcheota (Alvarez-Martinez & Christie 2009). Un esquema de la conjugación a nivel molecular y de la estructura del SST4 se muestra en la Figura 1.8. La manera en que

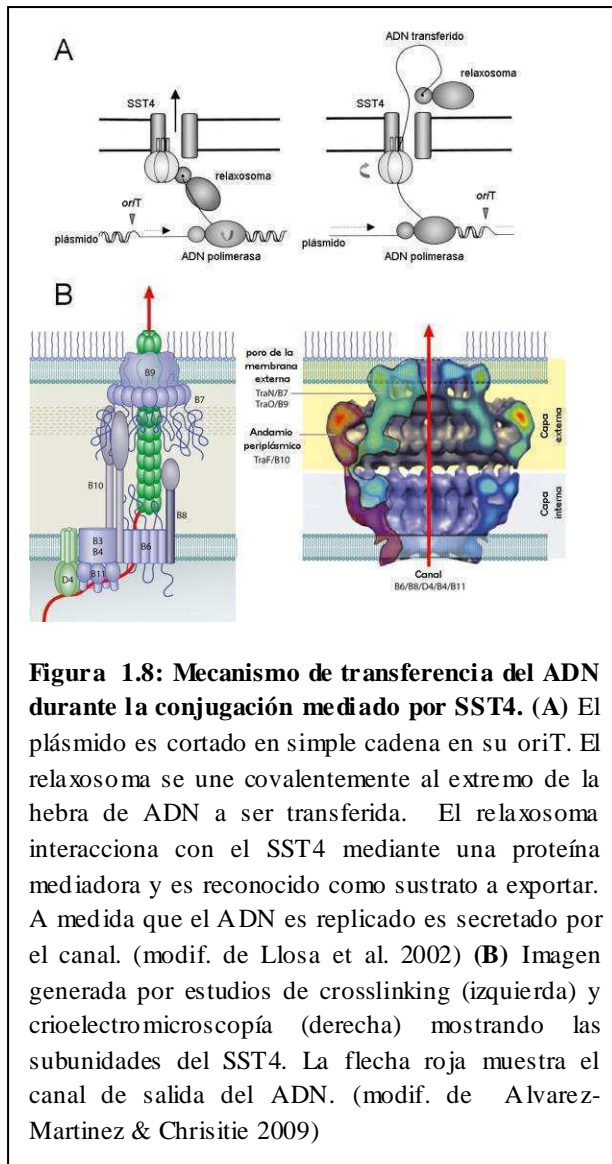


Figura 1.8: Mecanismo de transferencia del ADN durante la conjugación mediado por SST4. (A) El plásmido es cortado en simple cadena en su oriT. El relaxosoma se une covalentemente al extremo de la hebra de ADN a ser transferida. El relaxosoma interactúa con el SST4 mediante una proteína mediadora y es reconocido como sustrato a exportar. A medida que el ADN es replicado es secretado por el canal. (modif. de Llosa et al. 2002) (B) Imagen generada por estudios de crosslinking (izquierda) y crioelectromicroscopía (derecha) mostrando las subunidades del SST4. La flecha roja muestra el canal de salida del ADN. (modif. de Alvarez-Martinez & Christie 2009)

ocurre este proceso es un tema en el que se están haciendo progresos notables, en particular por la aplicación de técnicas de biología estructural que permiten obtener detalles con un nivel de resolución inédito (de la Cruz et al. 2010; Alvarez-Martinez & Christie 2009).

iii. Mantenimiento de plásmidos.

Se había enunciado que para que la transferencia de la información genética sea exitosa, en una segunda etapa, tras su adquisición, los plásmidos deben ser capaces de replicar y mantenerse establemente en la célula hospedadora. Una conjugación exitosa sin esta propiedad derivaría en la segura e irremediable pérdida del replicón por lo cual la THG no sería exitosa.

1. Replicación de plásmidos.

Los plásmidos deben en primer lugar poder replicar dentro de la célula hospedadora. Para ello, requieren de la maquinaria de replicación de la célula hospedadora. Sin embargo, lo deben hacer de manera controlada y coordinada con el ciclo celular y ajustar finamente su número de copias de modo tal de no ser perjudiciales para el hospedador. De este modo, lo que se regula con precisión es el inicio de la duplicación, que se da físicamente en el origen de replicación del plásmido (oriV). Se puede definir el oriV como: (i) la mínima región en cis que puede mantener la replicación autónoma del plásmido, (ii) el lugar en donde se

separan las hebras del ADN para iniciar el proceso de replicación o (iii) las bases donde comienza la síntesis de la cadena líder del ADN (del Solar et al. 1998). El oriV varía mucho de acuerdo a cada tipo de plásmido aunque existen características comunes. Casi siempre adyacente al origen está presente un gen rep que codifica para una proteína iniciadora de la replicación (Rep) que interacciona con las secuencias de ADN del origen de replicación. Su función es ayudar a la separación de las hebras y/o a reclutar la maquinaria de replicación del ADN (del Solar et al. 1998; Christopher M Thomas 2000). Además, asociado al oriV suelen haber secuencias ricas en AT o bien secuencias de unión de la proteína DnaA del hospedador.

Los plásmidos se agrupan en varios grupos de incompatibilidad según el tipo de oriV que lleven. Los plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad compiten por los factores de iniciación de la replicación lo que impide que ambos replicones puedan coexistir en la misma célula. La capacidad de división de un plásmido depende entonces de su oriV y de la presencia de factores intrínsecos del hospedador que puedan reconocerlo.

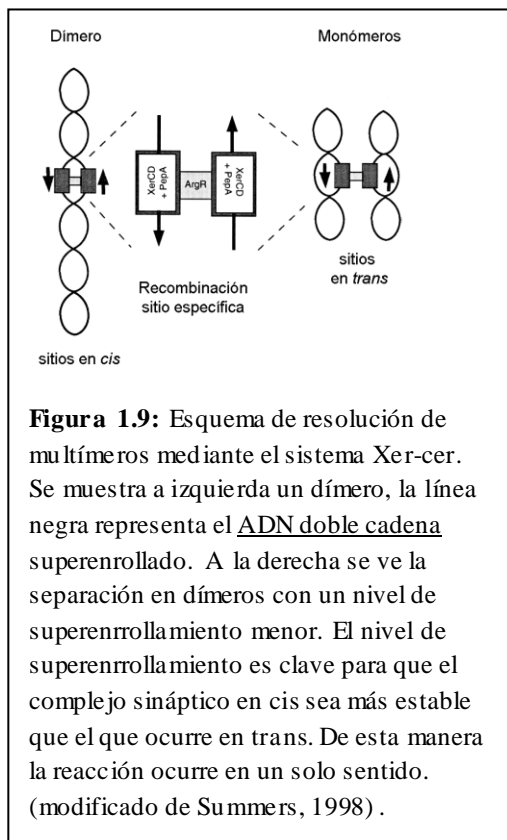
En lo que concierne a la resistencia a antibióticos, resultan de particular interés aquellos que no sólo son capaces de replicar y transmitirse en una misma especie, sino aquellos que pueden hacerlo entre diferentes grupos de microorganismos. A estos, se los llama de amplio rango o plásmidos promiscuos. Esta capacidad suele atribuirse a la presencia de factores adicionales importantes para la replicación del plásmido, de manera de independizarse de los factores del hospedador. Por ejemplo, los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncQ son de amplio rango y se ha especulado que se debe a que codifican para su propia helicasa y su propia primasa (Rawlings & Tietze 2001).

2. Estabilización del plásmido.

Además de replicar, los plásmidos codifican funciones de mantenimiento en el hospedador. Los plásmidos generalmente generan una carga metabólica en el hospedador y tienden a perderse. A su vez, eventos estocásticos como la segregación asimétrica de los plásmidos en las células hijas, pueden originar su pérdida. Las funciones de mantenimiento entonces codifican factores que evitan la pérdida del replicón. Cuando una cepa bacteriana pierde un plásmido, se dice que se cura del mismo.

La evolución de un plásmido puede básicamente seguir dos caminos: adquirir un alto número de copias (por encima de la centena de copias) pero un tamaño pequeño o bien, un mayor tamaño (2-10 copias) que le permite codificar para una mayor cantidad de información

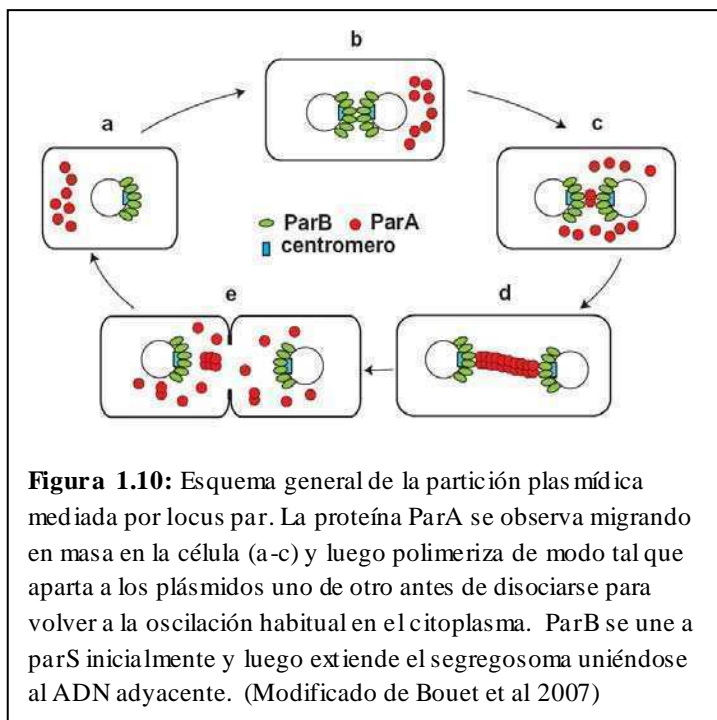
genética a costo de disminuir su número de copias (Norman et al. 2009; Christopher M Thomas 2000; D. Summers 1998). En el caso de los plásmidos de gran tamaño al tener pocas copias deben enfrentar la posibilidad de una distribución asimétrica de los mismos. A menor número de copias aumenta la posibilidad de que, tras la división celular, una de las células hijas no herede ningún plásmido. Generalmente los plásmidos de alto número de copias no tienen este problema. Por encima de las 25 copias, la chance de que un plásmido no sea



transmitido después de la división es de 6×10^{-8} (D. Summers 1998). Sin embargo, un plásmido pequeño, aún en gran número de copias, puede terminar generando dímeros por recombinación homóloga entre las diferentes copias o por problemas topológicos durante la división de isómeros súper enrollados. La generación de dímeros provoca una rápida propagación en los mismos. Esto se debe a que un dímero poseen dos orígenes de replicación y por lo tanto la chance de replicar es doble comparada a la de un monómero. De esta manera, eventualmente se formarán trímeros, tetrámeros, es decir multímeros (que tienen tres, cuatro o n chances más de duplicarse que el monómero). Al mantenerse el número de orígenes de replicación existe una menor cantidad

de moléculas. Al disminuir el número de plásmidos, aumenta la chance de segregación asimétrica de plásmidos. En el caso extremo se forma un único multímero que no puede segregarse. A este fenómeno se lo llama la “catástrofe del dímero” (D. Summers 1998). En la célula existen mecanismos que evitan tanto la segregación asimétrica como la formación de dímeros. Estos son sistemas de resolución de multímeros (mrs), sistemas de partición y sistemas de adicción a plásmidos (también llamados sistemas toxina-antitoxina o sistemas de muerte post-segregacional).

Los mrs son sistemas de recombinación sitio específicos que son capaces de, por ejemplo, transformar un dímero en dos monómeros por intercambio de cadenas en un sitio de recombinación específico. Un sistema muy estudiado es el sistema Xer-cer de los plásmidos de la familia ColE1. El plásmido aprovecha el sistema de resolución de los dímeros de cromosomas bacterianos en su propio beneficio. Este replicón posee una secuencia llamada cer, de 240 pb, que es reconocida por XerCD y otras proteínas codificadas por el hospedador que efectúan el intercambio de las cadenas que finalmente resuelven el dímero (ver Figura 1.9). El mecanismo detallado es sujeto de investigación (Trigueros et al. 2009) pero está por fuera del objeto de esta tesis y ha sido revisado en detalle en la literatura (Summers 1998;



Rajeev et al. 2009 y otros). Un caso interesante que tiene que ver con la resistencia a antibióticos es el plásmido pJHCMW1, que aloja al transposón Tn1331. Tn1331 alberga al gen de resistencia *aac(6')-Ib*. Este plásmido posee un posible sitio de resolución similar a cer. Sin embargo, cuando se investigó su capacidad de catalizar el intercambio de cadenas se descubrió que no era activo. La capacidad de resolución de los multímeros de pJHCMW1

es dependiente de la resolvasa del transposón Tn1331 que normalmente resuelve los cointegrados (M E Tolmasky et al. 2000). Así, el transposón tiene la doble función de evitar la pérdida del replicón y de propagar los genes de resistencia a nivel molecular (ver más adelante).

Los sistemas de partición activa son importantes para evitar la herencia asimétrica de plásmidos siendo estos particularmente importantes en plásmidos grandes, de bajo número de copia. Estos sistemas aseguran la segregación simétrica de los plásmidos por separación física de los mismos de manera activa (Bouet et al. 2007; Finbarr Hayes & Barillà 2006a; Finbarr Hayes & Barillà 2006b). Los plásmidos que emplean esta estrategia poseen un “centrómero”, compuesto de dos genes de las familias parA y parB junto con un locus de

partición en cis, compuesto por varias repeticiones de una secuencia, parS. Como se muestra en la Figura 1.10, ParB es una proteína de unión al locus parS mientras que ParA es una ATPasa que se une a ParB y recluta a otras unidades de ParA. Éstas forman un filamento que empuja activamente a ambos replicones a sitios opuestos de la célula. Se suele llamar al complejo ADN-ParA-ParB segregosoma. El ejemplo mejor conocido es el del plásmido R1 (de la Cueva-Méndez & Pimentel 2007) pero existen otros ejemplos como el plásmido pTP228 donde los genes parF y parG son de la misma familia parA y parB y cumplen funciones homólogas (Barillà & Finbarr Hayes 2003; Barillà et al. 2007).

Otro sistema importante para evitar la pérdida de plásmidos son los sistemas de adicción al plásmido también conocidos como sistemas toxina-antitoxina (TA). Estos sistemas generan la muerte de las células que hayan perdido el plásmido. Para ello se valen de dos genes: uno codifica para una toxina mientras que el otro codifica para su antitoxina. La antitoxina tiene mucha menor estabilidad que la toxina. Si el plásmido se pierde, la antitoxina rápidamente se degrada. La célula muere ya que la toxina se mantiene estable porque ya no está el replicón que produce la antitoxina continuamente. Existen muchos trabajos que discuten el tema en más profundidad y el hecho intrigante de que estos sistemas se encuentren en múltiples copias en el cromosoma de varias bacterias ha abierto el interés de la comunidad científica y de compañías farmacológicas (Kenn Gerdes et al. 2005).

iv. Los plásmidos y su evolución.

Se piensa que en su origen, los plásmidos son poco más que un fragmento de ADN circular que posee un gen rep. Poco a poco, la adquisición de mecanismos para controlar el número de copias (como el locus cop), sistemas mrs, de partición y TA hacen que los plásmidos se estabilicen. Al aumentar su tamaño tienden a disminuir en número de copias de modo de no generar una carga metabólica excesiva al hospedador (D. Summers 1998; Christopher M Thomas 2000; Norman et al. 2009). La Figura 1.11 ilustra esta evolución. La adquisición adicional de genes de replicación permite ampliar el rango de hospedador. Al mismo tiempo, el acoplamiento a sistemas de conjugación ya sea en cis incorporando un sistema de secreción tipo IV o en trans al emplear una maquinaria preexistente en el hospedador (productos de genes de movilización) favorecen la propagación del plásmido aumentando también su tamaño. Sin embargo, dado que estos cambios implican grandes costos metabólicos, para que puedan ocurrir, resulta crucial que la incorporación al replicón de genes confieran ventajas adaptativas a la bacteria que lo aloje (Norman et al. 2009; Ochman et al. 2000).

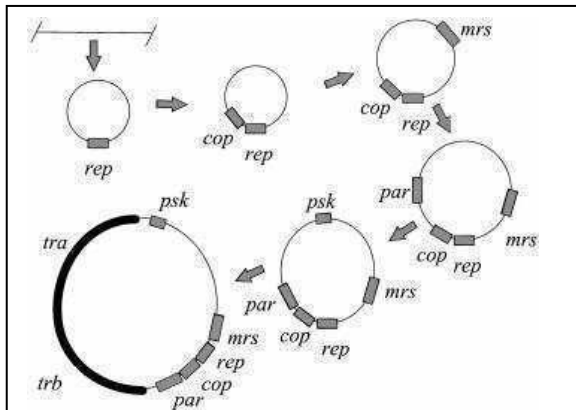


Figura 1.11: Evolución en el tamaño del plásmido. Una mayor estabilidad y capacidad de propagarse de manera “egoísta” le confiere a un plásmido una mayor probabilidad de perpetuarse en el metagenoma ambiental. La inclusión de estas funciones genera un paulatino aumento del tamaño a lo largo de la evolución. (Tomado de Thomas 2000)

Todo lo antedicho se puede esquematizar y resumir en la Figura 1.12. Todo plásmido esencialmente posee cuatro módulos : i) uno de adaptación que aloja genes que confieren ventajas adaptativas, como genes de resistencia a antibióticos, genes que permiten asociaciones simbióticas o explotar una fuente de carbono particular; ii) uno de replicación que asegure la división del replicón; casi siempre son genes rep aunque puede haber otros; iii) uno que permita el mantenimiento estable en la célula hospedadora como mrs, TA o un segregosoma ; y iv) un módulo de propagación que codifique para los factores que permiten la

conjugación, como un oriT y un SST4 (Norman et al. 2009). Estos módulos se agrupan en clusters de genes de acuerdo a su función generando mosaicos de funciones. El orden de estos clusters no es importante aunque sí su coherencia interna a fin de que cumplan su función. Existen muchos ejemplos donde los mismos “parches de funciones” están en varios

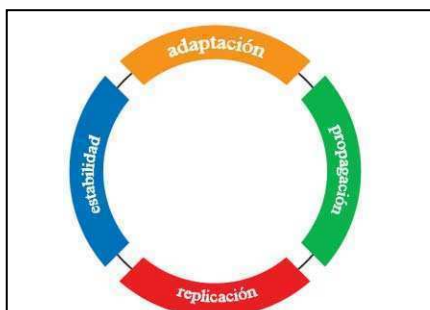


Figura 1.12: Esquema general de las funciones contenidas dentro de un típico plásmido conjugativo. Se muestra en naranja el módulo dedicado a los genes de adaptación, en verde los de propagación, en rojo los que intervienen en la replicación y en azul aquellos que codifican las funciones de estabilidad el plásmido. (Modificado de Norman et al 2009)

órdenes posibles (Christopher M Thomas 2000; Norman et al. 2009). Lo que sí es importante para la supervivencia del plásmido es que siempre existan estos cuatro tipos de módulos con mayor o menor complejidad.

v. Los plásmidos y la adquisición de determinantes de resistencia.

Además de su trascendencia en la evolución del linaje bacteriano y su capacidad de transferir genes lateral y horizontalmente, hemos visto que los plásmidos tienen gran importancia en la propagación de genes de resistencia a antimicrobianos. Hoy en día se sabe que la transmisión horizontal y vertical de genes de resistencia a antibióticos en miembros de la familia

Enterobacteriaceae y Pseudomonas se debe principalmente a grandes plásmidos de amplio rango de hospedador. De esta manera, genes que confieren una ventaja como puede ser la

resistencia a un antimicrobiano particular, pueden propagarse entre distintos microorganismos dispersándose de este modo las resistencias implicadas. Por lo tanto, es importante estudiar cómo es que estos genes llegan a los replicones plasmídicos. Aquí es donde cobra muchísima importancia la dispersión a nivel molecular de genes de resistencia. En la siguiente sección veremos los mecanismos por los cuales los determinantes de la resistencia a antibióticos son capaces de insertarse en estos replicones que finalmente los dispersarán en las poblaciones bacterianas.

c. Dispersión de genes de resistencia a antimicrobianos a nivel molecular.

Anteriormente se discutió el origen diverso de los genes que confieren resistencia a los antibióticos. Generalmente no provienen de microorganismos patógenos, sino que llegan a ellos por conjugación. Para que los genes de resistencia antibióticos puedan migrar mediante conjugación deben, en primer lugar, poder alcanzar un replicón estable y conjugativo desde el sitio donde se hallan naturalmente. Por ejemplo se sabe que el gen de que codifica para la β -lactamasa de espectro expandido CTX-M-2 proviene del cromosoma de *Kluyvera ascorbata*.

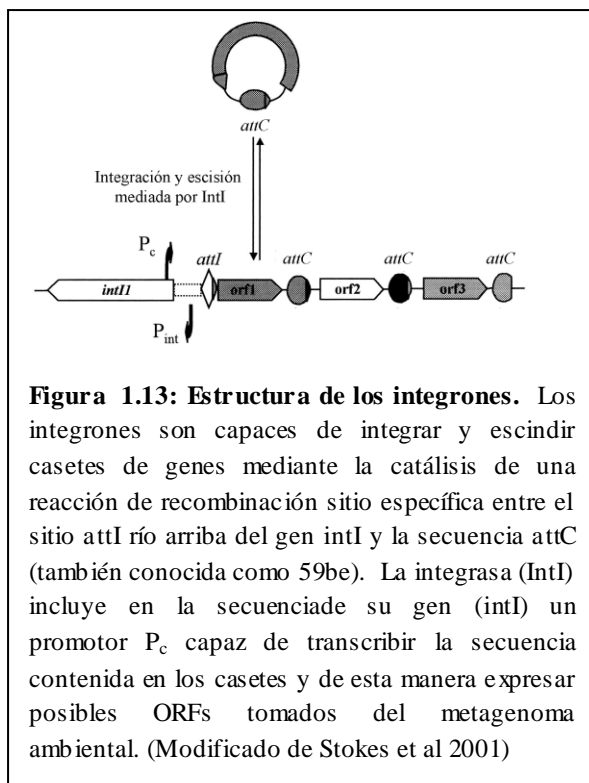


Figura 1.13: Estructura de los integrones. Los integrones son capaces de integrar y escindir casetes de genes mediante la catálisis de una reacción de recombinación sitio específica entre el sitio *attI* río arriba del gen *intI* y la secuencia *attC* (también conocida como 59be). La integrasa (*IntI*) incluye en la secuencia de su gen (*intI*) un promotor P_c capaz de transcribir la secuencia contenida en los casetes y de esta manera expresar posibles ORFs tomados del metagenoma ambiental. (Modificado de Stokes et al 2001)

En algún momento, este gen pasó a algún plásmido conjugativo desde donde fue transferido a bacterias patógenas de humanos de aislamientos clínicos (J. Di Conza et al. 2002; Power et al. 2005; S. M. Arduino et al. 2002). Llamaremos a este pasaje de genes de una molécula de ADN a otra, dispersión a nivel molecular. Esencialmente depende de fenómenos de recombinación sitio específica. En estos eventos son trasladados fragmentos de ADN de un replicón a otro, o bien, se incorpora ADN a un plásmido preexistente. En esta sección se describirán brevemente los integrones, que permiten la incorporación de genes en casete a un replicón. Se describirán

también a los elementos ISCR y los transposones.

i. Integrones: coleccionistas de elementos del metagenoma.

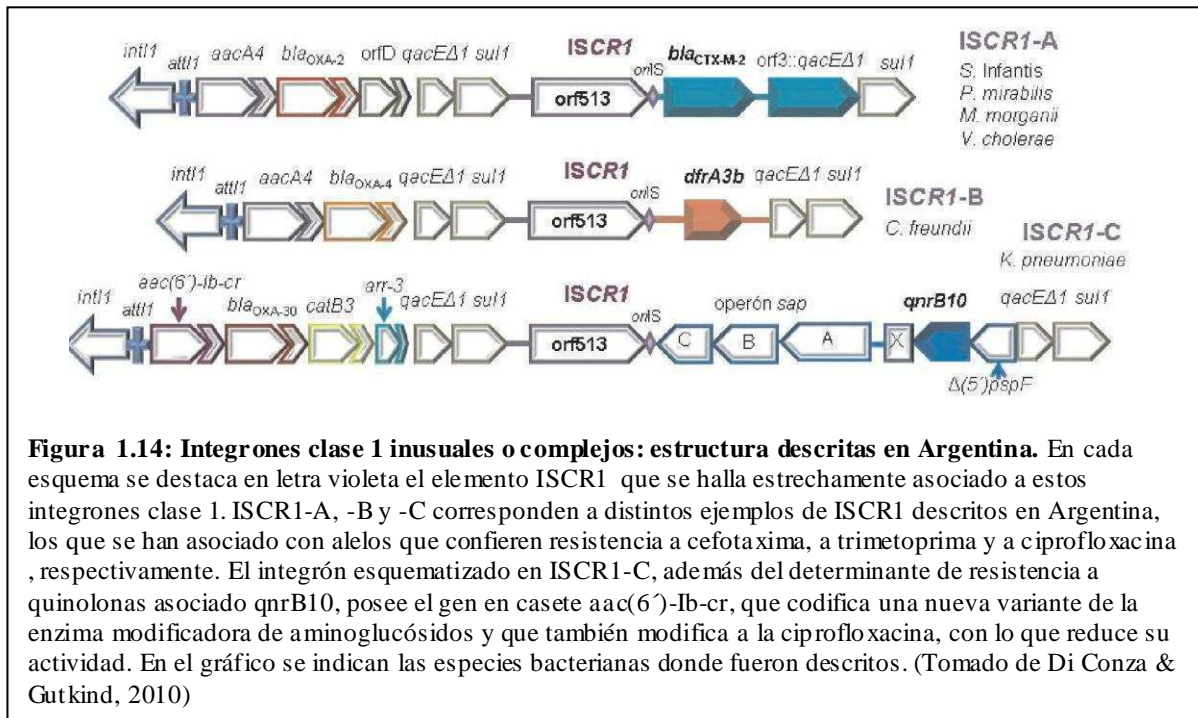
Los integrones son estructuras genéticas capaces de incorporar, de manera independiente de RecA, fragmentos de ADN circular bajo un promotor que permite la expresión de ORFs (Didier Mazel 2006). Están compuestos de i) el gen de una integrasa (intI), de la familia de las tirosina recombinasas, con su promotor, ii) una secuencia de integración de los casetes (attI) y iii) un promotor (P_c) codificado sobre la integrasa en dirección opuesta que permite la transcripción de los genes en casete (ver figura 1.13). La integrasa codificada permite la inserción pero también la escisión de fragmentos de genes en casete. Esto se debe a la capacidad de la enzima de ligar por recombinación el sitio attI con una secuencia consenso presente en el casete llamada attC. Una vez integrado el casete, el promotor P_c permite la transcripción de los ORFs que contiene. La adquisición de un primer casete no impide la integración de un segundo o un tercero. De hecho, existen en el genoma de las bacterias de la familia Vibrionaceae superintegrones con arreglos que incluyen más de 100 casetes. Dado que la integrasa puede catalizar tanto la incorporación como la escisión de los genes en casete, el sistema es muy dinámico y flexible. Si bien los integrones en un principio se descubrieron y caracterizaron en bacterias del ámbito clínico asociados a elementos de movilidad (transposones en plásmidos conjugativos como el Tn21) hoy se sabe que son elementos genéticos, muy antiguos (Rowe-Magnus et al. 2001), ampliamente distribuidos entre las γ - y β -proteobacterias (Didier Mazel 2006), que permiten la adquisición de una diversidad enorme de genes en ambientes prístinos (Stokes et al. 2001). La investigación de los integrones cromosómicos es sumamente interesante y es un área de relativa vacancia en la que hay muchísimas preguntas que contestar. Se describirá solamente lo que es relevante para esta Tesis, como son los integrones móviles típicamente asociados a la resistencia a antibióticos.

Originalmente el descubrimiento de los integrones fue producto del trabajo pionero de Ruth M. Hall. A lo largo de los años '80 se habían descubierto diversos genes que eran los determinantes de los fenotipos clínicos de resistencia clínica. Estos determinantes se hallaban en combinaciones variables y eran frecuentemente antecidos y seguidos de regiones constantes a las que llamó 5'-CS y 3'-CS (por región conservada en 5' y en 3' respectivamente). Encontraron luego que estas dos zonas constantes codificaban un ORF en sentido opuesto y genes de resistencia a antimicrobianos respectivamente. A continuación, se observó que el ORF en la 5'-CS codificaba para un péptido similar a la integrasa del fago λ . Posteriormente se demostró la actividad catalítica de la integrasa (G. D. Recchia & R M Hall 1995; Ruth M. Hall & Collis 1995). Se los denominó integrones de multiresistencia (MRI), y

se clasificaron inicialmente en tres grupos según la divergencia en la secuencia de la integrasa que codifican. Las integrasas tipo 1 y 3 son activas mientras que la integrasa 2 tiene un codon stop prematuro en la posición 179. Si bien estos tres tipos de integrones no pueden movilizarse ni transponerse por si mismos (con la notable excepción del Tn402, una forma probablemente ancestral) suelen encontrarse en plataformas móviles como plásmidos o transposones, por lo que se los suele llamar integrones móviles (Di Conza & Gutkind 2010.; Liebert et al. 1999; Mazel 2006).

De los tres tipos integrones móviles mencionados, los identificados con mayor frecuencia en aislamientos clínicos multirresistentes son los integrones de clase 1. Además, esta clase de integrones lleva una gran variedad de casetes ya que se los ha encontrado asociados a más de 80 genes de resistencia diferentes (J. A. Di Conza & G. O. Gutkind 2010; Didier Mazel 2006). Los integrones móviles de clase 1 en general poseen en la región conservada en 3' (3'-CS) los genes *qacEΔ1*, *sul1*, *orf5* y *orf6*. El primero confiere resistencia parcial a las aminas cuaternarias presentes en antisépticos y desinfectantes. El gen *sul1* otorga resistencia a sulfonamidas. Las funciones de *orf5* y *orf6* son desconocidas. Sin embargo, la mayoría no presenta esta estructura 3' en forma completa, sino que generalmente sólo se encuentra el gen *sul1* (S Partridge et al. 2001) o incluso puede estar ausente como en el Tn402 (Rådström et al. 1994). Esta última, sería una forma ancestral ya que los integrones clase 1 parecerían ser modificaciones de éste por deleciones en un antiguo módulo de transposición.

Si bien los integrones clase 1 no pueden transponer por si mismos, la presencia de IRs en sus extremos, sugiere que podrían transponer si las enzimas necesarias les son suministradas en trans, como sugiere un trabajo de Ruth Hall y colaboradores (Partridge, et al. 2002). Sin embargo, parece más probable que su movilidad se deba a que suelen estar asociados a transposones, típicamente de la familia del Tn21 (Liebert et al. 1999).



Algunos integrones de clase 1 fueron llamados también inusuales o complejos (J. A. Di Conza & G. O. Gutkind 2010). Los primeros ejemplos fueron los integrones In6 e In7 y el presente en el plásmido pSAL-1 (Verdet et al. 2000; Stokes et al. 1993; Parsons et al. 1991). A grandes rasgos son muy similares a los integrones clase 1, sólo que presentan una duplicación del 3'-CS. Al primero se lo llamó 3'-CS1 ó 3'-CS' y al segundo se lo llamó 3'-CS2 ó 3'-CS''. Esta segunda copia es incompleta ya que posee una delección de tamaño variable en su extremo 5' (Figura 1.14). Entre ambas 3'-CSs se identificó una región constante y una región variable. La región constante, llamada CR, contiene el orf513, que codifica para una proteína de 513 aminoácidos. Río abajo se encuentra la región variable que contiene un gen de resistencia a antibióticos. Existe mucha variabilidad (en diferentes aislamientos) a los costados de la CR ya que la delección en el extremo 5' de la 3'-CS2 es diferente en cada caso. Al mismo tiempo, la orientación del determinante de resistencia asociado no es la misma en todos los genes incluidos. En nuestro país (Figura 1.14) se identificaron estructuras de este tipo en los géneros Salmonella, Proteus, Citrobacter, Klebsiella y Morganella (J. Di Conza et al. 2002; S. M. Arduino et al. 2002; M. P. Quiroga et al. 2007; Power et al. 2005). Considerando que existe cierta similitud de secuencia del orf513 con su transposasa de IS91 y las características particulares que posee, se cree que estas regiones CR son, en efecto, secuencias de inserción de la familia del IS91 (Toleman et al. 2006; T. R. Walsh 2006). Estas secuencias de inserción poseen la particularidad de replicar por un mecanismo de círculo rodante y no tener secuencias IR definidas lo que

explicaría la variabilidad observada en las CR. De este modo ha sido bastante aceptado en la comunidad que se llame a estas secuencias ISCR.

Los integrones son elementos genéticos muy importantes para la incorporación y asociación física de varios determinantes de resistencia a antibióticos que típicamente generan multiresistencia. Sin embargo, salvo raras excepciones, los integrones no son capaces de moverse de un replicón a otro por sí mismos. Muchas veces entonces, se los ve asociados a, o incluidos en transposones. Estos elementos son finalmente los encargados de mover toda la estructura de un replicón a otro. En la siguiente sección se describirán las características de los transposones.

ii. Transposición de genes de resistencia.

La transposición es el movimiento de determinadas secuencias de ADN, los transposones,

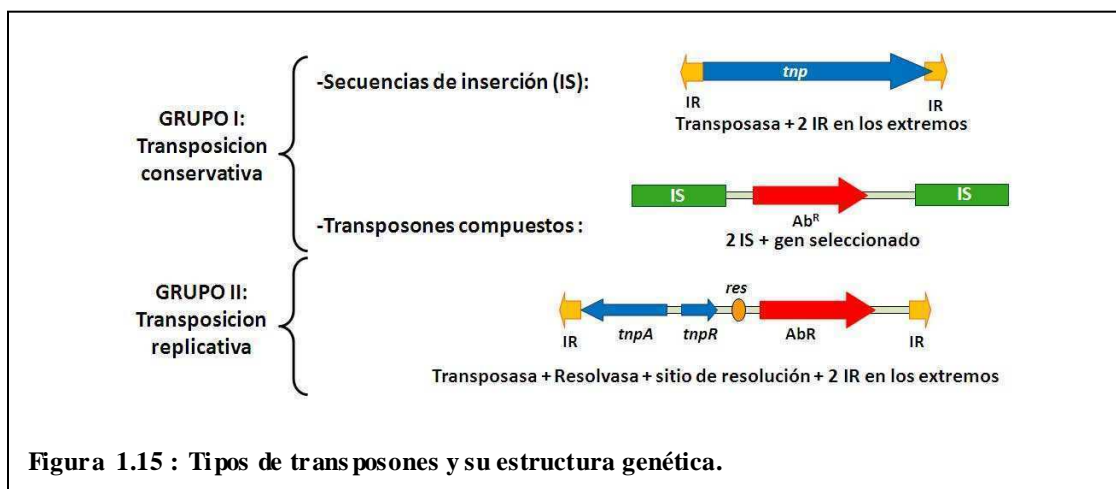


Figura 1.15 : Tipos de transposones y su estructura genética.

independientemente de proteínas de recombinación celulares como RecA. Este movimiento puede ser dentro de la misma molécula o de una molécula de ADN a otra. Al sitio aceptor del ADN se lo llama sitio blanco. Si bien fueron caracterizados en Bacteria, Archea, Eucaria y en varios de los distintos reinos de cada Dominio, nos referiremos puntualmente a los identificados en bacterias. El movimiento del material genético se da por la acción de una recombinasa sitio-específica, la transposasa (Tnp). En caso de que la transposición sea replicativa, como se verá más adelante, también es necesaria una resolvasa. Además de la Tnps, también son esenciales para la transposición repeticiones invertidas a los costados del elemento móvil. Si bien la transposición es un suceso poco frecuente, es importante en la evolución de los procariontes y en la diseminación de resistencias a antimicrobianos (Mahillon 1999; Liebert et al. 1999; Julian Davies 1994; Ochman et al. 2000; M E Tolmasky 2000).

Los transposones más sencillos son las secuencias de inserción (IS) (Figura 1.15). Se trata de fragmentos de ADN de entre 750 y unos 2500 pb. En general, sólo poseen una transposasa flanqueada por un par de repeticiones invertidas de entre 10 y 40 pb que son importantes en la reacción de transposición (Mahillon & M Chandler 1998; M Chandler & Mahillon 2002; Siguier et al. 2006; Mahillon 1999). Las repeticiones invertidas tienen un número específico de bases que es característico de cada transposón. Por fuera de estas repeticiones se encuentran repeticiones directas que corresponden al sitio blanco ya que durante la transposición el sitio blanco se duplica. Sin embargo, existen excepciones como IS4321 que pertenece a la familia de las secuencias de inserción IS1111, que interrumpe al sitio blanco sin duplicarlo (Mahillon & M Chandler 1998; Siguier et al. 2006; S Partridge & R Hall 2003).

Por otro lado, los transposones compuestos (Figura 1.15) son dos IS del mismo tipo flanqueando uno o más genes. Estos suelen ser genes fácilmente seleccionables como determinantes de resistencia a antimicrobianos. La transposición de estos elementos es no replicativa. Las IS pueden estar en la misma orientación como en el Tn9, o en orientación opuesta como el caso del transposón Tn10. Además en muchos transposones compuestos, sólo una sola de las dos Tnps está activa. Los transposones compuestos poseen en muchos casos uno o dos de los determinantes de resistencia de los plásmidos R. Sin embargo, es poco frecuente observar más de un gen de resistencia a antibióticos en transposones compuestos, siendo una excepción el Tn5 que posee tres (D Mazel & J Davies 1999).

Tanto las IS como los transposones compuestos son agrupados como transposones del grupo I, por su mecanismo de transposición conservativo, es decir, luego de la transposición se mantiene el número de copias del elemento, es decir, se escinde del sitio de origen para insertarse en el sitio blanco sin dejar copia.

Los transposones del Grupo II son aquellos que realizan una transposición replicativa. Se los conoce como transposones complejos o replicativos y se caracterizan por poseer repeticiones invertidas, una transposasa, una resolvasa y un sitio de resolución que es reconocido por esta última que permite resolver el cointegrado (Figura 1.15). Luego de transponerse a su nuevo sitio dejan una copia del transposón en el sitio de origen.

Se conocen numerosos casos en los que los transposones son responsables de la diseminación de resistencias a antibióticos. Tanto los miembros de la familia del Tn3, del Tn1331 (Figura 1.16), como los de la familia del Tn21 (Figura 1.16) son conocidos por estar involucrados muy frecuentemente en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (M E Tolmasky 2000; Liebert et al. 1999). En particular, el Tn21 posee una estructura con una transposasa, una resolvasa, un integrón (In2) y un operón de resistencia a mercurio. In2 es el

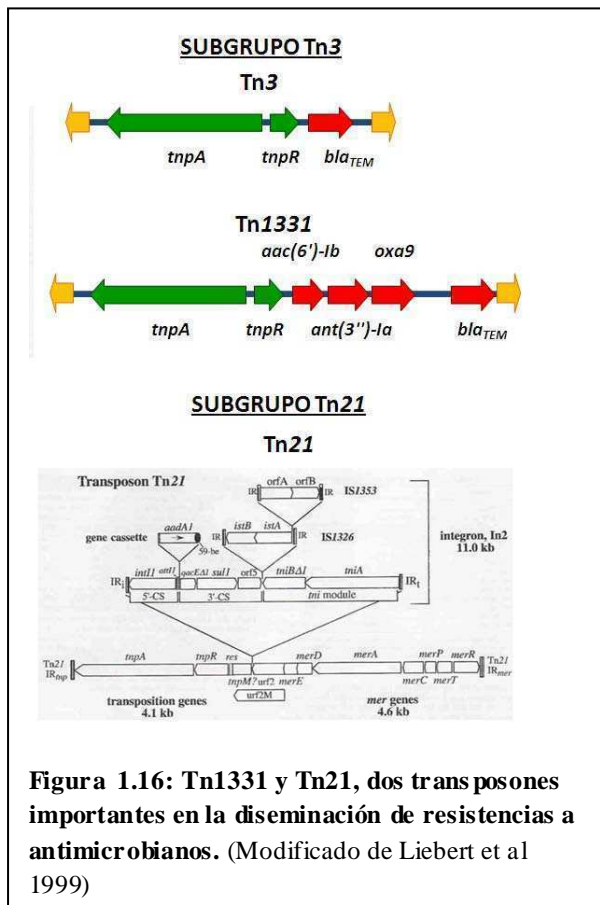


Figura 1.16: Tn1331 y Tn21, dos transposones importantes en la diseminación de resistencias a antimicrobianos. (Modificado de Liebert et al 1999)

responsable de la adquisición de resistencias a antibióticos por integración de casetes de genes de resistencia.

Por su lado, el Tn1331 es un transposón derivado del Tn3 con genes de resistencia a antibióticos en casetes similares a los de la región variable de los integrones (Figura 1.16) (M E Tolmasky 2000). Fue identificado en numerosos aislamientos pediátricos de todos el país incluido en plásmidos conjugativos (R. M. Chamorro et al. 1990) y es importante porque lleva como primer casete de resistencia a *aac(6')-Ib* que, como ya se dijo, confiere resistencia a Ak. Esto es particularmente grave porque la Ak es el tratamiento empírico que se aplica en infecciones de neonatos. Si el tratamiento

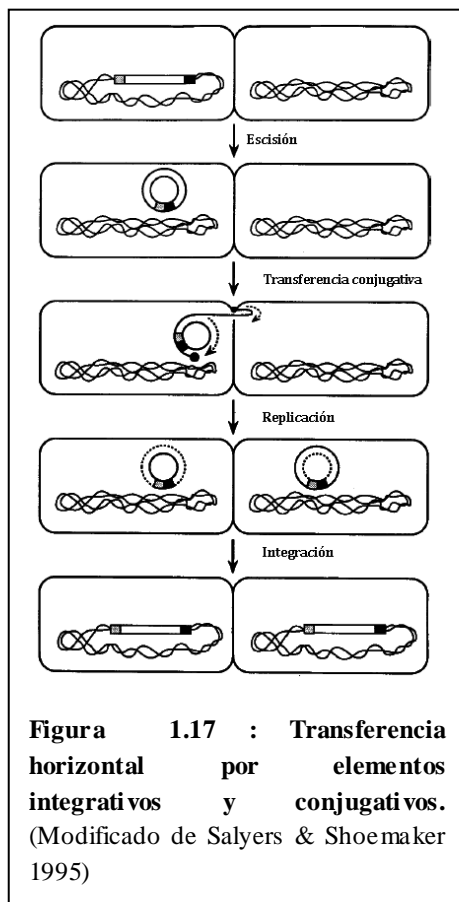
falla, las posibilidades de supervivencia son escasas.

d. Dispersión a nivel celular y molecular simultánea: Elementos Integrativos y Conjugativos (ICEs).

Existe una serie de elementos genéticos que realizan su dispersión a nivel celular y molecular simultáneamente: los ICE. Es decir, se escinden del cromosoma bacteriano, pasan por conjugación a otra bacteria y finalmente se integran en un nuevo hospedador (Figura 1.17). Es de destacar que los ICEs no pueden mantenerse circularmente en el citoplasma bacteriano y deben integrarse necesariamente a un replicón por recombinación sitio específica mediada por una integrasa (Burrus & Waldor 2004). Sin embargo, estudios muy

recientes muestran que podría haber cierto grado de replicación autónoma (C. A. Lee et al. 2010).

En un principio se describieron en *Enterococcus faecalis* y en *Bacteroides thetaiotaomicron* (Salyers et al. 1995; Burrus & Waldor 2004). Dado que se los identificó en diferentes sitios del genoma, en un principio, se los llamó “transposones conjugativos” y hasta en algunos casos se los consideró como plásmidos integrados al cromosoma (Burrus & Waldor 2004).



Luego aparecieron elementos similares en bacterias Gram negativas como *Salmonella enterica*, *Pseudomonas putida*, *Sinorhizobium meliloti* y el elemento STX de *Vibrio cholerae*. Varios de ellos no fueron identificados inicialmente como “transposones conjugativos”. Luego se demostró que la mayoría de estos elementos se integraba de manera sitio específica de un modo similar al bacteriófago λ (Burrus, Pavlovic, Decaris & Guedon 2002). Por este motivo es más apropiado llamarlos ICEs que “transposones conjugativos”, un término menos abarcativo. Sin embargo, aún existe cierta inercia en la literatura lo que marca que el término no fue aún plenamente incorporado en la comunidad.

La organización de los ICEs es similar a la de los plásmidos. Tienen un módulo de mantenimiento que codifica las funciones de integración y escisión.

Clásicamente existe un gen de integrasa (*int*) y río arriba de la integrasa un gen de escisasa (*xis*). Además, hay secuencias importantes en cis, como las *attC* a ambos lados del ICE que se suelen llamar *attR* o *attL* según estén a derecha o izquierda. El ICE se integra en una secuencia blanco llamada *attB* en el replicón bacteriano. La integrasa puede tener una mayor o menor especificidad de secuencia; ésta varía mucho de acuerdo al elemento en cuestión: por ejemplo, Tn915 es capaz de integrarse a trectos ricos en A+T lo que le da cierta promiscuidad mientras que STX de *Vibrio cholerae* tiene una secuencia de integración muy específica que posee un solo sitio en todo el genoma (Burrus, Pavlovic, Decaris & Guedon 2002). La integrasa cataliza la recombinación *attB-attC* generando la inserción del ICE en el replicón con duplicación de la secuencia blanco. Cuando hay una escisasa, esta cataliza el

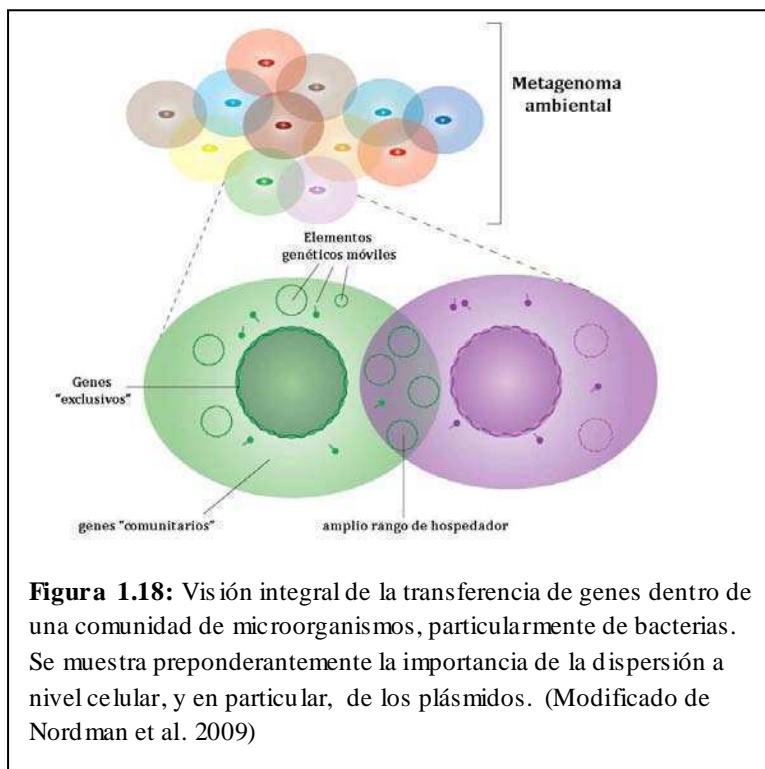
intercambio entre las cadenas de ADN sobre attR-attL, lo cual recirculariza el elemento liberándolo del replicón. Estos genes son muy variables pudiendo cambiar en ICEs muy parecidos (Burrus & Waldor 2004).

Otro módulo funcional es el de transferencia que codifica típicamente un SST4 (o genes tra), que es el que permite la formación del mfp y contiene genes de transferencia como los mob. La existencia de este módulo permite la movilización de otros elementos genéticos a los que se les puede suministrar el SST4 en trans (Salyers et al. 1995; Burrus & Waldor 2004).

Los genes dentro del ICE que regulan la movilización del elemento constituyen otro grupo funcional. Es un tema de creciente interés puesto que se ha visto que señales de estrés específicas como la inducción del sistema SOS, el empleo de antibióticos y otras tienen la capacidad de inducir la movilización del elemento. Por ejemplo, un muy elegante estudio del grupo de Grossman muestra que el elemento ICEBS1 de *Bacillus subtilis* es regulado por quórum sensing y daño global al ADN (Auchtung et al. 2005).

Por último, es importante destacar que los ICEs contienen genes que confieren ventajas adaptativas en un determinado nicho ecológico. Existe una gran variedad de funciones asociadas a los ICEs: simbiosis, resistencia a antibióticos, factores de patogenicidad, resistencia a fagos y un largo etcétera (Burrus, Pavlovic, Decaris & Guedon 2002; Burrus &

Waldor 2004). De hecho, las islas genómicas podrían ser residuos de ICEs que se han fijado en el genoma por pérdida de función de los genes de movilización (Juhas et al. 2009; Hacker & Kaper 2000), aunque existen opiniones que señalan que ICEs e islas genómicas poseen historias filogenéticas diferentes (Boyd et al. 2009). Sin embargo, aunque los ICEs pueden llevar genes de resistencia a antibióticos de relevancia clínica (Croucher et



al. 2009), generalmente no generan multirresistencia. Más bien, suelen tener mayor relevancia clínica por los genes de patogenicidad que cargan y dispersan.

4. Una visión global de la dispersión de genes a antimicrobianos.

En la naturaleza, los microorganismos tanto bacterias, como arqueas y eucariotas, coexisten (en simbiosis, competencia o en relaciones neutras) dentro de nichos complejos en los que

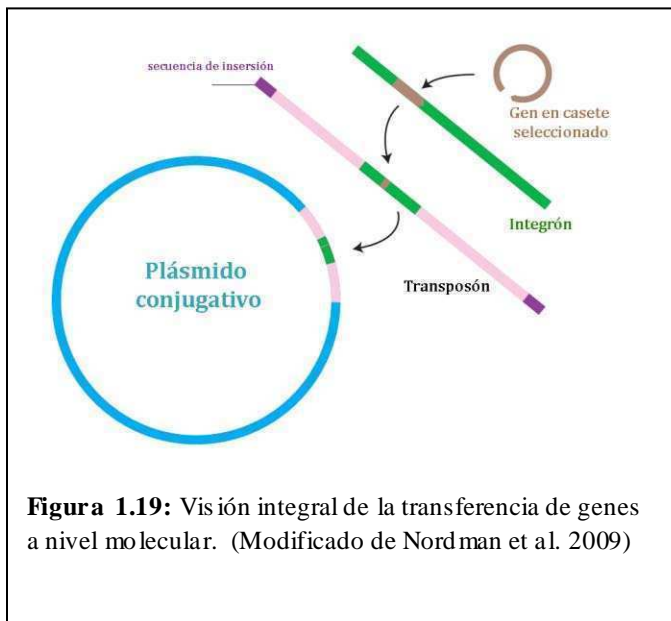


Figura 1.19: Visión integral de la transferencia de genes a nivel molecular. (Modificado de Nordman et al. 2009)

son necesarias una enorme variedad de funciones químicas. Llevan a cabo muchísimas funciones no sólo biológicas sino biogeoquímicas, como el ciclo de diversos elementos incluyendo su fijación en moléculas biológicas. Se trata entonces de un reservorio enorme de genes con las más diversas funciones, al que se lo ha llamado metagenoma (Norman et al. 2009). La THG y la transferencia lateral de genes permiten que estos

genes sean asequibles por diferentes microorganismos. Este proceso ha sido fundamental en la evolución del dominio Bacteria, dándole forma al genoma, permitiendo el acceso a este reservorio metagenómico. Así, no es raro que un 20% del genoma de una bacteria pueda haber sido adquirido horizontal o lateralmente (Ochman et al. 2000). Por otro lado, se calcula que estas transferencias han acelerado unas 10.000 veces la introducción de genes nuevos en los genomas de las bacterias si se compara con la que se obtendría con la mera expansión clonal (Norman et al. 2009).

En la figura 1.18, se muestra el concepto de metagenoma ambiental con una variedad enorme de información genética compuesta de genes exclusivos de determinados microorganismos y otros accesibles a su comunidad circundante. Se muestra cómo diferentes microorganismos pueden compartir parcialmente sus genes con otros, por diversos elementos de movilidad genética (como plásmidos o fagos) y distintos procesos de adquisición (como la transformación natural) que hemos revisado al inicio de este capítulo (Ochman et al. 2000; Norman et al. 2009; I. Chen & David Dubnau 2004). Sin duda, aquellos genes que estén albergados en plásmidos o ICEs serán intercambiados mucho más fácil y rápidamente. Los

plásmidos (e ICEs) permiten la adquisición de genes preseleccionados con alta frecuencia y eficiencia, no sólo la incorporación de ADN fortuito en situaciones de stress como en el caso de la transformación o transducción. Estos genes pudieron llegar a estos elementos genéticos móviles merced a su inclusión en transposones o integrones que los captaron (Figura 1.19). A su vez, un integrón incluido en un transposón permite la movilidad de todo el conjunto entre diversos plásmidos con distinto rango de hospedador (Figura 1.18 y Figura 1.19). En el caso particular de los genes de resistencia a antimicrobianos, el uso intensivo de los antibióticos no sólo en la clínica si no en otras actividades humanas ha acelerado aún más este proceso (Palumbi 2001; Julian Davies 1994; Hiroshi Nikaido 2009; Aminov 2009; Martinez 2009a; R Cantón 2009; Martínez 2008; Taubes 2008). Así, se ha acelerado la emergencia en la clínica de los genes de resistencia preexistentes en el metagenoma ambiental (Julian Davies 1994).

5. Técnicas de silenciamiento en bacterias.

Los antibióticos conocidos son producto de búsqueda de compuestos en microorganismos, en muchos casos del suelo. De hecho la gran mayoría de los antibióticos conocidos proviene de bacterias del género *Streptomyces*. Visto el problema de la emergencia de resistencias a antibióticos se han generado diferentes alternativas para paliarlo. (Falconer & E. D. Brown 2009; Fischbach & C. T. Walsh 2009). Por ejemplo, actualmente, se están realizando esfuerzos para identificar nuevos mecanismos de acción antimicrobiana. Para ello, se está explorando la existencia de nuevos genes esenciales en los genomas microbianos secuenciados (Falconer & E. D. Brown 2009; Fischbach & C. T. Walsh 2009). Sustancias que los inhiban o los silencien serían buenos candidatos para desarrollar nuevas terapias antimicrobianas. Un nuevo concepto es el análisis de nuevos fenotipos que permitan evitar infecciones sin inhibir a los microorganismos. Por ejemplo, la inhibición de genes de virulencia es interesante porque ya existen numerosos blancos identificados. Por otro lado, al inhibir estos genes, la microbiota endógena no se vería afectada. Como ventaja adicional, la menor presión de selección generaría menos resistencia a estos agentes farmacológicos (Clatworthy et al. 2007; Cegelski et al. 2008). Se pretende el desarrollo de moléculas a medida de estos nuevos blancos o bien el rastreo de productos naturales que inhiban la actividad de cada uno de estos nuevos blancos.

El diseño racional de drogas permitiría un descubrimiento más veloz de sustancias inhibitoras de estos nuevos blancos. Más aún teniendo en cuenta que el screening de sustancias en bibliotecas artificiales o naturales es costoso y lento. En este sentido, una

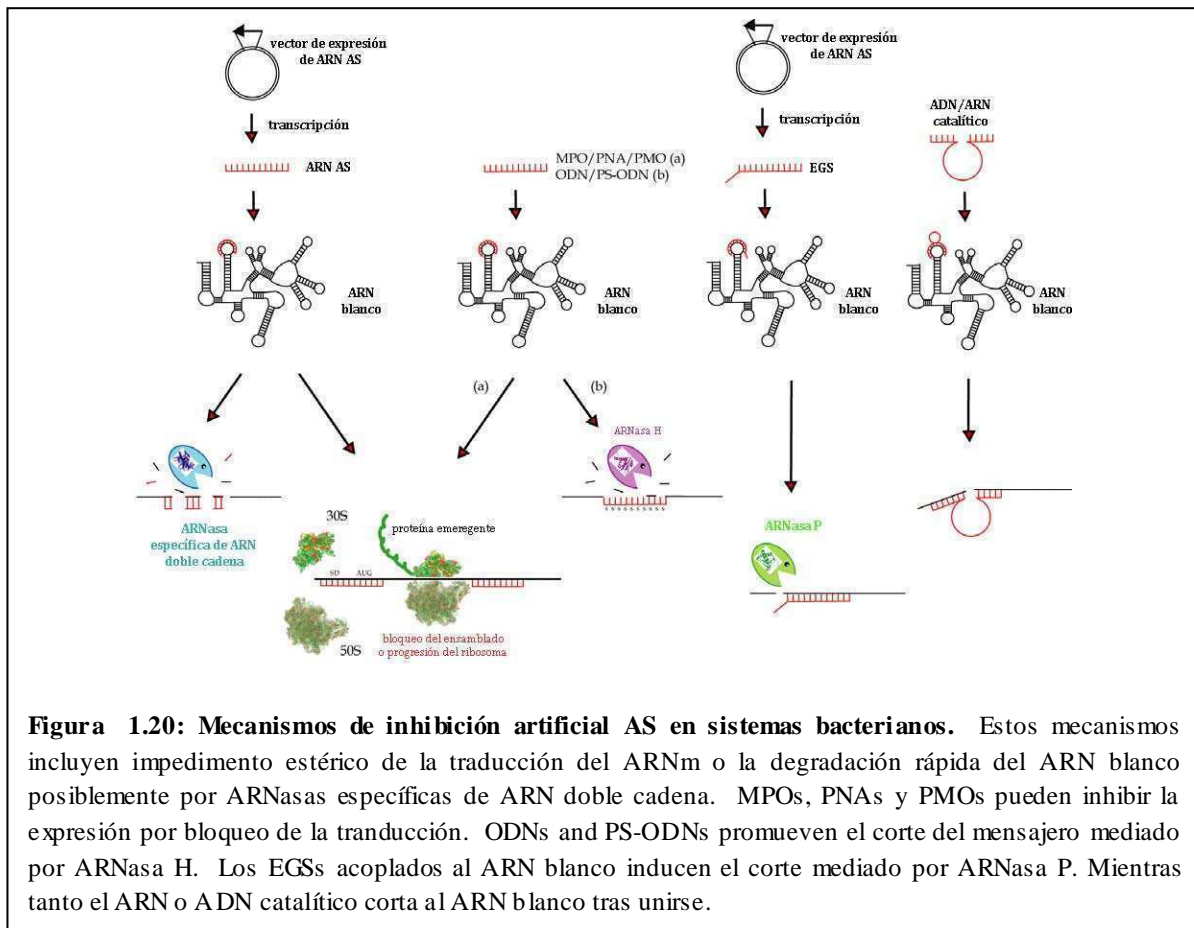


Figura 1.20: Mecanismos de inhibición artificial AS en sistemas bacterianos. Estos mecanismos incluyen impedimento estérico de la traducción del ARNm o la degradación rápida del ARN blanco posiblemente por ARNasas específicas de ARN doble cadena. MPOs, PNAs y PMOs pueden inhibir la expresión por bloqueo de la traducción. ODNs and PS-ODNs promueven el corte del mensajero mediado por ARNasa H. Los EGSs acoplados al ARN blanco inducen el corte mediado por ARNasa P. Mientras tanto el ARN o ADN catalítico corta al ARN blanco tras unirse.

alternativa atractiva son las técnicas antisentido (AS) que permiten un diseño racional relativamente sencillo. Este tipo de técnicas han sido empleadas con éxito en sistemas eucariotas. En particular la técnica mediada por el complejo enzimático RISC, ARNi, ha permitido la regulación de genes de manera eficiente (Hebert et al. 2008). Sin embargo, no todos los sistemas biológicos poseen esta maquinaria celular. Incluso ciertos organismos eucariotas, como *Trypanosoma cruzi*, carecen de él. Es el caso de los sistemas bacterianos, muy distanciados filogenéticamente. Por este motivo, el desarrollo de técnicas AS en bacterias ha sido menos explorado (Hebert et al. 2008). Sin embargo, la regulación AS parece ser un mecanismo de regulación génica natural ampliamente extendido en bacterias (Selinger et al. 2000; Sharma et al. 2010; L Good 2003). Existen varias estrategias AS basadas esencialmente en la degradación de mensajeros específicos o bien en el impedimento estérico de la traducción (Rasmussen et al. 2007) que se detallan en la Figura 1.20. Estas metodologías se han desarrollado en procura de nuevos antibióticos (al silenciar genes

vitales), para el control de la producción de metabolitos de interés industrial (al controlar la expresión de vías metabólicas), o incluso para silenciar la resistencia a antibióticos a fin de extender la vida útil de los antimicrobianos existentes (Hebert et al. 2008; Rasmussen et al. 2007; Woodford & Wareham 2009).

a. Estructura del blanco.

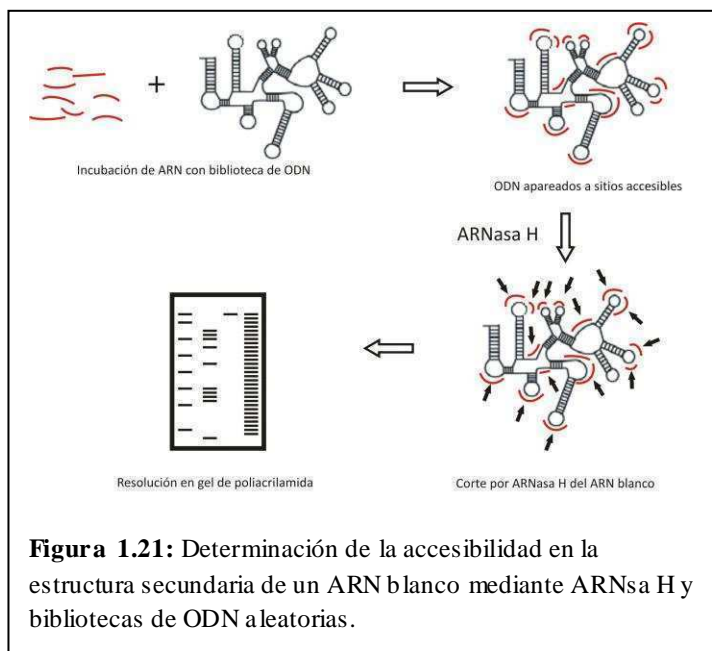


Figura 1.21: Determinación de la accesibilidad en la estructura secundaria de un ARN blanco mediante ARNasa H y bibliotecas de ODN aleatorias.

Todas estas metodologías deben enfrentar una dificultad adicional inherente al ARN: la presencia de estructura secundaria y terciaria. Esta propiedad genera que el ARN posea regiones que son accesibles a la interacción con secuencias complementarias y otras que no lo son. De este modo resulta importante conocer la estructura secundaria y terciaria del ARN blanco de modo tal de poder

evaluar la accesibilidad de las diferentes regiones. En la práctica se sabe que sólo una de cada ocho moléculas AS diseñadas es capaz de unirse al blanco in vivo (Kurreck 2003). Una aproximación rápida, aunque no siempre precisa, es la simulación computacional in silico de la estructura secundaria de la molécula mediante la minimización de energía libre con programas como el M-fold (Zuker 2003) o bien mediante programas como el S-fold que infieren estadísticamente la estructura (Shapiro et al. 2007; Y. Ding 2006). Si bien es más tedioso, el análisis bioquímico in vitro de las regiones accesibles resulta más preciso. Un ejemplo es el empleo de bibliotecas aleatorias o semialeatorias de oligodeoxinucleótidos (ODN) junto con la ARNasa H (Figura 1.21). Esta enzima reconoce las interacciones ARN-ADN cortando la molécula de ARN. De este modo, la incubación de un ARN blanco, junto a la biblioteca de ODNs y la enzima genera cortes en los sitios accesibles del mensajero. Las regiones accesibles a oligos AS pueden evidenciarse electroforéticamente por extensión de primer (Lima et al. 1997) o bien por simple electroforesis si la molécula blanco se marca previamente (Ho, Britton, Stone, Behrens, Leffet, Hobbs, J. A. Miller & Trainor 1996a). Un procedimiento similar empleando ARNasa P ha sido empleado para predecir la accesibilidad de EGSs (Eirik W Lundblad et al. 2008). Por otro lado, estas metodologías también presentan

ciertas limitaciones ya que las condiciones existentes en el citoplasma celular pueden ser muy diferentes a las empleadas *in vitro* para estas reacciones. En sistemas eucariotas se han realizado determinaciones de la estructura *in vivo* sin embargo no se ha informado de este tipo de estudios en sistemas bacterianos (Rasmussen et al. 2007).

b. Metodologías de silenciamiento en sistemas bacterianos.

Como ya se ha dicho, estas metodologías en general procuran una aceleración en la degradación del mensajero o bien la interferencia de la traducción. La figura 1.20 resume las existentes a la fecha.

Una metodología es la simple expresión de un ARN AS del gen a silenciar. Para ello se puede clonar todo o una parte del gen blanco en un vector de expresión fuerte. El mecanismo más frecuente de acción en el caso de moléculas AS largas sería la degradación por ARNasa que reconocen ARN en doble cadena. Sin embargo este mecanismo se ha empleado más que nada para el estudio de la expresión génica (Rasmussen et al. 2007). Moléculas AS de pequeño tamaño han mostrado una mayor efectividad. A su vez la cercanía al extremo 5' mejora la actividad siendo particularmente efectivas aquellas superpuestas al codón de iniciación de la traducción AUG y/o la secuencia Shine-Dalgarno. El mecanismo de acción en este caso es el impedimento estérico del ensamblado o de la actividad ribosomal. Otros sitios del mensajero serían menos efectivos por la alta procesividad y la actividad helicasa presente en el ribosoma (L Good 2003; Rasmussen et al. 2007).

Pero el ARN, en particular el de pequeño tamaño, tiene una vida media muy corta dentro de la célula bacteriana debido a las nucleasas citoplasmáticas. Para conferir estabilidad a estas moléculas, se emplean ARNs pequeños protegidos en el extremo 3' mediante un apareamiento interno (Nakashima et al. 2006) u oligómeros AS de análogos no hidrolizables de ácidos nucleicos (Goh et al. 2009; Rasmussen et al. 2007; Kurreck 2003). Para este último, caso se han empleado con éxito diversos tipos de análogos de ácidos nucleicos. El acoplamiento de péptidos permeabilizantes a oligómeros de análogos de ácidos nucleicos como ácidos nucleicos peptídicos (PNAS) o oligonucleótidos de fosfoamidatos de morfolinos (PMOS) ha sido exitoso para aumentar la permeabilidad del compuesto y al mismo tiempo en evadir las nucleasas bacterianas. Esta estrategia fue capaz de silenciar genes en cultivos *in vitro* e incluso en modelos animales (B. L. Geller 2005; L. D. Tilley et al. 2007).

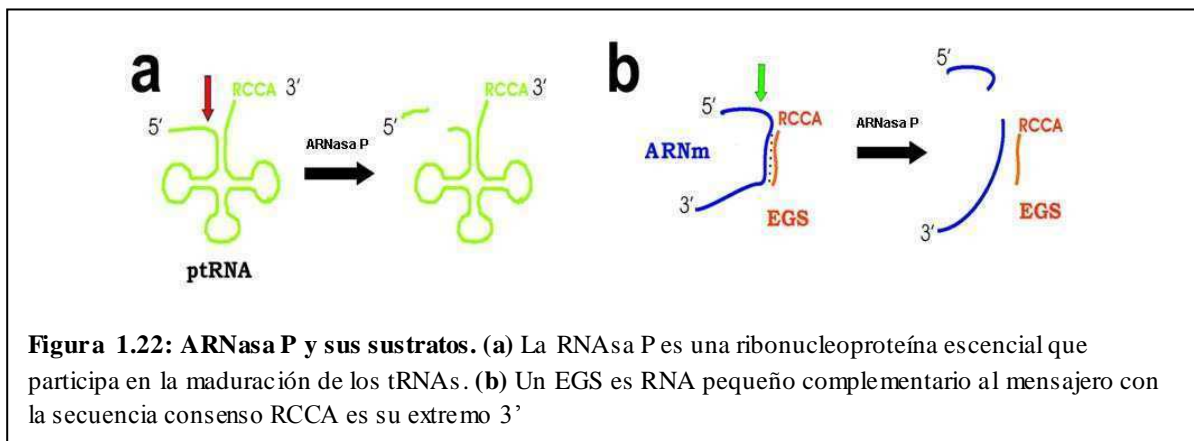
Otra técnica de silenciamiento se basa en la ARNasa H, una enzima involucrada en la replicación, la transcripción y la reparación del ADN en bacterias (Tadokoro & Kanaya 2009). Como ya se dijo antes, esta enzima es capaz de reconocer apareamientos ARN-ADN y cortar el ARN. Esta propiedad se ha empleado para silenciar diversos genes mediante ODN en sistemas eucariotas y bacterianos (Kurreck 2003), entre ellos *aac(6')-Ib*, el gen de resistencia a Ak (R Sarno et al. 2003). Dado que estos compuestos también pueden ser degradados por nucleasas bacterianas, esta estrategia se ha reforzado también con el uso de análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables (D G White et al. 1997; Kurreck 2003; Kurreck et al. 2002; Rasmussen et al. 2007). Sin embargo en el caso de los sistemas bacterianos, los experimentos in vivo son difíciles de efectuar dado que no se pueden expresar las moléculas en el citoplasma. Deben por lo tanto ser introducidas en el citoplasma mediante electroporación o shock térmico (D G White et al. 1997; R Sarno et al. 2003).

Las ribozimas cabeza de martillo son secuencias de ARN con capacidad de autoclivarse descubiertas originalmente en virioides patógenos de plantas (Symons 1989). Sin embargo, su uso como para degradar mensajeros específicos en trans ha sido limitado en bacterias, muy probablemente debido a que la traducción co-transcripcional limita la capacidad de estas moléculas de llegar al sitio blanco y procesarlo a tiempo (Rasmussen et al. 2007). Sin embargo, el silenciamiento de la expresión del gen *cat* que confiere resistencia a cloranfenicol, pudo ser conseguido por este medio en una mutante de traducción lenta (H. Chen et al. 1997). La obtención y caracterización de una ADNzima simple cadena capaz de degradar ARN en trans fue importante para evitar la degradación de la ribozima y prolongar la actividad (Zaborowska et al. 2005; Joyce 2001; Santoro & Joyce 1997). El desarrollo de un método de producción citoplasmática de ADN simple cadena en *E.coli* permitió el silenciamiento in vivo del gen vital *ftsZ* empleando una ADNzima específica (X.-X. Tan et al. 2004). Sin embargo esta tecnología no se ha desarrollado más profundamente por ejemplo con el empleo de análogos no hidrolizables.

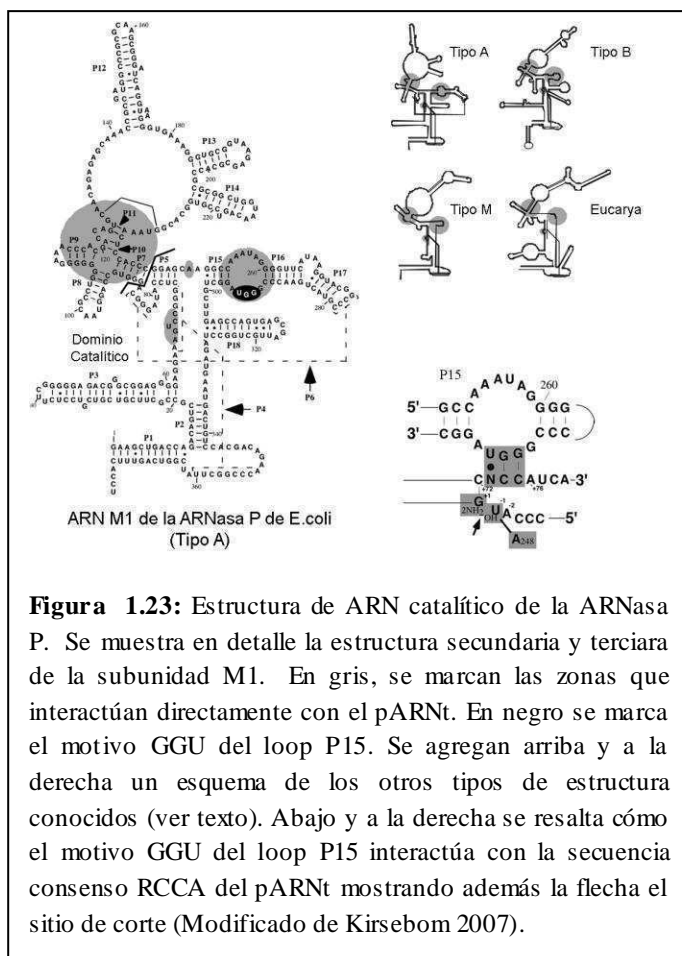
La ARNasa P bacteriana también puede ser empleada en tecnologías AS y ha recibido particular atención en los últimos años, por eso, la desarrollaremos en una sección aparte.

c. Tecnología de silenciamiento génico basada en ARNsa P: uso de EGS.

La ARNasa P es, junto con el ribosoma, la única ribonucleoproteína universal. La ARNasa P está conservada y es esencial en todos los organismos de los tres dominios de la vida (Marvin & Engelke 2009; Sun & Caetano-Anollés 2010; Kazantsev & Pace 2006) con la excepción de una arquea (Randau et al. 2008; Sidney Altman 2007). La ARNasa P es vital ya que se encarga de la maduración de los ARNts por un corte en el extremo 5' del ARNt inmaduro (Figura 1.22a). La ARNasa P fue el primer ARN con actividad catalítica identificado, lo que le valió a su descubridor Sidney Altman el premio Nobel en química en el año 1989 (compartido con Thomas Cech por el descubrimiento de los intrones autocatalíticos). Esta



ribozima está compuesta de su ARN catalítico y de por lo menos un cofactor proteico. En el Dominio Bacteria, está formada por un único cofactor proteico, mientras que en Arquea están formadas por al menos cuatro cofactores proteicos y en Eucariotas se identificaron hasta nueve (Sun & Caetano-Anollés 2010). En el caso de las bacterias, el ARN por sí sólo es capaz de catalizar la reacción de maduración del tRNA in vitro. Sin embargo, in vivo, la célula no es viable sin el cofactor proteico. La ARNasa P de *E.coli* está compuesta por dos subunidades: el ARN M1 de 377 nts y la proteína C5 de 155 aminoácidos. El ARN M1 de los distintos organismos se clasifica por su estructura secundaria y terciaria en cuatro tipos (Figura 1.23): el tipo A (*E. coli*), el tipo B (*Bacillus subtilis*), el tipo M que es el más conservado en Arqueas y el tipo eucariota (L. a Kirsebom 2007). El ARN M1 de la mayoría de las de arqueas y de los organismos eucariotas, tiene mucho menor actividad in vitro que el bacteriano. Sólo en condiciones muy especiales se puede generar la reacción sin emplear los cofactores proteicos (Evans et al. 2006; Kazantsev & Pace 2006). Esto se debería a la ausencia del motivo GGU en el loop P15 (Figura 1.23). Además está en discusión si en las organelas de eucariotas la actividad ARNasa P es catalizada por una proteína (L. B. Lai et al. 2010; Sidney Altman 2007).



En bacterias, la ARNasa P reconoce su sustrato debido a que los ARNts precursores poseen una particularidad estructural: un ARN de doble cadena seguido de una parte de la molécula como simple cadena (Figura 1.22a). El sitio de corte es identificado mediante el dúplex ARN-ARN seguido de la secuencia consenso RCCA que interacciona directamente con el motivo GGU del loop P15 de M1 (Figura 1.23) (L. a Kirsebom 2007). Históricamente, se ha llamado EGS (por External Guide Sequence) a la secuencia adyacente al consenso RCCA en el pARNt que forma el dúplex ARN-ARN. Experimentos que buscaban conocer qué parte del

ARNt es esencial en la actividad de la ribozima han demostrado que la mayor parte de la molécula precursora puede eliminarse sin que se pierda el corte mediado por ARNasa P. Además, se probó que, si bien la secuencia EGS es fundamental para la actividad catalítica, no necesita ser parte de la misma molécula de ARN que es degradada por la ribozima. Se ha determinado también que cualquier molécula de ARN puede ser sustrato de la enzima, mientras forme un dúplex ARN-ARN y que conforme la estructura secundaria adecuada (Gopalan et al. 2002). Es decir que si se genera una molécula complementaria a un ARN mensajero con la secuencia RCCA en su extremo 3', se puede generar el corte del ARNm mediado por ARNasa P (Figura 1.22b).

Varios EGS artificiales fueron usados para regular la expresión génica. Se ha empleado esta técnica para regular la expresión de genes constitutivos (Guerrier-takada et al. 1995), vitales (J. McKinney et al. 2001), de patogenicidad (J. S. McKinney et al. 2004) y genes de fagos (Y. Li & S Altman 1996). En particular, la inhibición de genes de resistencia a antibióticos por digestión con ARNasa P puede ser una estrategia viable para prolongar la efectividad de los antibióticos (Guerrier-Takada et al. 1997; Gao et al. 2005). Sin embargo, en todos los

experimentos realizados al momento de esta Tesis, los EGSs fueron expresados en las células hospedadoras. Existen muy pocos estudios con análogos de nucleótidos resistentes a nucleasas y su suministro exógeno. Estos pocos trabajos se llevaron a cabo en sistemas eucariotas (Ma et al. 2000).

CAPITULO 2

Antecedentes y Objetivos

CAPITULO 2:

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El objetivo global de esta Tesis es dilucidar diferentes aspectos de la resistencia a Ak, como los mecanismos de dispersión del gen *aac(6')-Ib* y generar estrategias que permitan prolongar su uso pese al creciente número de cepas resistentes. Se diseñó un proyecto cuyo objetivo a largo plazo es el desarrollo de moléculas antisentido como herramientas farmacológicas que permitan inhibir selectivamente la expresión del gen *aac(6')-Ib*. Paralelamente, como objetivo adicional de la tesis, se extendieron y profundizaron estudios previos sobre el contexto genético del gen *aac(6')-Ib*, su dispersión y transferencia horizontal.

1. Dispersión de *aac(6')-Ib*

Los mecanismos de resistencia a antibióticos y su propagación entre bacterias patógenas constituyen temas de máxima relevancia clínica así como también un problema epidemiológico. La resistencia a los antimicrobianos se da por genes que codifican proteínas que pueden inhibir la acción de los antibióticos de distintas maneras. La codificación de estos genes en vectores fácilmente transferibles como los plásmidos facilita su dispersión entre distintas bacterias patógenas del hombre. Los aminoglucosidos (Ags) son un grupo de antibióticos que actúan interfiriendo en el proceso de la síntesis de proteínas en bacterias. La amikacina (Ak) es un Ag semisintético refractario a gran parte de las enzimas inactivantes y se emplea en el tratamiento de diversas infecciones. En los últimos años, la resistencia a Ak ha aumentado dramáticamente por la propagación de genes de resistencia como *aac(6')-Ib*. Este gen está presente en más del 70% de las bacterias Gram negativas que muestran resistencia al antibiótico (Vakulenko & Mobashery 2003). La propagación de los genes de resistencia en general y de *aac(6')-Ib* en particular constituyen un riesgo sanitario ya que inutiliza las escasas opciones de tratamiento existentes. El aumento de la resistencia a Ak se debe a la frecuente transferencia horizontal de *aac(6')-Ib* asociada a plásmidos conjugativos, transposones e integrones que promueven su dispersión a nivel molecular y celular.

a) Integrón InV117:

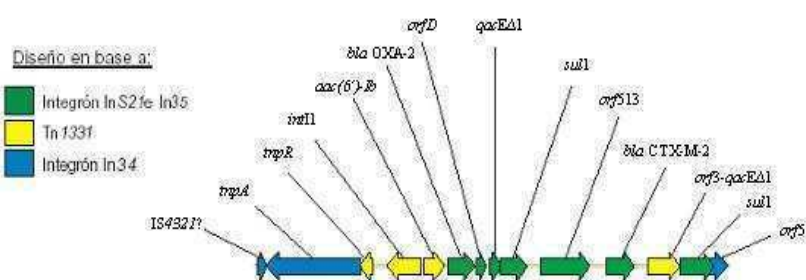


Figura 2. 1: Mapa genético el integrón InV117 al inicio de esta tesis.

Durante la epidemia de cólera en Argentina entre 1992 y 1998 el laboratorio del Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas- ANLIS “Carlos G. Malbrán” analizó 1947 aislamientos clínicos de *Vibrio cholerae*, la bacteria que causa esta enfermedad. De estas cepas, 26 fueron resistentes a cefalosporinas de espectro extendido y a Ak. El análisis de una de ellas mostró que los determinantes de estas resistencias estaban presentes en un megaplásmido conjugativo (A Petroni et al. 2002). Se secuenciaron 14 Kpb del plásmido lo que condujo a la identificación de los determinantes de resistencia a antibióticos. Se identificó un integrón tipo 1 inusual relacionado a InS21, In35 e In116 que incluía: a) un copia de una variante de la *aac(6')-Ib* que podía codificar potencialmente para una proteína que incluía una repetición de 20 aminoácidos en el N-terminal; b) una copia de *bla_{OXA-2}* que a diferencia de InS21 no se encuentra como pseudogen y c) una copia de *bla_{CTX-M-2}* (Figura 2. 1). Estas observaciones mostraron que el megaplásmido pAS1 de *V. cholerae*, conjugativo y capaz de replicar en *E. coli*, incluye un elemento genético dinámico que aloja a los genes *aac(6')-Ib* y *bla_{CTX-M-2}* clínicamente relevantes. Nos interesó determinar si esta estructura puede potencialmente dispersarse a nivel molecular por transposición. Si bien se identificaron genes *tnpA*, *tnpR* y un sitio res idénticos a los de Tn1696, las repeticiones invertidas en los extremos no pudieron ser detectadas. La presencia de otros posibles elementos móviles asociados normalmente a integrones, como el operón de resistencia a mercurio, tampoco fue evaluada. Además nos resultó de interés determinar cuál es la secuencia del N-terminal de AAC(6')-Ib ya que el gen codificante generalmente es el primer cassette en integrones. Por lo tanto, los objetivos de esta parte del trabajo fueron:

- Determinar la secuencia de uno o ambos extremos del posible transposón en el que estaría incluido el integrón. Completar la secuenciación de regiones internas.
- Definir el extremo aminoterminal de la AAC(6')-Ib codificada en el integrón.

- **Descartar posibles rearrreglos genéticos en la E.coli transconjugante respecto de la cepa original de V.cholerae.**
- **Inferir si el integrón se pudo haber dispersado a nivel molecular o por convergencia evolutiva**

Esta parte de la Tesis se realizó en colaboración con Fernando Ariel Martín y Alejandro Petroni.

b) Transposón Tn1331.2:

Los transposones Tn1331 y su variante con los genes de resistencia duplicados Tn1331.2, fueron identificados en brotes de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a Ak de diferentes regiones del país (R. M. Chamorro et al. 1990). El plásmido pMET1, de 48 Kpb, estaba albergado en *Klebsiella pneumoniae* FC1, una cepa resistente a Ak. Esta cepa fue aislada en una unidad pediátrica del Hospital Luis C. Lagomaggiore en Mendoza, donde causó la muerte de varios neonatos (M E Tolmasky et al. 1988). Algunos años antes se había caracterizado *Klebsiella pneumoniae* JHCK1 a partir de un brote en el Hospital de Niños de Buenos Aires. Esta cepa contenía varios plásmidos. Uno de ellos pJHCMW1, de 11 Kpb, confería resistencia a Ak y fue donde se caracterizó inicialmente al gen *aac(6')-Ib* y a Tn1331 (Wolj et al. 1986; M E Tolmasky et al. 1986; M E Tolmasky & J. H. Crosa 1987; Nobuta et al. 1988; Marcelo E Tolmasky et al. 1988). Dado que ambas cepas eran resistentes a Ak, se compararon ambos plásmidos encontrándose que mientras que la zona de replicación era diferente, el determinante de resistencias, Tn1331, era muy similar: en el caso de pMET1 había una duplicación en tándem que generaba de 3 Kpb extra. Por lo tanto se lo llamó Tn1331.2 (M E Tolmasky et al. 1988). Sin embargo, el resto de la secuencia del plásmido no estaba disponible. Años después, el laboratorio de Marcelo Tolmasky inició un proyecto de secuenciación del resto del plásmido por corte y subclonando de diferentes fragmentos de pMET1 en los vectores de clonado pUC18, pCR1 (Invitrogen) y pSMART (Lucigen). El objetivo de esta sección de la tesis fue:

- **Identificar los elementos de propagación de los genes de resistencia a antibióticos a nivel celular de Tn1331.2 y otras funciones albergadas por pMET1 (42 kb)**

Esta parte de la Tesis se realizó en colaboración con Manisha Danekar y Luis Actis.

2. Silenciamiento de *aac(6')-Ib* mediante técnicas antisentido.

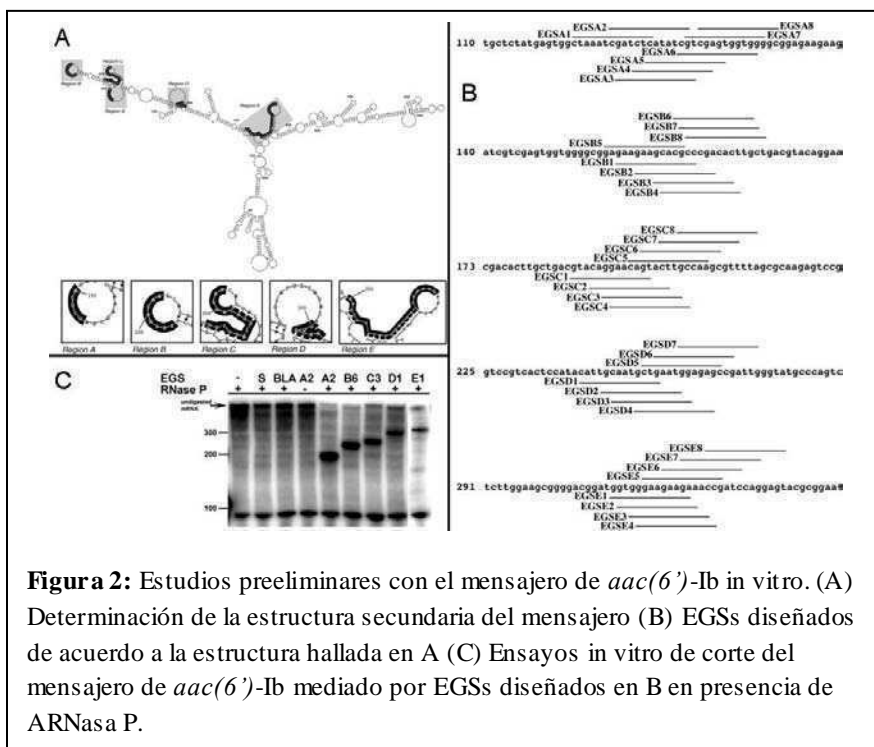
Como se mencionó anteriormente, la propagación del gen *aac(6')-Ib* genera gran preocupación en el ámbito clínico debido al alarmante crecimiento de la frecuencia de aparición de cepas resistentes a Ak. Esto condujo no solo a esfuerzos para entender cómo se propaga el gen *aac(6')-Ib* sino también a intentar desarrollar técnicas de silenciamiento del gen. Previamente a esta tesis, en el laboratorio de Marcelo Tolmasky se desarrollaron oligodeoxinucleótidos (ODNs), que al ser administrados a bacterias resistentes a Ak, las sensibilicen al antibiótico. Dichos ODNs fueron diseñados para dirigir la digestión del ARNm de *aac(6')-Ib* mediante un mecanismo en el que interviene la ARNasa H. Un primer paso fue la caracterización de la estructura secundaria del mensajero. Se realizó un mapeo

bioquímico del ARNm, en el que se incubó una biblioteca de ODNs al azar con el mensajero de *aac(6')*-Ib marcado radiactivamente en su extremo 5' y ARNasa H que reconoce dímeros ARN::ADN, de manera similar a la que se había descrito previamente (Ho et al 1996b). Adicionalmente también se realizó un modelado de la estructura secundaria del mensajero mediante el programa Mfold Web Server (Zuker 2003). A partir de estos estudios se determinó que existen 5 regiones del mensajero de *aac(6')*-Ib simple cadena accesibles para interactuar con una molécula antisentido (Sarno et al. 2003). Estas zonas fueron identificadas sucesivamente con las letras A a la E. Con esta información, se diseñaron varios ODNs antisentido y sus respectivos controles antiparalelos para cada una de estas cinco regiones. Algunos de estos ODNs fueron capaces de cortar al mensajero in vitro en presencia de ARNasa H. Además un subconjunto de ellos mostró ser capaz de inhibir in vivo la expresión de *aac(6')*-Ib al electroporar E. coli con un plásmido que llevaba al gen de resistencia a Ak (Sarno et al. 2003).

Paralelamente se comenzó a evaluar como alternativa el silenciamiento del gen a través de una estrategia basada en la digestión del mensajero mediada por ARNasa P. Esta estrategia requirió la purificación de la ribozima y su cofactor. Se diseñaron de 7-8 EGSs por cada una de las regiones simple cadena del mensajero de acuerdo al mapeo realizado previamente. Se ensayó la capacidad de dichos EGSs de inducir el corte mediado por ARNasa P in vitro y de

unirse al ARNm de *aac(6')*-Ib. Los resultados obtenidos en estos ensayos nos indicaban que algunos de estos EGSs fueron capaces de unirse al mensajero y mediar su corte in vitro.

Tanto los ODN como los EGS ácidos nucleicos de pequeño tamaño son probablemente



hidrolizados por las nucleasas presentes en el medio. Por lo tanto, es necesario generar moléculas resistentes a las nucleasas bacterianas y al suero humano. La mayoría de los análogos de nucleótidos resistentes a nucleasas desarrollados hasta el momento lleva bases nitrogenadas artificiales, azúcares modificados o diferencias en el esqueleto de fosfatos. La primera generación de análogos son los fosforotioatos de oligodeoxinucleótidos que son compuestos en los que se reemplaza a uno de los oxígenos del enlace fosfodiéster por un átomo de azufre (Kurreck 2003). Estos son los compuestos mejor conocidos y más usados debido a que son muy estables en los fluidos corporales, forman pares Watson y Crick y pueden activar el corte por ARNasa H (Kurreck 2003). No existe mucha información sobre oligonucleótidos resistentes a nucleasas que medien la degradación de ARN por ARNasa P y se limita a ARNasa P eucariótica (Ma et al. 2000). Sin embargo, como los requerimientos estructurales de una EGS para la ARNasa P eucariótica son diferentes a los de la ARNasa P bacteriana, los resultados mencionados no podían ser extrapolados en el uso de EGSs en sistemas procarióticos. De esta manera los objetivos específicos de esta sección de la tesis eran:

- **Verificar que la expresión citoplasmática de los EGS capaces de degradar el mensajero de *aac(6')*-Ib in vitro es capaz de interferir con la resistencia a amikacina in vivo. En caso de éxito verificar que el mecanismo es mediado por ARNasa P.**
- **Diseñar en base a los resultados del punto anterior, diversos EGSs de análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables.**
- **Determinar si existen alguno de los EGSs de análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables por nucleasas es capaz de cortar el ARNm de *aac(6')*-Ib in vitro.**
- **Investigar si alguno de los EGS diseñados in vitro podía silenciar exitosamente el gen in vivo. En caso de lograrlo determinar si el mecanismo in vivo depende de la actividad de la ARNasa P.**

CAPITULO 3

Resultados y Conclusiones

CAPITULO 3:

Dispersión del gen *aac(6')-Ib*

RESULTADOS & CONCLUSIONES

1. Integrón InV117:

Como se explicó anteriormente, *aac(6')-Ib* se halló en los transposones Tn1331 y Tn1331.2 (M E Tolmasky 2000) así como en los integrones InS21, In35 e In116 (S. M. Arduino et al. 2002; J. Di Conza et al. 2002; Power et al. 2005) en aislamientos de nuestro país. Los tres integrones poseen el mismo arreglo de genes de resistencia dentro de sus partes variables entre el 5'CS y el 3'CS y entre el 3'CS y el 3'CS2 del integrón complejo. Sin embargo, no existía información respecto a posibles elementos genéticos que facilitaran su dispersión a nivel molecular. InV117, incluido en el plásmido conjugativo pAS1 de unos 150 Kpb, poseía el mismo arreglo de casetes de genes de resistencia a antimicrobianos. Dicho plásmido fue transferido exitosamente por conjugación desde su hospedador original *V.cholerae* M1516 a *E.coli* donde se mantuvo en forma estable. Resultados preliminares (A. J. Soler Bistué 2005), sugerían una asociación física entre InV117 y genes de transposición. Dicha asociación era similar a la del integrón In34 alojado en el plásmido pRMH760, donde los genes de la transposasa y recombinasa del transposón replicativo Tn1696 se encuentran río arriba del integrón In34 (Sr Partridge & Rm Hall 2004). Se intentó determinar los extremos 5' y 3' de este posible transposón.

a. Determinación de los extremos del posible transposón asociado a InV117:

Al analizar los genes *tnpA* y *tnpR* adyacentes a InV117 mediante BLASTx, se determinó que la secuencia de la base de datos con mayor similitud correspondía a *tnpA*₁₆₉₆ y *tnpR*₁₆₉₆, los genes homónimos del plásmido pRMH760 identificado en un aislamiento australiano de *Klebsiella pneumoniae* (Partridge & Hall 2003; Partridge et al. 2001; Partridge & Hall 2004). Por lo tanto, se diseñaron cebadores de acuerdo a la secuencia disponible del plásmido pRMH760. Las reacciones de PCR generaron productos de acuerdo al tamaño esperado para una estructura genética similar a pRMH760. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados (Tabla 3.1). Al igual que en pRMH760, río arriba de InV117 se encontró codificada la transposasa de Tn1696. Su repetición invertida (RI) estaba interrumpida por un transposón de

la subfamilia IS1111 y de la familia del IS110 (Mahillon & M Chandler 1998; Rm Hall & Sr Partridge 2003): IS4321.

Tabla 3.1 : amplicones diseñados para resolver la secuencia del extremo 5' de InV117			
Región amplificada	Fragmento esperado (pb)	Producto obtenido (Kpb)	Cebadores empleados
IS4321 – <i>tnpA</i> ₁₆₉₆	1148	1,1	ShotIn34_In5 - ShotIn34_out3
IS4321 – <i>tnpA</i> ₁₆₉₆	984	1	ISL_2R – ISL_2F
IS4321 – <i>tnpA</i> ₁₆₉₆	1403	1,4	ISL_2R – ISL_3F
IS4321 – <i>tnpA</i> ₁₆₉₆	918	0,9	ISL_3R – ISL_4F
IS4321	1670	1,7	ISL_2R – ISL_4F

A continuación, se intentó determinar la secuencia a la derecha del integrón para determinar el extremo del posible transposón. Los ejemplos más parecidos a InV117 en la bibliografía sugerían que el integrón podía encontrarse en un contexto similar al In4 o bien similar al de los integrones In5 e In2 que están incluidos en Tn21 (Partridge et al. 2002; Partridge & Hall 2003; Partridge et al. 2001 y ver Figura 3.1). Por lo tanto, se diseñaron cebadores complementarios a zonas río abajo del integrón In5 e In2 de Tn21 (IS1326, IS1353, los genes *tni* y el operón *mer*) o bien a zonas complementarias a IS6100/Δ como en el caso de In4 (Partridge et al. 2002; Partridge & Hall 2003; Partridge et al. 2001; Partridge & Hall 2004; Cantón et al. 2006). Se exploraron estas posibilidades en el extremo derecho mediante cartografía por PCR de acuerdo a la Figura 3.1, empleando los cebadores indicados en la Tabla 3.2. Al menos en las condiciones experimentales ensayadas, no se observó la formación de producto de amplificación del tamaño esperado en ninguna de las reacciones realizadas para determinar el extremo derecho del transposón.

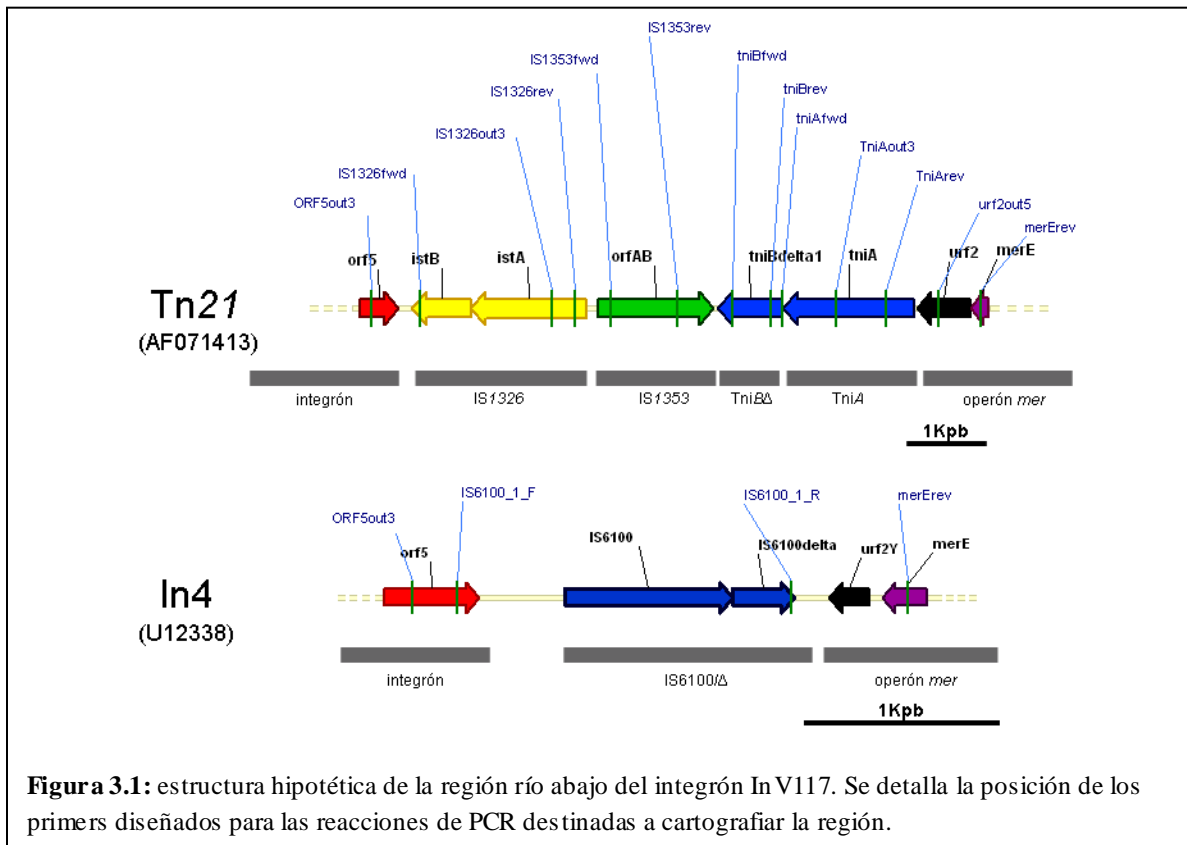
Tabla 3.2 : amplicones diseñados para resolver la secuencia del extremo 3' de InV117			
Región amplificada	Fragmento esperado (Kpb)	Producto obtenido (Kpb)	Cebadores empleados
<i>orf5</i> _{InV117} - IS1326	2,7	-	Orf5out3' – IS1326revb
IS1326	1,7	-	IS1326out3 – IS1326rev
IS1326 – <i>tniB</i>	2,9	-	IS1326out3 – TniBrev

<i>tniB</i> – Tn4352	2,9	-	TniBFwd – Tn4352Brev
Tn4352 – <i>tniA</i>	2,3	-	Tn4352B – TniArev
<i>tniA</i> – <i>urf2</i>	1,35	-	TniAout3 – <i>urf2</i> out5
<i>tniA</i> – <i>merE</i>	1,8	-	TniAout3 – MerERev
<i>tniB</i>	0,5	-	TniBfwd – TniRev
<i>orf5</i> _{Inv117} – <i>urf2</i>	10,4	-	Orf5out3' - <i>urf2</i> out5
<i>orf5</i> _{Inv117} - <i>merE</i>	10,9	-	Orf5out3' - MerERev
IS6100	1,7	0,3	IS6100f – IS6100r
<i>orf5</i> _{Inv117} – IS6100	3,5	0,6	Vins21rev - IS6100r

Casi simultáneamente a la obtención y publicación de estos resultados, Rafael Cantón y colaboradores publicaron un estudio complementario a este proyecto. Estos autores describieron al integrón In117 con un arreglo diferente de genes en la zona variable adyacente a la integrasa pero con una secuencia 100% idéntica al In35 a partir del 3'CS1 hasta el 3'CS2, que incluye a *bla*_{CTX-M-2}. En este caso In117 estuvo asociado a un elemento similar a Tn21 de manera análoga a la que planteamos pero no logramos hallar (Rafael Cantón et al. 2006). Esto sugeriría que río abajo del InV117 podría haber una estructura similar a la del Tn21 que no pudo ser hallada con nuestra metodología.

Antes de continuar el análisis de la secuencia, se analizó si el plásmido pAS1, donde se aloja InV117, no habría sufrido rearrreglos genéticos durante su pasaje desde *V.cholerae* M1516 a *E.coli* M3099. Con este fin, se realizó una cartografía por PCR empleando como molde extractos de ambas bacterias. Se realizaron cinco reacciones de PCR. Los pares de cebadores empleados fueron, ShotIn34 out3 – ShotIn34In5, ISL2R-ISL2F, InsB3-InsB5, InsB7 - InsB antisense y Ins B9 – InsA out3 (ver Capítulo 6). Los amplicones coincidieron con el tamaño esperado en ambos microorganismos, desechándose entonces la posibilidad de cambios.

Conclusiones: InV117 es un integrón que aloja los genes de resistencia a antibióticos clínicamente relevantes *aac(6')*-Ib y *bla*_{CTX-M-2} que está asociado a su izquierda a genes de transposición de Tn1696 e IS4321.

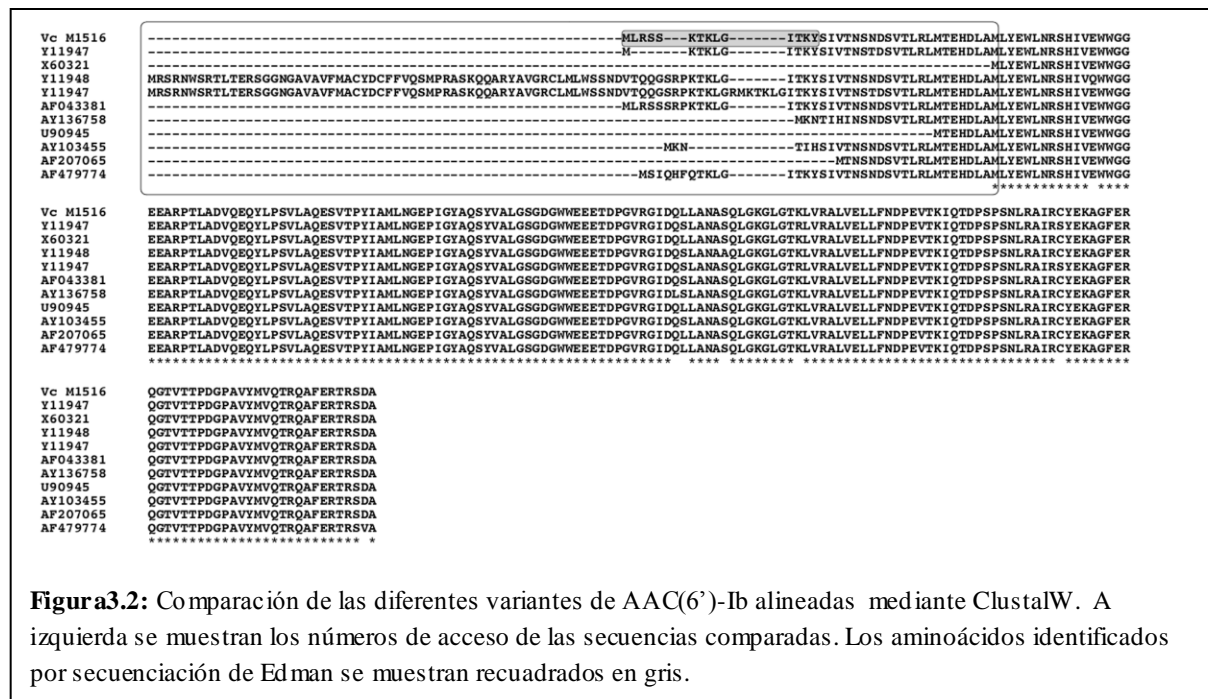


b. Análisis de la secuencia obtenida de InV117 y zonas circundantes.

Se obtuvieron 127 cromatogramas correspondientes a 64 secuencias nucleotídicas de la cadena 5' y 63 de la 3'. Con estas secuencias se ensambló una secuencia de 15,723 pb con una cobertura de 5X (78,479 bases leídas). Los datos obtenidos se depositaron en GeneBank, DQ310703. La secuencia completa permitió confirmar la presencia del gen que codifica para la β -lactamasa CTX-M-2 y una copia del gen *aac(6')*-Ib como casete de un integrón con su locus attC usual (M E Tolmasky 2000). El análisis de secuencia mostraba tres posibles sitios de inicio de la traducción para este gen. Para resolver esta ambigüedad se clonó el gen en el vector de expresión pT7-5, generándose el plásmido pFC77. Sin embargo, luego de la inducción con IPTG sólo se observaron bajos niveles de la proteína en extractos provenientes de cultivos en medio mínimo M9 o rico LB. Como otra alternativa, el gen fue clonado con su promotor natural en el vector pGEM-T-easy generándose así el plásmido pFC9. Experimentos de Western blot y ensayos de CIM de Ak mostraron que AAC(6')-Ib es producida en altos niveles desde su promotor, en células de E.coli DH5- α (pFC9). Luego de someter el extracto de proteínas a PAGE, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDFV) y el extremo N-terminal de la proteína correspondiente a AAC(6')-Ib fue determinado por microsecuenciación por el servicio de LANAIS-PRO. La

secuencia obtenida fue MLRSSKTKLGITKY diferente a otras variantes descritas (ver Figura 3.2). Las variantes de AAC(6')-Ib son por lejos las más prevalentes dentro de las AAC(6') tipo I en bacterias Gram negativas (Vakulenko & Mobashery 2003; M E Tolmasky 2000; Pourreza et al. 2005). La alta flexibilidad observada en el extremo N-terminal de la proteína podría ser un factor importante en esta predominancia clínica, dado que pone la actividad enzimática a resguardo de eventos de recombinación ilegítima que puedan ocurrir en eventos como la integración del casete.

El análisis de la secuencia nucleotídica en el entorno genético de bla_{CTX-M-2} y aac(6')-Ib mostró la presencia del integrón tipo 1 que aloja un ISCR1 (Toleman et al. 2006; T. R. Walsh 2006) InV117 muy relacionado a In35, InS21 e In116 (S. M. Arduino et al. 2002; J. Di Conza et al. 2002; Eckert et al. 2006; Power et al. 2005). El alineamiento de InV117 con las regiones secuenciadas de estos tres integrones mostró una identidad de 99.98%, 99.88% y 99.86% respectivamente, lo cual muestra un origen común muy cercano. Las pocas diferencias existentes se deben a mutaciones puntuales. Un diagrama detallado de la estructura del integrón, la superposición de los cuatro integrones y un gráfico de % G+C se muestran en la Figura 3.3. Dado que los cuatro integrones provienen de plásmidos de diferentes, estos resultados realzan la importancia de caracterizar las estructuras genéticas



responsables de su dispersión a nivel molecular como genes de transposición.

Como se vio antes, InV117 está asociado a un elemento genético potencialmente móvil ya que río arriba de la integrasa, se identificó un módulo que incluye genes de transposición que presenta una gran similitud con el *tnp1696*, una estructura genética adyacente al In34 del plásmido pRMH760 (Sr Partridge & Rm Hall 2004)(Figura 3.3). El módulo *tnp1696* incluye una copia de los genes *tnpA* y *tnpR* con su sitio de resolución y la inserción de IS4321 en la RI izquierda (Sr Partridge & Rm Hall 2004). Mientras que la identidad entre pAS1 y pRMH760 en el módulo *tnp1696* es del 100%, a la altura del IS4321 se detectaron varias diferencias. IS4321_{pAS1} y el módulo *tnp1696* muestran un % GC diferente, 48,6 y 60,6% respectivamente, lo cual sugiere un origen diferente de ambos elementos genéticos (Figura 3.3). Mientras que *tnpA*_{pAS1} y *tnpR*_{pAS1} son idénticos a *tnpA*_{pRMH760} y *tnpR*_{pRMH760}, la secuencia de IS4321_{pAS1} comparte mayor identidad con otra variante de IS4321: IS4321_{pHCM1} (J Parkhill et al. 2001). IS4321_{pAS1} presenta 100% identidad con IS4321_{pHCM1} y 97% con IS4321_{pRMH760} (Figura 3.3) (Sr Partridge & Rm Hall 2004; Rm Hall & Sr Partridge 2003; J Parkhill et al. 2001). Existen otros ejemplos en los que IS4321 se encuentra insertado en las repeticiones invertidas de transposones del tipo de Tn1696. Otros grupos describieron integrones en los que IS4321 e IS5075 (ambos miembros de la familia IS110) se insertan en las repeticiones invertidas terminales (RITs) de transposones pertenecientes a las familia Tn501/Tn21 (Partridge & Hall 2003). El transposón compuesto Tn4321 del plásmido R751 posee en sus extremos dos copias parecidas pero no idénticas de IS4321 (IS4321L e IS4321R) (Thorsted et al. 1998). IS4321_{pAS1} e IS4321_{pHCM1} comparten mayor similitud con IS4321R (99%) que con IS4321L (96%). Por su lado, IS4321_{pRMH760} presenta mayor identidad con IS4321L que con IS4321R. Es destacable que en la estructura del transposón de pAS1, la secuencia de las RITs de *tnp1696* se encuentra interrumpida por una copia de IS4321R, mientras que, en todos los casos descritos hasta el momento mostraron dentro de la RIT la inserción de IS4321L o IS4321R incompleto (Partridge & Hall 2003). A pesar de que la inserción de IS4321, al estar interrumpiendo RIT, muy probablemente inactiva la capacidad de transposición de Tn1696, la habilidad de IS4321 de reconstituir el RIT por escisión precisa (Partridge & Hall 2003) debería ser capaz de revertir esta inactivación. Al comparar las secuencias nucleotídicas de IS4321_{pAS1}, IS4321_{pRMH760} e IS4321_{pR751} se observan algunas diferencias. IS4321_{pAS1} e IS4321_{pRMH760} mostraron un 97.1% de identidad a nivel de secuencia. Esta diferencia del 2,9% se debe a 38 mutaciones puntuales. Si bien 33 de estas 38 se localizan en el gen *tnpA* y la mayoría de ellas no generan un cambio en un residuo aminoacídico (Figura 3.4). También se observó un alto grado de conservación de la estructura primaria cuando se compararon las secuencias nucleotídicas de IS4321_{pAS1} e

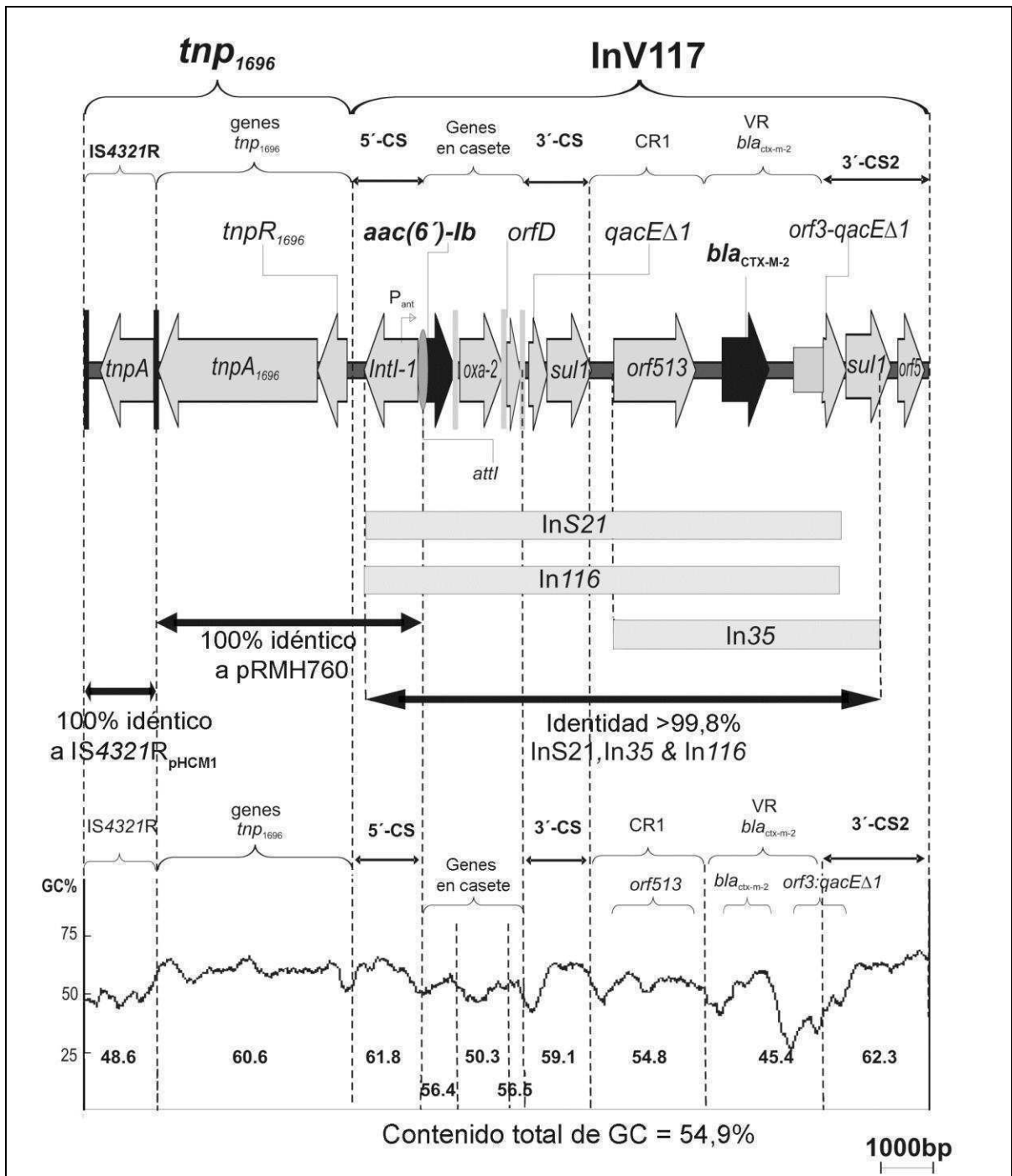


Figura 3.3. Estructura genética de *InV117* y su región adyacente. La figura muestra los genes y otros elementos hallados en el fragmento de pAS1 secuenciado. Las flechas denotan genes en su sentido de transcripción. En negro se señalan los genes clínicamente relevantes *aac(6')-Ib* y *bla*_{CTX-M-2}. Las barras verticales grises y negras señalan sitios attC y las RI. El óvalo gris muestra el sitio attI. Las regiones más relevantes fueron agrupadas de acuerdo a su nombre: CR, ISCR1; VR, región variable, 5'-CS, secuencia constante en 5'; 3'-CS, secuencia constante en 3'. Las flechas dobles muestran el grado de identidad elementos especificados. Las barras grises denotan las zonas secuenciadas para *InS21*, *In35* e *In116*. Abajo se muestra el gráfico de GC% para toda la región. Se muestra el valor medio de GC calculado para cada región entre las líneas punteadas.

IS4321R_{pR751} (99.69% de identidad) ó IS4321_{pAS1} e IS4321L_{pR751} (97.01% de identidad). De hecho, es notable que los pocos cambios de aminoácido encontrados entre las diferentes versiones de las transposasas no ocurrieron en las posiciones altamente conservadas dentro de las proteínas de esta subfamilia de transposasas (Figura 3.4). Estas observaciones sugieren que la transposasa de IS4321_{pAS1} es probablemente funcional y apoya la posibilidad de que las RIT se regeneren por la escisión precisa de IS4321_{pAS1}. Alternativamente, se ha propuesto que las transposasas de la familia del Tn21 podrían reconocer los extremos de IS4321 y como consecuencia, cuando IS4321 se inserta en los extremos de un transposón de la familia del Tn21, podrían promover la transposición de todo el elemento junto a IS4321 (Thorsted et al. 1998). Si este fuera el caso, toda la estructura incluyendo el módulo tnp1696 e InV117, podrían potencialmente ser capaces de transponer. Si bien esta estructura ya se encuentra en un replicón de amplio rango de hospedador, que al menos va desde Enterobacteriaceae hasta Vibrionaceae, la capacidad de dispersión a nivel molecular le permitiría el pasaje a otros replicones con diferente rango de huésped. De este modo, genes clínicamente muy relevantes como *aac(6')-Ib* y *bla_{CTX-M-2}* tienen un enorme potencial de diseminación entre patógenos. Por otro lado, poblaciones de *Vibrio cholerae* podrían servir como reservorio para estos genes en pAS1 o integrados como casetes en los dos “superintegrones” presentes en su genoma (T. R. Walsh 2006; Didier Mazel 2006).

Conclusiones: el análisis del extremo aminoterminal de AAC(6')-Ib mostró la presencia de una nueva variante del gen. La variabilidad existente sugiere una flexibilidad en el N-terminal que facilitaría la dispersión del gen. Por otro lado, InV117 mostró muy alta identidad con integrones como In35, InS21 e In116 identificados en Argentina. Esto indica origen muy cercano y además prueba la amplia diseminación de este integrón. El módulo tnp1696 codifica una transposasa y resolvasa aparentemente activas con su sitio de res intacto. A pesar de tener la RIT interrumpida por un IS4321R, este podría escindirse reconstituyendo el sitio o bien podría ser reconocido directamente por la transposasa del modulo tnp1696. Todas estas observaciones implican que InV117 podría estar alojado en un transposón que facilita su dispersión a nivel molecular explicando la alta dispersión de este integrón en la región. Por otro lado, *Vibrio cholerae* podría ser un reservorio de *aac(6')-Ib* y *bla_{CTX-M-2}* y participar en su diseminación.

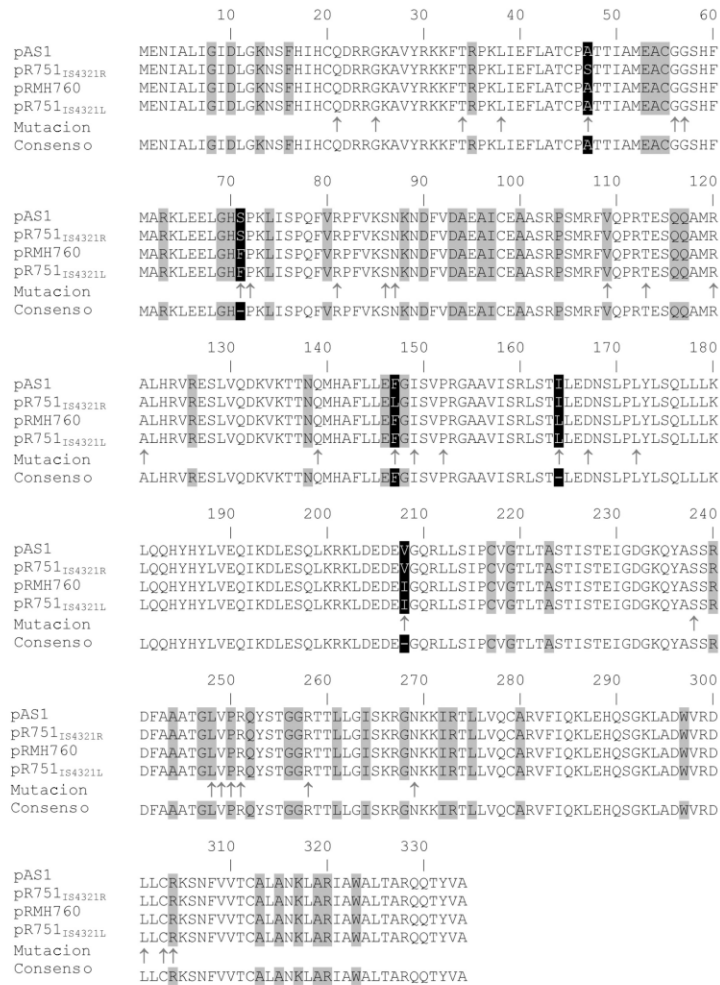
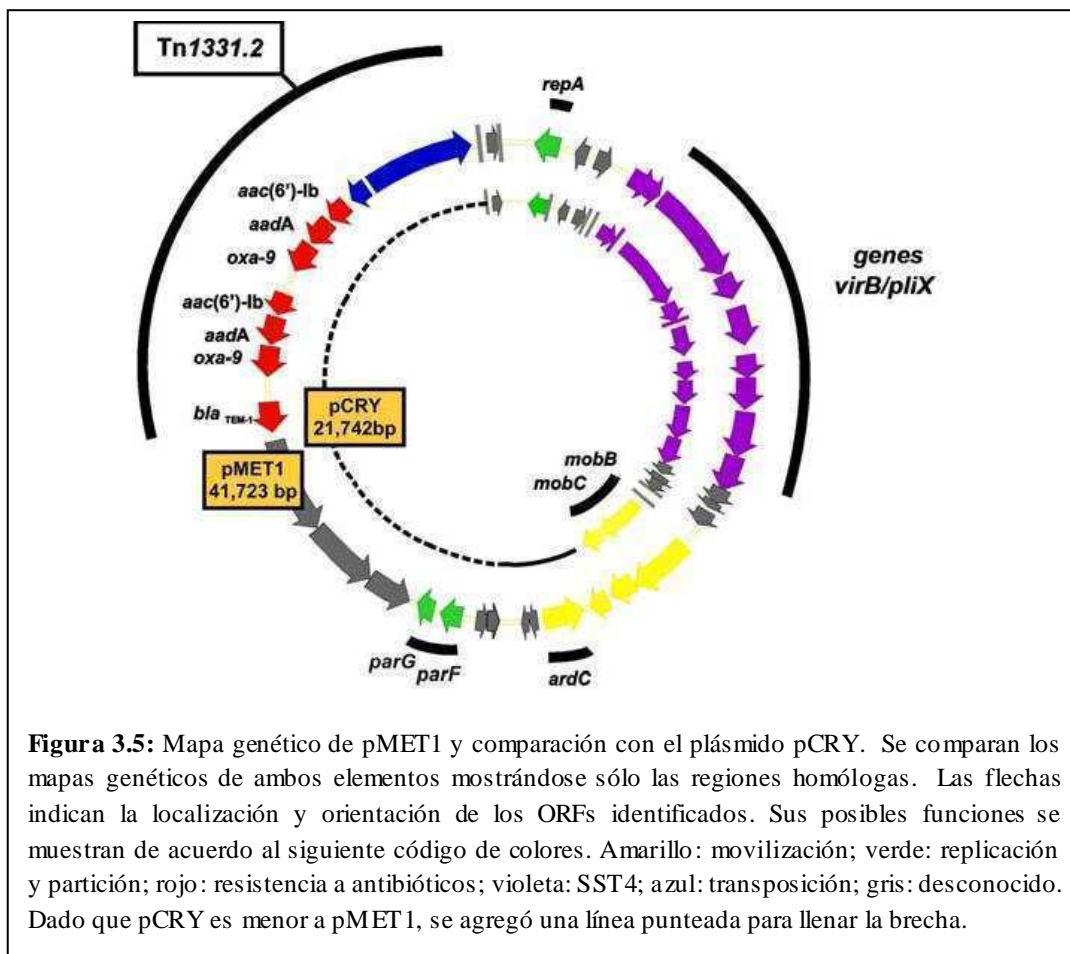


Figura 3.4: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las diferentes variantes de TnpA presentes en IS4321R_{pASI}, IS4321R_{pR751}, IS4321L_{pRMH760} e IS4321L_{pR751}. Las diferencias respecto a pAS1 se marcan en letras blancas en fondo negro. En gris se marcan los residuos altamente conservados en las transposasas de la familia IS1111. Las flechas marcan posiciones con codones diferentes.

2. Diseminación de Tn1331.2 a nivel celular: secuenciación y análisis de pMET1:

Originalmente *aac(6')*-Ib fue identificado dentro del transposón Tn1331 que se encuentra incluido en el plásmido pJHCMW1 (Wolj et al. 1986; M E Tolmasky et al. 1986; M E Tolmasky & J. H. Crosa 1987). Este replicón fue secuenciado completamente obteniéndose el “esqueleto” del plásmido que permitió explicar la dispersión de estos genes de resistencia a nivel celular (Renee Sarno et al. 2002). El transposón Tn1331.2 que también aloja los genes *aac(6')*-Ib, *aadA*, *oxa9* y *bla_{TEM-1}* clínicamente relevantes, es el determinante de resistencia a

antibióticos del plásmido pMET1 (M E Tolmasky et al. 1988). Como se mencionó previamente (ver Capítulo 2: Antecedentes y Objetivos), Tn1331.2 contiene respecto a Tn1331, una duplicación de los genes de resistencia a antimicrobianos *aac(6')-Ib*, *aadA* y



oxa-9. Otros plásmidos con esta misma duplicación de los determinantes de resistencia también fueron descritos en otras regiones de la Argentina (R. M. Chamorro et al. 1990). Nos propusimos determinar los elementos responsables de la dispersión a nivel celular de Tn1331.2 fue caracterizado, no se conocía el resto del plásmido ni de su capacidad de dispersión a nivel celular. Por lo tanto, el plásmido pMET1 fue secuenciado completamente y analizado por métodos informáticos.

Los electrofenogramas obtenidos en las reacciones de secuenciación permitieron ensamblar una secuencia única de 41,723 nucleótidos que fue depositada en GeneBank, EU383016. El plásmido pMET1 incluye una región de replicación, un sistema de secreción tipo IV (SST4), un sistema de partición y como ya se había descrito, el Tn1331.2 que incluye dos genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglicósidos y dos genes de β -lactamasas. La Figura 3.2.1 y la Tabla 3.4 resumen las características generales del replicón incluyendo las funciones predichas de cada uno de los productos de los marcos abiertos de lectura (ORFs)

identificados en base a la comparación de la secuencia aminoacídica correspondiente con las proteínas depositadas en la base de datos mediante BLASTx.

Tabla 3.4 : ORFs identificados en pMET1

ORF	Posición	/ GC	Proteína (aa)	Mayor similitud	Valor <i>E</i>	Identidad /Similitud	No. de acceso en GenBank
1	1.387-1.674	45	238	Posible proteína RepA [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	2e-119	89/95	NP_995415
2	2.198-1.839	42.6	118	Posible regulador transcripcional [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	2e-42	72/84	NP_995417
3	2.451-2.906	48.7	151	Antiterminador de la transcripción [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	2e-83	99/100	NP_995418
4	3.534-4.244	57.3	236	VirB1 componente de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	2e-132	99/99	NP_995421
5	4.241-4.546	56.2	101	VirB2 componente de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	9e-31	98/99	NP_995422
6	4.559-7.297	52.8	912	Proteína tipo Pilx3-4/VirB3-4 [<i>Escherichia coli</i>]	0.0	99/100	AAP70302
7	7.316-8.026	49.2	236	Componente VirB5 de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	2e-98	84/90	NP_995424
8	8.275-9.351	46.4	358	Componente VirB6 de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	1e-155	87/95	NP_995426
9	9.620-1.0255	55.4	211	Componente VirB8 de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001]	4e-105	99/100	NP_995427
10	10.252-	56.9	302	Componente VirB9 de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia</i>	1e-170	99/100	NP_995428

	11.160			<i>pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]			
11	11.201-12.475	57.4	424	Componente VirB10 de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	0.0	96/97	NP_995429
12	12.465-13.490	47.6	341	Componente VirB11 de un SST4 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001].	0.0	99/100	NP_995430
13	13.487-13.885	46.5	132	Proteína hipotética YP_pCRY17 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	8e-73	98/100	NP_995431
14	13.921-14.226	42.4	101	Proteína hipotética YP_pCRY18 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	3e-52	99/99	NP_995432
15	14.251-14.565	40	104	Posible remanente de proteína dopa decarboxilasa [<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	8e-41	96/97	NP_995433
16	15.331-17.082	39.8	583	Posible proteína de movilización MobB [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	0.0	99/99	NP_995436
17	17.079 - 17.846	48.7	255	Posible proteína de movilización MobC [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	9e-144	99/100	NP_995437
18	17.949-18.749	54.2	168	Posible endonucleasa [pK245, <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	2e-54	62/76	ABG56794
19	19.631-18.663	53.3	320	Proteína antirrestricción ArdC [p29930, <i>Yersinia enterocolitica</i>]	3e-152	86/92	CAD58578.
20	20.016-20.351	33.7	112	Proteína hipotética AmetDRAFT_2972 [<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYMF]	2e-14	39/86	ZP_007999 58
21	20.348-20.680	31.1	111	Proteína hipotética AmetDRAFT_2972 [<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYMF]	2e-05	43/60	ZP_007999 58
22	21.353-21.057	45.8	99	Regulador transcriptional [<i>Escherichia coli</i>]	5e-34	72/86	CAH19146
23	21.706-21.356	47.8	117	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	1e-43	71/84	CAH19145

24	22.100-22.717	45.8	206	Proteína de partición del plásmido ParF [p29930, <i>Yersinia enterocolitica</i>]	3e-84	77/90	CAD58556
25	22.772-23.011	47.3	79	Proteína de partición del plásmido ParG[p29930, <i>Yersinia enterocolitica</i>]	9e-16	53/70	CAD58557
26	24.886-23.633	46.8	417	Proteína hipotética V12B01_09786 [<i>Vibrio splendidus</i> 12B01]	6e-134	59/74	ZP 00991171
27	24.890-26.905	46.6	675	Proteína hipotética V12B01_09791 [<i>Vibrio splendidus</i> 12B01]	0.0	73/84	ZP 00991172
28	29.632-26.948	45.4	892	Proteína hipotética V12B01_09796 [<i>Vibrio splendidus</i> 12B01]	0.0	67/80	ZP 00991173
29	30.731-29.871	50.3	286	Precursor de beta-lactamasa (TEM-1) [pJHCMW1, Tn1331, <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	2e-152	100/100	NP 608310
30	32.270-31.431	50.3	279	Precursor de beta-lactamasa (Penicilinas) (Oxacilinas) (OXA-9)	1e-157	100/100	NP 608309
31	33.103-32.315	53.6	262	Adenililtransferasa [pJHCMW1, Tn1331, <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	6e-145	99/100	NP 608308
32	33.778-33.173	54.1	201	Aminoglicósido 6'-N-acetiltransferasa Ib (AAC(6')-Ib) [pJHCMW1, Tn1331, <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	1e-112	100/100	NP 608307
33	35.317-34.478	50.3	279	Precursor de beta-lactamasa (Oxacilinas, OXA-9) [pJHCMW1, Tn1331, <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	1e-157	100/100	NP 608309
34	36.150-35.362	53.6	262	Adenililtransferasa [pJHCMW1, Tn1331, <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	6e-145	99/100	NP 608308
35	36.825-36.220	54.1	201	Aminoglicósido 6'-N-acetiltransferasa Ib (AAC(6')-Ib) [pJHCMW1, Tn1331, <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	1e-112	100/100	NP 608307

36	37.565- 37.008	54.3	185	Resolvasa [pJHCMW1, <i>Tn1331</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	2e-95	99/100	NP 608306
37	37.694- 40.732	51.8	1015	Transposasa [pJHCMW1, <i>Tn1331</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>]	0.0	100/100	NP 608305
38	41.223- 40.942	52.7	93	Regulador transcripcional predicho [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	7e-37	100/100	NP 995443
39	41.157- 41.516	52.1	120	Proteína hipotética YP_pCRY30 [pCRY, <i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001]	1e-50	97/98	NP 995444
40	41.545- 41.204	53	107	Proteína hipotética plu0442 [<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp.laumondii TTO1]	2e-27	60/73	NP 927795

a. Estudio de la replicación de pMET1

El análisis por BLASTn mostró una región de pMET1 con alta similitud al plásmido críptico de *Yersinia pestis* 91001 pCRY (Song et al. 2004) (mostrado esquemáticamente en la Figura 3.5). Esta similitud no presentó una cobertura del 100% sino que abarcaba una región de 17.860 pb con un 44% de cobertura. En esta zona se incluyen dos grupos de genes importantes: los relacionados con la replicación del plásmido (repA) y aquellos relacionados con la conjugación del plásmido (SST4 y genes mob). Los genes relacionados con la transferencia horizontal por conjugación presentaron además similitud con ICEs de cepas patógenas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (ver más adelante). Sin embargo, la región que contiene los genes posiblemente involucrados en la replicación (1-4.244) sólo mostró homología con el plásmido críptico pCRY (AE017044) de *Yersinia pestis* (Figuras 3.5 y 3.6A). Esta región incluye dos segmentos de ADN ricos en AT junto al ORF1, al que llamamos repA. La secuencia aminoacídica de este ORF es 89% idéntica y 95% similar al posible RepA codificado en pCRY (Figura 3.6B). RepA presentó además similitudes menores pero significativas con otras proteínas de replicación de plásmidos aislados de *Buchnera aphidicola* (Pérez-Brocal et al. 2006; van Ham et al. 1997) y de *Yersinia enterocolitica* (pYVe227, GenBank NC_002120).

Para identificar funcionalmente la región de replicación de pMET1, se eligieron tres de los clones empleados en el proyecto de secuenciación del plásmido de manera tal que cubrieran diferentes partes de la secuencia que incluía los dos primeros ORFs del plásmido. Se

seleccionaron entonces los fragmentos 12, 34 y 45 (situados en coordenadas 41.298-1.655, 522-2.039 y 1-2.039 respectivamente) (Fig. 3.6). Los tres fragmentos incluyen a repA, sin

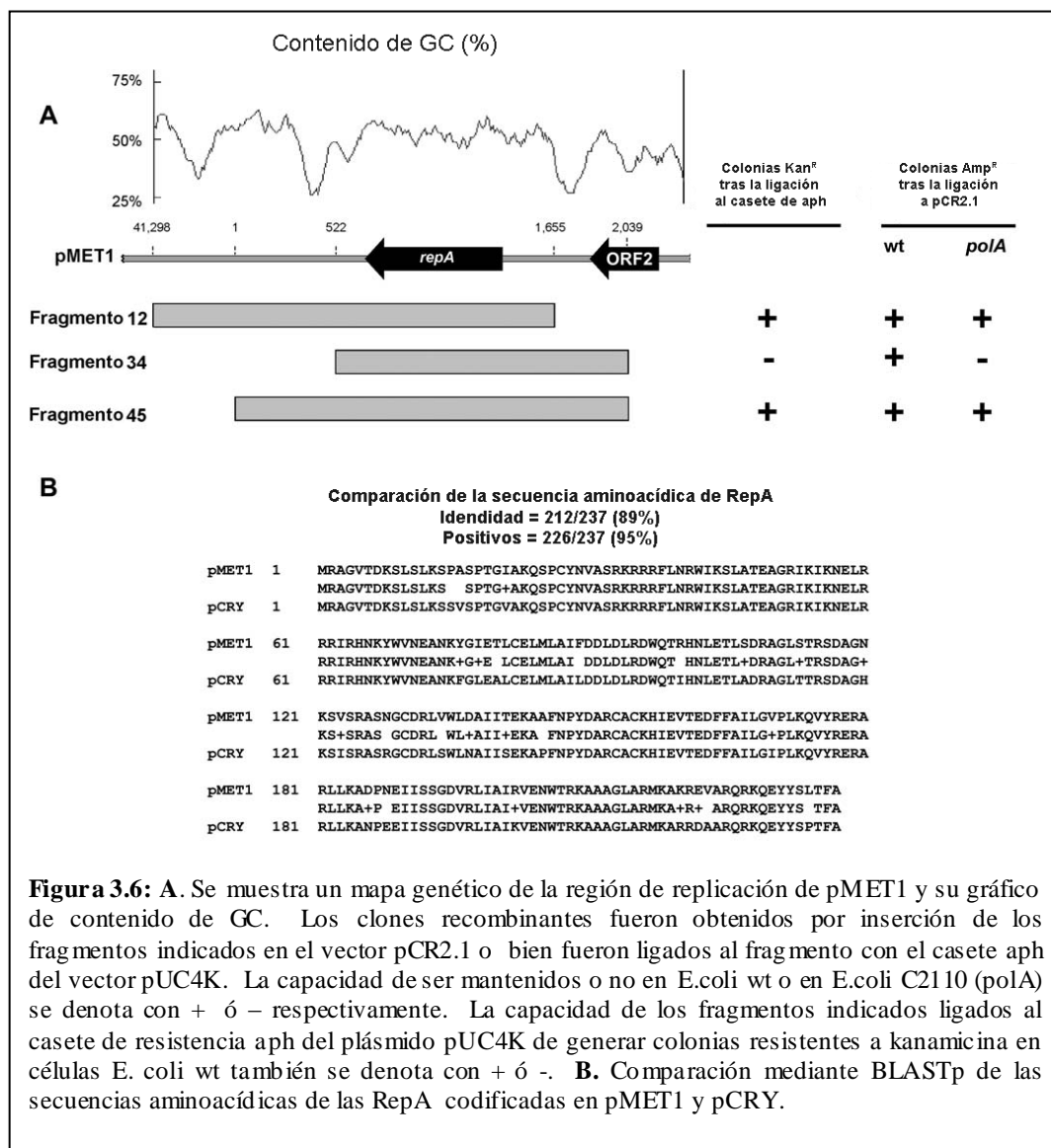


Figura 3.6: A. Se muestra un mapa genético de la región de replicación de pMET1 y su gráfico de contenido de GC. Los clones recombinantes fueron obtenidos por inserción de los fragmentos indicados en el vector pCR2.1 o bien fueron ligados al fragmento con el casete aph del vector pUC4K. La capacidad de ser mantenidos o no en E.coli wt o en E.coli C2110 (polA) se denota con + ó - respectivamente. La capacidad de los fragmentos indicados ligados al casete de resistencia aph del plásmido pUC4K de generar colonias resistentes a kanamicina en células E. coli wt también se denota con + ó -. B. Comparación mediante BLASTp de las secuencias aminoacídicas de las RepA codificadas en pMET1 y pCRY.

embargo, el 12 incluye las dos zonas ricas en AT, 45 sólo la más próxima a ORF1 y 34 no incluye a ninguna de las dos zonas. Los segmentos seleccionados se ligaron a un gen de resistencia a kanamicina para luego transformar E.coli sensible al antibiótico. Sólo se obtuvieron colonias resistentes cuando los clones recombinantes incluían los fragmentos 12 ó 45 (Fig. 3.6A).

Los resultados se confirmaron clonando los tres fragmentos en pCR2.1 e intentando transformar la cepa E.coli C2110 deficiente en la ADN polimerasa I (polA⁻). Se observó, que en un contexto genético silvestre, los tres plásmidos eran capaces de replicar y mantenerse. Por el contrario, en el contexto polA de E.coli C2110 sólo los clones recombinantes que incluían los fragmentos 12 ó 45 podían ser mantenidos establemente. El clon recombinante

que porta el fragmento 34 era incapaz de replicar en ausencia de la ADN polimerasa I (Fig. 3.6A). Por lo tanto, los resultados de ambos experimentos definen una región de replicación que va desde el nucleótido 1 hasta el 1655. Esta región incluye dos características esenciales: i) un ORF completo, llamado repA, y ii) una región rica en AT entre las posiciones 1 y la 522 (Fig. 3.6A). Esta última seguramente incluye el locus ori. Además, nos pareció destacable que estas dos características están conservadas en la región de replicación de pCRY: la secuencia rica en AT está presente dado que su perfil de contenido de GC que es idéntico al de pMET1; RepA, como ya se mencionó antes, muestra un 95% de similitud y un 89% de identidad con el producto del ORF identificado en pMET1 (Fig. 3.6B). Por otro lado, la identidad total a nivel nucleotídico entre pMET1 y pCRY para este locus es del 90%. Estas observaciones sugieren que pMET1 podría replicar en bacterias del género *Yersinia*.

Conclusiones: la secuenciación completa del plásmido pMET1 (41.723 pb) que porta Tn1331.2 y su análisis permitió determinar que dicho plásmido alberga 41 ORF. Una región de unos 18 Kpb del plásmido muestra una alta similitud con pCRY de *Yersinia pestis*. Esta zona comprende genes de un SST4 y genes de replicación. Se identificó la zona de inicio de replicación de pMET1 que incluye al gen repA y una región rica en AT adyacente y conservada en pCRY. Esto sugiere fuertemente que pMET1 sería capaz de replicar en *Y.pestis*.

b. Análisis del posible “centrómero” para la partición de pMET1

El plásmido pMET1 incluye un posible locus de partición que posee una organización similar a la del plásmido pTP228, también conocido como locus parFG (Barillà & Finbarr Hayes 2003). La región de partición de pMET1 abarca los nucleótidos 22.100 al 23.011 e incluye dos ORFs (ORF25 y ORF26, Tabla 3.4, Figura 3.5) que codifican dos proteínas con alta similitud a ParF y ParG. El homólogo a ParF tiene 205-aminoácidos muestra una similitud significativa con numerosas proteínas pertenecientes al subgrupo Ib de la superfamilia de ParA que se relaciona al subgrupo de proteínas de división celular MinD (F Hayes 2000; Bignell & C M Thomas 2001; Møller-Jensen et al. 2000). Las proteínas con máxima similitud e identidad con ParF de pMET1 están codificadas por el plásmido críptico de *Yenterocolitica*, p29930 (Strauch et al. 2003) (90% de similitud y 77% de identidad), el plásmido de multirresistencia pTP228 de *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Newport (Barillà & Finbarr Hayes 2003) (87% de similitud y 72% de identidad), y el plásmido pEA29 de *Erwinia amylovora* Ea88 (McGhee & Jones 2000) (85% de similitud y

73% de identidad). A diferencia de ParF, la proteína ParG de pMET1 tiene homólogos sólo en p29930 (70% de similitud y 53% de identidad), pTP228 (71% de similitud y 58% de identidad) y pEA29 (68% de similitud y 51% de identidad). Todas ellas son generalmente consideradas como proteínas tipo ParB. ParG de pTP228 actúa como un dímero, y puede interactuar de manera secuencia específica con repeticiones directas situadas río arriba de parF, en un locus conocido como parH, estimulando la hidrólisis de ATP por ParF y modulando la polimerización de ParF (Barillà et al. 2005). Además, el dímero de ParG se une a un operador y actúa como autorregulador del operón parFG (Hayes & Barillà 2006b). Se han determinado estructuras de las proteínas tipo ParB puras o en complejo con ADN (Schumacher et al. 2007; Weihofen et al. 2006; Golovanov et al. 2003). En otros plásmidos, se identificaron homólogos a ParF pero que incluyen proteínas que serían análogos funcionales pero heterólogas a ParG. El complejo nucleoproteico que forman las proteínas del tipo ParB con el locus parH del plásmido ha sido recientemente llamado segregosoma y es importante para asegurar una partición equitativa de las moléculas plasmídicas (Hayes & Barillà, 2006; Hayes & Barillà, 2006b).

Conclusiones: la región de pMET1 que abarca los genes parF y parG es homólogo al locus de partición del plásmido pTP228 de Salmonella entérica, constituiría el sistema de partición del plásmido pMET1 que contribuye al mantenimiento estable del plásmido en la bacteria hospedadora.

c. Conjugación de pMET1

Los sistemas de secreción de tipo IV (SST4s) codificados por plásmidos y elementos integrativos y conjugativos (ICEs) están involucrados tanto en la conjugación bacteriana como en el transporte de proteínas efectoras a células eucarióticas durante los procesos de infección, en la liberación de ADN al medio extracelular y la incorporación de ADN foráneo a la célula (Alvarez-Martinez & Christie 2009; Z. Ding et al. 2003). Como se dijo antes, la conjugación bacteriana tiene un rol muy importante en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos a nivel celular. Estudios previos indicaron que pMET1 es autoconjugativo, es decir, no requiere factores específicos de la célula hospedadora (Tolmasky et al. 1988). El análisis de la secuencia nucleotídica del plásmido muestra que la región de transferencia de pMET1 se ubica dentro de un segmento de 16 Kbp de ADN. El ATG del primer gen, virB1, se encuentra en la posición 3534 y el ATG del último gen, ardC (con orientación opuesta a todo el resto), en la coordenada 19,631. Como mencionamos

antes, un bloque de ORFs (llamados VirB1–VirB11) es altamente homólogo al que compone el complejo de conjugación (Mpf, por sus siglas en inglés) en un gran número de plásmidos y elementos conjugativos con máxima identidad con los del plásmido pCRY de *Y. pestis* 91001 (Song et al. 2004), la isla de alta patogenicidad HPI_{ECOR31} (Sören Schubert et al. 2004) e ICE_{KP1}, un ICE identificado en *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (T.-L. Lin et al. 2008) (Figura 3.5, Figura 3.7, Tabla 3.4 y Tabla 3.5). La posible función de cada una de estas proteínas y la estructura del SST4 se han abordado en varias revisiones (Alvarez-Martinez & Christie 2009; Z. Ding et al. 2003; G. Schröder & Erich Lanka 2005). En los casos mencionados, virB3 y virB4 están fusionados. No se identificó ningún homólogo de VirB7 en ninguna de las cuatro estructuras. Sin embargo, caracterizó un marco de lectura abierto de 45 aminoácidos (ORF9) presente y conservado (Tabla 3.5) entre virB6 y virB8 en las cuatro estructuras genéticas. La alta conservación y la sintenia observada sugieren que ORF9 podría ser un análogo funcional a VirB7.

Tabla 3.5: Comparación de la secuencia aminoacídica de proteínas tipo VirB/PlIX			
Proteína hipotética	pCRY	HPI_{ECOR31}	ICE_{KP1}
	AE017044.1	AY233333.1	AB298504.1
VirB1	99/99	63/77	63/77
VirB2	98/99	76/85	76/85
Tipo VirB3-4	97/98	99/100	98/99
VirB5	84/90	83/98	84/89
VirB6	87/95	87/92	95/96
Orf7	97/97	100/100	97/100
VirB8	99/100	98/100	99/99
VirB9	98/100	99/99	98/99
VirB10	96/97	95/96	95/95
VirB11	99/100	99/100	97/99

Los valores indican identidad/similitud obtenida mediante comparación con BLASTx de cada ORF de pMET1 y proteína hipotética correspondiente de pCRY, HPI_{ECOR31} and ICE_{KP1}.

En pMET1, existen río abajo del operón vir se ubican ORFs de función desconocida. A continuación se localiza el grupo de genes cuya función predicha es la transferencia de ADN. Potencialmente codifican una MobB, una MobC, y una endonucleasa. La búsqueda de homólogos de estos ORFs en las bases de datos mostró que mientras que MobB y MobC de pMET1 poseen un 99% de identidad con los productos de los genes análogos del plásmido pCRY de *Y. pestis*, la endonucleasa mostró máxima identidad con un análogo alojado en el plásmido pK245 de *K. pneumoniae*, que lleva los genes que codifican para la resistencia a quinolonas y β -lactamasas de espectro expandido (Y.-T. Chen et al. 2006), y el plásmido críptico de *Y. enterocolitica* p29930 (Strauch et al. 2003). Sorpresivamente, no se encontró un nivel de similitud significativo con la endonucleasa presente en pCRY. Un análisis posterior de la región de movilización de pMET1 mostró una estructura oriT-mobB-mobC similar a la presente en otros elementos como HPI_{ECOR31} (Sören Schubert et al. 2004) o el plásmido CloDF13 (Núñez & De La Cruz 2001).

En pMET1, la región río arriba de mob posee un 90% de identidad con la de HPI_{ECOR31}. Río abajo del gen de la endonucleasa, existe un ORF, ardC, que se transcribiría en la dirección opuesta a los genes anteriores. El producto de este gen presenta similitud con una posible proteína antirestricción del plásmido p29930 (Strauch et al. 2003). Estudios en su homólogo del plásmido pSA muestran que la proteína ArdC es capaz de unirse a ADN simple cadena y protegerlo de la actividad de la enzima HhaI. Se ha propuesto que ArdC entraría junto con el plásmido conjugado a la célula hospedadora protegiéndolo de la degradación de las nucleasas de la célula receptora (Belogurov et al. 2000).

Conclusiones: un locus que abarca 16 Kpb que incluye los genes vir1-11, genes mob y el gen ardC sería el responsable de la capacidad de transferencia que posee pMET1. El operón vir generaría el Mfp, MobB, MobC y la endonucleasa contribuirían al corte simple cadena y transferencia del plásmido, y ArdC ayudaría a la estabilización del ADN conjugado. Este locus no tendría un origen monofilético sino que sería un mosaico de genes hallados en estructuras genéticas similares.

d. Análisis comparativo de pMET1 y otros elementos genéticos.

Como ya se mencionó, pCRY, un plásmido críptico de 21,742 pb aislado de la cepa 91001 de *Y. pestis*, fue secuenciado recientemente (Song et al. 2004). El análisis comparativo las secuencias nucleotídicas de pMET1 y pCRY reveló una alta similitud estructural entre ellos

(Figura 3.5). En particular, una región de unos 18 kpb, que incluye la región de replicación y el SST4 necesario para la conjugación, mostró una alta similitud de secuencia así como sintenia entre pMET1 y pCRY. Estos resultados sugieren un origen común. Sería esperable encontrar en aislamientos clínicos de enterobacterias, plásmidos con una estructura similar pero alojando otros elementos móviles con genes de adaptación como genes de resistencia a antibióticos. Más aún, estudios anteriores han mostrado que algunos plásmidos de *Y. pestis* también comparten la región esencial para la replicación y mantenimiento con otros plásmidos de *Salmonella* (Prentice et al. 2001) y de otras enterobacterias presentes en alimentos (Welch et al. 2007). Todo esto evidencia que debe haber una transferencia activa de plásmidos entre el género *Yersinia* y otras bacterias de la familia Enterobacteriaceae por contacto directo o por intermedio de otras bacterias. Esto implica un alto riesgo de diseminación de genes de resistencia a antibióticos a cepas de un organismo altamente patógeno como *Y. pestis*.

El análisis del SST4 de pMET1 mostró también una alta similitud con dos elementos conjugativos no plasmídicos: ICE_{Kp1} y HPI_{ECOR31} (Figura 3.7). Un estudio realizado sobre HPI_{ECOR31} mostró que este elemento comparte estructuras comunes como genes de patogenicidad con otras islas de alta patogenicidad identificadas en Enterobacteriaceae incluyendo especies de *Yersinia*. Sin embargo, HPI_{ECOR31} difiere respecto a estas islas en la presencia de una región de ADN en uno de los extremos del elemento genético. Se ha llamado a esta región RB-HPI_{ECOR31} por las siglas en inglés de Borde Derecho de la Isla de Alta Patogenicidad ECOR31 como se muestra en la Figura. 3.7B (Sören Schubert et al. 2004). Curiosamente, esta región incluye a SST4, que como ya mencionamos está muy relacionado al SST4 presente en pMET1. La presencia de este locus hizo de HPI_{ECOR31} la primer isla de patogenicidad identificada que aloja un juego completo de genes conjugativos (Sören Schubert et al. 2004). Pero lo que resulta aún más interesante, es que se ha demostrado que HPI_{ECOR31} puede escindirarse del cromosoma bacteriano, circularizarse y transferirse, indicando que se trata efectivamente de un ICE activo (Burrus, Pavlovic, Decaris & Guédon 2002; Sören Schubert et al. 2004). Estas propiedades en conjunto con la estructura genética de las islas genómicas de alta patogenicidad identificadas en especies del género *Yersinia* y otras enterobacterias, llevaron a hipotetizar que HPI_{ECOR31} es su progenitor (Sören Schubert et al. 2004). Es posible entonces que HPI_{ECOR31} sea también el origen del SST4 presente tanto en pCRY como en pMET1. Sin embargo, también podría pensarse que el ICE pudo haber adquirido el SST4 de un plásmido similar a pMET1 ó pCRY. Todas estas

observaciones no hacen más que acumular evidencia que muestra la alta tasa de intercambio de información genética que ocurre dentro de las bacterias de esta familia. De nuevo, estas

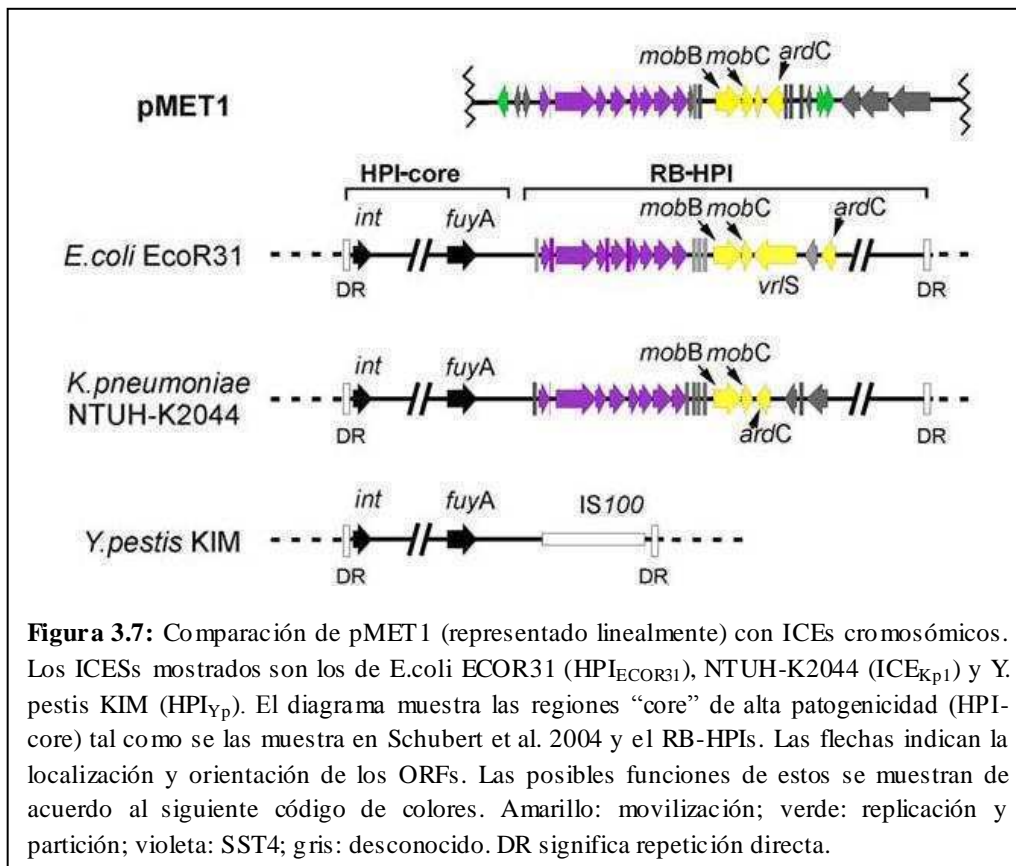


Figura 3.7: Comparación de pMET1 (representado linealmente) con ICES cromosómicos. Los ICESs mostrados son los de *E. coli* ECOR31 (HPI_{EcoR31}), NTUH-K2044 (ICE_{Kp1}) y *Y. pestis* KIM (HPI_{Yp}). El diagrama muestra las regiones “core” de alta patogenicidad (HPI-core) tal como se las muestra en Schubert et al. 2004 y el RB-HPIs. Las flechas indican la localización y orientación de los ORFs. Las posibles funciones de estos se muestran de acuerdo al siguiente código de colores. Amarillo: movilización; verde: replicación y partición; violeta: SST4; gris: desconocido. DR significa repetición directa.

evidencias muestran el alto riesgo de que patógenos como *Y. pestis* adquieran con relativa facilidad elementos de resistencia a antibióticos.

Conclusiones: el análisis comparativo de pMET1 con pCRY, HPI_{EcoR31} e ICE_{Kp1} muestra una tasa de intercambio genético muy activo entre Enterobacteriaceae que incluyen al patógeno *Yersinia pestis*. Esto representa una gran amenaza a la salud pública ya que la transferencia de estructuras genéticas (como Tn1331.2) que confieren resistencia a múltiples antibióticos, a microorganismos patogénicos podría darse con mucha facilidad y en alta frecuencia.

CAPITULO 4

Resultados y Conclusiones

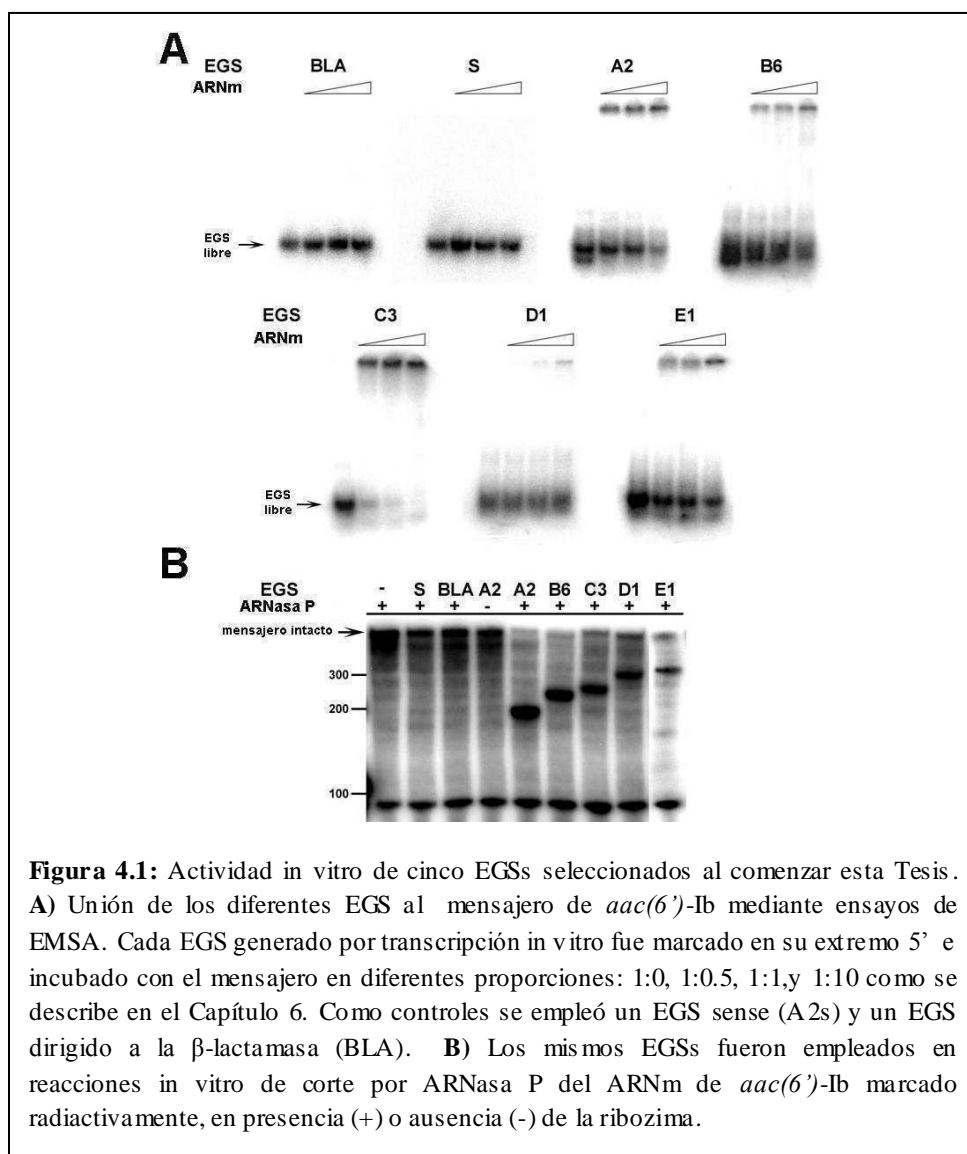
CAPITULO 4:

Estrategias antisentido para silenciar *aac(6')-Ib*

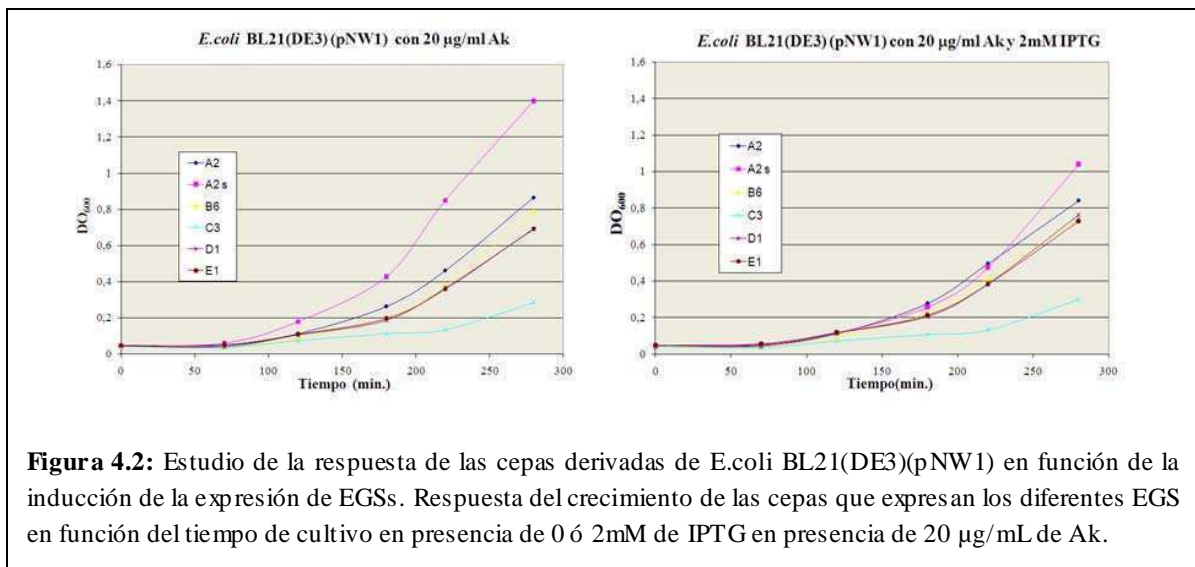
RESULTADOS & CONCLUSIONES

1. Silenciamiento de *aac(6')-Ib* en un sistema in vivo mediante EGS.

Uno de los objetivos específicos del proyecto de doctorado de esta tesis era la elaboración de compuestos antisentido que por medio de la ARNasa P, pudieran silenciar al gen de resistencia a Ak *aac(6')-Ib* (ver Capítulo 2).

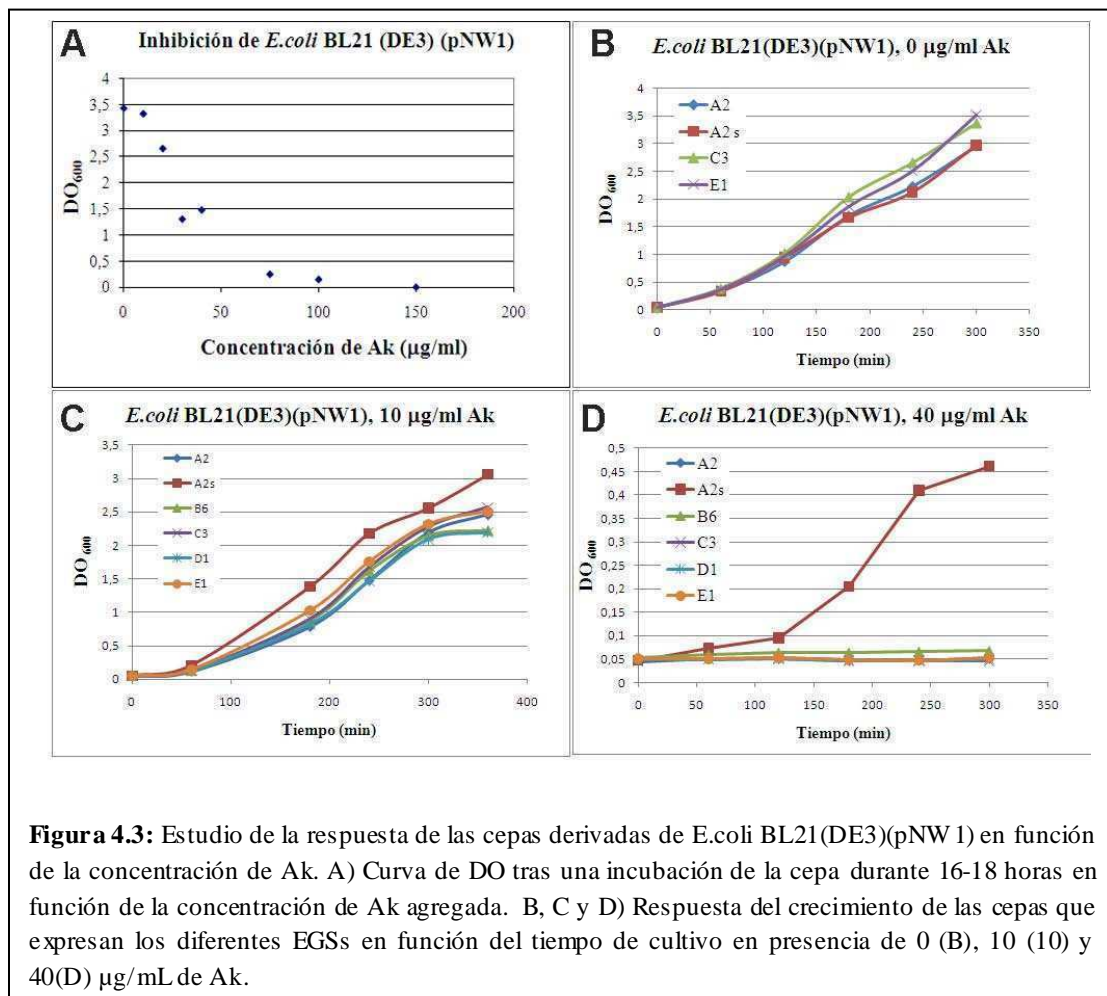


Al comienzo de esta Tesis se había logrado generar el ARN M1 y purificar la proteína C5 que conforman la ARNasa P de E.coli. Al incubar el mensajero del gen *aac(6')*-Ib con cualquiera de los distintos EGSs (A2, B6, C3, D1 ó E1 ver secuencia en el Capítulo 6) dirigidos a regiones simple cadena del mensajero y ambas subunidades de la RNasa P se observó el clivaje del mensajero en el sitio predicho (Figura 4.1B). Dicho corte fue dependiente de la presencia de ambas subunidades de la ARNasaP, el mensajero y un EGS específico. Como se esperaba, no se observó la fragmentación del mensajero cuando el EGS empleado correspondía a una secuencia aleatoria o una sense (sentido) del mensajero del gen. Además, todos los EGSs seleccionados mostraron afinidad por el mensajero en ensayos de EMSA (Figura 4.1 A). Estos resultados demuestran que la ARNasaP es capaz de promover el corte in vitro del mensajero de *aac(6')*-Ib dirigidos por EGSs específicos. Con estos resultados resultó de interés observar si esta actividad in vitro podría reproducirse in vivo.



Se construyeron plásmidos capaces de expresar cada uno de estos EGS bajo el control del promotor T7. Cada uno fue denominado de acuerdo al EGS que expresa, por ejemplo el plásmido pEGSD1s expresa la secuencia sense del EGSD1. El protocolo detallado de generación de estos plásmidos se describe en el Capítulo 6 de acuerdo al trabajo pionero del grupo de Sidney Altman (Guerrier-takada et al. 1995; Guerrier-Takada et al. 1997; Y. Li & S Altman 1996; Y. Li et al. 1992; J. McKinney et al. 2001). Una vez generados, cada uno de ellos se transfirió por electroporación a la cepa E.coli BL21(DE3)(pNW1). El plásmido pNW1, un derivado del F, posee un bajo número de copias, es compatible con pUC57 y aloja a *aac(6')*-Ib confiriendo a la cepa resistencia a Ak. Las cepas fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina y Ak. La secuencia de cada plásmido de la serie pEGS fue confirmada por secuenciación. Se generaron así las cepas que contenían plásmidos para la expresión de

los cinco EGS a probar (pEGSA2, pEGSB6, pEGSC3, pEGSD1 y pEGSE1) y los respectivos controles (pEGSAP, pEGSA2s, pEGSC3s, pEGSD1s y pEGSE1s). Las cepas resultantes expresan al mismo tiempo, el gen de resistencia a A_gs y los diferentes EGSs. Si el gen es silenciado debido a la ARNasa P endógena por la interacción entre el correspondiente EGS y el mensajero se observará un aumento en la susceptibilidad a Ak. Para evidenciar este efecto, se realizaron curvas de crecimiento de las diferentes cepas en presencia o ausencia de Ak. Se



partió de 15ml de cultivos en LB con una DO₆₀₀ inicial de 0,05 y se midió la evolución de este parámetro por turbidimetría, en función del tiempo. Se estudió, además, cómo evoluciona el sistema en presencia o ausencia del inductor de la expresión de los EGSs, IPTG. Los primeros ensayos mostraron que: i) la concentración adecuada de antibiótico para estos experimentos era de 20 µg/ml, ii) el inductor de la expresión del EGS, IPTG, no tenía efecto o incluso podría ser tóxico para la cepa *E. coli* BL21(DE3) (pNW1) (pEGSA2s) (Figura 4.3) lo que coincidía con estudios anteriores (Guerrier-Takada et al. 1997) y iii) los efectos observados se debían a cambios en la susceptibilidad a la Ak y no a la toxicidad de

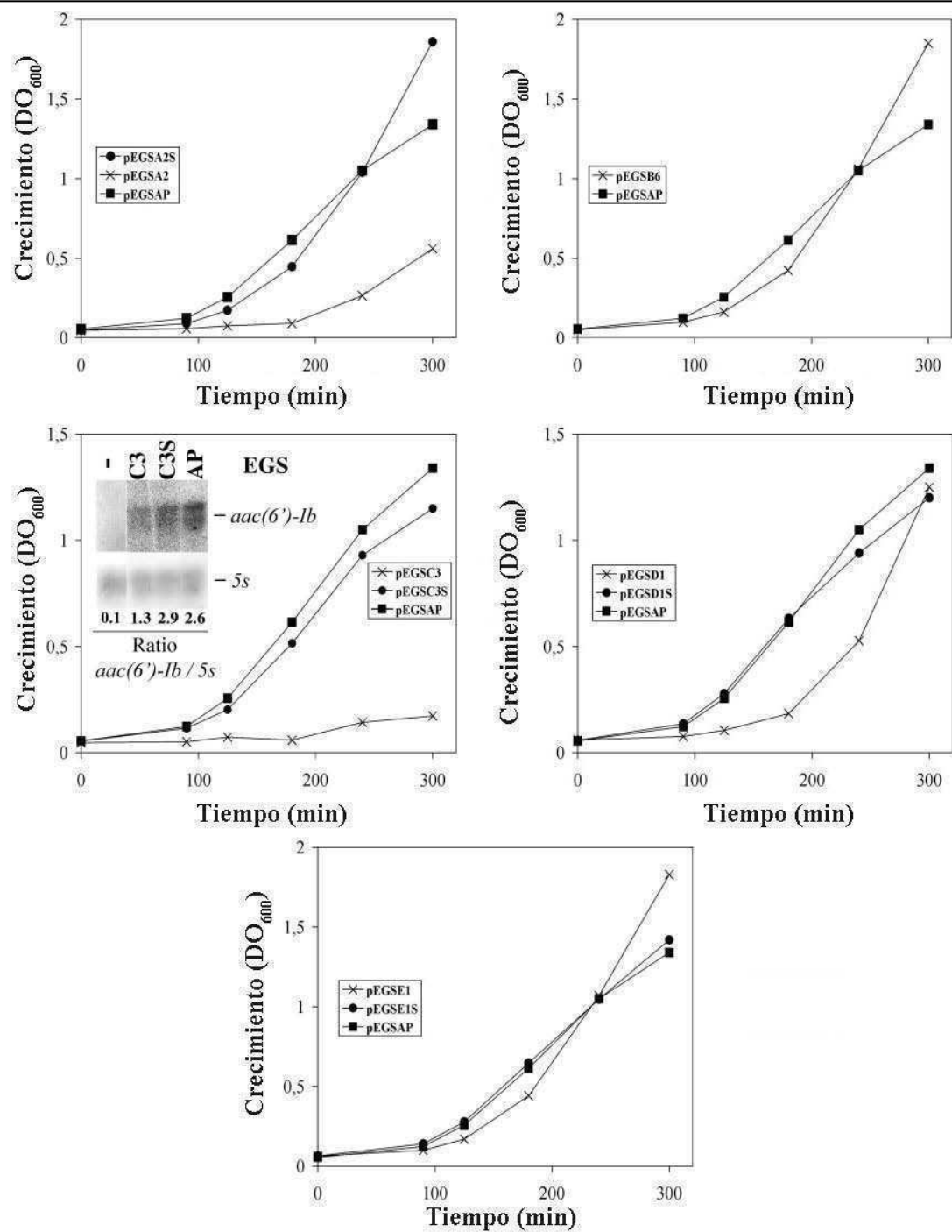


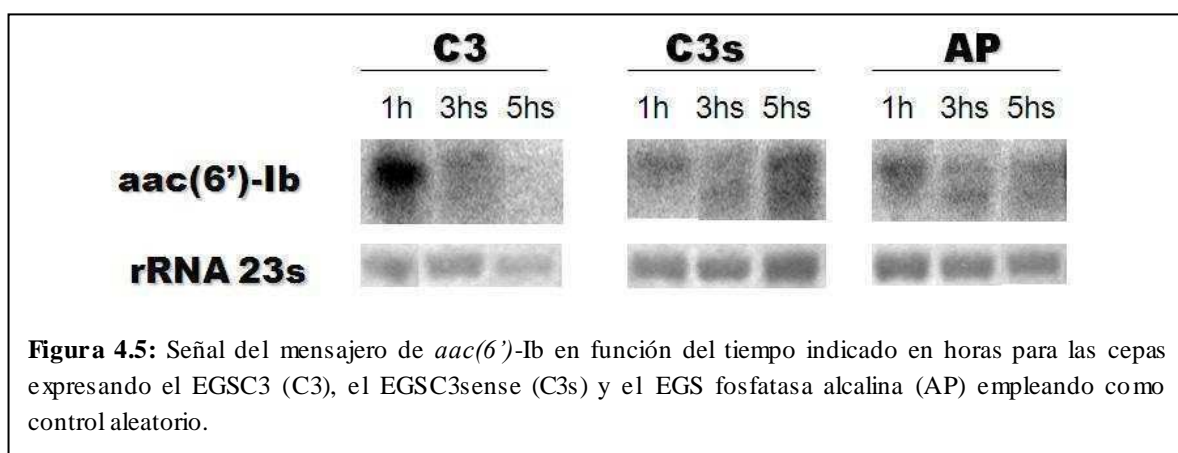
Figura 4.4: Efecto de la expresión de EGSs en *E. coli*. *E. coli* BL21(DE3)(pNW1) resistente a Ak alojando el plásmido recombinante codificando para el EGS indicado en cada panel. Cada cepa fue cultivada como se describe en el texto en presencia de 50 µg /ml de ampicilina y 15 µg /ml de Ak. El crecimiento fue medido siguiendo la DO₆₀₀ a lo largo del tiempo. Los controles fueron EGSAP, dirigido contra el gen de la fosfatasa alcalina y un EGS con la secuencia sense del EGS ensayado. Se midieron los niveles del mensajero de *aac(6')-Ib* para la cepa que codifica EGSC3 (C3), sus controles (C3S y AP) y de una cepa sin el mensajero (-) por Northern Blot. Las muestras de ARN total se corrieron en geles de agarosa al 2,5% y se transfirieron a una membrana de nylon donde se hibridaron con sondas contra el gen de resistencia a Ak y el ARN 5s. Se cuantificaron las señales y se calculó el cociente *aac(6')-Ib*/5S para cada muestra.

los EGS per se ya que experimentos en las mismas condiciones pero omitiendo agregar el Ag no mostraron diferencias de crecimiento entre las cepas (Figura 4.2).

Posteriormente se llevaron a cabo las curvas de crecimiento en las condiciones óptimas. Un ensayo representativo de tres experimentos para cada EGS se muestra en la Figura 4.4. Se observó que las cepas que llevaban los plásmidos que codifican para EGSA2 y EGSC3

fueron los que mostraron mayor sensibilidad a Ak comparados con los respectivos controles sense y el control aleatorio (EGSAP). Este efecto suele ser llamado conversión fenotípica de resistencia a sensibilidad (Guerrier-Takada et al. 1997). Aquellas cepas que expresaban EGSB6, EGSD1 y EGSE1 no mostraron diferencias respecto a sus controles (EGSB6) o bien tuvieron un comportamiento variable (EGSD1 y EGSE1). Otra observación de interés es que si se continúa el experimento durante más tiempo, todos los cultivos llegan eventualmente a fase estacionaria, incluso la cepa que lleva el plásmido pEGSC3. Este efecto que podría deberse a la pérdida o a mutaciones en el plásmido de expresión del EGS, ya ha sido observado en trabajos anteriores (Guerrier-Takada et al. 1997; J. McKinney et al. 2001).

Dado que EGSC3 fue la molécula antisentido de mayor eficiencia, por mostrar un efecto particularmente fuerte y reproducible, se compararon los niveles de ARNm *aac(6')*-Ib respecto a sus controles mediante Northern blot. Los cultivos empleados en este ensayo se cultivaron en ausencia de Ak para obtener un crecimiento considerable del cultivo, pero suplementados con ampicilina (100 µg/ml) para evitar contaminaciones y conservar la expresión de cada EGS. No fue necesaria la inducción con IPTG porque la actividad basal de la ARN polimerasa del fago T7 en *E. coli* BL21 (DE3) mostró ser suficiente para observar la conversión fenotípica. Como control de carga se empleó el ARNr 5S o 24S de expresión constitutiva. Se observó una reducción del 50% de la señal del mensajero en las células que expresan el EGSC3 respecto a sus controles (Figura 4.4 recuadro EGSC3). Por otro lado, la señal de mensajero se redujo en función del tiempo en la cepa que expresa el EGSC3 mientras



que se mantuvo estable o aumentó en el caso de las que expresan el EGSC3sense o el EGSAP (Figura 4.5). Esto muestra que el efecto observado se debe a una reducción del mensajero del gen *aac(6')*-Ib.

Como otro enfoque para evaluar el efecto fenotípico del EGS, se midió la sensibilidad a Ak de las cepas que alojan los plásmidos pEGSC3, pEGSC3sense y pEGSAP por ensayos de microdilución. Brevemente, un inóculo de unas 10^5 UFC de un cultivo en fase exponencial cada 200 μ l de medio MH, fue incubado de 16 a 18 horas en agitación a 37°C con concentraciones crecientes del antibiótico. Los resultados de cuatro experimentos mostraron una CIM para la Ak de 48 μ g/ml, 96 μ g/ml y 96 μ g/ml respectivamente. Esto coincide con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores y muestra conversión fenotípica en condiciones más restrictivas y estandarizadas. Si bien hubo variaciones entre experimento y experimento, la tendencia fue siempre la misma: la cepa que portaba el plásmido pEGSC3 resultó siempre más sensible en al menos una dilución respecto a los controles con pEGSC3sense ó pEGSAP.

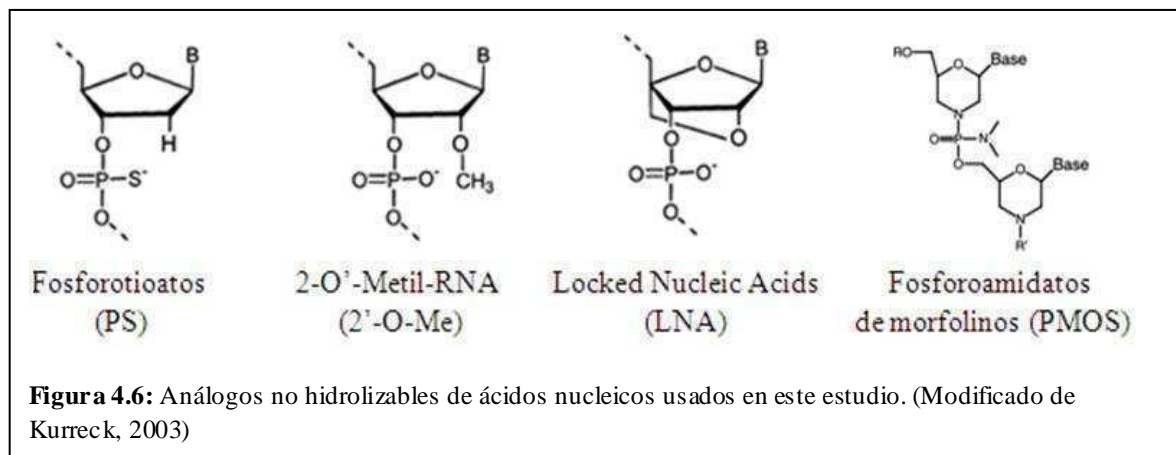
Conclusiones: el mensajero de *aac(6')*-Ib puede ser degradado por RNAsa P in vitro al incubarse con EGSs específicos. En este estudio se obtuvieron dos EGSs, EGS A2 y EGSC3, capaces de disminuir la resistencia a Ak generada por *aac(6')*-Ib en un modelo in vivo. Además, el EGSC3 generó una reducción de un 50% del mensajero de *aac(6')*-Ib comparado con los EGSAP o EGSC3sense lo cual sugiere un mecanismo mediado por degradación del mensajero. Curiosamente, los dos EGSs con mayor afinidad por el mensajero fueron los de mayor efectividad in vivo. Por lo tanto, el desarrollo esta tecnologías de silenciamiento podría eventualmente ser una herramienta para extender la vida útil de la Ak.

2. Oligómeros de análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables como EGSs:

En la sección anterior, se describió que una molécula pequeña de ARN antisentido es capaz de dirigir el corte por la ARNasa P del mensajero de *aac(6')*-Ib in vitro y que, al expresarse in vivo en una cepa portadora del gen de resistencia, genera la conversión de su fenotipo resistente a uno susceptible a la Ak. Pese a este avance, aún quedan por resolver dos problemas. Por un lado, los EGS fueron expresados en el citoplasma bacteriano mediante un plásmido de alto número de copias. Por lo tanto es necesario probar que estos compuestos pueden tener efecto al administrarlos exógenamente. En relación a esto es fundamental el desarrollo de un método de alta eficiencia y/o que logre dirigir específicamente los compuestos a las células bacterianas. El segundo problema a resolver es la alta susceptibilidad del ARN, más aún de oligómeros pequeños como los EGSs, a nucleasas bacterianas y del suero humano. Es decir, que aún con un buen método de permeabilización,

la eficiencia de los compuestos se vería muy afectada debido a la degradación de los mismos por las nucleasas celulares y extracelulares.

Por lo tanto, se decidió diseñar un EGS que fuese al mismo tiempo efectivo y resistente a la acción de las nucleasas. Dado que EGSC3 mostró la mayor eficiencia y reproducibilidad in vivo, se diseñaron EGSs con la misma secuencia empleando diferentes análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables. Si bien existe una enorme variedad de estos compuestos (Kurreck 2003), en este estudio se emplearon solamente algunos; por ejemplo se descartaron aquellos que presentan modificaciones en las bases nitrogenadas. En particular, se evaluaron aquellos con modificaciones en los enlaces fosfodiéster pero que además estuvieran disponibles comercialmente. Se decidió analizar los siguientes análogos: oligonucleótidos de fosfortioatos (PS), 2-O-metil-ARN (2-O-Me), ácidos nucleicos cerrados (LNA) y oligonucleótidos de fosforoamidatos de morfolinos (PMOS). La estructura química de estos análogos de ácidos nucleicos se muestra en la Figura 4.6. Los oligonucleótidos de PS resultaron de interés por la alta cantidad de estudios antisentido realizados con ellos y a que la primer droga antisentido aprobada por la FDA para su comercialización, Fomivirsen, fue generada con estos análogos (Roush 1997). De esta manera, se generó un oligómero con la secuencia de EGSC3 sintetizado completamente con ribonucleótidos unidos por enlaces fosfortioatos (Tabla 4.1). Por otro lado, también existen estudios extensivos sobre



oligómeros de 2'-O-Me en estrategias antisentido aunque en general, resultan más efectivos si se emplean como gapmers, es decir reemplazando con análogos las primeras y últimas posiciones del oligonucleótido (Kurreck 2003). Se diseñó entonces un oligoribonucleótido de 2'-O-Me con reemplazos en forma de gapmer (Tabla 4.1). Los LNA resultan apropiados por la similitud estructural con el ARN (Figura 4.6) y por la baja toxicidad demostrada en modelos animales (Gupta et al. 2010; Elmén et al. 2008). Otra propiedad importante de los LNA es que forman las uniones Watson-Crick más fuertes que se conocen (Jepsen & Jesper

Wengel 2004). Se diseñaron dos deoxioligonucleótidos en forma de gapmer: uno donde se priorizó la unión al mensajero reemplazando con LNAs las posiciones complementarias al mensajero (LNA-1) y otro donde se priorizó la protección del EGS contra las nucleasas colocando los reemplazos en ambos extremos del oligonucleótido (LNA-2). Se hace notar que se diseñaron cooligómeros de ADN/LNA ya que los de ARN/LNA no están disponibles comercialmente. Finalmente, también se generó un oligómero de PMO. Si bien este compuesto es el que más difiere estructuralmente al ARN, es muy ventajoso por la permeabilidad de células bacterianas a este tipo de compuestos probablemente por la carga neutra de sus uniones y por la facilidad con la que se le pueden acoplar péptidos permeabilizantes (Figura 4.6). En este sentido, durante la concreción de esta tesis, el equipo de Sidney Altman, informó que en algunos casos, EGSs de PMO acoplados a un péptido permeabilizante pueden inducir el corte de un mensajero mediado por ARNasa P (Shen et al. 2009). Los oligómeros y cooligómeros utilizados en esta parte de la Tesis se indican en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Oligómeros de diferentes análogos de ácidos nucleicos empleados.

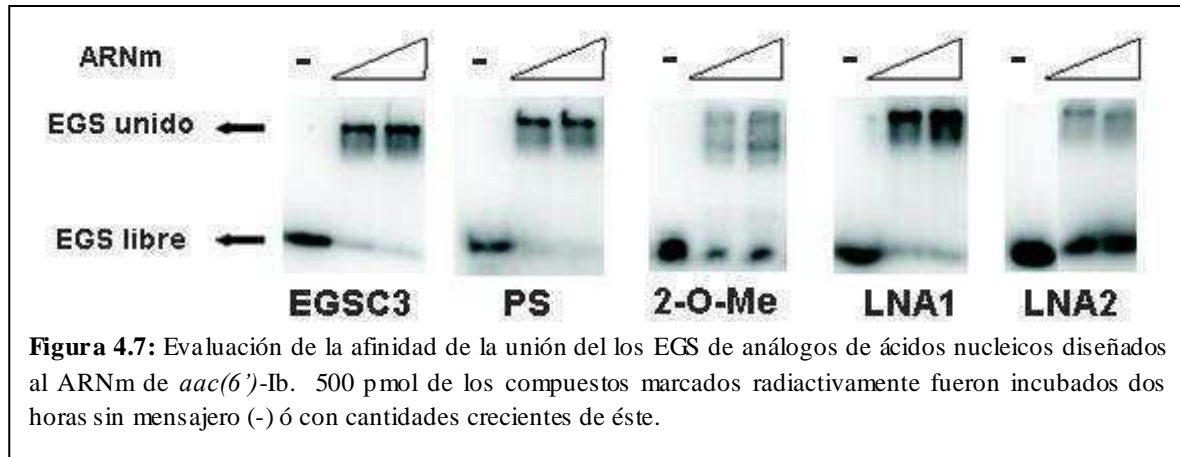
Oligómero	Secuencia y química ^{1,2}
EGSC3	caaguacuguuccacca
Oligonucleótido Fosforotioato (PS)	<i>caaguacuguuccacca</i>
2'-O-metil oligorribonucleótido (2'-O-Me)	CA aguacuguucca CCA
Oligómeros de Morfolino fosforodiamidato (PMO)	CAAGTACTGTTCCACCA
LNA1	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA2	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA1Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>
LNA2Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>

¹Mayúsculas, ADN; minúsculas,ARN; itálicas, fosforotioato; negrita, 2'-O-metil oligorribonucleótido; itálica y negrita, oligómeros de morfolino fosforodiamidato; subrayado, LNA. ² caaguacuguuccacca es la secuencia de EGSC3.

A continuación se verificó la capacidad de unión al mensajero de estos EGS de análogos de ácidos nucleicos en ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Para ello, los diferentes EGS ensayados fueron marcados radiactivamente en su extremo 5', incubados con el mensajero generado por transcripción in vitro en buffer apropiado por dos horas y resueltos

por PAGE no desnaturalizante. Todos los EGSs ensayados se unieron específicamente al mensajero aunque con pequeñas diferencias de afinidad. Como se esperaba LNA1 se unió con mucha mayor afinidad al ARNm de *aac(6')*-Ib que LNA2 (Figura 4.7). El oligomero de PMO no fue analizado en estos ensayos.

A continuación, se ensayó la capacidad de estos compuestos de provocar el corte del



mensajero de *aac(6')*-Ib mediado por ARNasa P. Para ello, el mensajero marcado radiactivamente en 5' fue incubado en un buffer apropiado junto a 5 pmol de cada uno de los EGS y la ribozima. Los ensayos muestran que el único compuesto capaz de repetir el patrón de corte de EGSC3 fue LNA2. Ambos mostraron el corte esperado lo que se manifestó por la formación de un fragmento de unos 250 nts al que se denominó F249. LNA1 mostró poca actividad de corte generando una señal de tamaño diferente al esperado (Figura 4.8A). Por otro lado, el corte generado por LNA2 fue secuencia-específico ya que el LNA2sense no fue capaz de producir el mismo patrón. Además la actividad mostró dependencia de la ARNsa P debido a que la incubación sin ribozima no generó corte del mensajero (Figura 4.8B). Más aún, se observa una clara disminución del mensajero intacto en la calle LNA2 respecto a sus dos controles (Figura 4.8B). Por otro lado, al estudiar la cinética de la reacción empleando una dilución al décimo (0,5 pmol) de EGSC3, LNA1 o LNA2 se observó que LNA2 induce el corte del mensajero con una cinética similar a la del EGSC3 de ARN mientras que el corte inducido por LNA1 resultó despreciable. En presencia de LNA2 ó EGSC3, el 50% del mensajero fue procesado en los primeros 15 minutos cortándose el 95% luego de dos horas de incubación. De todos modos, los experimentos de cinética muestran de manera reproducible que la reacción corte es levemente menos veloz al emplear LNA2 que EGSC3 como EGS. Por el contrario, sólo se cortó menos del 5% del mensajero original en presencia de LNA-1 (Figura 4.8C).

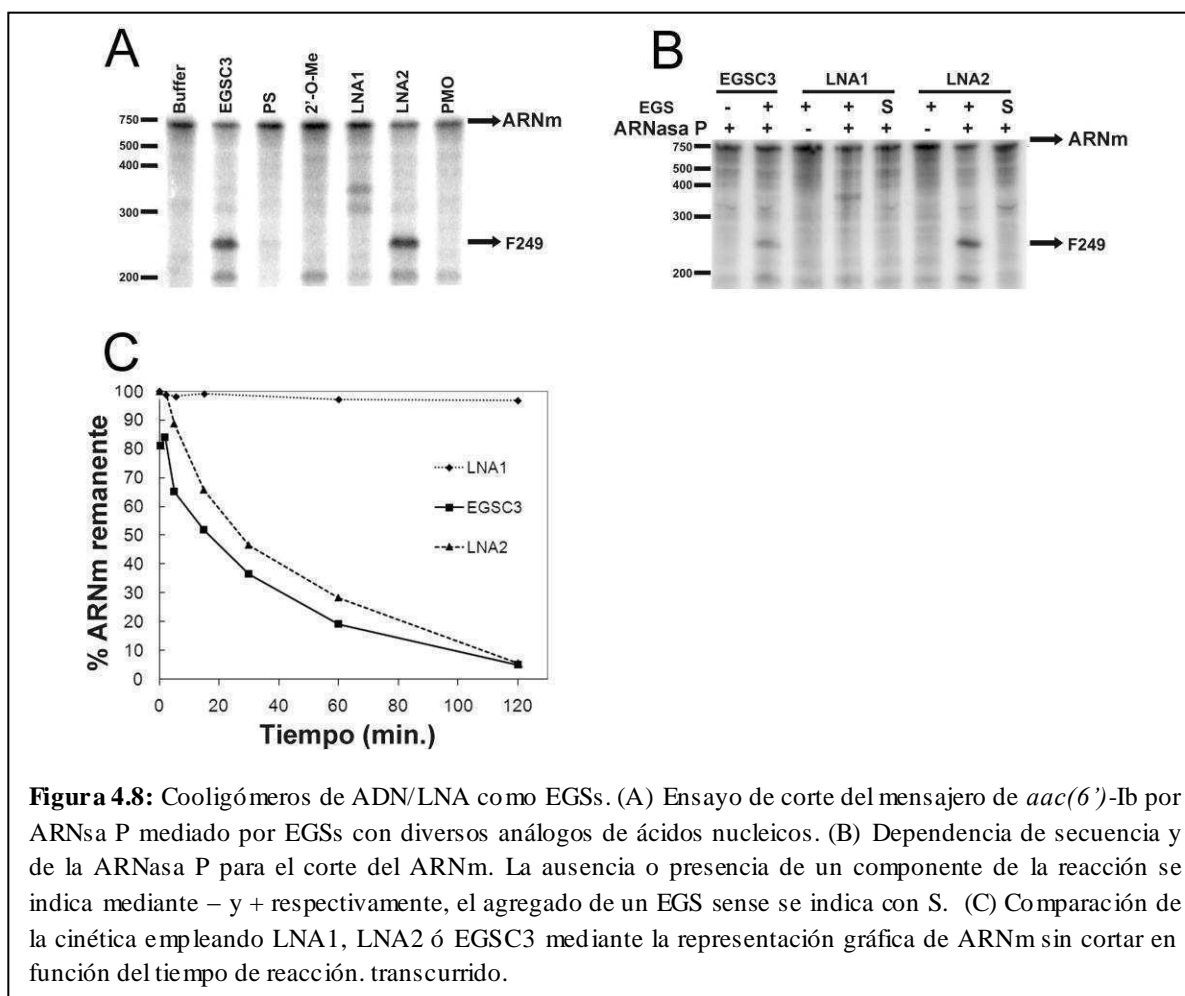


Figura 4.8: Cooligómeros de ADN/LNA como EGSs. (A) Ensayo de corte del mensajero de *aac(6')*-Ib por ARNasa P mediado por EGSs con diversos análogos de ácidos nucleicos. (B) Dependencia de secuencia y de la ARNasa P para el corte del ARNm. La ausencia o presencia de un componente de la reacción se indica mediante - y + respectivamente, el agregado de un EGS sense se indica con S. (C) Comparación de la cinética empleando LNA1, LNA2 ó EGSC3 mediante la representación gráfica de ARNm sin cortar en función del tiempo de reacción, transcurrido.

Conclusiones: de los análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables ensayados, solamente un cooligómero de ADN/LNA (LNA2) fue capaz de dirigir el corte preciso, secuenciadependiente del mensajero *aac(6')*-Ib mediado por ARNasa P. Este corte se produjo con una cinética similar pero algo menor que la del EGSC3. Es interesante que, pese a poseer una menor afinidad al mensajero que LNA1, sólo LNA2 haya sido capaz inducir su corte. Esto muestra que no sólo la naturaleza de los reemplazos es importante, sino que además es crucial en qué posiciones del EGS se realizan los reemplazos con LNA.

3. Efecto de reemplazos con LNA en cooligómeros de LNA/DNA empleados como EGSs.

Los resultados del punto anterior mostraron que además de la naturaleza de los análogos de ácidos nucleicos empleados, también es fundamental dónde se realizan los reemplazos si se diseña un EGS de ADN/LNA. Las diferencias observadas entre LNA1 y LNA2 resultaron

interesantes teniendo en cuenta que los LNA generan pares Watson-Crick muy fuertes y que los reemplazos en el EGS que generaron actividad fueron en aquellas bases que interactúan con la ribozima (la secuencia conservada ACCA). Por otra parte, es posible que reemplazos en la zona complementaria al mensajero colaboraren en un mejor reconocimiento del EGS como sustrato de corte, mejorando la actividad ARNasa P. De este modo, se decidió primero determinar una configuración ideal de reemplazos en la secuencia consenso del EGS ACCA para luego ensayar diferentes configuraciones en la zona complementaria al mensajero.

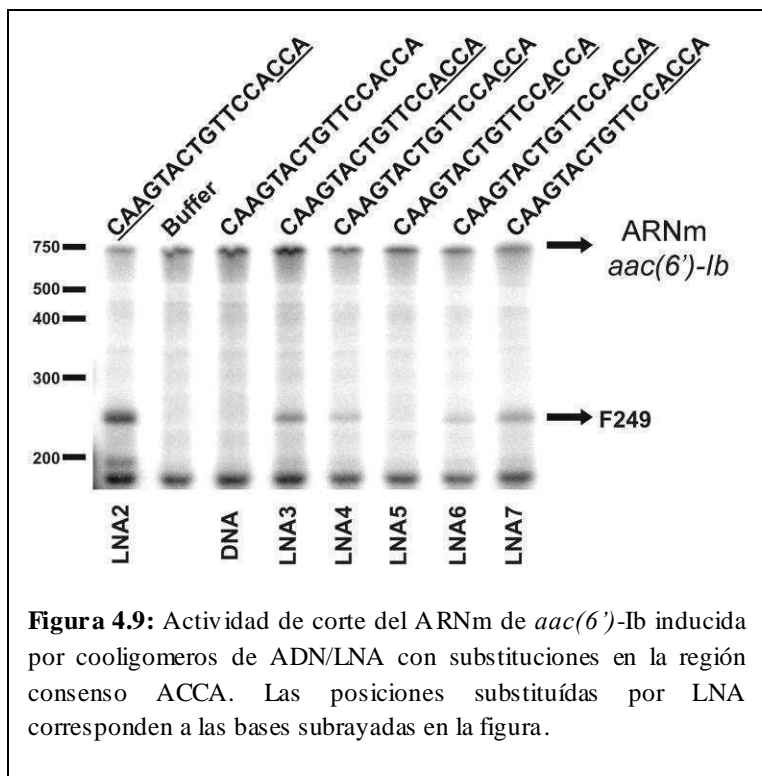
Tabla 4.2. Cooligómeros de ADN/LNA empleados.

Oligómero	Secuencia y química ^{1,2}
DNA	CAAGTACTGTTCCACCA
LNA3	CAAGTACTGTTCC <u>ACCA</u>
LNA4	CAAGTACTGTTCC <u>ACCA</u>
LNA5	CAAGTACTGTTCC <u>ACCA</u>
LNA6	CAAGTACTGTTCC <u>ACCA</u>
LNA7	CAAGTACTGTTCC <u>ACCA</u>
LNA8	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA9	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA10	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA11	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA9Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>
LNA10Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>
LNA9random	<u>AGGCATCTATACCACCA</u>
LNA10random	<u>AGGCATCTATACCACCA</u>

¹Mayúsculas, ADN; minúsculas,ARN; subrayado, LNA.² caaguacuguuccacca es la secuencia de EGSC3.

a. Estudio de reemplazos con LNA en la secuencia consenso ACCA.

Se realizaron ensayos de actividad ARNasa P similares a los explicados anteriormente empleando los LNA3 a LNA7 de la Tabla 4.2. Estos poseen diferentes configuraciones de reemplazos en la secuencia consenso ACCA de los EGS dejando la zona complementaria al



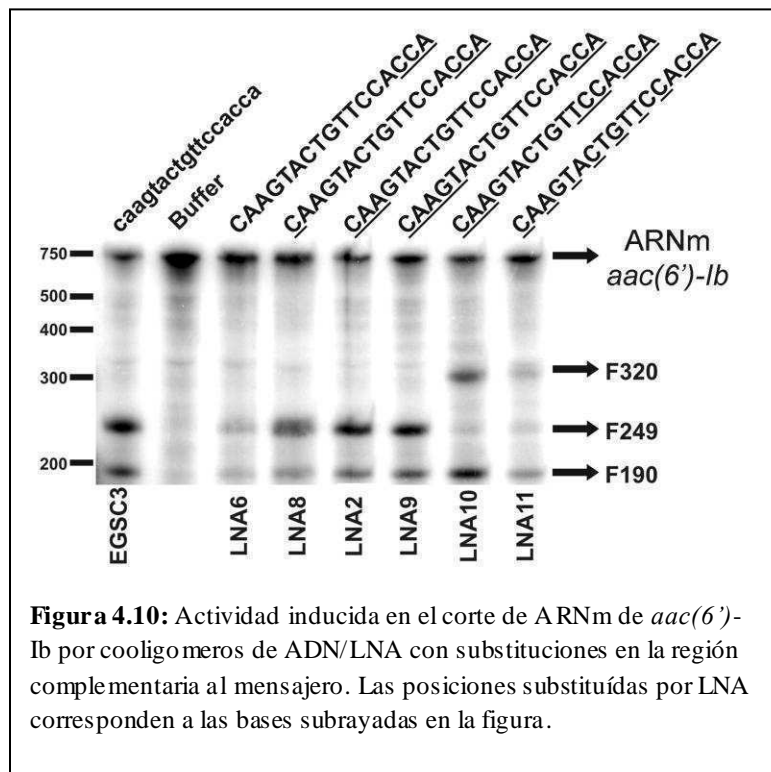
mensajero sin sustituciones. Los resultados pueden visualizarse en la Figura 4.9. En primer lugar, se observa que el reemplazo de las dos citosinas centrales de la secuencia consenso ACCA (LNA4 en la Tabla 4.2) fue necesario y suficiente para hacer que un EGS de ADN (DNA en la Tabla 4.2) genere un corte en el mensajero. El subsiguiente reemplazo de las dos adeninas adyacentes (LNA 3 en la Tabla 4.2) aumentó la

actividad. Sin embargo, el reemplazo de las dos adeninas no generó corte en el mensajero si no se reemplazan también las dos citosinas centrales (LNA5 en la Tabla 4.2). Al comparar LNA7 con LNA6 se observa que el reemplazo de la primera adenina en la secuencia consenso reforzó la actividad. Más aún, LNA7 mostró una actividad similar a LNA3 que fue el compuesto de mayor actividad (entre aquellos que no tienen reemplazos en la parte complementaria al mensajero) en el que todas las posiciones de la secuencia consenso están substituidas por LNA. El efecto del reemplazo en la primera adenina concuerda con estudios previos que señalan que esta base interactúa directamente con la ARN M1 de la ARNasa P por uniones Watson-Crick (Wegscheid & Hartmann 2007; Perreault & S Altman 1992; Svärd et al. 1996; L A Kirsebom & Svärd 1994). Por otro lado, LNA2 que lleva tres substituciones en la zona complementaria al mensajero, induce el corte del ARNm de *aac(6')-Ib* con mayor eficiencia que LNA6. Esto demuestra que el reemplazo de posiciones en la zona complementaria al mensajero es importante para reforzar la actividad de la ARNsa P.

b. Reemplazos en la secuencia complementaria al mensajero de *aac(6')-Ib*.

Para el análisis del efecto de reemplazos en la región complementaria al ARNm se ensayaron tres configuraciones de reemplazos diferentes: alternados (mixmers) en el caso LNA11, en ambos extremos (gapmer) en LNA10 ó bien un número creciente de substituciones en el extremo 5' del EGS. De este modo se ensayaron EGSs sin reemplazos (LNA6) o bien con

uno (LNA8), tres (LNA-2) y cinco reemplazos (LNA9). Todos estos compuestos se indican

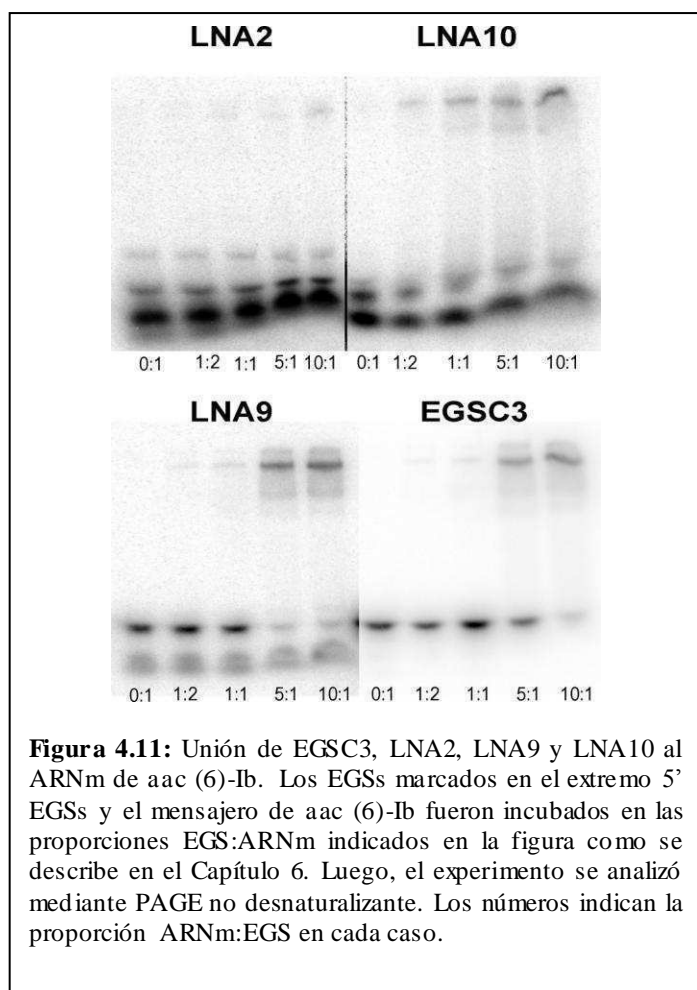


en la Tabla 4.2. En estos casos, la configuración en la secuencia ACCA se mantuvo constante: se substituyeron las últimas tres bases de la secuencia consenso ACCA dado que generarían una buena protección contra nucleasas del extremo 3' con el mínimo de reemplazos, lo cual evita posibles interacciones inespecíficas con otros genes.

Se ensayó la actividad de cada compuesto (5 pmol) de inducir

el corte del mensajero de *aac(6')-Ib* marcado radiactivamente en el 5' en presencia de la ARNasa P en las mismas condiciones utilizadas en los experimentos anteriores. Se observó que los reemplazos en el extremo 5' generaron una capacidad de corte creciente que se equiparó más allá de las tres substituciones, siendo LNA2 y LNA9 con tres y cinco reemplazos respectivamente, aquellos de mayor actividad (Figura 4.10). Esta propiedad podría deberse a una mayor afinidad por el mensajero. LNA10, con configuración de gapmer, también mostró una alta inducción del clivaje del mensajero de *aac(6')-Ib*. En contraste el mixmer, LNA11, mostró una actividad relativamente débil. Curiosamente, tanto el mixmer como el gapmer, generaron cortes en el ARNm de *aac(6')-Ib* en posiciones no esperadas: mayoritariamente un fragmento de unos 320 nts (F320) pero también uno en proporción minoritaria de 190 nts (F190). Además, produjeron el fragmento de tamaño esperado, F249, pero en baja proporción (Figura 4.10). Una posibilidad es que la estructura secundaria y/o terciaria del mensajero sea capaz de interactuar con LNA10 y LNA11, explicando entonces los cortes en sitios diferentes a los esperados. Experimentos a tiempos cortos desnaturizando previamente el mensajero por calor podrían apoyar o rechazar esta suposición. Por otro lado, se ha descrito que EGSs de PMOs conjugados a un péptido permeabilizante también generan cortes de tamaño diferente al esperado (Shen et al. 2009).

c. Estudio de la afinidad de los EGSs de ADN/LNA al mensajero de *aac(6')*-Ib.



En las secciones anteriores se describió que la actividad de los EGSs expresados in vivo tiene correlación con la capacidad de unión al mensajero. Además, LNA2 mostró baja afinidad al mensajero si se lo compara con EGSC3 ó con LNA1 (Figura 4.7). Por otro lado, tanto LNA2 como LNA9 y LNA10 mostraron in vitro muy buena actividad de corte del mensajero del gen de resistencia a Ak. Dado que LNA9 y LNA10 poseen más substituciones en la zona complementaria al mensajero se predijo una mayor capacidad de unión al mensajero por parte de estos que LNA2. Se realizaron entonces

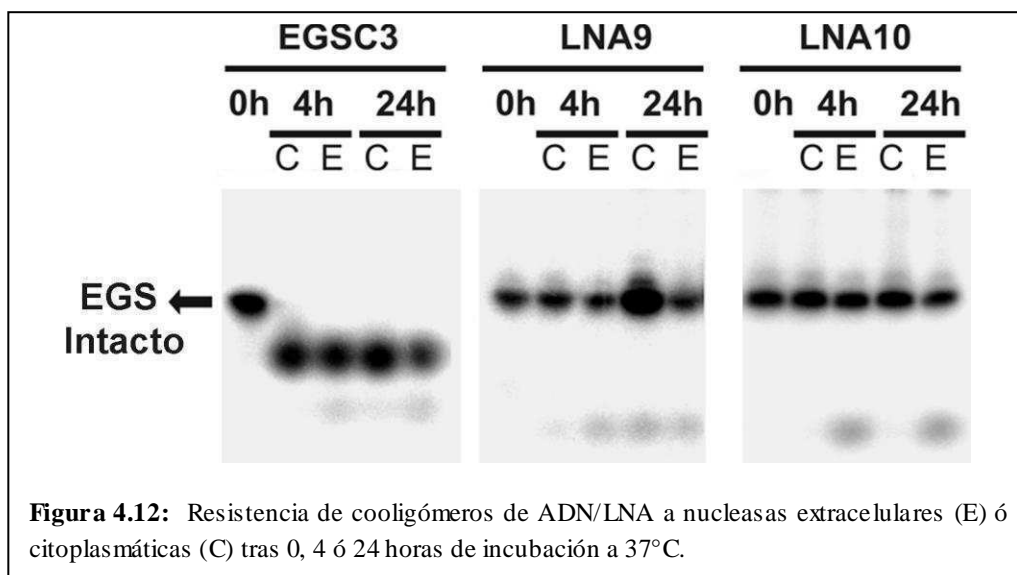
ensayos de EMSA con el fin de comparar la afinidad por el mensajero de EGSC3, LNA2, LNA9 y LNA10. Para ello se marcó radiactivamente el extremo 5' de los cuatro compuestos con ^{32}P , se incubó con cantidades crecientes del mensajero de *aac(6')*-Ib y se resolvió en PAGE no desnaturizante. Los resultados indican que tanto LNA9 como LNA10 poseen una afinidad al mensajero muy superior a la LNA2 y una afinidad similar o superior a la del EGSC3 (Figura 4.11). Por lo tanto estos dos últimos compuestos presentan dos de las propiedades deseables en un EGS: alta afinidad por la molécula blanco y buena capacidad de inducir el corte del mensajero mediado por ARNasa P.

Conclusiones: los resultados de esta sección indican que los reemplazos con LNA dentro de un EGS de ADN, en las posiciones correspondientes a la secuencia consenso ACCA son absolutamente necesarios para que la inducción del corte del mensajero mediado por la ARNasa P ocurra in vitro: un EGS con gran afinidad al mensajero como LNA1 no es capaz de inducir el clivaje del mismo. Dentro de esta secuencia el reemplazo de las dos C centrales resultó crucial.

Además, la sustitución de la primera adenina refuerza la actividad. También son importantes las efectuadas en la zona complementaria al mensajero ya que permiten aumentar la actividad. Nuestros resultados señalan que no hay una correlación entre el número de reemplazos y la actividad ARNasa P inducida por el EGS sino más bien una configuración y número ideal de sustituciones. Los experimentos realizados permitieron generar dos cooligómeros de ADN/LNA, LNA9 y LNA10, que no sólo poseen una alta capacidad de inducir el corte del mensajero de *aac(6')-Ib* in vitro sino que además son muy afines al mismo. Ambos EGSs poseen buenas perspectivas de poder generar la conversión fenotípica de resistencia a susceptibilidad in vivo.

4. Resistencia a nucleasas bacterianas.

El siguiente paso fue evaluar la resistencia a la degradación de los oligonucleótidos que mostraron las mejores propiedades in vitro, LNA9 y LNA10, y compararlos con EGSC3. A pesar de que la resistencia a nucleasas está bien documentada en suero humano y animal (C Wahlestedt et al. 2000; Kurreck et al. 2002; Schmidt et al. 2004), no existen registros de esta propiedad en sistemas bacterianos. Por lo tanto, se marcaron radiactivamente con ^{32}P en el extremo 5' tanto de EGSC3 como LNA9 y LNA10. Se utilizaron cultivos de *E. coli* en etapa de crecimiento exponencial. Una fracción del cultivo fue sonicada suavemente para liberar



enzimas citoplasmáticas. Se incubó 1 µl de oligonucleótido marcado (≈20 pmol) marcado con 7 µl de células intactas o los extractos obtenidos por sonicación suave a 37°C durante diferentes tiempos. Luego, cada muestra fue analizada por PAGE en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes. Como se observa en la Figura 4.12, tanto LNA9

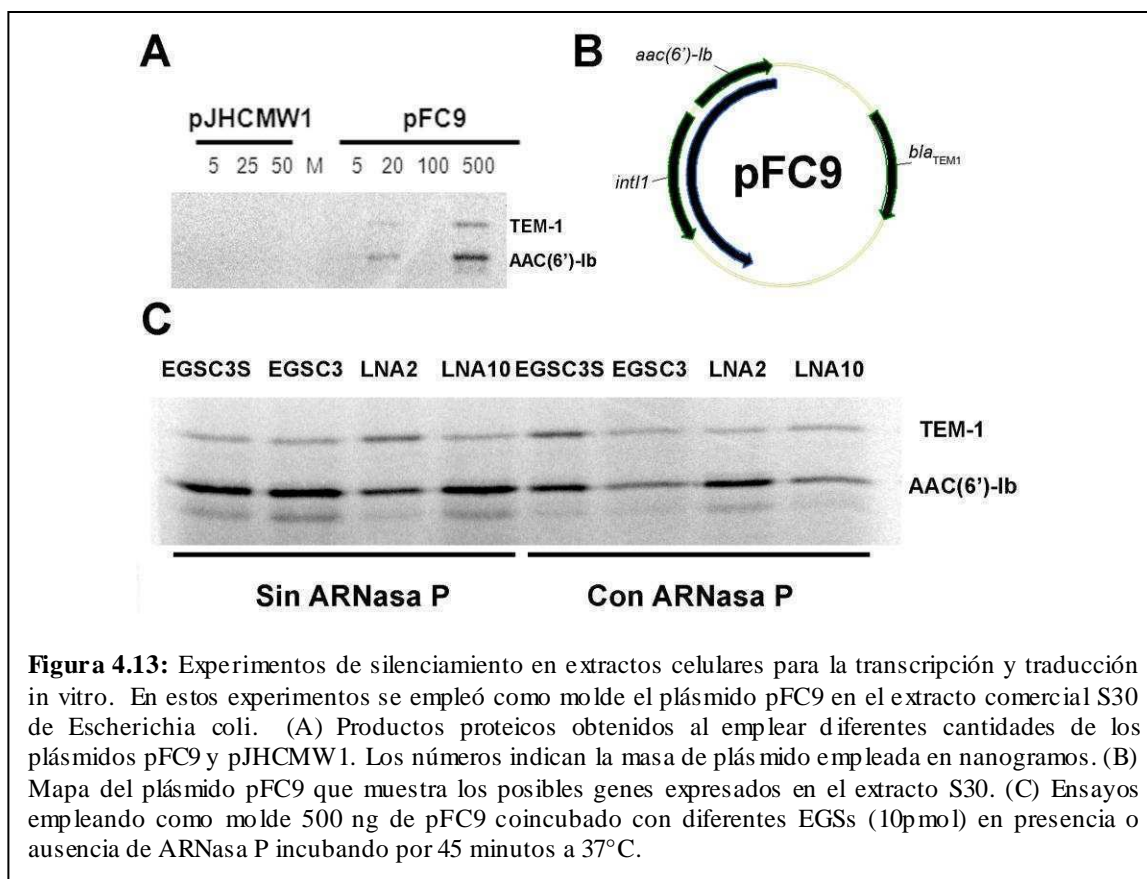
como LNA10 fueron sumamente refractarios a la degradación por nucleasas de cultivos bacterianos o de extractos celulares. Por otro lado, tras una sola hora de incubación, EGSC3 fue completamente degradado. En contraste, aún después de 24 horas de incubación con células enteras o con el extracto obtenido luego de la sonicación suave, tanto LNA9 como LNA10 permanecieron casi intactos.

Conclusiones: los cooligómeros de ADN/LNA mostraron ser resistentes a las nucleasas intra y extracelulares de E.coli. Esta propiedad es fundamental para aproximarse a un uso farmacológico de estos compuestos.

5. Sistemas de traducción y transcripción in vitro como aproximación a un sistema vivo.

Como ya se mencionó, el análisis del efecto de los EGS in vivo es problemático por la baja permeabilidad celular a los análogos de ARN. Por este motivo, se decidió utilizar un extracto que promueva la transcripción-traducción acopladas in vitro como una aproximación alternativa a un citoplasma bacteriano. Si bien existen en bibliografía varias posibilidades para preparar extractos celulares más o menos sencillas y eficientes (Köhler et al. 1996; T.-W. Kim et al. 2006), se empleó un sistema estandarizado: el extracto S30 de E. coli que además es asequible comercialmente. Sin embargo, se ignoraba si el extracto posee actividad de ARNasa P. Como molde de la transcripción y traducción se probaron los plásmidos pJHCMW1 (Sarno et al. 2002, ver Capítulo 3) y pFC9 (Figura 4.13B y ver Capítulo 3). En los ensayos preliminares de transcripción y transcripción in vitro acoplados, se observó que el primero no tuvo la funcionalidad que sí mostró el segundo (Figura 4.13A). Además pFC9, dado su alto número de copias, es más fácil de purificar en las cantidades necesarias para los ensayos (500 ng por reacción). Empleando entonces este plásmido como molde de la reacción se observó la producción de dos proteínas que por peso molecular aparente corresponderían a AAC(6')-Ib (24,5 kDa) y TEM1 (32 kDa). Sería muy poco probable que la proteína de mayor tamaño fuera la integrasa de InV117 debido a que está bajo control transcripcional de un promotor débil. Además, se predice para TEM1 una proteína de mayor tamaño (38,5 kDa) a las visualizadas en el gel (Figura 4.13B). Se analizó entonces cómo se comporta el sistema al adicionar 10 pmol (0,6 pmol/ μ l) de EGSC3, EGSC3sense, LNA2 ó LNA10. Se esperaba que, en caso de estar presente la ARNasa P en el extracto S30, EGSC3 debería interferir con el mensajero disminuyendo la cantidad de proteína de 25 kDa, respecto a la que produce un extracto al que se le agrega EGSC3sense (Figura 4.13C). Sin embargo,

la presencia de ninguno de los EGSs afectó la síntesis de AAC(6')-Ib. Esta observación

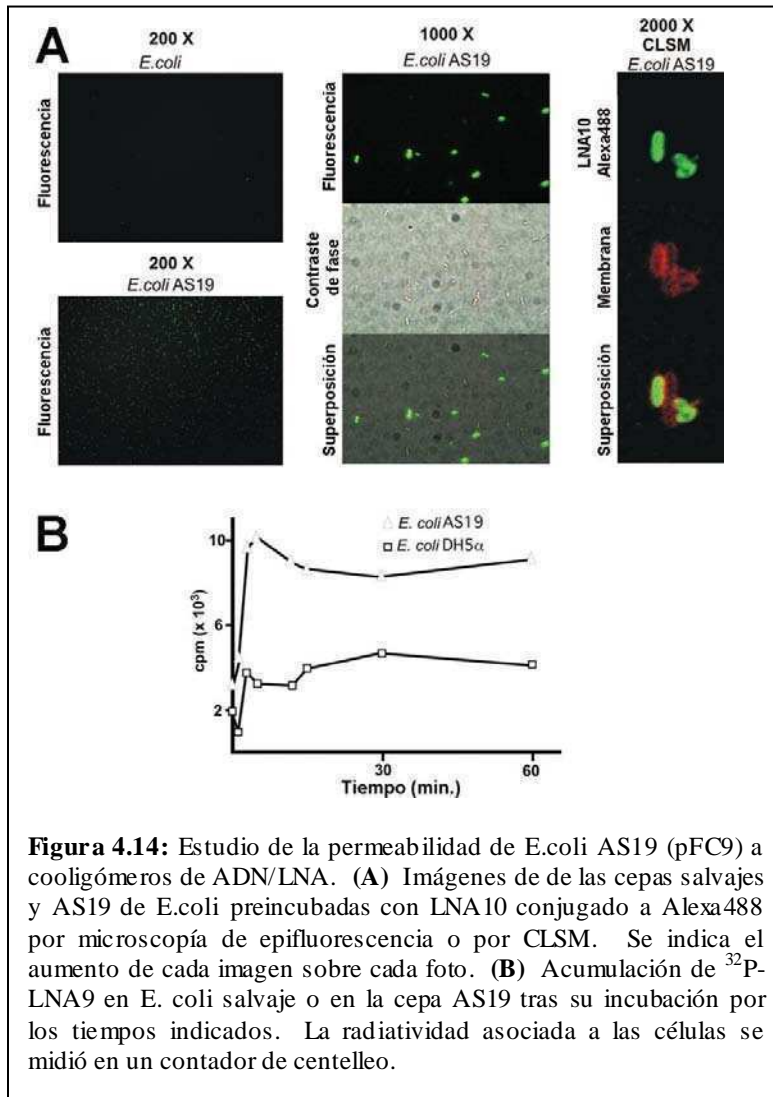


sugiere que el extracto no incluye (al menos en cantidad suficiente) a la ARNasa P. Extrañamente, LNA2 pareciera tener cierto efecto, aún en ausencia de ARNasa P, lo cual esto podría deberse al impedimento estérico de la traducción. Se decidió adicionar ARNasa P a la mezcla de reacción (Ver Capítulo 6). Con el agregado de la ribozima al sistema se observa que la proteína de 25 kDa se produce en menor cantidad en presencia de EGSC3 que al agregar EGSC3sense. Esto sugiere fuertemente que la ARNasa P inhibe la expresión de la proteína blanco en presencia de un EGS adecuado en el sistema estudiado. En estos ensayos se observa que LNA10, pero no LNA2, es capaz de silenciar la expresión del gen de resistencia a Ak. Resultó interesante que al igual que el efecto in vivo de EGSs expresados desde plásmidos, se observa una correlación de la actividad del EGS con la capacidad de unión al mensajero del cooligómero de ADN/LNA. Sin embargo, será necesario probar otros EGSs dirigidos contra diversos genes antes de poder enunciar con más seguridad esta afirmación.

Conclusiones: se analizó el efecto de EGSs sobre un sistema de transcripción y traducción acopladas in vitro. Resultó destacable que, en presencia de ARNasa P, LNA10 pero no LNA2, fue capaz de inhibir la síntesis de AAC(6')-Ib. Este efecto no se

observó en ausencia de la ribozima. Por lo tanto, LNA10 podría estar mediando el corte por ARNasa P del mensajero de *aac(6')*-Ib reduciéndose así la síntesis del producto proteico. Estos resultados apoyan la hipótesis que cooligómeros de ADN/LNA podrían dirigir in vivo la inhibición del gen de resistencia por la ARNasa P.

6. Evaluación del efecto in vivo de los EGSs de ADN/LNA sobre el fenotipo de resistencia a Ak.



En estudios anteriores, tanto de nuestro grupo como de otros autores, los EGSs han sido expresados desde plásmidos. Al momento de la realización de esta Tesis no existían antecedentes de administración exógena de EGSs en sistemas bacterianos. Sin embargo, existían algunos estudios sobre el efecto antisentido de oligónucleótidos administrados exógenamente a bacterias por electroporación (D G White et al. 1997; R Sarno et al. 2003), análogos con esqueletos no cargados (PMO y peptide nucleic acids, PNAS) y PNAS ó PMOS

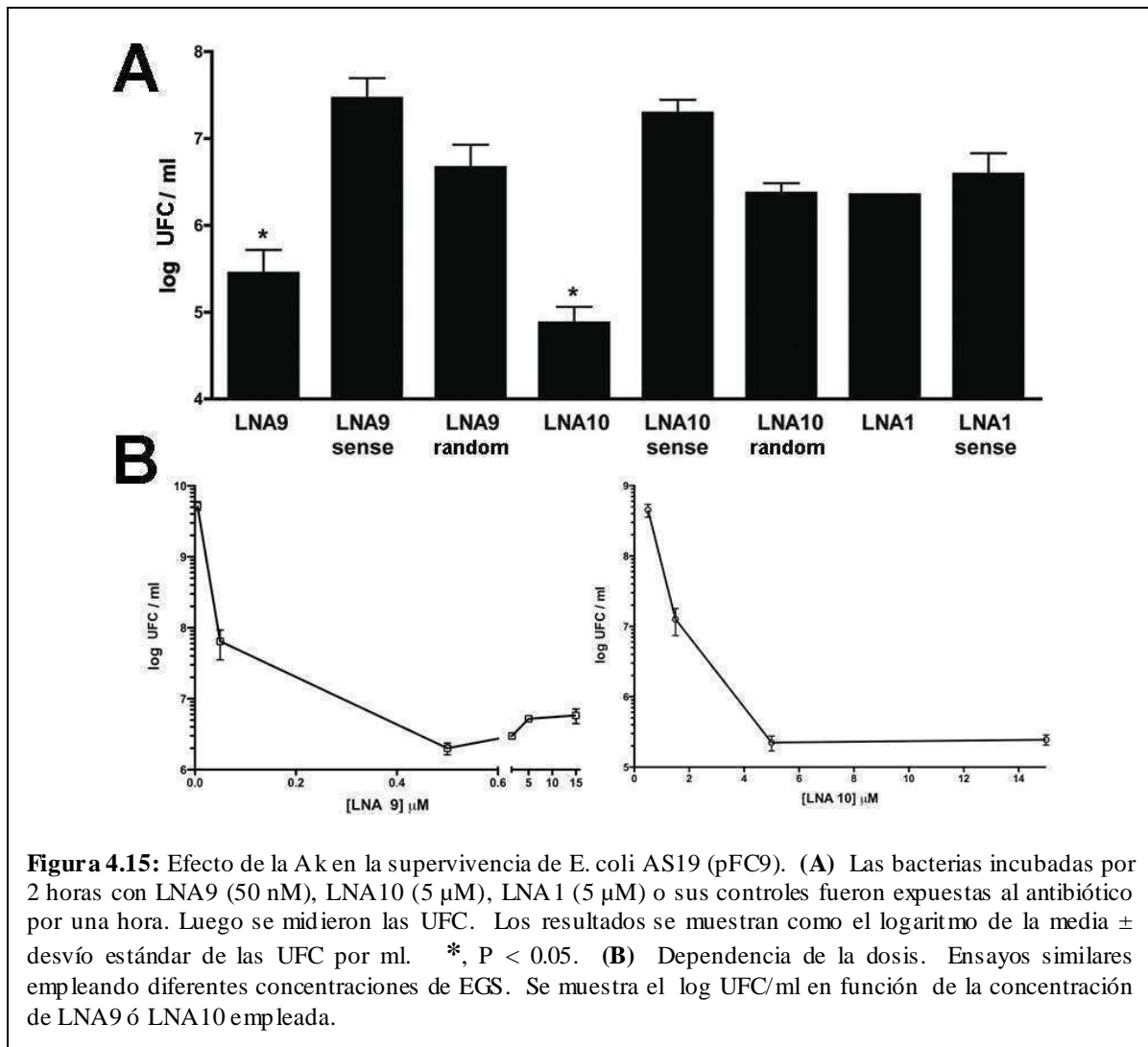
acoplados a péptidos ricos en arginina, de propiedades permeabilizantes (B. L. Geller et al. 2005; L. D. Tilley et al. 2007; L Good et al. 2001; Liam Good et al. 2000; L Good 2003; L Good & P E Nielsen 1998). Dado que se considera a los microorganismos (particularmente a los Gram negativos) impermeables a los oligonucleótidos (H Nikaido 1994) y que experimentos preliminares de electroporación con cooligómeros resultaron poco

informativos, se decidió emplear una bacteria hiperpermeable (*E. coli* AS19) (Sekiguchi & Iida 1967) debido a un defecto en su LPS (Liam Good et al. 2000).

En primer lugar se determinó la capacidad de los cooligómeros de penetrar a la célula de *E. coli* AS19 portadora del plásmido de alto número de copias pFC9 que aloja *aac(6')*-Ib que le confiere resistencia a Ak (ver Capítulo 3). Con este fin se incubaron *E. coli* (pFC9) y *E. coli* AS19 (pFC9) en solución fisiológica con LNA10 acoplado al fluoróforo verde Alexa-488 como se indica más adelante (ver Capítulo 6, visualización de la entrada de EGS a las células mediante microscopías). Luego de los lavados, se observó el preparado por microscopía de epifluorescencia o bien por microscopía láser confocal (CLSM). La Figura 4.14A, muestra cómo *E. coli* AS19 incorpora en una proporción mucho mayor que la cepa salvaje el oligonucleótido verde fluorescente. Además se observa que el compuesto es retenido en alta concentración, y por lo tanto se visualiza en aproximadamente un 50% de las células. Para mostrar que el EGS se encuentra en el citoplasma y no queda retenido en membrana o en el periplasma bacteriano se observaron por CLSM secciones menores a 0,7 μm . Simultáneamente, se empleó para estos experimentos un colorante fluorescente rojo específico de membrana (FM5-95) luego del tratamiento con LNA10 fluorescente verde. En la Figura 4.14A, (CLSM) se muestra un campo representativo. Se observa que las membranas y la fluorescencia verde del oligonucleótido no co-localizan quedando esta última en el interior bacteriano. Experimentos realizados con el oligonucleótido LNA9 marcado radiactivamente y no con fluorescencia muestran resultados similares lo que descarta que la mayor permeabilidad se deba a la conjugación con el colorante Alexa-488 (Figura 4.14B).

Una vez demostrado que los cooligómeros de ADN/LNA son capaces de alcanzar el interior de AS19, para evaluar si los EGS diseñados podrían ser efectivos *in vivo*, se procedió a incubar *E. coli* AS19 (pFC9) en presencia de 50 nM LNA9 ó 5 μM de LNA10 durante dos horas en placas multipocillo por triplicado como se describe en el Capítulo 6. Luego se adicionó Ak hasta alcanzar una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se incubaron por una hora más y finalmente se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en cada pocillo. Como controles se emplearon EGS con la secuencia complementaria e invertida y la misma configuración de reemplazos (LNA9sense y LNA10sense, Tabla 4.2) o controles con una secuencia complementaria al gen de la fosfatasa alcalina pero con la misma configuración de reemplazos (LNA9random y LNA10random Tabla 4.2). La figura 4.15A muestra el promedio de 3 experimentos realizados por triplicado. Se observa que LNA9 y LNA10 presentaron hasta 2 órdenes de magnitud menos de UFCs que los controles. También

se observó que la actividad fue dependiente de la dosis (Figura 4.15B). Al realizar experimentos similares con LNA1, que posee una configuración de reemplazos similar a



LNA10 pero sin sustituciones en la secuencia ACCA (ver Tabla 4.1), no se observaron diferencias respecto al control LNA1sense. Esto sugiere fuertemente que LNA9 y LNA10 generan un efecto antisentido por un mecanismo mediado por la ARNasa P.

Conclusiones: se mostró que los cooligómeros de ADN/LNA, no degradables por nucleasas, LNA9 y LNA10, generan una merma en el número de bacterias en un cultivo al administrarlos exógenamente junto a Ak. Este efecto fue dosis dependiente para ambos compuestos. Sin embargo, no fueron igualmente efectivos ya que LNA9 generó una reducción significativa en el número de células a concentraciones 100 veces menores que LNA10 (50 nM vs 5 μ M). Por otro lado, el hecho de que LNA1, que no genera corte in vitro, no tenga efecto in vivo pese a poseer alta afinidad al mensajero sugiere fuertemente que las diferencias observadas in vivo sean mediadas por ARNasa P. Se dio

prueba al concepto de la inhibición de un gen bacteriano por adición exógena de un oligonucleótido antisentido a un cultivo bacteriano, aunque en un contexto de hiperpermeabilidad bacteriana. Futuros trabajos en esta línea deberán profundizar en el abordaje de tecnologías que promuevan la entrada de los EGS de ADN/LNA al citoplasma bacteriano.

CAPITULO 5:

Discusión

Al inicio de esta Tesis se propuso como objetivo contribuir al conocimiento de los mecanismos que contribuyen a la dispersión de la resistencia a amikacina (Ak) y generar estrategias que permitan prolongar su uso a pesar del creciente número de cepas resistentes. En este aspecto, se diseñó un proyecto cuyo objetivo a largo plazo es el desarrollo de moléculas antisentido como herramientas farmacológicas que permitan inhibir selectivamente la expresión del gen *aac(6')-Ib*. La relevancia del análisis de los mecanismos de dispersión del gen en aislamientos clínicos de nuestro país se debe a que: i) el gen está ampliamente extendido entre las cepas resistentes a Ags; ii) también ha cobrado gran relevancia a nivel internacional y iii) su variante *aac(6')-Ib_{CR}* es el primer gen capaz de modificar dos antibióticos de familias diferentes al mismo tiempo. De este modo, inhibidores de la expresión del gen serían de gran utilidad a nivel nacional e internacional. Por otro lado, las técnicas de silenciamiento desarrolladas en esta tesis podrían eventualmente extenderse a otros genes bacterianos.

1. Dispersión de *aac(6')-Ib*:

a. InV117

Por un lado, se analizó el contexto genético del gen en dos aislamientos clínicos a fin de entender la capacidad de dispersión de *aac(6')-Ib* tanto a nivel molecular como celular. En estudios previos el gen fue identificado dentro del Tn1331 (M E Tolmasky 2000) o bien alojado en un integrón similar InS21 ó In35 (S. M. Arduino et al. 2003; B. E. Orman et al. 2002; J. A. Di Conza & G. O. Gutkind 2010). Es importante remarcar que estructuras coincidentes con Tn1331 que conferían resistencia a Ak, se hallaron en aislamientos de varias localidades del país (R. M. Chamorro et al. 1990). Por otro lado, los aislamientos clínicos donde *aac(6')-Ib* fue identificado incluido en integrones provienen de la Ciudad de Buenos Aires. *Vibrio cholerae* M1516 es un aislamiento clínico del norte del país que mostró resistencia a Ak y a antibióticos β -lactámicos que podía ser transferido por conjugación a *E. coli*. El elemento conjugativo capaz de transferir las resistencias a antibióticos fue un plásmido de unos 150 Kpb (Alejandro Petroni et al. 2002) al que denominamos pAS1. Al inicio del proyecto, la primer hipótesis de trabajo fue que las resistencias observadas se debían a una estructura tipo Tn1331 (A. J. Soler Bistué 2005). Tras secuenciar de 15,723 pb correspondientes al plásmido pAS1 sorpresivamente el gen *aac(6')-Ib* se encontró asociado a un integrón, InV117, similar a los encontrados en aislamientos de Buenos Aires.

Si bien InV117 y otros integrones de aislamientos clínicos de nuestro país presentan una estructura casi idéntica, se hallan en plásmidos muy diferentes (S. M. Arduino et al. 2002; Power et al. 2005; J. A. Di Conza & G. O. Gutkind 2010; J. Di Conza et al. 2002). De esta manera, cobra importancia la dispersión a nivel molecular de estas estructuras genéticas,

siendo que la misma plataforma es movilizada por diferentes replicones. Los resultados de este trabajo dan indicios de cómo dichas estructuras pueden estar pasando de replicón en replicón, ya que se encontró al integrón asociado físicamente a diferentes genes de transposición. Es interesante notar que el contenido de G+C% del IS4321R insertado es notablemente distinto al del resto del integrón, lo cual muestra un origen diferente y sugiere que la incorporación de este elemento a InV117 fue reciente. Es posible que esta inserción estabilice al transposón manteniendo así sus genes de resistencia en el plásmido.

Otro hallazgo de interés es la nueva variante de *aac(6')*-Ib, que sumada a las variantes ya descritas refuerza la idea de la flexibilidad que posee la proteína en su amino-terminal. Esta característica explicaría la alta frecuencia con que se encuentra al gen *aac(6')*-Ib como primer casete de integrones, ya que eventos de recombinación ilegítima que generen errores o inserciones de aminoácidos en el gen no afectarían su actividad enzimática. La proliferación a nivel local y global de una nueva variante del gen, *aac(6')*-Ib_{CR} que genera al mismo tiempo resistencia a Ak y fluorquinolonas (Robicsek et al. 2006) aumenta la importancia de esta observación. Recientemente caracterizamos varios aislamientos clínicos que alojan esta variante en integrones, siempre como primer casete (M. P. Quiroga et al. 2007). Esta última plataforma genética se ha distribuido ampliamente en la clínica en los últimos años y se la encuentra frecuentemente asociada a cepas medianamente resistentes a fluorquinolonas (Resultados no publicados en colaboración con el Instituto Malbrán). Los datos obtenidos en esta Tesis llevan a pensar que este gen de resistencia seguirá siendo de interés en el contexto clínico de nuestro país.

Dado que el plásmido pAS1 posee unas 150 Kpb se decidió analizar por secuenciación 15.723 pb, es decir, solamente el 10% de su secuencia (Alejandro Petroni et al. 2002). El gran tamaño de este plásmido coincide con las características observadas en plásmidos de amplio rango de hospedador (Ver Capítulo 1: Introducción). En las regiones restantes de la secuencia, que sería interesante analizar, se deben hallar necesariamente sistemas de replicación, estabilización y transferencia (Ver Capítulo 1: Introducción). Toda esta información sería de gran valor para comprender la diversidad de plásmidos, sistemas genéticos para los cuales no existen bases de datos tan organizadas como para los genomas bacterianos. Para secuenciar completamente pAS1, sería necesaria la preparación del plásmido por ultracentrifugación con un gradiente de cloruro de cesio dado que es un plásmido de gran tamaño y bajo número de copias. Para su secuenciación completa debería

haberse fragmentado y subclonado. Con la secuencia completa, se podrían determinar los elementos necesarios para su replicación (*oriV*), mantenimiento (posibles sistemas de partición, sistemas toxina-antitoxina, etc), conjugación (*SST4* 4, *oriT*, etc) así como otros determinantes de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas no identificados en esta Tesis (Alejandro Petroni et al. 2002).

Por último, *V. cholerae* M1516 resulta de interés por otro motivo: la infección por este microorganismo no suele ser tratada con antibióticos. ¿Cómo llegó entonces el plásmido *pAS1* a *V. cholerae*? Muy probablemente pudo haber sido transferido por conjugación desde una enterobacteria. Es destacable entonces que *V. cholerae* podría estar actuando como reservorio de genes de resistencia como *aac(6')-Ib*. Paralelamente, los casetes de los integrones podrían ingresar (e intercambiarse) con aquellos de los superintegrones cromosómicos de *V. cholerae* favoreciendo su dispersión (Biskri et al. 2005; T. R. Walsh 2006).

b. pMET1

El gen de resistencia a Ak, también se propaga en el ámbito clínico, particularmente en el caso de aislamiento de cepas de *K. pneumoniae*, mediante el transposón *Tn1331* (M E Tolmasky 2000) y su derivado *Tn1331.2* (Marcelo E Tolmasky et al. 1988). *Tn1331.2* posee una duplicación de los genes de resistencia a antibióticos *aac(6')-Ib*, *aadA* y *oxa-9*. Entre los plásmidos que alojan elementos del tipo *Tn1331* sólo se había caracterizado uno de ellos: *pJHCMW1* proveniente de un aislamiento del Hospital de Niños de Buenos Aires (Renee Sarno et al. 2002). Por otro lado, los vectores que alojan a este tipo de transposones varían mucho de aislamiento en aislamiento (R. M. Chamorro et al. 1990; M E Tolmasky et al. 1988). Por este motivo, resultaba de interés secuenciar completamente otro plásmido que albergara un transposón similar a *Tn1331*. El plásmido *pMET1* proveniente de *K. pneumoniae* FC1, aislado en una ciudad distante de Buenos Aires como Mendoza, en donde produjo la muerte de varios neonatos en la sala de cuidados intensivos del Hospital “Luis Lagomaggiore” resultaba especialmente interesante. El plásmido *pMET1* alberga al transposón *Tn1331.2* y es compatible con *pJHCMW1*, por lo cual, sus sistemas de mantenimiento debían diferir (Marcelo E Tolmasky et al. 1988). En esta Tesis, se analizaron las 41,723 pb secuenciadas, que fueron depositadas en la base de datos Genbank bajo el número de acceso EU383016. Mediante BLASTx se identificaron 41 ORFs y una zona de 18 Kpb con alta similitud con regiones del plásmido críptico *pCRY* del patógeno y agente

etiológico de la peste bubónica *Yersinia pestis*. El análisis de los datos obtenidos permitió identificar varios loci con funciones características como las que se enumeraron en la introducción (ver Capítulo 1.3.b.iv “los plásmidos y su evolución”): adaptación, propagación, estabilidad y mantenimiento. En primer lugar, se caracterizó el módulo de adaptación, la región que aloja los determinantes de resistencia a antibióticos. Se confirmó la duplicación de los genes *aac(6’)-Ib*, *aadA* y *oxa-9*. Este hecho puede ser interpretado como una estrategia evolutiva que permite el aumento de la expresión de genes de resistencia en plásmidos con bajo número de copias mediante el aumento de la dosis génica. También se caracterizaron los módulos de mantenimiento y estabilización del plásmido. Por un lado, se identificó la mínima región necesaria para la replicación del plásmido y se demostró su funcionalidad experimentalmente. Es importante destacar que esta región mostró un 90% de homología con la del plásmido pCRY de *Yersinia pestis* (Song et al. 2004). Por otra parte, se caracterizó un “centrómero” compuesto por dos ORFs con alta similitud a los genes *parF* *parG* (Finbarr Hayes & Barillà 2006). Adicionalmente, Tn1331.2 podría tener un rol en la resolución de dímeros de plásmido de manera similar a como se ha demostrado para pJHCMW1 ya que el sitio de resolución del transposón y *tnpR* están conservados (M E Tolmasky et al. 2000). Finalmente, el SST4 y los genes *mob* constituyen el módulo de propagación de este plásmido. Por lo tanto es, un plásmido autotransmisible que muy probablemente sea capaz de replicar en un patógeno como *Yersinia pestis*. En este sentido pMET1 podría mantenerse establemente en este peligroso patógeno humano y conferirle resistencia a múltiples antibióticos.

Un cluster de genes muy similar al empleado en la conjugación por pMET1 se encuentra en ICEs de cepas patógenas. Es interesante destacar que los genes de patogenicidad incluidos en estos ICEs no se hallan asociados genes que codifican para resistencia a antibióticos. Nuestras observaciones apuntan hacia esto mismo: se halla en un plásmido que causa multiresistencia a antibióticos, casi el mismo SST4 que en dos ICEs diferentes que no presentan genes de resistencia a antibióticos. Ambos ICEs además están asociados a cepas de alta patogenicidad. ¿Porqué se selecciona el SST4 y no los genes de resistencia entonces para los ICEs? La pregunta inversa es válida: ¿Porqué, si comparten el mismo sistema genético de propagación, no adquirieron estos plásmidos también genes que codifiquen para factores de patogenicidad? Varias hipótesis podrían responder esta pregunta. La más trivial es que los genes de patogenicidad y resistencia aún no han entrado en contacto. Otra posibilidad es que ambos tipos de genes necesiten ser regulados de manera diferente. Por ejemplo, un factor de

virulencia podría ser expresado solamente en determinadas circunstancias para el éxito de la infección, muchas veces regulado por quórum sensing. Esto los lleva a una localización cromosómica, donde pueden ser regulados de manera más sofisticada. Paralelamente, los genes de resistencia a antibióticos serían necesarios en mayor dosis, por lo cual se los encuentra frecuentemente en plásmidos y con mucha menor frecuencia en el cromosoma. Es interesante plantear si existen en el ámbito clínico, los dos tipos de genes ligados en elementos móviles, lo cual podrá develarse a medida que se publiquen secuencias completas de plásmidos provenientes de aislamientos clínicos. Por otro lado, otros tipos de resistencia a antimicrobianos, como por ejemplo, los conferidos por mutaciones en la girasa (que son el mecanismo más frecuente de resistencia a quinolonas), no son adquiridos horizontalmente sino por mutación. Algunos estudios han identificado genes de resistencia y de virulencia ligados (Martínez & Baquero 2002 y sus referencias). De hecho se ha enunciado que en un futuro aumentarán los casos en los que se encuentren estos dos tipos de genes asociados físicamente (Martínez & Baquero 2002 y sus referencias). Esta es un área de investigación de gran interés.

2. Estrategias antisentido contra el gen *aac(6')*-Ib.

En sistemas bacterianos, mecanismos antisentido que se basaban en el bloqueo estérico de la traducción habían sido empleados con mucho éxito (B. L. Geller 2005; L. D. Tilley et al. 2007). Sin embargo, dado que *aac(6')*-Ib es sumamente variable en su extremo 5' esta técnica no resultaba adecuada. Previamente a esta Tesis, se habían logrado el silenciamiento del gen de resistencia a Ak empleando una técnica basada en la ARNasa H (R Sarno et al. 2003). Por otro lado, el silenciamiento por ARNasa P había mostrado ser exitoso con otros genes en sistemas bacterianos (Y. Li et al. 1992; Guerrier-takada et al. 1995; Y. Li & S Altman 1996; J. McKinney et al. 2001). Por lo tanto, el proyecto era relevante y tenía buenas chances de éxito.

A partir de un screening de 39 oligorribonucleótidos de 13 nts se eligieron cinco candidatos para ensayar in vivo según su capacidad de unión y de mediar el corte del mensajero de *aac(6')*-Ib por ARNasa P in vitro. Para ello se clonaron fragmentos de ADN codificando para cada uno de los EGS a ensayar junto a una ribozima cabeza de martillo y un terminador de la transcripción en un vector de alto número de copias. El inserto se clonó bajo el promotor T7, que es fuerte e inducible por IPTG. Se clonaron tanto los candidatos como sus controles sense y un control contra el gen de la fosfatasa alcalina. Las cepas que expresaron

los EGS antisentido resultaron más sensibles a la Ak que los controles. Sin embargo, la inducción por IPTG no generó un efecto mayor. Esto puede deberse a que el oligorribonucleótido puede resultar tóxico per se, o bien a que el EGS no llega a escindir de la ribozima cabeza de martillo en el transcripto. Un efecto similar fue descrito en estudios anteriores (Guerrier-Takada et al. 1997).

Resultaron particularmente sensibles a la Ak aquellas cepas que expresaban el EGSC3 y el EGSA2. Éstas mostraron coincidentemente un descenso en la CIM, de acuerdo a lo observado en ensayos de microdilución. Los EGSs de mayor capacidad de unión al mensajero de *aac(6')*-Ib fueron aquellos que mostraron un mayor efecto de reversión del fenotipo resistente. Si bien no se demostró que este efecto sea mediado por ARNasa P, se observó que al expresarse el EGSC3 disminuye el mensajero del gen de resistencia a amikacina en un 50%. Esto sumado a la abundante bibliografía y antecedentes disponibles (Gao et al. 2005; Gopalan et al. 2002; Guerrier-takada et al. 1995; Guerrier-Takada et al. 1997; J.-hyeong Ko et al. 2008; Y. Li & S Altman 1996; Y. Li et al. 1992; Eirik Wasmuth Lundblad & Sidney Altman 2010; J. S. McKinney et al. 2004) sugiere muy fuertemente que la ARNasa P media el efecto observado.

Estos resultados constituyen una prueba de concepto que apoya la idea de que esta estrategia se podría emplear para prolongar la vida útil de la Ak. Sin embargo, antes de una potencial aplicación, se necesita un modelo más cercano a una situación real de infección. Aún existen varios obstáculos que sortear antes de que se puedan diseñar fármacos en base a esta estrategia. En primer lugar, el ARN, en particular si se trata de oligonucleótidos, es muy susceptible a la degradación por nucleasas. Existen muy pocos estudios con análogos de nucleótidos resistentes a nucleasas y su suministro exógeno. Además éstos fueron efectuados en sistemas eucariotas donde la ARNasa P es muy diferente a nivel de estructura y requerimientos, por los resultados no pueden ser extrapolados a sistemas bacterianos (Ma et al. 2000; Gopalan et al. 2002; Eirik Wasmuth Lundblad & Sidney Altman 2010; Sun & Caetano-Anollés 2010). Por lo tanto, era necesario probar si oligómeros de análogos no hidrolizables de ácidos nucleicos podían funcionar como EGSs e inducir el corte mediado por ARNasa P del mensajero de *aac(6')*-Ib. Para ello, se diseñaron varios EGSs en base a la secuencia del EGSC3 (aquel que había generado la mayor actividad in vivo) empleando diversos análogos de ácidos nucleicos disponibles.

Entre los diferentes compuestos ensayados, solamente los cooligómeros de ADN/LNA pudieron reproducir una actividad similar al EGSC3 de ARN. Estos resultados no implican necesariamente que oligonucleótidos de PS, 2-O-Me ó de PMO no puedan ser funcionales in vivo. Cabe la posibilidad de que puedan tener un efecto mediante otro mecanismo. Dado que no están dirigidos al codón de iniciación de la traducción es poco probable que puedan silenciarlo mediante impedimento estérico de la traducción (L Good 2003). Sin embargo, podrían, por ejemplo, inducir el corte mediado por ARNasa H. Los EGS de cooligómeros de ADN/LNA mostraron una buena actividad para inducir el corte del mensajero del *aac(6')*-Ib mediado por ARNasa P in vitro. No se observa una correlación lineal entre número de reemplazos y actividad, sino que existen posiciones dentro del EGS que tienen un rol muy relevante: se mostró que los reemplazos en las tres primeras posiciones de la secuencia consenso ACCA son muy importantes en la actividad. Es destacable que estos EGSs mostraron ser resistentes a las nucleasas bacterianas de E.coli. Por otra parte, estos compuestos fueron capaces de inhibir la producción de la enzima en un sistema de transcripción y traducción in vitro pero sólo ante el agregado de ARNasa P. Para probar estos compuestos en un modelo in vivo se debió recurrir a una cepa de E.coli hiperpermeable, E.coli AS19 (Sekiguchi & Iida 1967). Dicha cepa fue transformada con los plásmidos pJHCMW1 y pFC9 que llevan al gen de resistencia a Ak en el contexto de Tn1331 y del integrón InV117 respectivamente. Sólo este último fue capaz de conferir a la cepa AS19 una alta resistencia a Ak. Es remarcable que este plásmido posee muy alto número de copias y aloja a *aac(6')*-Ib bajo un promotor fuerte. Teniendo en cuenta esto, es posible que hayan subvalorado los resultados obtenidos luego de la administración exógena de los compuestos antisentido. Si bien LNA9 y LNA 10 fueron capaces de inhibir el fenotipo de resistencia aún en bajas concentraciones, es muy sugestivo que LNA1, que no posee reemplazos de LNA en la región ACCA del EGS, no haya mostrado efecto in vivo. Por otra parte, LNA1 induce el corte del mensajero de *aac(6')*-Ib mediado por ARNasa H con mayor potencia que LNA2 (datos no mostrados). Esto nos sugiere fuertemente que el mecanismo por el cual ocurre el silenciamiento en el sistema explorado está mediado por ARNasa P. De todos modos, sería relevante realizar experimentos con una mutante condicional en uno de los genes de la ARNasa P, de modo tal de demostrar concluyentemente el mecanismo. Existe una cepa con una mutación en el gen *rnpB*, que codifica para una C5^{TS} que podría ser de mucha utilidad. Próximamente se transferirá esta mutación a la cepa de E .coli AS19 (pFC9) por transducción generalizada.

Si bien se exploraron varias opciones de análogos de ácidos nucleicos, existen muchas otras que no fueron ensayadas debido a su costo o a que no son comercialmente asequibles. En particular sería de interés la exploración de variantes capaces de permear a la célula. Casi simultáneamente a nuestro trabajo, el equipo de investigación de Sidney Altman señaló en concordancia con nuestros resultados, que los EGSs de PMO no son capaces de inducir el corte mediado por ARNasa P. Sin embargo, un EGS de PMO contra el gen *cat*, al ser acoplado a un péptido permeabilizante, mostró capacidad de corte del mensajero in vitro, aunque en sitios diferentes al esperado. Además inhibió la expresión del gen in vivo en varias especies bacterianas (Shen et al. 2009). Sin embargo, no esto mismo no ocurrió con todos los genes que el equipo del Dr. Altman ensayó (Shen et al. 2009). Recientemente, este mismo equipo publicó un trabajo donde se intenta explicar cuál es el mecanismo por el cual el EGS dirigido contra el gen *cat* acoplado al péptido corta el ARNm in vitro en presencia de ARNasa P (Xiao et al. 2010). En nuestro sistema, el EGSC3 de PMO acoplado a un péptido permeabilizante tampoco fue capaz de cortar al gen de *aac(6')-Ib* en presencia de ARNasa P (Datos no mostrados, realizados en colaboración con el Dr. Michael Gait, Cambridge, RU).

Nuestros datos necesitarían ser reforzados mediante la inducción del corte de otros genes bacterianos mediante EGSs de ADN/LNA. En este sentido, se están desarrollando compuestos antisentido contra el gen *ftsZ* que participa en la división celular y contra un gen heterólogo como *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente. Ambos son genes cuyos genotipos son fácilmente evidenciables: mientras que el silenciamiento de *ftsZ* genera filamentación y muerte celular el de *gfp* provocaría una pérdida de fluorescencia. En el primer caso, se está avanzando rápidamente, habiéndose obtenido ya EGSs candidatos a ensayar próximamente (Davies-Sala 2010). En el segundo caso, la inestabilidad del mensajero de *gfp* dificulta la realización de los ensayos correspondientes (datos no mostrados). Sin embargo, dado que la reversión del fenotipo no es letal, el silenciamiento de este gen resulta de gran interés y se continuará realizando esfuerzos para manipular su ARNA. Por otro lado, también se logró el corte del mensajero de *aac(6')-Ib* mediante el EGSA2 de ADN/LNA. Sus propiedades e interacciones con el EGSC3 de ADN/LNA se están analizando actualmente (datos no mostrados).

El otro gran obstáculo antes de llegar a un uso farmacológico de estos compuestos es su falta de capacidad de ingresar al citoplasma bacteriano. En los experimentos de esta Tesis, los EGS se expresaron directamente en las células hospedadoras o bien se administraron exógenamente a una cepa hiperpermeable. Existen diversas estrategias que podrían ayudar a

solucionar este problema que incluyen la encapsulación de EGS en liposomas, la introducción de estructuras en forma de hairpin en la secuencia o la conjugación a péptidos permeabilizantes que ha sido muy exitosa en el caso de los PMOs (Fillion et al. 2001; Kurupati et al. 2007; L. D. Tilley et al. 2007; Shen et al. 2009; Nikravesch et al. 2007; Günter Harth et al. 2007; G Harth et al. 2000; Eriksson et al. 2002). La línea de trabajo proseguirá en esta dirección. El laboratorio de Marcelo Tolmasky generó con éxito diversos tipos de liposomas para la administración de EGSs. Sin embargo, aún no ha tenido éxito en la internalización de compuestos antisentido mediante esta herramienta. Por otro lado, se intentó la generación de LNA9 acoplado a un péptido permeabilizante. Sin embargo, dado que la carga negativa del EGS se compensa con la del péptido permeabilizante (dado que se trata de oligopéptidos ricos en arginina), al ser acoplados, forman un precipitado insoluble (datos no mostrados, en colaboración con el Dr. Michael Gait, Cambridge, RU). Próximamente se intentará la formación de un complejo entre LNA9 con estearil-péptido de manera similar a trabajos publicados muy recientemente que han permitido el ingreso de oligómeros de análogos de ácidos nucleicos a células eucariotas (Langel et al. 2010; Mäe et al. 2009).

En conclusión, el desarrollo de compuestos capaces de inhibir la expresión del gen *aac(6')-Ib* al ser administrados exógenamente por un mecanismo muy probablemente mediado por ARNasa P, constituye un paso en la dirección correcta para el desarrollo racional de compuestos que inhiban la expresión de genes bacterianos y que puedan ser empleados farmacológicamente. Estos agentes podrían emplearse para la inhibición de genes de resistencia, de genes bacterianos esenciales o de factores de virulencia. En el caso de la inhibición de *aac(6')-Ib* permitiría prolongar la vida útil de la Ak. El próximo objetivo será mejorar su permeabilidad a fin de que puedan alcanzar el citoplasma bacteriano.

CAPITULO 6:

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas utilizadas:

En la presente tesis se emplearon varias cepas bacterianas, las cuales se enumeran junto a sus características más relevantes en la siguiente tabla.

Cepa	Características relevantes	Origen
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺), λ -	New England Biolabs
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> T7A49	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) rnpA ^{TS}	Lab. Sidney Altman
<i>Escherichia coli</i> AS19	F ⁻ λ ⁻ ilvG ⁻ ,rfb ⁻ 50, rph-1. Deriva de K12 por mutagénesis química. Fenotipo de hiperpermeabilidad, por una mutación desconocida que revierte con alta frecuencia. Sensible a lisozima.	Lab. Marcelo Tolmasky.

Medios y condiciones de cultivo:

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio correspondiente en un agitador a 37°C durante 16 a 24 hs. Con una frecuencia de agitación de entre 200 y 250 rpm/min. Se emplearon los medios cuya composición se detalla a continuación:

Luria-Bertani (LB): 1% Triptona, 0,5% Extracto de levadura y 0,5% NaCl.

Medio Mínimo M9 (M9): Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0,5 g NH₄Cl 1 g y se llevó hasta un volumen final de un litro con agua bidestilada. Se autoclavó y se agregaron 10 ml de una solución esterilizada por filtrado 100 mM MgSO₄, 20% glucosa, 10 mM CaCl₂ y 100 mM tiamina-HCl.

Medio Mueller-Hinton (MH) fue provisto por Britannia y preparado según las instrucciones del fabricante.

Para obtener los correspondientes medios sólidos en los casos requeridos se agregó ágar al 1,7% y se colocan 18 a 20 ml en Placas de Petri.

Para la diferenciación basada en el ensayo de β -galactosidasa empleado en los clonados de productos de PCR se agregó a placas de medio LB-ágar X-gal 40 $\mu\text{g/ml}$ e IPTG 20 $\mu\text{g/ml}$. Para la inducción de cultivos líquidos se empleó un stock 1M de IPTG.

Conservación de cepas:

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas fue realizada por congelamiento rápido de cultivos en fase logarítmica tardía, suplidos con glicerol estéril a una concentración final de 15 % en criotubos conservados a -20°C y a -80°C .

Preparación de células electrocompetentes y electroporación:

Se prepararon las células de acuerdo al protocolo high efficiency electrotransformation (Bio-Rad). Para el procedimiento se utilizó un electroporador Gene Pulser Transfection Apparatus (Bio-Rad). Se emplearon en cada electroporación 40 μl de suspensión de células electrocompetentes y 0,1-1 μg de ADN disuelto en agua milliQ. El procedimiento se llevó a cabo en cubetas de 2 mm (Bio-Rad) en las condiciones de campo eléctricas indicadas en el manual del Electroporador. Tras el pulso eléctrico rápidamente se agrega 0.8 ml de medio rico para colocar luego las células a 37°C por una hora con agitación. Por último se sembró en medio sólido selectivo toda la noche a 37°C .

Oligonucleótidos generados:

Se enumeran a continuación los oligonucleótidos de ADN empleados en este trabajo. Todos ellos fueron encargados a Integrated DNA Techonlgies.

Oligo	Secuencia	Gen blanco
ISL_F	ATCGGTGTCGGTATTGTAGG	río arriba del IS4321 de pRMH760
InsA sense	CTGGCTCTAACATTTTCGGTCA	<i>orfD</i>
ISL_3_R	GAATCTCAGCAGGCAATG	<i>tnpA</i> IS4321
IS 1353 F	GGGCAGTAGATCACTATATCG	IS1353
IS 1353 R	TGTGTATTTCCGTCAGATCG	IS1354
IS 1326 F	GGTTAGTCGGTCCAACAAC	IS1326

IS 1326 R	GTGGTTGAACCGCAGTAC	IS1326
mer E rev	TGCCATCTGCCGATTCTC	<i>mer E</i>
tni A out3	GGTCAGGGTTGGAGAAGG	<i>tniA</i>
tniA F	GATATTCGTCCACGGCTAC	<i>tniA</i>
tniA Rev	GTTCTGACCAAGCAGAAG	<i>tniA</i>
tniB F	GCAGCAATCGTCGTTGG	<i>tniB</i>
tniB rev	GCTGGAAGCCCTTATGC	<i>tniB</i>
5s Fwd	TGTCTGGCGGCAGTAGCG	5s rRNA
5s Rev	GCATGGCAGTTCCTAC	5s rRNA
aacout3'_1	TGACGTACAGGAACAG	<i>aac(6')-Ib</i>
aacout3'_2	ACACGCCAGGCATTTCG	<i>aac(6')-Ib</i>
aacout5'_1	GATCGGTTTCTTCTTC	<i>aac(6')-Ib</i>
aacout5'_2	GATGCTGTACTTTGTG	<i>aac(6')-Ib</i>
aacoutdown 7859	GTAACCACCCCAGATGGTCCAGCCGTGTAC	<i>aac(6')-Ib</i>
Aacoutup 7349	GTGTGACGGAATCGTTGCTGTTGGTCACGATG	<i>aac(6')-Ib</i>
aacpcr7334	CATCACAAAGTACAGCATCGTGACCAACAG	<i>aac(6')-Ib</i>
aacpcr7907	TTAGGCAACACTGCGTGTTGCTCGAATGC	<i>aac(6')-Ib</i>
ISL_4_F	ATGGTCACTCCCGTTTTTGC	IR4321
ISL_3_F	TTGCTGTCGTGCCGTTAGG	<i>tnpA</i> IS4321
ISL_2_F	GCTCAACAAGATAGTGATAATG	<i>tnpA</i> IS4322
IS1326fwd	GGTTAGTCGGTCCAACAAC	IS1326
IS1326out3	CTGAAGTTTGACCTGTTTGC	IS1326
IS1326rev	GTGGTTGAACCGCAGTAC	IS1326
IS1353fwd	GGGCAGTAGATCACTATATCG	IS1353

IS1353rev	TGTGTATTTCCGTCAGATCG	IS1353
IS4321L FWD	TGCGTATTAAGACGTGGT	IS4321
IS4321L-rev	GTATATCTGGAGCGTGCC	IS4321
IS6100_1_F	ACTGCCACCCGAACTGCG	IS6100
IS6100_1_R	GACGGAGGCTCTGGTGC	IS6100
ISL_2_F	GCTCAACAAGATAGTGATAATG	IS4321
ISL_2_R	GGCTGAATAAGGGCGAGGC	IS4321
ISL_3_F	TTGCTGTCGTGCCGTTAGG	IS4321
ISL_3_R	GAATCTCAGCAGGCAATG	IS4321
ISL_4_F	ATGGTCACTCCCGTTTTTGC	IS4321
ISL_4_R	TGCTCTGGCAAACAAGC	IS4321
ISL_F extremo	ATCGGTGTCGGTATTGTAGG	IS4321
merErev	TGCCATCTGCCGATTCTC	<i>merE</i>
Tn4352Bfwd	CGTATTTTCGTCTCGCTCAG	Tn4352
Tn4352Brev	GCCATGAGGGTAGGGAAG	Tn4352
tniAfwd	GATATTCGTCCACGGCTAC	Tn21
TniAout3	GGTCAGGGTTGGAGAAGG	Tn21
TniArev	GTTCTGACCAAGCAGAAG	Tn21
tniBfwd	GCAGCAATCGTCGTTGG	Tn21
tniBrev	GCTGGAAGCCCTTTATGC	Tn21
T7_acc	TTGTAATACGACTCACTATAGG GAGACATGAGACAATAACCCTGATAAA TGCTTC	<i>aac(6')-Ib</i>
ACCA1 protein	GTTTAACGTTTGACATGAGGGC	<i>aac(6')-Ib</i>
T7 promoter primer	CGCTAATACGACTCACTATAGG	Promotor T7
EGSC3_aac(6')	TGGTGGAAACAGTACTTGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCG	EGSC3_aac(6')

)-lb molde)-lb molde
------------	--	------------

Oligómeros y Cooligómeros de análogos de ácidos nucleicos:

Se describen a continuación los oligonucleótidos de análogos de ácidos nucleicos empleados en este trabajo. Todos ellos fueron encargados a Integrated DNA Techonlgies. Aquellos empleados en experimentos in vitro requirieron una purificación adicional por HPLC.

Oligómero	Secuencia y química ^{a,b}
EGSC3	Caaguacuguuccacca
EGSC3DNA	CAAGTACTGTTCCACCA
Oligonucleótido Fosforotioato (PS)	<i>caaguacuguuccacca</i>
2'-O-metil oligorribonucleótido (2'-O-Me)	CAA guacuguucca CCA
Oligómeros de Morfolino fosforodiamidato (PMO)	CAAGTACTGTTCCACCA
LNA1	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA2	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA3	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA4	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA5	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA6	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA7	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA8	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA9	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA10	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA11	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA1Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>
LNA2Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>
LNA9Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>
LNA10Sense	<u>GGAACAGTACTTGACCA</u>

LNA9random	<u>AGGCATCTATACCA</u> <u>CCA</u>
LNA10random	<u>AGGCATCTATACCA</u> <u>CCA</u>
LNA11	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA2b	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>
LNA9b	<u>CAAGTACTGTTCCACCA</u>

^a Mayúsculas, ADN; minúsculas,ARN; itálicas, fosforotioato; negrita, 2'-O-metil oligorribonucleótido; intálica y negrita, oligómeros de morfolino fosforodiamidato; subrayado, LNA.

^b caaguacuguuccacca es la secuencia de EGSC3.

Plásmidos empleados

Se describe a continuación los plásmidos empleados en esta tesis junto a sus características más relevantes y las referencias.

Plásmido	Características Relevantes	Origen/Referencia
pJHCMW1	Plásmido aislado de <i>K.pneumoniae</i> del Hospital de Niños de Buenos Aires, aloja Tn1331.	Woloj et al. 1986 Sarno et al. 2002
pMET-1	Plásmido aislado de <i>K.pneumoniae</i> del Hospital "Luis C. Lagomaggiore", Mendoza. Aloja Tn1331.2	Tolmasky et al. 1988. Esta Tesis
pAS1	Plásmido hallado en <i>V.cholerae</i> del Hospital de Tartagal, Salta. Aloja InV117.	Petroni et al. 2002
pFC33.5	Plásmido derivado de pT7-5 con <i>aac(6')-Ib</i> _{pJHCMW1} clonado bajo el promotor T7	Tolmasky 1990.
pFC77	Plásmido derivado de pT7-5 con <i>aac(6')-Ib</i> _{InV117} clonado bajo el promotor T7	Esta tesis
pNW1	Derivado de F. Bajo número de copias. Incluye <i>aac(6')-Ib</i> . Ak ^R Cm ^S Sm ^R	Sarno et al. 2003
pFC9	pGEMT-easy que incluye parte de <i>tnpR</i> , <i>int11</i> y <i>aac(6')-Ib</i> de InV117. Amp ^R Ak ^R	Soler Bistué 2005
pJA2'	<i>rnpB</i> PT7 pMB1ori <i>lacZa</i> , Amp ^R	Vioques et al. 1988
pPTyr	<i>tRNATyr</i> PT7 pMB1ori <i>lacZa</i> Amp ^R	Robertson et al.1972

pYM201	Creado por inserción de 857 pb de <i>aac(6')-Ib</i> insertadas en pZero-1 [<i>Plac lacZa PSp6 PT7 ccdB f1ori pMB1ori (Zcr Akr)</i>] Zeo ^R	Lab. Marcelo Tolmasky
pEGS	Plásmidos empleados para la expresión de EGSs en <i>E.coli</i> BL-21 (DE3) (pNW1). Se detalla más abajo la estructura de los mismos.	Esta Tesis

Para construir plásmidos capaces de expresar las EGSs (pEGS) se encargaron construcciones específicas con una secuencia genérica clonada en el vector pUC57. La secuencia genérica para los diferentes plásmidos que incluye el promotor T7, el EGS introducido, la secuencia consenso para la ARNasa P, ACCA, una ribozima cabeza de martillo y un terminador de la transcripción para el promotor del fago T7.

promotor T7 EGS ACCA Ribozima cabeza de martillo
 GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGTGTCCGGCGTGACCAAGTCCACCGGATGTGCTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCTG
 terminador transcripcional de T7
 GATCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTG

Entre plásmido y plásmido lo único que varió fue la secuencia del EGS. Se produjeron 8 clones contra cada región simple cadena del mensajero de *aac(6')-Ib*, sus controles antiparalelos y un clon con un EGS contra la fosfatasa alcalina. Estos fueron los EGSs clonados y alojados en diferentes cepas

Cepa/plásmido	EGS expresado	Secuencia del EGS	Fenotipo
Yp59			Ak ^R Amp ^S
Yp62/pEGSA2	A2	CGATATGAGATCG	Ak ^R Amp ^R
Yp63/pEGSA2s	A2sense	CGATCTCATATCG	Ak ^R Amp ^R
Yp64/pEGSB6	B6	AGTGTCGGGCGTG	Ak ^R Amp ^R
Yp65/pEGSC3	C3	CAAGTACTGTTCC	Ak ^R Amp ^R
Yp66/pEGSD1	D1	CAGCATTGCAATG	Ak ^R Amp ^R
Yp67/pEGSE1	E1	TCTTCTCCACC	Ak ^R Amp ^R
Yp70/pEGSC3s	C3sense	GGAACAGTACTTG	Ak ^R Amp ^R
Yp71/pEGSD1s	D1sense	CATTGCAATGCTG	Ak ^R Amp ^R

Yp72/pEGSE1s	E1sense	GGTGGGAAGAAGA	Ak ^R Amp ^R
Yp73/pEGSAP	Fosfatasa Alcalina (AP)	AGGCATCTATACC	Ak ^R Amp ^R

En un contexto genético que permita la expresión del promotor T7, estos plásmidos generan un transcripto que va desde la última G del promotor hasta el terminador de la transcripción, incluyendo, la secuencia antisense, la secuencia ACCA y la ribozima cabeza de martillo. A continuación la ribozima cabeza de martillo se autoescinde del transcripto junto al terminador de la transcripción. De este modo el EGS, compuesto por la secuencia antisentido y el ACCA se liberan al citoplasma bacteriano (Guerrier Takada et al. 1995).

Análisis bioinformático de secuencias

Para el análisis bioinformático de secuencias se emplearon diversos programas de acuerdo al objetivo. Para el análisis electrofenogramas de reacciones de secuenciación se empleo el Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd). En el ensamblado de secuencias se utilizaron SeqMan (Lasergene) o Sequencher 4.7 (Gene Codes Corp.). Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando Vector NTI (Invitrogen Life Technologies) y Artemis (Sanger Institute).

Visualización de la entrada de EGS a las células mediante microscopías:

Para estos ensayos se mezclaron 7 µl de un cultivo bacteriano de toda la noche en solución 18 µl de solución fisiológica agregándose luego 0,5 µl de LNA10 acoplado al fluoróforo verde Alexa-488 (500pmol/µl). Se incubó a 37°C durante 10 minutos en agitación y oscuridad. Se centrifugó, se agregaron 25 µl de solución fisiológica y se resuspendieron suavemente las células. Luego se agregó el colorante específico de membranas FM5-95 (Invitrogen) en las concentraciones indicadas por el fabricante y se incubó en hielo por 5 minutos. Se colocaron entonces los cultivos en un portaobjetos con una capa de agarosa 2% en solución fisiológica. Luego se cubrió con un cubreobjetos. Tras ello se observó el preparado por microscopía de epifluorescencia en un microscopio BX60 Olympus (Olympus) o por microscopía confocal láser en un microscopio Zeiss Pascal (Zeiss).

Acumulación de Cooligómeros de ADN/LNA marcados radiactivamente:

Células en crecimiento exponencial ($DO_{600}=0,6$) fueron lavadas dos veces con buffer Tanaka modificado frío. Las células se incubaron con $50\mu\text{M}$ de ^{32}P -LNA9. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se filtraron a través de una membrana de Millipore $0,45\ \mu\text{M}$. Tras lavarlos una vez en PBS frío, se midió la radiactividad asociada a los filtros (y por ende a las células) mediante un contador de centelleo.

Procedimientos generales con ácido desoxirribonucleico (ADN):

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron empleando los kits comerciales QIAspin Miniprep Kit de Quiagen o Wizard(R) Plus Minipreps DNA Purification System de Promega. La purificación de ADN tanto de productos de PCR como a partir de geles se realizó empleando el kit comercial Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Para las reacciones de corte con enzimas de restricción se emplearon los buffers y reactivos provistos por New England Biolabs o Promega según las instrucciones de los proveedores.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Las reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron empleando de Taq polimerasa de Invitrogen, Promega o bien la fabricada en la Fundación Instituto Leloir. Para las reacciones empleando la enzima pfu se usó la fabricada en la Fundación Instituto Leloir. Para reacciones de más de 5 Kpb se empleó la enzima elongase (Invitrogen) o bien Kod (Novagene). Los cebadores empleados en cada reacción se detallan en las secciones correspondientes de resultados, y su listado completo se encuentra en la Tabla XX. Las mezclas de reacción contenían 0,5 a 3 mM de MgCl_2 , $0,5\ \mu\text{M}$ de cada cebador, $0,1\ \text{mg/ml}$ de seroalbúmina bovina acetilada (BSA) y $0,2\ \text{mM}$ de dNTPs en un buffer apropiado según la enzima empleada. Se emplearon entre 10 y $50\ \mu\text{l}$ finales de reacción. Como molde se empleó ADN de diversas fuentes: minipreparaciones de plásmidos, ADN cromosómico o extractos celulares. Estos últimos fueron generados por resuspensión de unas pocas colonias de un microorganismo en $50\ \mu\text{l}$ de agua MQ, su tratamiento por 5 minutos a $95\text{-}100^\circ\text{C}$ y su centrifugación por 1 minuto a máxima velocidad. Las reacciones a partir de extractos celulares se denominan “colony-PCR”.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Mastercycler de Eppendorf empleando un programa que incubara 5 minutos a 94°C (desnaturalización inicial), 25 repeticiones de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 55°C (hibridación) y 60 segundos por cada Kpb a amplificar a 72°C (polimerización) y finalmente 10 minutos a 72°C (extensión).

final). En el caso de usar pfu, se emplearon 68°C en lugar de 72°C para la polimerización. Los productos de PCR fueron purificados por columna como se detalló antes o directamente visualizados por electroforesis (ver más adelante).

Consideraciones generales para trabajar con ácidos ribonucleicos (ARN):

Dado que el ARN es sumamente susceptible a la degradación se tuvieron varias precauciones. Para las preparaciones y experimentos se emplearon material de plástico y drogas libres de ARNasas. El material de vidrio y metal fue horneado 3 horas a 180°C antes de su uso. Se empleó agua libre ARNasas. Para ello se empleó agua directamente del filtro MQ o bien se pre trató el agua con dietilpirocarbonato (DEPC). Para ello se adicionó 1 ml de DEPC a 1 l de agua MQ, se agitó vigorosamente y se dejó toda la noche. Luego se autoclavó y fraccionó congelándose diversas alícuotas a -20°C. Las micropipetas y superficies en donde se realizaron los experimentos fueron lavadas con una solución 0,1M NaOH y 0,5% SDS y enjuagadas dos veces con agua bidestilada. Durante su manipulación, las mezclas de ARN, en particular el ARN extraído de células, fueron conservadas en hielo y se evitó su exposición a altas temperaturas.

Extracción de ARN de cultivos bacterianos:

Para la extracción de ARN bacteriano se tomaron cultivos de toda la noche para llevarlos a DO inicial deseada (0,05) y luego cultivarlos por el tiempo necesario. Luego se transvasaron los cultivos a un tubo Falcon de 15 ml nuevo y se agregaron 1,25 ml de solución STOP en hielo por cada 10 ml de cultivo original (20 ml de solución STOP se prepararon con 1 ml fenol saturado en agua y 19 ml de etanol). Se centrifugó a 4°C 2 a 5 minutos y se quitó el medio. Este precipitado se guardó -80°C dejándose así hasta por seis meses. El precipitado se resuspendió en 800 µl de TE pH=8 con 0,5 mg lizozima y se agregaron 80 µl de 10% SDS. Se incubó 2 minutos a 64°C. Se agregaron 88 µl de 1M NaAcO pH=5,2 y se mezcló por inversión. Se agregó 1 ml de fenol saturado en agua DEPC invirtiéndose la mezcla 10 veces. Se incubó a 64°C por 6 minutos mezclando por inversión cada 40 segundos. Para cultivos con una OD muy superior a 1 es recomendable hacer una segunda extracción con fenol. A continuación se colocaron los tubos en hielo para centrifugar a 4°C 10-20 minutos a máxima velocidad. Se pasó la fase acuosa a tubos eppendorff de 2 ml nuevos, se extrajo con 1 ml de cloroformo y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos de 1,5 ml. Se agregó 0,1 volumen de 3M NaAcO pH=5,2, 1mM EDTA y 2,5 volúmenes de etanol. La solución permaneció 20 minutos a -80°C para la precipitación del

ARN y se centrifugó a 4°C por 25 minutos a máxima velocidad. Se lavó el pellet con 80% etanol frío libre de ARNsas y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad a 4°C. Se dejó secar el pellet en campana y se resuspendió en 100 µl de agua DEPC. Alternativamente el ARN fue purificado mediante el kit ilustra RNAspin minikit (GE Healthcare). También se puede guardar en 50% formamida que protege de ARNsas. El ARN fue cuantificado por absorción de la luz UV a 260. Su integridad fue verificada observando el ARNr en geles de agarosa desnaturalizantes de las preparaciones de ARN. Para su conservación fue guardado a -80°C.

Northern blots:

Para cada muestra a analizar 1-5 µg de ARN fueron sembrados en calles de un gel en condiciones desnaturalizantes [18ml de formaldehído 37% cada 100 ml de gel y una concentración final de 20mM ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico (MOPS)] con 2,5% agarosa. Tras la electroforesis el ARN fue transferido a una membrana Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) por transferencia capilar con una solución 10X SCC (1,5 M NaCl, 0,15M citrato de sodio). Luego de un lavado en 2X SCC y una vez seca la membrana, el ARN fue fijado por irradiación con luz UV de 254nm en una cámara UV GS gene linker (BioRad). Luego la membrana fue teñida con azul de metileno (0,3M NaAco, 0,03% azul de metileno pH=5,2) y el gel con bromuro de etidio para corroborar la transferencia efectiva de los ácidos nucleicos. Paralelamente, se generaron los moldes para sondas específicas contra los mensajeros de *aac(6')-Ib* y ARN5s por colony-PCR. Para ello se emplearon los cebadores *aacpcr7334* y *aacpcr7907* y 5s Fwd y 5s Rev respectivamente. Los productos de PCR fueron purificados por columna y luego empleados para la generación de cada sonda mediante la incorporación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ usando el kit Prime-a-gene labeling kit (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El dCTP no incorporado fue eliminado empleando el kit NucAway (Ambion). Para la hibridización se incubó la membrana a 42°C con 20ml de solución de hibridización (1X SCC, 5X Denhearts, 50% formamida y 0,5% SDS) durante 3 horas. Luego se agregó la sonda desnaturalizada y se dejó incubando toda la noche. Se realizaron luego dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con solución 2X SCC y 0,1% SDS, otros dos lavados con solución 0,2% SCC y 0,1% SDS y un lavado final a 42°C durante 15 minutos en solución 0,2X SCC, 0,1% SDS. Una vez seca la membrana se reveló mediante Phosphoimager (Storm 840, Molecular Dynamics).

Transcripción in vitro:

Todos los ARNs sintetizados in vitro necesarios para esta tesis fueron generados empleando el kit de transcripción in vitro *MEGAscript™ high yield transcription T7 kit* o *MEGAscript™ high yield transcription T7 kit* (ambos de Ambion). El primero fue empleado en para transcriptos menores a 500 nucleótidos [pre tRNA de tirosina (ptRNA^{Tyr}) y la subunidad M1 de la ARNasa P] mientras que el segundo se empleo para transcriptos mayores a esa longitud (ARNm de *aac(6')-Ib*). Se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante empleando siempre 1 µg de molde cada 20 µl de reacción.

Para la síntesis del pARNt^{Tyr} se usó como molde una digestión con la enzima FokI del plásmido pPTYR. Este plásmido posee clonado el gen del pARNt bajo el promotor del fago T7. La digestión del mismo con FokI genera un fragmento lineal que incluye al pARNt bajo el promotor del fago T7. La transcripción in vitro de este molde generó un fragmento de ARN de un tamaño muy similar a los 185 nts esperados.

Para la síntesis de M1, la subunidad catalítica de la ARNasa P, se usó como molde una digestión con la enzima FokI del plásmido pJA2'. Este plásmido posee clonado gen rnpB bajo el promotor del fago T7. La digestión del mismo genera un fragmento lineal que incluye al rnpB bajo el promotor del fago T7. La transcripción in vitro de este molde generó un fragmento de unos 350-400 nts, muy similar a los 377 nts esperados.

Para la transcripción in vitro de EGS o moléculas más pequeñas se partió de la mezcla de un oligodeoxinucleótido con la secuencia del promotor T7, T7 promoter primer, y otro con la secuencia complementaria a invertida al EGS a transcribir y el promotor T7. En primer lugar, se purificaron por PAGE y se concentraron hasta 200 mM o más. Ambos oligómeros se mezclaron, se desnaturalizaron por calor y se enfriaron lentamente en mesada. A continuación se procedió a la reacción de transcripción in vitro empleando el *MEGAscript™ high yield transcription T7 kit* según instrucciones del fabricante.

El ARNm de *aac(6')-Ib* se generó empleando como molde el producto de PCR del plásmido pYM201, que contiene al gen, y los primers ACCA1 protein y T7 promoter primer. El producto de transcripción con *MEGAscript™ high yield transcription T7 kit* generó una banda de unos 750 nts y muchas bandas de menor tamaño de naturaleza desconocida. Se esperaba sólo una banda de 749nts. Si bien es posible trabajar con este producto, por mayor prolijidad y para una disminución del ruido en los experimentos sucesivos se purificó la banda de 750 nts mediante PAGE. Para ello el producto se corrió por 5% PAGE preparativo, se tiñó con bromuro de etidio y la banda con el ARN del tamaño de interés fue recortada.

Luego la banda se machaca con una punta azul libre de nucleasas y se resuspende en 500 μ l de una solución 0,4M NaAcO pH 5. Se mantiene a 4° C toda la noche. Luego se centrifuga a máxima velocidad por 2 minutos y se recupera el sobrenadante con el ARN disuelto. Se agregan dos volúmenes y medio de etanol absoluto frío y se deja en hielo 20 minutos. Finalmente se centrifuga a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C, se lava el precipitado con una solución 80% etanol fría, se deja secar y se resuspende en 15 o 20 μ l de agua DEPC.

Para la conservación de los distintos transcriptos las soluciones madre fueron guardadas a -80°C mientras que las soluciones de trabajo se conservaron a -20°C.

Marcado radiactivo de moléculas:

Para el marcado radiactivo de moléculas de ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos 1 μ g de la molécula de interés se incubó en buffer adecuado con fosfatasa alcalina (New England Biolabs) en 20 μ l de volumen final durante 30 minutos a 37°C. Luego se realizó una extracción con fenol equilibrado-cloroformo (1:1), agregando a la reacción un volumen de fenol-cloroformo, agitando vigorosamente y centrifugando 5 minutos a máxima velocidad. Se reiteró el procedimiento con cloroformo para eliminar las trazas de fenol que puede inhibir reacciones subsiguientes. A continuación, se marcaron las moléculas radiactivamente agregando a la reacción 1-2 μ l ó 100-200 μ Ci de 32 P- γ -ATP (Perkin Elmer), el buffer apropiado, T4 polinucleótido kinasa (New England Biolabs) y agua hasta un volumen de 20-25 μ l. La mezcla se incubó por 90 minutos a 37°C. Para eliminar el radiactivo no incorporado se empleó el sistema de columnas de sefarosa ilustra MicroSpin G-50 Columns (GE Healthcare) quedando las moléculas marcadas en un volumen final de 50 μ l. Las moléculas marcadas fueron conservadas a -20°C. Para el marcado de oligonucleótidos obtenidos por síntesis se obvió el paso de defosfatación.

Ensayos de unión al mensajero:

Se realizaron ensayos de cambio de movilidad en gel (EMSA) para demostrar unión de oligonucleótidos al mensajero. Para ello se mezclaron en un volumen final de 10 μ l, 10 pmol (1 μ M) de oligómeros marcados radiactivamente con concentraciones crecientes de mensajero marcado de *aac(6')*-Ib (de 0, 5, 10, 50 o 100 pmol) en buffer STE (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8) durante 2 horas a 25°C. Los resultados se analizaron por 5% PAGE no desnaturizante. Tras secar los geles, los resultados fueron analizados mediante un Phosphorimager (Storm 840, Molecular Dynamics).

Ensayos de corte por ARNasa P :

Para los ensayos de digestión de mensajero dirigidos por EGS mediados por ARNasa P, 2,5 pmol del ARNm de *aac(6')*-Ib marcado radiactivamente se preincubaron con 5 pmol del EGS indicado a 25°C de 30 a 120 minutos. Paralelamente los componentes de la ARNasa P (2.5 pmol de ARN M1 y 70 pmol de proteína C5) se ensamblaron en 7 µl de un buffer compuesto por 20mM Hepes-KOH (pH 8.0), 400mM acetato de amonio, 10mM acetato de magnesio y 5% glicerol agregándose un inhibidor de ARNasas (0,25 µl de Ribolock de Fermentas). Esta solución se pre incubó 15 minutos a 37°C y luego se combinó con la mezcla de mensajero y EGS en un volumen final de 10 µl. Luego del tiempo indicado de incubación (de 2 a 120 minutos) la reacción se detuvo por calentamiento a 90°C por dos minutos. Luego se agregó un volumen de agua DEPC, se extrajo con fenol-cloroformo y se extrajo con fenol. Por último se agregó un volumen de Buffer de Carga II (95% formamida, 1mM EDTA pH=8, 0,05% Azul de Bromofenol) y se desnaturalizó por calor calentando la mezcla 2-5 minutos a 85°C. Los resultados se analizaron por 5-7% PAGE, según el tamaño de los productos a resolver, en condiciones desnaturalizantes. Tras el secado del gel, los resultados fueron analizados mediante Phosphoimager (Storm 840, Molecular Dynamics).

Ensayos de corte por ARNasa H:

Para los ensayos de corte del mensajero mediados por ARNasa H, 2,5pmol de ARNm de *aac(6')*-Ib marcado radiactivamente se pre incubaron en el buffer apropiado para la reacción con 5pmol de EGS a 25° por 30 minutos. Tras ello se agregó a la mezcla una unidad de ARNasa H (New England Biolabs). Los 10 µl de reacción se incubaron entre 5 y 60 minutos a 37°C. La reacción se detuvo agregando un volumen de Buffer de carga II e incubando 2-5 minutos a 85°C. Las muestras fueron resueltas por 5% PAGE desnaturalizante. El gel fue secado y luego se analizaron los resultados por Phosphoimager (Storm 840, Molecular Dynamics).

Ensayos de transcripción y traducción acopladas in vitro:

Para estos experimentos se purificó el plásmido pFC9 en condiciones libres de ARNasas y se empleó como molde en reacciones de transcripción y traducción acopladas in vitro con ³⁵S-metionina (Perkin Elmer) con el extracto S30 de E.coli del kit para ADN circular (Promega). Para cada reacción se siguieron las instrucciones del fabricante pero se hicieron algunas modificaciones. Por un lado se agregaron diferentes cooligómeros de LNA/ADN junto al

plásmido empleado como molde (Mezcla 1). Por otro, se agregaron la mezcla de aminoácidos, el premix, la metionina marcada y se incluyó Ribolock (Fermentas) como inhibidor de ARNasas (Mezcla 2). Por último, al extracto S30, que contiene la maquinaria de síntesis de proteínas, se agregó ARNasa P (M1 y C5) o agua DEPC (Mezcla 3). Las reacciones se ensamblaron de acuerdo a las siguientes proporciones:

Mezcla 1: 500 ng de pFC9 y 10 pmol de EGS para un volumen de 1,7 µl final.

Mezcla 2: 5 µl aminoácidos sin metionina, 24 µl premix, 1 µl de ³⁵S-metionina y 1 µl de Ribolock.

Mezcla 3: 18 µl de extracto S30 y 4,25 µl de agua DEPC ó 2,5 µl de ARN M1 y 1,75 µl de la proteína C5.

A continuación la Mezcla 3 se preincubó 15 minutos a 37°C. Luego se agregó a la Mezcla 2 y se homogeneizó suavemente con micropipeta. Finalmente, 13,3 µl del homogenato se agregaron a cada Mezcla 1 obteniéndose un volumen final de 15 µl que se incubó a 37°C por 45 minutos. La reacción se detuvo por enfriamiento a -20°C o agregando directamente 4 volúmenes de acetona fría. Para la purificación se mantuvo en hielo al menos 15 minutos y se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima para precipitar las proteínas. Tras secar el sobrenadante con speedvac se resuspendió en buffer de crackeo 1X y se desnaturizó la muestra calentando 5 minutos a 100°C. Los resultados del experimento se analizaron por PAGE al 12%. El gel se secó sobre papel, se expuso toda la noche y se reveló mediante Phosphoimager (Storm 840, Molecular Dynamics).

Ensayos de degradación de EGSs:

Cultivos de toda la noche de *Escherichia coli* DH5α se diluyeron 1/100 y se incubaron en agitación a 37°C hasta una DO₆₀₀=1. Se tomó 1 ml de cultivo y se sonicó 5 segundos 6 veces en hielo. Luego 20 pmol del EGS marcado radiactivamente correspondiente se incubó con 6 µl de los lisados celulares o 6 µl de los cultivos por los tiempos indicados. Luego se agregó un volumen de Buffer de Carga II y se calentó la muestra a 85°C durante 2 minutos. Las muestras se resolvieron mediante 15% PAGE desnaturizante. El gel fue secado y analizado mediante Phosphoimager (Storm 840, Molecular Dynamics).

Ensayos de reversión de fenotipo por expresión de EGSs:

Cultivos de toda la noche de *Escherichia coli* BL21(DE3)(pNW1) que alojaban al plásmido recombinante que expresa el EGS a ser ensayado, se diluyeron hasta alcanzar una DO_{600} de 0,05 en LB suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y/o 15 $\mu\text{g/ml}$ de amikacina, en un volumen final de 15 ml. Luego se incubaron con una agitación de 250 rpm en un baño de agua a 37°C por 5 horas. Regularmente se tomaron alícuotas del cultivo y se midió la DO_{600} .

Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima se realizaron ensayos de microdilución de manera similar a los protocolos establecidos por el CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). En primer lugar, cultivos de toda la noche de cepas con plásmidos para la expresión de EGSs fueron diluidos al céntimo y se cultivaron en medio MH suplementado con 200 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina hasta una DO_{600} de 0,6-0,8. El inóculo empleado para el experimento fue una dilución al décimo de este cultivo. Luego, placas multipocillo de 96 espacios fueron llenados con 100 μl de medio MH suplementado con ampicilina evitar la pérdida de los plásmidos que codificaban los EGSs (J. McKinney et al. 2001). Los pocillos fueron empleados para hacer diluciones de amikacina seriadas al medio, generando un gradiente de 128 a 0 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico (en el volumen final de 125 μl). Cada pocillo fue inoculado cuidadosamente con 25 μl del inóculo de manera de agregar $\approx 6,5 \times 10^3$ células por pocillo. Cada cepa fue ensayada por triplicado. La proliferación celular fue determinada 18hs después midiendo DO_{595} en un lector de Elisa 3550 (BioRad).

Para la medición de actividad in vivo de cooligómeros de LNA/ADN se partió de un cultivo de toda la noche de la cepa hiperpermeable *E.coli* AS19 (pFC9) en LB suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Antes de iniciar el ensayo se probó la sensibilidad de la cepa a lisozima, para evitar la reversión de la mutación de hiperpermeabilidad por la metodología descrita por Sekiguchi e Iida (Sekiguchi et Iida, 1967). Se colocaron entonces 10^5 células por pocillo en una placa de 96 multipocillos con las concentraciones indicadas de LNA, en un volumen final de 150 μl . Después de 2 horas de cultivo a 37°C con agitación a 150 rpm se agregó amikacina hasta una concentración final de 40 $\mu\text{g/ml}$. Tras una hora de incubación a 37°C con agitación, las células fueron diluidas y sembradas en LB-ágar. Al día siguiente se contaron las unidades formadoras de colonia en cada caso. Los experimentos se repitieron tres veces, por triplicado sembrándose cada vez por cuadruplicado. El análisis estadístico se efectuó con el programa GraphPad 4.0 (GraphPad Software). Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación de multigrupos seguido de un test de Bonferroni para el análisis post-ANOVA para la comparación de grupos no apareados. Se consideraron diferencias significativas si $p < 0,05$.

Electroforesis en geles de agarosa:

La separación para el análisis y/o purificación de fragmentos obtenidos de ADN fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa, generalmente entre 0,8 y 3 % (p/v) conteniendo 1-2 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Ocasionalmente, los geles fueron teñidos y desteñidos tras la corrida y no se agregó el colorante a la mezcla del gel. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado en un sistema digital de adquisición de imágenes.

Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida:

Para la resolución de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida se empleó el equipo miniprotean III siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de los geles se empleó una solución 40% m/v de poliacrilamida:bisacrilamida 19:1 en agua DEPC como stock. La concentración final varió entre 5 y 20% de acuerdo al tamaño de fragmentos a resolver. En el caso de geles desnaturizantes se agregó urea sólida hasta una concentración final de 7M. Se emplearon diferentes buffers de corrida, TAE, TBE o bien GTG (USB Corporation). En todos los casos se mezclaron los componentes con agua MilliQ o DEPC de modo tal de obtener una solución final con la concentración de poliacrilamida deseada, 7M urea para las geles desnaturizantes y 1X del buffer de corrida. A la mezcla de componentes se agregó 1/1000 volúmen de TEMED y 1/200 volúmen de 20% persulfato de amonio (PSA). Para la corrida de las muestras se agregó un volumen de Buffer de Carga II (ver Ensayos de corte por ARNasa P) y tras su desnaturización fueron sometidas a un campo eléctrico de 100-150V por una hora.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS:

Se empleó el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Para la polimerización y electroforesis del gel se utilizó el sistema Miniprotean III (BioRad). Los componentes se agregaron en el orden en que aparecen en la tabla. En todos los casos se agregó en último término la solución de persulfato de amonio (PSA) y la N,N,N',N'-Tetrametil-etilen-diamino (TEMED) dado que estos compuestos catalizan la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida. La proporción de agua y acrilamida varió según la concentración de poliacrilamida a emplear en el gel.

Sol. STOCK	Gel de Resolución 15 %	Gel de apilamiento5%
H2O d	1,8 ml	0,78 ml

Tris HCl	1,8 ml de 1,5M pH=8,8	1,25 ml de 0,25M pH=6,8
Acrilamida 30/ (p/v)	3,75 ml	0,425 ml
SDS 20/	37,5 μ l	12,5 μ l
TEMED	7 μ l	3,0 μ l
PSA 10/	75 μ l	30 μ l
Volumen Final	7,5 ml	2,5 ml

Buffer de corrida: Tris 25mM, Glicina 192mM, 0,1% SDS a pH=8,3

Buffer de crackeo (CB): 100 mM TrisHCl pH=6.8, 20% glicerol, 1% SDS, 1 mM EDTA, 100 mM DTT y 0,005% de azul de bromofenol.

Solución colorante: Coomassie Brilliant Blue R250 0.1% (p/v) en ácido acético al 7%.

Solución Decolorante: Ácido acético al 7%

Las muestras en CB se colocaron 5 minutos a 95°C, se vortexearon y centrifugaron por un minuto a máxima velocidad para luego sembrarse en el gel. En el caso de los pellets bacterianos se emplearon 100 μ l de CB por cada ml de cultivo con una unidad de DO₆₀₀. La coloración y decoloración de los geles se realizó tras un prelavado de 5 minutos en solución decolorante.

Transferencia de geles de poliacrilamida a membranas de polivinilideno difluoruro (PDVF):

Se empleó el mismo equipo que para la corrida. Se siguieron las instrucciones del fabricante (BioRad). Brevemente, se enjuagó el fragmento de membrana de PDVF en metanol y se procedió al armado del cassette en el siguiente orden: papel Watman 3MM, gel, membrana, papel Watman 3MM. Todos estos elementos se preincubaron por 15 minutos en buffer de transferencia. Se transfiere durante toda la noche a 20-30mA (30V) en buffer de transferencia frío con el aparato sumergido en hielo. Si no se decolora el gel de poliacrilamida teñido puede verse directamente en la transferencia sobre la membrana pudiendo evaluarse la efectividad del proceso.

Secuenciación de extremo N-terminal de proteínas:

Para la determinación del extremo amino terminal de AAC(6')-Ib incluida en InV117, se prepararon proteínas totales a partir de cultivos de toda la noche. Tras la corrida

electroforética y transferencia a membrana de PDVF, se cortó el trozo de membrana conteniendo el sitio de migración de AAC(6')-Ib y se envió al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires para un análisis por degradación de Edman.

Análisis por Western Blot:

Para los ensayos se empleó como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal de conejo contra AAC(6')-Ib suministrado por el Laboratorio de Marcelo Tolmasky. Brevemente, se enjuagó 2-3 veces las membranas con TBS 1X, con agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear las membranas se suplementó el TBS con BSA al 3% y se incubó durante 30 min con agitación a temperatura ambiente. Luego se agregó una milésima de volumen del anticuerpo primario y se dejó en agitación toda la noche a 4°C. Tras 2-3 lavados sucesivos con TBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación se agrega una dosmilésima de volumen del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) en TBS 1X-BSA 3% y se incubó en agitación una hora a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados con TBS 1X durante 30 minutos con agitación. Para el revelado se equilibraron las membranas con buffer fosfatasa alcalina. Tras descartar se incubó 5 minutos con el mismo buffer para el revelado (15 ml). Se agregaron 60 µl de NBT (50 mg/ml), agitando y luego se agregaron 60 µl de BCIP (25mg/ml) sin dejar de agitar suavemente. Se agitó hasta la aparición del color frenando la reacción por enjuague con agua destilada.

Buffer fosfatasa alcalina: 100 mM TrisHCl pH=9.6, 8 mM MgCl₂

NBT (50mg/ml) en DMF 70% (dimetilformamida) BCIP (25mg/ml) en agua MQ

TBS 1X: 0,1 M Tris, 1% de NaCl pH=7.6.

BIBLIOGRAFÍA

- Alekshun, M.N. & Levy, Stuart B, 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), pp.1037-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382878>.
- Allen, H.K. et al., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews. Microbiology*, 8(4), pp.251-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190823>.
- Altman, Sidney, 2007. A view of RNase P. *Molecular bioSystems*, 3(9), pp.604-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700860>.
- Alvarez-Martinez, C.E. & Christie, P.J., 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(4), pp.775-808. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Aminov, R.I., 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental microbiology*, 11(12), pp.2970-88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601960>.
- Aminov, R.I. & Mackie, R.I., 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS microbiology letters*, 271(2), pp.147-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17490428>.
- Andriole, V.T., 2005. The quinolones: past, present, and future. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 Suppl 2(Suppl 2), pp.S113-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15942877>.
- Arduino, S.M. et al., 2003. Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), pp.3945-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=296183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Arduino, S.M. et al., 2002. blaCTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(7), pp.2303-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069995>.
- Armstrong, G.L., 1999. Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(1), pp.61-66. Available at: <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/1/61>.
- Auchtung, J.M. et al., 2005. Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 102(35), pp.12554-9.
Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/102/35/12554>.

Barillà, D., Carmelo, E. & Hayes, Finbarr, 2007. The tail of the ParG DNA segregation protein remodels ParF polymers and enhances ATP hydrolysis via an arginine finger-like motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), pp.1811-6. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1794263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Barillà, D. & Hayes, Finbarr, 2003. Architecture of the ParF*ParG protein complex involved in prokaryotic DNA segregation. *Molecular microbiology*, 49(2), pp.487-99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828644>.

Barillà, D. et al., 2005. Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF. *The EMBO journal*, 24(7), pp.1453-64. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1142544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Belogurov, A. A. et al., 2000. Antirestriction protein Ard (Type C) encoded by IncW plasmid pSa has a high similarity to the "protein transport" domain of TraC1 primase of promiscuous plasmid RP4. *Journal of molecular biology*, 296(4), pp.969-77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686096>.

Bignell, C. & Thomas, C M, 2001. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *Journal of biotechnology*, 91(1), pp.1-34. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522360>.

Biskri, L. et al., 2005. Comparative study of class 1 integron and *Vibrio cholerae* superintegron integrase activities. *Journal of bacteriology*, 187(5), pp.1740-50.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1063995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Bouet, J.-Y., Nordström, K. & Lane, D., 2007. Plasmid partition and incompatibility--the focus shifts. *Molecular microbiology*, 65(6), pp.1405-14. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714446>.

Boyd, E.F., Almagro-Moreno, S. & Parent, M. a, 2009. Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends in microbiology*, 17(2), pp.47-53.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19162481>.

Breidenstein, E.B.M. et al., 2008. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(12), pp.4486-91. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2592849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Burrows, L.L., 2005. Weapons of mass retraction. *Molecular microbiology*, 57(4), pp.878-88.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091031>.

- Burrus, V. et al., 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular Microbiology*, 46(3), pp.601-610. Available at: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118923565/abstract>.
- Burrus, V. et al., 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular microbiology*, 46(3), pp.601-10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410819>.
- Burrus, V. & Waldor, M.K., 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Research in microbiology*, 155(5), pp.376-86. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.012>.
- Camilli, A. & Bassler, B.L., 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* (New York, N.Y.), 311(5764), pp.1113-6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2776824&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cantón, R., 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 Suppl 1, pp.20-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220348>.
- Cantón, Rafael & Coque, T.M., 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology*, 9(5), pp.466-75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942899>.
- Cantón, Rafael et al., 2006. In117, an Unusual In0-Like Class 1 Integron Containing CR1 and. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(2), pp.799-802.
- Cascales, E. & Christie, P.J., 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology*, 1(2), pp.137-49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035043>.
- Cegelski, L. et al., 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1), pp.17-27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2211378&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chamorro, R.M. et al., 1990. Dissemination of plasmid-mediated amikacin resistance among pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Medicina (B aires)*, 50, pp.543-547.
- Chandler, M & Mahillon, J., 2002. Insertion sequences revisited. In N. Craig et al., eds. *Mobile DNA*, vol II. ASM press, pp. 305-366.
- Chen, H., Ferbeyre, G. & Cedergren, R., 1997. Efficient hammerhead ribozyme and antisense RNA targeting in a slow ribosome *Escherichia coli* mutant. *Nature biotechnology*, 15(5), pp.432-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131620>.

- Chen, I. & Dubnau, David, 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature reviews. Microbiology*, 2(3), pp.241-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15083159>.
- Chen, Y.-T. et al., 2006. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum-beta-lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), pp.3861-6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1635178&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Christie, P.J., 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular microbiology*, 40(2), pp.294-305. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309113>.
- Cirz, R.T. et al., 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS biology*, 3(6), p.e176. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869329>.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E. & Hung, D.T., 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, 3(9), pp.541-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17710100>.
- Croucher, N.J. et al., 2009. Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae* Spain23F ST81. *Journal of bacteriology*, 191(5), pp.1480-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2648205&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cruz, F. de la et al., 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(1), pp.18-40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919603>.
- Cueva-Méndez, G. de la & Pimentel, B., 2007. Gene and cell survival: lessons from prokaryotic plasmid R1. *EMBO reports*, 8(5), pp.458-64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Davies, Julian, 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264(5157), pp.375-385.
- Davies, Julian & Rownd, R., 1972. Transmissible multiple drug resistance in *Enterobacteriaceae*. *Science*, 176(4036), pp.758-768.
- Davies-Sala, C., 2010. Inhibición de la expresión del gen bacteriano *ftsZ* mediante tecnología antisentido.
- Di Conza, J.A. & Gutkind, G.O., 2010. [Integrans: gene collectors]. *Revista Argentina de microbiología*, 42(1), pp.63-78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20461298>.

- Di Conza, J. et al., 2002. Novel class 1 integron (InS21) carrying blaCTX-M-2 in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(7), pp.2257-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069984>.
- Ding, Y., 2006. Statistical and Bayesian approaches to RNA secondary structure prediction. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(3), pp.323-31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1383571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ding, Z., Atmakuri, K. & Christie, P.J., 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends in microbiology*, 11(11), pp.527-35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607070>.
- Dubern, J.-F. & Diggle, S.P., 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular bioSystems*, 4(9), pp.882-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704225>.
- Dubnau, D., 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological reviews*, 55(3), pp.395-424. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943994>.
- D'Costa, V.M. et al., 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5759), pp.374-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424339>.
- Eckert, C., Gautier, V. & Arlet, G., 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(1), pp.14-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291869>.
- Elmén, J. et al., 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, 452(7189), pp.896-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18368051>.
- Eriksson, M., Nielsen, Peter E & Good, Liam, 2002. Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 277(9), pp.7144-7. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/277/9/7144>.
- Evans, D., Marquez, S.M. & Pace, N.R., 2006. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends in biochemical sciences*, 31(6), pp.333-41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2006.04.007>.
- Fajardo, A. et al., 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PloS one*, 3(2), p.e1619. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2238818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Falconer, S.B. & Brown, E.D., 2009. New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Current opinion in microbiology*, 12(5), pp.497-504. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651534>.

- Fillion, P. et al., 2001. Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1515, pp.44-54.
- Fischbach, M.A. & Walsh, C.T., 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325(5944), pp.1089-93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2802854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gao, M.-Y. et al., 2005. Chloramycetin resistance of clinically isolated E coli is conversed by using EGS technique to repress the chloramycetin acetyl transferase. *World journal of gastroenterology : WJG*, 11(46), pp.7368-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437645>.
- Garau, G., Di Guilmi, A.M. & Hall, B.G., 2005. Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), pp.2778-84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1168685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gay, K. et al., 2006. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of. *Clinical and Infectious disease*, 43, pp.297-304.
- Geller, B.L., 2005. Antibacterial antisense. *Current opinion in molecular therapeutics*, 7(2), pp.109-13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15844617>.
- Geller, B.L. et al., 2005. Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer inhibits viability of Escherichia coli in pure culture and in mouse peritonitis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55(6), pp.983-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15872045>.
- Gerdes, Kenn, Christensen, S.K. & Løbner-Olesen, A., 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature reviews. Microbiology*, 3(5), pp.371-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864262>.
- Goh, S. et al., 2009. Concurrent growth rate and transcript analyses reveal essential gene stringency in Escherichia coli. *PloS one*, 4(6), p.e6061. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2698124&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Golovanov, A.P. et al., 2003. ParG, a protein required for active partition of bacterial plasmids, has a dimeric ribbon-helix-helix structure. *Molecular microbiology*, 50(4), pp.1141-53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622405>.
- Good, L., 2003. Translation repression by antisense sequences. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(5), pp.854-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12827275>.

- Good, L et al., 2001. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nature biotechnology*, 19(4), pp.360-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283595>.
- Good, L & Nielsen, P E, 1998. Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp.2073-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482840>.
- Good, Liam et al., 2000. Antisense PNA effects in *Escherichia coli* are limited by the outer-membrane LPS layer. *Microbiology*, 146, pp.2665-2670.
- Gopalan, V., Vioque, Agustin & Altman, Sidney, 2002. RNase P: variations and uses. *The Journal of biological chemistry*, 277(9), pp.6759-62. Available at: <http://www.jbc.org>.
- Guerrier-takada, C., Li, Y. & Altman, S, 1995. Artificial regulation of gene expression in *Escherichia coli* by RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, pp.11115-11119.
- Guerrier-Takada, C., Salavati, R. & Altman, S, 1997. Phenotypic conversion of drug-resistant bacteria to drug sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), pp.8468-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9238000>.
- Gupta, N. et al., 2010. A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo. *PloS one*, 5(5), p.e10682. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hacker, J. & Kaper, J.B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual review of microbiology*, 54, pp.641-79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018140>.
- Hall, B.G. & Barlow, M., 2004. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 7(2), pp.111-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158767>.
- Hall, Rm & Partridge, Sr, 2003. The IS1111 Family Members IS4321 and IS5075 Have Subterminal Inverted Repeats and Target the Terminal Inverted Repeats of Tn21 Family Transposons. *Journal of bacteriology*, 185(21), pp.6371-6384.
- Hall, Ruth M. & Collis, C.M., 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15(4), pp.593-600. Available at: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119252158/abstract>.
- Ham, R.C. van, Moya, A & Latorre, A, 1997. Putative evolutionary origin of plasmids carrying the genes involved in leucine biosynthesis in *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of aphids). *Journal of bacteriology*, 179(15), pp.4768-77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9244264>.

- Harth, G et al., 2000. Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), pp.418-23. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Harth, Günter et al., 2007. Hairpin extensions enhance the efficacy of mycolyl transferase-specific antisense oligonucleotides targeting *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17), pp.7199-204. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1855390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hayes, F, 2000. The partition system of multidrug resistance plasmid TP228 includes a novel protein that epitomizes an evolutionarily distinct subgroup of the ParA superfamily. *Molecular microbiology*, 37(3), pp.528-41. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931346>.
- Hayes, Finbarr & Barillà, D., 2006a. Assembling the bacterial segrosome. *Trends in biochemical sciences*, 31(5), pp.247-50. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16584885>.
- Hayes, Finbarr & Barillà, D., 2006b. The bacterial segrosome: a dynamic nucleoprotein machine for DNA trafficking and segregation. *Nature reviews. Microbiology*, 4(2), pp.133-43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415929>.
- Hayes, Finbarr & Barillà, D., 2006. The bacterial segrosome: a dynamic nucleoprotein machine for DNA trafficking and segregation. *Nature reviews. Microbiology*, 4(2), pp.133-43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1342>.
- Hebert, C.G., Valdes, J.J. & Bentley, W.E., 2008. Beyond silencing--engineering applications of RNA interference and antisense technology for altering cellular phenotype. *Current opinion in biotechnology*, 19(5), pp.500-5. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760358>.
- Ho, S.P. et al., 1996a. Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic acids research*, 24(10), pp.1901-7. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ho, S.P. et al., 1996b. Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic acids research*, 24(10), pp.1901-7. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657572>.

- Houghton, J.L. et al., 2010. The Future of Aminoglycosides: The End or Renaissance? *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*, 11(7), pp.880-902. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397253>.
- Jepsen, J.S. & Wengel, Jesper, 2004. LNA-antisense rivals siRNA for gene silencing. *Current opinion in drug discovery & development*, 7(2), pp.188-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15603252>.
- Joyce, G.F., 2001. RNA cleavage by the 10-23 DNA enzyme. *Methods in enzymology*, 341, pp.503-17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11582801>.
- Juhas, M. et al., 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), pp.376-93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2704930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kazantsev, A.V. & Pace, N.R., 2006. Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nature reviews. Microbiology*, 4(10), pp.729-40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16980936>.
- Kim, T.-W. et al., 2006. Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *Journal of biotechnology*, 126(4), pp.554-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16797767>.
- Kirsebom, L A & Svärd, S.G., 1994. Base pairing between Escherichia coli RNase P RNA and its substrate. *The EMBO journal*, 13(20), pp.4870-6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=395427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kirsebom, L. a, 2007. RNase P RNA mediated cleavage: substrate recognition and catalysis. *Biochimie*, 89(10), pp.1183-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624654>.
- Ko, J.-hyeong, Izadjoo, M. & Altman, Sidney, 2008. Inhibition of expression of virulence genes of Yersinia pestis in Escherichia coli by external guide sequences and RNase P. RNA (New York, N.Y.), 14(8), pp.1656-62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18567813>.
- Kotra, L.P., Haddad, J. & Mobashery, S., 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(12), pp.3249-56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=90188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kurreck, J., 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), pp.1628-1644. Available at: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046%2Fj.1432-1033.2003.03555.x>.
- Kurreck, J. et al., 2002. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic acids research*, 30(9), pp.1911-8. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=113840&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Kurupati, P. et al., 2007. Inhibition of gene expression and growth by antisense peptide nucleic acids in a multiresistant beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(3), pp.805-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158940>.
- Köhler, C. et al., 1996. Use of T7 RNA polymerase in an optimized *Escherichia coli* coupled in vitro transcription-translation system. Application in regulatory studies and expression of long transcription units. *European journal of biochemistry / FEBS*, 236(1), pp.234-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617270>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>.
- Lai, L.B. et al., 2010. Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects. *FEBS letters*, 584(2), pp.287-96. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2799185&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lan, R., Reeves, P.R. & Octavia, S., 2009. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(5), pp.996-1005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.011>.
- Langel, U., with Lehto, T. et al., Samir El Andalousi, 2010. Delivery of nucleic acids with a stearylated (RxR)₄ peptide using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 141(1), pp.42-51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744531>.
- Lawley, T.D. et al., 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS microbiology letters*, 224(1), pp.1-15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855161>.
- Lee, C.A., Babic, A. & Grossman, A.D., 2010. Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Molecular microbiology*, 75(2), pp.268-79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943900>.
- Li, X.-Z. & Nikaido, Hiroshi, 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), pp.159-204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14717618>.
- Li, Y. & Altman, S, 1996. Cleavage by RNase P of gene N mRNA reduces bacteriophage lambda burst size. *Nucleic acids research*, 24(5), pp.835-42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600449>.
- Li, Y., Guerrier-Takada, C. & Altman, S, 1992. Targeted cleavage of mRNA in vitro by RNase P from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America, 89(8), pp.3185-9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373488>.
- Liebert, C.A., Hall, R M & Summers, A.O., 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63(3), pp.507-22. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=103744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lima, W.F. et al., 1997. Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *The Journal of biological chemistry*, 272(1), pp.626-38. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995306>.
- Lin, T.-L. et al., 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *Journal of bacteriology*, 190(2), pp.515-26. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2223707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Llosa, M. et al., 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular microbiology*, 45(1), pp.1-8. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100543>.
- Lujan, S.A. et al., 2007. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), pp.12282-7. Available at:
<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/104/30/12282>.
- Lundblad, Eirik W et al., 2008. Rapid selection of accessible and cleavable sites in RNA by *Escherichia coli* RNase P and random external guide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), pp.2354-7. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lundblad, Eirik Wasmuth & Altman, Sidney, 2010. Inhibition of gene expression by RNase P. *New biotechnology*, 00(00). Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211282>.
- Ma, M. et al., 2000. Intracellular mRNA cleavage induced through activation of RNase P by nuclease-resistant external guide sequences. *Nature biotechnology*, 18(1), pp.58-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625392>.
- Mahillon, J., 1999. IS elements as constituents of bacterial genomes. *Research in Microbiology*, 150(9-10), pp.675-687. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250899001242>.
- Mahillon, J. & Chandler, M, 1998. Insertion Sequences. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 62(3), pp.725-774.

- Martinez, J.L., 2009a. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276(1667), pp.2521-30. Available at:
<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/content/abstract/276/1667/2521>.
- Martinez, J.L., 2009b. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276(1667), pp.2521-30. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2684669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Martínez, J.L., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5887), pp.365-7. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635792>.
- Martínez, J.L. & Baquero, F., 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), pp.647-79. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126860&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Marvin, M.C. & Engelke, D.R., 2009. Broadening the mission of an RNA enzyme. *Journal of cellular biochemistry*, 108(6), pp.1244-51. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2800852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mazel, D & Davies, J, 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 56(9-10), pp.742-54. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11212334>.
- Mazel, Didier, 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 4(8), pp.608-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845431>.
- McGhee, G.C. & Jones, A.L., 2000. Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), pp.4897-907. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055941>.
- McKinney, J. et al., 2001. Inhibition of *Escherichia coli* viability by external guide sequences complementary to two essential genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), pp.6605-10. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381134>.
- McKinney, J.S. et al., 2004. Disruption of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by external guide sequences. *Nucleic acids research*, 32(2), pp.848-54. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Mäe, M. et al., 2009. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 134(3), pp.221-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105971>.
- Møller-Jensen, J., Jensen, R.B. & Gerdes, K., 2000. Plasmid and chromosome segregation in prokaryotes. *Trends in microbiology*, 8(7), pp.313-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878766>.
- Nakashima, N., Tamura, T. & Good, Liam, 2006. Paired termini stabilize antisense RNAs and enhance conditional gene silencing in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 34(20), p.e138. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17062631>.
- Nakaya, R., Nakamura, A. & Murata, Y., 1960. Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochemical and biophysical research communications*, 3, pp.654-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13727669>.
- Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5157), pp.382-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8153625>.
- Nikaido, Hiroshi, 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78(2), pp.119-46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2839888&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nikravesh, A. et al., 2007. Antisense PNA accumulates in *Escherichia coli* and mediates a long post-antibiotic effect. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(8), pp.1537-42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17534267>.
- Nobuta, K. et al., 1988. Sequencing and expression of the 6'-N-acetyltransferase gene of transposon Tn1331 from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 170(8), pp.3769-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2841303>.
- Norman, A., Hansen, L.H. & Sørensen, S.J., 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1527), pp.2275-89. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Núñez, B. & De La Cruz, F., 2001. Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Molecular microbiology*, 39(4), pp.1088-99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251827>.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. & Groisman, E. a, 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), pp.299-304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10830951>.

- Orman, B. E. et al., 2002. Evolution of Multiresistance in Nontyphoid Salmonella Serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), pp.3963-3970. Available at: <http://aac.asm.org/cgi/content/abstract/46/12/3963>.
- Palumbi, S.R., 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5536), pp.1786-90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11546863>.
- Parkhill, J et al., 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858), pp.848-52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11677608>.
- Parsons, Y., Hall, R M & Stokes, H.W., 1991. A new trimethoprim resistance gene, dhfrX, in the In7 integron of plasmid pDGO100. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(11), pp.2436-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=245401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Partridge, S, Brown, H. & Hall, R, 2002. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46(5), pp.1288-1294.
- Partridge, S & Hall, R, 2003. In34, a complex In5 family class 1 integron containing orf513 and dfrA10. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, pp.342-349.
- Partridge, S et al., 2001. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob. Agents Chemother*, 45, pp.3014-3020.
- Partridge, Sr & Hall, Rm, 2004. Complex Multiple Antibiotic and Mercury Resistance Region Derived from the r-det of NR1 (R100). *Antimicrob. Agents Chemother*, 48(11), pp.4250-4255.
- Perreault, J.P. & Altman, S, 1992. Important 2'-hydroxyl groups in model substrates for M1 RNA, the catalytic RNA subunit of RNase P from Escherichia coli. *Journal of molecular biology*, 226(2), pp.399-409. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379304>.
- Pesci, E.C. et al., 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), pp.11229-34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Petroni, A et al., 2002. Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46(5), pp.1462-1468.
- Petroni, Alejandro et al., 2002. Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(5), pp.1462-8. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Pourreza, A. et al., 2005. Mutagenesis analysis of a conserved region involved in acetyl coenzyme A binding in the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib encoded by plasmid pJHCMW1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), pp.2979-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980378>.
- Power, P. et al., 2005. Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55(4), pp.461-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743901>.
- Prentice, M.B. et al., 2001. *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid. *Journal of bacteriology*, 183(8), pp.2586-94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pérez-Brocal, V. et al., 2006. A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science (New York, N.Y.)*, 314(5797), pp.312-3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038625>.
- Quiroga, M.P. et al., 2007. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(12), pp.4466-70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2167984&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rajeev, L., Malanowska, K. & Gardner, J.F., 2009. Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(2), pp.300-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2698419&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ramirez, M.S. et al., 2010. Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of clinical microbiology*, 48(4), pp.1488-90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Randau, L., Schröder, I. & Söll, D., 2008. Life without RNase P. *Nature*, 453(7191), pp.120-3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451863>.
- Rasmussen, L.C.V., Sperling-Petersen, H.U. & Mortensen, K.K., 2007. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microbial cell factories*, 6, p.24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692125>.

- Rawlings, D.E. & Tietze, E., 2001. Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 65(4), pp.481-96, table of contents. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99038&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Recchia, G.D. & Hall, R M, 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology (Reading, England)*, 141 (Pt 1, pp.3015-27. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8574395>.
- Rice, L.B., 2009. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology*, 12(5), pp.476-81. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716760>.
- Robicsek, A. et al., 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature medicine*, 12(1), pp.83-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369542>.
- Roush, W., 1997. Biotechnology: Antisense Aims for a Renaissance. *Science*, 276(5316), pp.1192-1193. Available at: <http://www.sciencemag.org>.
- Rowe-Magnus, D.A. et al., 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), pp.652-7. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=14643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rådström, P. et al., 1994. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *Journal of bacteriology*, 176(11), pp.3257-68. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=205496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Salyers, A.A. et al., 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiological reviews*, 59(4), pp.579-90. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Santoro, S.W. & Joyce, G.F., 1997. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), pp.4262-6. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20710&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sarno, R et al., 2003. Inhibition of aminoglycoside 6J-N-acetyltransferase type Ib-mediated amikacin resistance by antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, pp.3296-3304.

- Sarno, Renee et al., 2002. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), pp.3422-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384346>.
- Schmidt, K.S. et al., 2004. Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic acids research*, 32(19), pp.5757-65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=528785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schröder, G. & Lanka, Erich, 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid*, 54(1), pp.1-25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2005.02.001>.
- Schröder, G. & Lanka, Erich, 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid*, 54(1), pp.1-25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15907535>.
- Schubert, Sören et al., 2004. A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Molecular microbiology*, 51(3), pp.837-48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731283>.
- Schumacher, M.A. et al., 2007. Segrosome structure revealed by a complex of ParR with centromere DNA. *Nature*, 450(7173), pp.1268-71. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06392>.
- Sekiguchi, M. & Iida, S., 1967. MUTANTS OF *ESCHERICHIA COLI* PERMEABLE TO ACTINOMYCIN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(6), pp.2315-20.
- Selinger, D.W. et al., 2000. RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nature biotechnology*, 18(12), pp.1262-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101804>.
- Shakya, T. & Wright, G.D., 2010. Nucleotide selectivity of antibiotic kinases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(5), pp.1909-13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2863675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shapiro, B.A. et al., 2007. Bridging the gap in RNA structure prediction. *Current opinion in structural biology*, 17(2), pp.157-65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17383172>.
- Sharma, C.M. et al., 2010. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 464(7286), pp.250-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164839>.
- Shen, N. et al., 2009. Inactivation of expression of several genes in a variety of bacterial species by EGS technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America, 106(20), pp.8163-8. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2688897&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Siguier, P., Filée, J. & Chandler, Michael, 2006. Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current opinion in microbiology*, 9(5), pp.526-31. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.005>.
- Solar, G. del et al., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(2), pp.434-64. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98921&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Soler Bistué, A.J., 2005. Un integrón tipo 1 atípico como responsable de la resistencia a amikacina en *Vibrio cholerae*.
- Song, Y. et al., 2004. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 11(3), pp.179-97. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15368893>.
- Stokes, H.W. et al., 2001. Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), pp.5240-6. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=93296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stokes, H.W. et al., 1993. The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid*, 30(1), pp.39-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8378445>.
- Strauch, E. et al., 2003. A cryptic plasmid of *Yersinia enterocolitica* encodes a conjugative transfer system related to the regions of CloDF13 Mob and IncX Pil. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 10), pp.2829-45. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523116>.
- Summers, D., 1998. Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Molecular microbiology*, 29(5), pp.1137-45. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767582>.
- Sun, F.-J. & Caetano-Anollés, G., 2010. The ancient history of the structure of ribonuclease P and the early origins of Archaea. *BMC Bioinformatics*, 11(1), p.153. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2858038&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Svärd, S.G., Kagardt, U. & Kirsebom, L A, 1996. Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(5), pp.463-72. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1369387&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Symons, R.H., 1989. Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends in biochemical sciences*, 14(11), pp.445-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2696172>.
- Tadokoro, T. & Kanaya, S., 2009. Ribonuclease H: molecular diversities, substrate binding domains, and catalytic mechanism of the prokaryotic enzymes. *The FEBS journal*, 276(6), pp.1482-93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228197>.
- Tamae, C. et al., 2008. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(17), pp.5981-8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2519525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tan, X.-X. et al., 2004. DNA enzyme generated by a novel single-stranded DNA expression vector inhibits expression of the essential bacterial cell division gene *ftsZ*. *Biochemistry*, 43(4), pp.1111-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744157>.
- Taubes, G., 2008. The bacteria fight back. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5887), pp.356-61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635788>.
- Thomas, Christopher M, 2000. Paradigms of plasmid organization. *Molecular microbiology*, 37(3), pp.485-91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931342>.
- Thorsted, P.B. et al., 1998. Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *Journal of molecular biology*, 282(5), pp.969-90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9753548>.
- Tilley, L.D. et al., 2007. Antisense peptide-phosphorodiamidate morpholino oligomer conjugate: dose-response in mice infected with *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(1), pp.66-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079242>.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M. & Walsh, T.R., 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(2), pp.296-316. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760305>.
- Tolmasky, M E, 2000. Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: the Tn1331 transposon paradigm. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 5, pp.D20-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702385>.
- Tolmasky, M E et al., 1988. Transposon-mediated amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(9), pp.1416-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848445>.
- Tolmasky, M E et al., 2000. Stability by multimer resolution of pJHCMW1 is due to the Tn1331 resolvase and not to the *Escherichia coli* Xer system. *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 3, pp.581-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746761>.

- Tolmasky, M E & Crosa, J.H., 1987. Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(12), pp.1955-60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2830842>.
- Tolmasky, M E et al., 1986. Molecular cloning of amikacin resistance determinants from a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 30(2), pp.315-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021052>.
- Tolmasky, Marcelo E et al., 1988. Transposon-Mediated Amikacin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(9), pp.1416-1420.
- Trigueros, S. et al., 2009. mwr Xer site-specific recombination is hypersensitive to DNA supercoiling. *Nucleic acids research*, 37(11), pp.3580-7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2699498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vakulenko, S.B. & Mobashery, S., 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, pp.430-450.
- Vanhooft, R., Hannecart-Pokorni, E. & Content, J., 1998. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(2), p.483. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527817>.
- Verdet, C. et al., 2000. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the bla(DHA-1) gene and its regulator gene ampR, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(1), pp.222-5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wahlestedt, C et al., 2000. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp.5633-8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Walsh, T.R., 2006. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Current opinion in microbiology*, 9(5), pp.476-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942901>.
- Wegscheid, B. & Hartmann, R.K., 2007. In vivo and in vitro investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA. *Nucleic acids research*, 35(6), pp.2060-73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1874595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weihofen, W.A. et al., 2006. Structures of omega repressors bound to direct and inverted DNA repeats explain modulation of transcription. *Nucleic acids research*, 34(5), pp.1450-8. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/34/5/1450>.

- Welch, T.J. et al., 2007. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PloS one*, 2(3), p.e309. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1819562&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- White, D G et al., 1997. Inhibition of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli* by antisense DNA analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(12), pp.2699-704. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=164191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Witte, W., 2004. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 4(3), pp.187-91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15450197>.
- Wolj, M. et al., 1986. Plasmid-encoded amikacin resistance in multiresistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonates with meningitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 29(2), pp.315-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3521478>.
- Woodford, N. & Wareham, D.W., 2009. Tackling antibiotic resistance: a dose of common antisense? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(2), pp.225-9. Available at: <http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/63/2/225>.
- Wright, G., 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), pp.563-569. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593103001066>.
- Xiao, G. et al., 2010. Morpholino oligonucleotides do not participate perfectly in standard Watson-Crick complexes with RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, pp.3-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817753>.
- Yim, G., Wang, H.H. & Davies, Julian, 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 362(1483), pp.1195-200. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zaborowska, Z. et al., 2005. Deletion analysis in the catalytic region of the 10-23 DNA enzyme. *FEBS letters*, 579(2), pp.554-8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.008>.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), pp.3406-3415. Available at: <http://www.nar.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkg595>.

ABREVIATURAS

G+C, porcentaje en la composición de la secuencia de G y C.

2-O-Me, 2-O-metil-ARN

3'-CS, región conservada en 3'

5'-CS, región conservada en 5'

AAC(6')-Ib, aminoglicósido acetil transferasa en 6' Ib

AACs, aminoglicósido acetil-transferasas

ANTs, aminoglicósido nucleotidil-transferasas

APHs, aminoglicósido fosfo-transferasas

ADN, ácido desoxirribonucleico

Ak, Amikacina

Ag, aminoglucósido

ARN, ácido ribonucleico

AS, antisentido

BLAST, Basic Local Alignment Search Tool

CIM, concentración inhibitoria mínima

DO_x, densidad óptica a x nm

EMSA, ensayo de cambio de movilidad electroforética

EGS, secuencias guiadas externamente

ICE, elemento integrativo y conjugativo

Int, integrada

IPTG, isopropil-tio-β-D-galactopiransido

IS, secuencia de inserción

ISCR, secuencia de inserción con región común

kDa, Kilo Daltons

Kpb, kilo pares de bases

LNA, ácidos nucleicos cerrados

mpf, complejo de conjugación

MRI, integrones de multiresistencia
MRSA, Staphylococcus aureus resistente a meticilina
mpf, canal de conjugación
mrs, sistemas de resolución de multímeros
nts, nucleótidos
ODNs, oligodeoxinucleótidos
ORF, marco abierto de lectura
oriT, origen de transferencia de un plásmido
oriV, origen de replicación de un plásmido
pARNt, ARNt de transferencia inmaduro
pb, pares de bases
PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida
PDVF, fluoruro de polivinilideno
PCR, reacción en cadena de la polimerasa
PMOS, fosfoamidatos de morfolinos
PNAS, ácidos nucleicos peptídicos
PS, fosforotioatos
RI, repetición invertida
RIT, repetición invertida terminal
SST4, sistema de secreción tipo IV.
TA, sistema toxina-antitoxina
Tnp, transposasa
THG, transferencia horizontal de genes
TLG, transferencia lateral de genes
UFC, unidades formadoras de colonia
VRSA, Staphylococcus aureus resistente a vancomicina
Xis, escisasa