

Tesis Doctoral

# Desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas: silenciamiento de genes bacterianos mediante tecnología antisentido

Davies Sala, Carol G.

2016-03-28

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Davies Sala, Carol G.. (2016-03-28). Desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas: silenciamiento de genes bacterianos mediante tecnología antisentido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Davies Sala, Carol G.. "Desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas: silenciamiento de genes bacterianos mediante tecnología antisentido". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-28.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

## **Desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas: silenciamiento de genes bacterianos mediante tecnología antisentido**

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

**Carol G. Davies Sala**

Directora de Tesis: Dra. Angeles Zorreguieta

Consejera de Estudios: Dra. Angeles Zorreguieta

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir- IIBBA CONICET

Buenos Aires, 28 marzo de 2016

## Resumen

La emergencia de enfermedades infecciosas causadas por bacterias multi-resistentes y la falta de antibióticos para su tratamiento constituyen una amenaza para la salud global. Ante la necesidad de desarrollo de nuevos antimicrobianos se ha considerado la posibilidad de emplear técnicas de silenciamiento génico mediado por ARNs antisentido. Una de estas estrategias de silenciamiento es la denominada tecnología EGS, que se encuentra mediada por la Ribozima P o ARNasa P, una ribozima presente en todos los dominios y que en bacterias Gram negativas está conformada por una subunidad ARN-catalítica y por otra proteica. La ARNasa P participa en la maduración de los ARN de transferencia generando el extremo 5' maduro por un corte simple endonucleolítico de su precursor. Esta propiedad puede emplearse para mediar el corte de una molécula de ARN blanco -cuya expresión quiera ser silenciada- en presencia de un oligorribonucleótido complementario, conocido como *External Guide Sequence* (EGS). Una vez formado el dúplex ARN blanco : EGS, este complejo puede ser reconocido por la ARNasa P como sustrato y entonces promover el corte endonucleolítico del ARN blanco, inactivándolo. El objetivo global en el que se enmarca este trabajo de tesis consiste en evaluar estrategias de silenciamiento génico mediante tecnología antisentido como posibles antimicrobianos o para prolongar el uso de los antibióticos ya existentes.

En este trabajo de tesis doctoral se exploró la posibilidad de inhibir la expresión de genes bacterianos a través del uso de tecnología EGS antisentido. Inicialmente se trabajó con cepas de *Escherichia coli* y como blanco se eligió al ARN mensajero del gen *ftsZ* cuyo producto, la proteína FtsZ es un análogo bacteriano de la tubulina y esencial para la división celular. Tanto la expresión de estos pequeños ARNs antisentido dirigidos contra el mensajero *ftsZ* como la administración exógena de análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables por nucleasas bacterianas, generaron una inhibición de la división celular, originando un cambio en la morfología de las bacterias y una disminución de la viabilidad de las células tratadas. Estos resultados apoyan la idea que los EGSs dirigidos contra genes vitales bacterianos podrían considerarse como potenciales antimicrobianos.

Con la intención de explorar la aplicación de esta tecnología de silenciamiento génico a una especie bacteriana de importancia clínica creciente, se logró identificar, clonar, transcribir y purificar los componentes de la ribozima P de *Acinetobacter baumannii*. Posteriormente, la ribozima se reconstituyó *in vitro*, presentando actividad tanto en presencia de un sustrato natural (pre-ARN<sup>Tyr</sup>)

como de un sustrato bimolecular compuesto por una dupla ARNm-EGS. De esta manera, se generó un sistema de evaluación *in vitro* de EGSs candidatos para *Acinetobacter baumannii*, paso previo a la realización de ensayos *in vivo* sobre esta especie bacteriana.

**Palabras Clave:** Ribozima P, Antimicrobianos, Silenciamiento Génico, Tecnología Antisentido, FtsZ, *Acinetobacter baumannii*.

## Abstract

### Development of new antimicrobial strategies: bacterial gene silencing through antisense technology

The emergence of infectious diseases caused by multi-resistant bacteria and the lack of traditional antibiotics for its treatment are a concerning threat for global health. Facing the need for development of new antimicrobials, gene silencing through antisense RNAs have been considered as a viable solution. One of these antisense strategies is called EGS technology which is mediated by ribozyme P or RNase P, a ribozyme present in all domains of life that in Gram negative bacteria is composed of two subunits: one catalytic – RNA and another peptidic. The RNase P processes pre-transfer RNA, maturing the 5' end by a simple endonucleolytic cut of its precursor. This property can be used to cut any other target RNA molecule in the presence of a complementary oligoribonucleotide, known as External Guide Sequence (EGS). Once the duplex target-RNA: EGS is formed can be recognized by the ribozyme P as a substrate and hence cut the RNA target, leading to its inactivation. The general purpose in which this thesis work is immersed consists on the evaluation of different gene silencing strategies through antisense technology and their use as possible antimicrobial agents or to extend the usage of already existent antibiotics.

In this thesis work the possibility of inhibiting bacterial gene expression through EGS antisense technology was explored. Initially, strains of *Escherichia coli* were employed and *ftsZ* mRNA was selected as target. FtsZ protein is a bacterial tubulin analogue essential for cell division. Expression of RNA-EGSs targeting *ftsZ* mRNA as well as exogenous administration of EGSs composed of nucleic acid analogues non hydrolysable by bacterial nucleases, led to a change in bacterial morphology and a decrease in cell viability, elicited by an impaired cell division. These results support the idea that EGSs targeting bacterial vital genes could be considered as potential antimicrobial agents.

Pursuing the intention to apply this gene silencing technology to a bacterial species with growing clinical importance, the components of the ribozyme P from *Acinetobacter baumannii* were identified, cloned, transcribed and purified. Then, the RNase was reconstituted *in vitro*, showing activity in the presence of a natural substrate such as pre-tRNA<sup>Tyr</sup> and also with a bimolecular substrate conformed by mRNA and EGS. Thereby an *in vitro* evaluation system was generated in order to select candidate EGSs for *Acinetobacter baumannii*, previous procedure to *in vivo* assays.

**Keywords: Ribozyme P, Antimicrobial, Gene Silencing, Antisense Technology, Gram negative, FtsZ, *Acinetobacter baumannii*.**

## Agradecimientos

A Angeles por enseñarme generosamente, por alentarme a dar lo mejor y abrirme las puertas para realizar este trabajo en su laboratorio. A Marcelo Tolmasky por codirigirme, ser tan expeditivo y estar siempre predispuesto.

A mis padres que a pesar de estar lejos, están siempre cerca. Gracias por su apoyo incondicional. A mis hermanos, en especial a Georgi, por las interminables charlas sobre ciencia. A toda mi familia, por ayudarme a hacer lo que me gusta.

A todos mis compañeros del laboratorio 204, de ayer, de hoy y de siempre (por orden alfabético): Alfonso, Ana, Daniela, Diana, Fernando, Gaby, Gastón, Johanna, Maga, Nahuel, Nico, Patri, Piku, Rodrigo, Romina, Tomas, Walter. A todo el laboratorio 304, muy especialmente a Nacho, Ine y Marielita. Al laboratorio 207, en particular a Estela. A Gaby del 209. A Sole y German del INPAM. A Alexis y a Kevin de la CSUF.

A Piku por ser mi compañera incondicional durante todo el doctorado. A Maga y Gaby por las pilas y la alegría. A Patri por guiarme, en especial en el mundo proteico. A Walter por los mejores mates de la FIL y por ser parte fundamental del Club. A Alfonso por todos los consejos. A Da por su experiencia. A Ine y Gaby por las charlas. A Nacho, presidente, animador y RR. PP. del microclub. A Sole por toda su calidez y la invaluable ayuda con Acineto.

A mi Comité de Seguimiento de Tesis: Andrea Gamarnik, Cecilia D'Alessio y Leo Alonso. Por su tiempo, sus ideas y sugerencias.

A mis amiguísimas de la facu: Sofi, Meli, Flor, Lu, Male, Aldana y Yami (y también a Sol!).

A mis amigos de la vida, a todos y cada uno, por estar siempre. En especial a Bahita, Luciana, Sil y Carito.

A la Fundación Instituto Leloir y a toda la gente que allí trabaja. A la FCEyN por formarme académicamente. Al CONICET por brindarme el apoyo para realizar esta tesis.

A los que están leyendo esto.

## Publicaciones

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

- Carol Davies-Sala, Alfonso J. C. Soler-Bistué, Robert A. Bonomo, Angeles Zorreguieta and Marcelo E. Tolmasky. *External guide sequence technology: a path to development of novel antimicrobial therapeutics*. Annals of the New York Academy of Science. 2015 Apr 9. doi: 10.1111/nyas.12755.
- Carol Davies Sala, Alfonso J. C. Soler-Bistué, Leeann Korrapun, Angeles Zorreguieta and Marcelo E. Tolmasky. *Inhibition of cell division induced by external guide sequence (EGS technology) targeting ftsZ*. PLoS ONE. October 2012. 7(10): e47690.
- German M. Traglia\*, Carol Davies Sala\*, Juan I. Fuxman Bass, Alfonso Soler-Bistué, Angeles Zorreguieta, María Soledad Ramírez and Marcelo E. Tolmasky. *Internalization of locked nucleic acids/DNA hybrid oligomers into Escherichia coli*. \* Igual contribución. BioResearch Open Access. October 2012. 1(5):260-263.

Parte de los resultados está en vías de publicación en el siguiente trabajo:

- Carol Davies-Sala, Angeles Zorreguieta and Marcelo Tolmasky. *EGS Technology: an LNA/DNA Hybrid External Guide Sequence that Targets Escherichia coli ftsZ Produces Abnormal Elongation and Reduces Viability*. Manuscrito terminado y en proceso de revisión para su publicación.

<b>Índice</b>	
<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>5</b>
<b>Publicaciones</b>	<b>6</b>
<b>Índice</b>	<b>7</b>
<b>Introducción</b>	<b>12</b>
La paradoja de los antibióticos	12
Antibióticos: mecanismos de acción de resistencia y de dispersión	14
Silenciamiento génico en bacterias	18
Ribozima P	21
Tecnología EGS: disminución de la expresión génica medida por la ribozima P	23
FtsZ	26
Internalización de oligómeros compuestos por ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos	30
<i>Acinetobacter baumannii</i>	32
<b>Objetivos e Hipótesis</b>	<b>37</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>40</b>
Procedimientos y consideraciones para el trabajo con ácidos ribonucleicos (ARN)	40
Transcripción in vitro	40
Marcación radiactiva de las moléculas	41
Extracción de ARN con fenol-cloroformo	42
Protocolo de purificación de ARN por precipitación con etanol	42
Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida	42
Cepas bacterianas utilizadas	43
Medios y condiciones de cultivo	44
Conservación de cepas	44
Preparación de células electrocompetentes	45
Electroporación	45



Plásmidos utilizados	46
Soluciones <i>Buffer</i>	47
Procedimientos generales con ácido desoxirribonucleico (ADN)	47
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
Extracción de ADN genómico total	48
Nombre y Secuencia de los cebadores utilizados	49
Análisis bioinformáticos	49
Modelado <i>in silico</i> de estructura secundaria de ARN mensajero	50
Ensayos de unión al mensajero	51
Ensayos de corte mediado por la Ribozima P de <i>Escherichia coli</i>	52
Ensayos <i>in vivo</i> con EGSs compuestos por ARN dirigidos contra el mensajero <i>ftsZ</i>	52
Generación de los plásmidos que expresan el EGS-ARN	52
Inducción de la expresión de los EGSs de ARN	53
Determinación de Unidades Formadoras de Colonias	54
Exploración de la morfología bacteriana mediante microscopía	54
Ensayos <i>in vivo</i> con EGSs no hidrolizables por nucleasa bacteriana compuestos por LNA y ADN dirigidos contra el mensajero <i>ftsZ</i>	55
Prueba de sensibilidad a la lisozima	55
Efectos del tratamiento con agregado exógeno de EGSs no hidrolizables por nucleasas bacterianas	55
Determinación de Unidades Formadoras de Colonias	56
Determinación de la morfología y el largo celular	56
Ribozima P de <i>A. baumannii</i>	56
Generación de vectores conteniendo la subunidad M1 de <i>A. baumannii</i>	56
Obtención de la subunidad ARN catalítica M1 de <i>A. baumannii</i>	58
Generación del vector de expresión para la subunidad proteica C5 de <i>A. baumannii</i>	59
Expresión de la subunidad proteica C5 de <i>A. baumannii</i> recombinante	60
Fraccionamiento subcelular	60
Electroforesis de proteínas	61
Geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)	61
Geles desnaturalizantes con tricina	62
Tinción con Azul de Coomassie	63
Transferencia a membrana de pvdf y ensayo de <i>western blot</i>	63
Purificación de la proteína C5Ab	65
Determinación de la funcionalidad de la subunidades ARN-catalítica (M1Ab) y proteica (C5Ab) de la ribozima P de <i>A. baumannii</i>	66

Sustrato unimolecular	66
Sustrato bimolecular	67
Ensayos de complementación heteróloga	68
Internalización de oligómeros	68
Oligómeros Utilizados	69
<b>Resultados</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo I: Tecnología EGS en <i>Escherichia coli</i></b>	
<b>A) Diseño de EGSs contra el mensajero <i>ftsZ</i> y evaluación de su actividad in vitro</b>	<b>71</b>
Modelado de la estructura secundaria del ARN mensajero <i>ftsZ</i>	71
Diseño de los EGSs a partir del mapeo de la estructura secundaria del ARNm <i>ftsZ</i>	74
<b>B) Evaluación de la actividad de EGSs compuestos por ARN contra el mensajero <i>ftsZ</i></b>	<b>75</b>
Evaluación de la actividad in vitro de los EGSs	75
Ensayos de unión al mensajero	75
Evaluación de la actividad de los EGSs diseñados: capacidad de inducir el corte del ARNm <i>ftsZ</i> in vitro en presencia de la ARNasa P	77
Evaluación de la actividad in vivo de los EGSs ARN contra el ARNm de <i>ftsZ</i>	80
<b>C) Evaluación de la actividad de los EGSs compuestos por análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables por nucleasas contra el mensajero <i>ftsZ</i></b>	<b>83</b>
Diseño de EGSs no hidrolizables por nucleasas bacterianas. Ensayos de actividad ARNasa P: efecto <i>in vitro</i> de los EGSs sobre el ARNm <i>ftsZ</i>	83
Evaluación de la actividad de los EGSs diseñados: capacidad de inducir el corte del ARNm <i>ftsZ</i> in vitro en presencia de la ARNasa P	84
Evaluación de la actividad in vivo de los EGSs compuestos por ADN/LNA	84
<b>D) Internalización de oligómeros en <i>Escherichia coli</i></b>	<b>91</b>
<b>Capítulo II: Ribozima P en <i>Acinetobacter baumannii</i></b>	<b>96</b>
Localización de la subunidad ARN catalítica en el genoma de <i>A. baumannii</i>	97
Identificación de la subunidad proteica de la ribozima P de <i>A. baumannii</i> (C5Ab)	99

Obtención de la subunidad ARN catalítica M1Ab	100
Obtención de la subunidad proteica de la Ribozima P de <i>A. baumannii</i> (C5Ab): clonado, expresión y purificación	101
Funcionalidad de la subunidad ARN catalítica de <i>A. baumannii</i>	106
Ensayos de funcionalidad in vitro	106
Ensayos de complementación heteróloga	109
Ensamble de los componentes de la ribozima P de <i>A. baumannii</i>	112
<b>Conclusiones y Discusión</b>	<b>115</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>124</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>132</b>

# Introducción

## Introducción

### La paradoja de los antibióticos

El uso de los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, es una práctica sanitaria ampliamente difundida a partir de mediados del siglo XX. Los primeros antimicrobianos de amplio espectro que se emplearon, en la década de 1930, fueron las sulfas que son inhibidores de la síntesis del ácido fólico. En la década del 40 con el advenimiento de la segunda guerra mundial comenzó la producción masiva de penicilina, cuya acción antimicrobiana había sido descrita por Alexander Fleming en 1928 [1, 2]. En 1943 fue descrito el primero de los aminoglucósidos, la estreptomina, que fue luego el primer quimioterapéutico empleado en el tratamiento de la tuberculosis [3]. Varios de estos descubrimientos fueron merecedores del premio Nobel y marcaron un hito en la historia de la medicina. La importancia del uso de antibióticos ha sido tan grande que durante el siglo pasado la mortalidad debida a enfermedades infecciosas se redujo drásticamente, llevando a considerar como fácilmente tratables enfermedades tales como la tuberculosis, la sífilis o la fiebre tifoidea[4, 5].

Sin embargo a medida que el uso de antibióticos se generalizó comenzó a detectarse el surgimiento de bacterias resistentes a cada nuevo quimioterapéutico (Figura 1), llegando a identificarse bacterias multi-resistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR), e incluso bacterias pan-resistentes (PDR). Las bacterias MDR son aquellas que presentan resistencia a más de un antimicrobiano de tres o más clases diferentes, mientras que se considera como XDR a las bacterias que no son susceptibles a al menos un agente antimicrobiano de todas las categorías, excepto dos o una (es decir que existe al menos uno o dos antibióticos a los cuales sí son sensibles). Por último, se considera como PDR a aquellas bacterias que son resistentes a todos los antibióticos conocidos [6, 7].

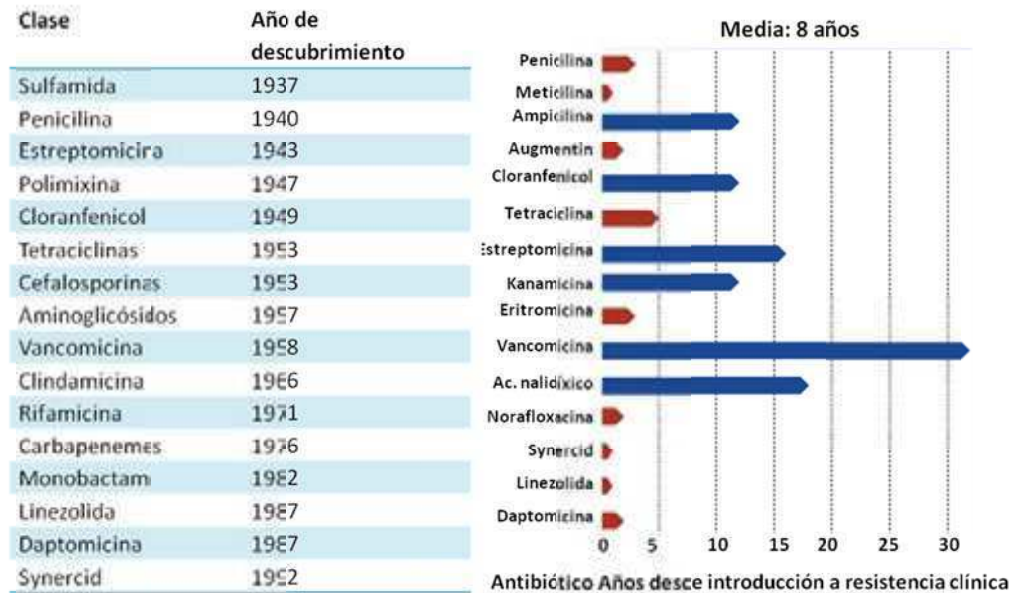


Figura 1. Izquierda. Tabla con los principales antibióticos en uso y su fecha de descubrimiento. Derecha. Evolución de la resistencia a varias clases de antibióticos. Las barras indican el tiempo transcurrido desde la introducción del antibiótico en la clínica y el primer caso de resistencia reportado para ese antibiótico. El promedio es ocho años. Las barras azules indican aquellos que se encuentran por encima de la media y las barras rojas los que están por debajo Tomado y adaptado de Julien Davies 2006 (izquierda) y de Schmieder & Edwards 2011 (derecha).

En estudios recientes se han detectado genes que codifican resistencia a antimicrobianos en muestras de origen ancestral como sedimentos de permafrost datados en 30000 años de antigüedad [8]. También se aislaron actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces* provenientes de suelos prístinos que fueron capaces de resistir 21 antibióticos diferentes incluyendo productos naturales (como vancomicina y eritromicina), derivados semisintéticos (minociclina y cefalexina) como así también drogas completamente sintéticas (como ciprofloxacina y linezolid) [9]. También se sabe que la distribución de estos genes que codifican para resistencias es global y ubicua, estando presente tanto en el suelo como en diversos microbiomas y hasta en sedimentos marinos

[10]. Esto indica que el acervo génico presente en el ambiente asegura la aparición de resistencias, cada vez que un nuevo antimicrobiano es utilizado en la clínica. A este acervo génico se lo denomina resistoma y es preexistente al uso de antibióticos [9, 11-13]. A su vez, esta aparición y dispersión de los genes que codifican para las resistencias puede explicarse a través de la transferencia horizontal de genes (THG) [14].

### **Antibióticos: mecanismos de acción, mecanismos de resistencia y dispersión**

Tradicionalmente los antibióticos se clasifican según su modo de acción en dos grandes grupos, los bactericidas que son capaces de matar a las bacterias y los bacteriostáticos que inhiben su crecimiento [15]. Ejemplos de los primeros son los betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas; ejemplos de los segundos son los macrólidos, las tetraciclinas y el cloranfenicol. Los antibióticos actúan inhibiendo funciones bacterianas como la síntesis de la pared (betalactámicos, cefalosporinas), la replicación del ADN (quinolonas), la transcripción del ARN (los glicopéptidos, que también inhiben la síntesis del peptidoglicano), la síntesis de proteínas (aminoglucósidos y macrólidos) y la síntesis de metabolitos esenciales (las sulfas por ejemplo inhiben la síntesis del ácido fólico) [2]. El empleo de estos antimicrobianos que afectan funciones vitales y por lo tanto la viabilidad celular, impone una presión de selección en favor de las cepas resistentes a estos compuestos.

Algunos microorganismos pueden ser naturalmente resistentes a los antimicrobianos, mientras que otros -o esos mismos- pueden adquirir resistencias a través de transferencia horizontal o mediante mutación [8, 16]. El uso extendido de antibióticos tanto en la clínica como en la actividad ganadera ha favorecido la selección de cepas resistentes a estos compuestos quimioterapéuticos [5, 17-21]. Los mecanismos por los cuales las bacterias pierden susceptibilidad a los antibióticos son variados, pero se basan en el impedimento de la interacción del antibiótico con su sitio blanco. En la Figura 2 se esquematizan estos mecanismos.

Las estrategias mediante las cuales las bacterias oponen resistencia a los antibióticos se pueden clasificar dentro de las siguientes categorías: impedimento de llegada al sitio blanco, modificación del sitio blanco y modificación del antibiótico.

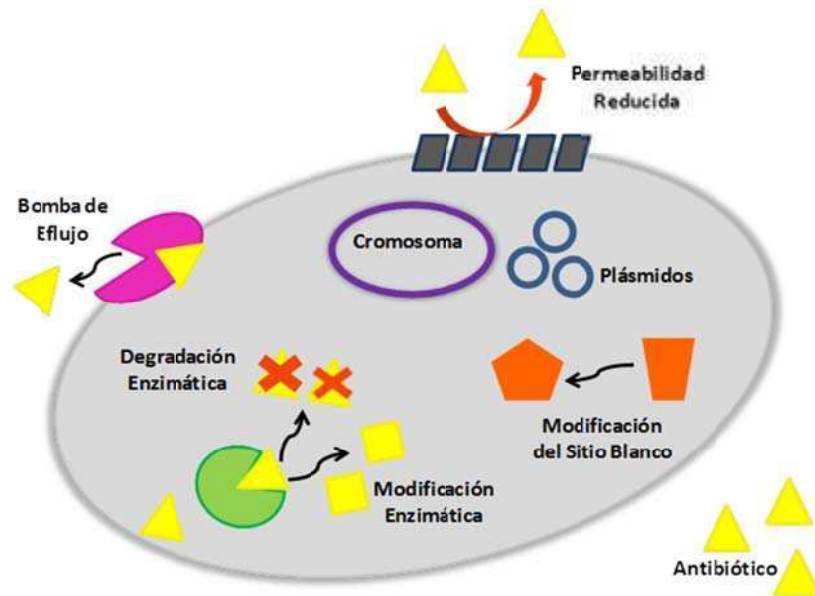


Figura 2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias. Se esquematizan diferentes estrategias mediante las cuales estos microorganismos evaden la acción de los antibióticos.

**Impedimento de llegada al sitio blanco.** Dentro de esta categoría se engloban la permeabilidad reducida y el eflujo. Se ha registrado que las bacterias pueden perder la permeabilidad a agentes antimicrobianos, impidiéndole el ingreso a las células y por ende la llegada a su sitio de acción. Por otra parte también se registra como mecanismo de resistencia, la expulsión del antibiótico mediante la expresión o sobreexpresión de bombas de eflujo. En ambos casos, el compuesto sigue siendo tóxico aunque no es capaz de alcanzar su sitio de acción o de alcanzar concentraciones intracelulares efectivas. En general, la resistencia obtenida por estos mecanismos es media o baja. Dado que la selectividad de las bombas de eflujo es generalmente baja y que la impermeabilidad dada por la modificación de la envoltura bacteriana es generalizada, estos mecanismos de resistencia son



efectivos para una amplia variedad de compuestos tóxicos y de antibióticos [22, 23].

**Modificación del sitio blanco.** En este mecanismo la modificación del sitio blanco ocurre por mutación, por lo que al estar el blanco modificado ya no puede ser reconocido por el antibiótico y la interacción no sucede. Debido a que la modificación se da por mutaciones, la transmisión de la misma sucede por proliferación clonal y es poco esperable que ocurra por THG. Un ejemplo de este mecanismo es el de la resistencia a fluoroquinolonas (compuestos que inhiben la acción de las ADN topoisomerasas) y que está generada por mutaciones específicas en el gen que codifica la topoisomerasa [24, 25].

**Modificación del antibiótico.** En estos casos la pérdida de sensibilidad al antibiótico ocurre por una modificación enzimática de su estructura o por la degradación del mismo. Un ejemplo de esta última es el de la resistencia a los betalactámicos dado por la presencia de betalactamasas, en particular es de destacar las betalactamasas de espectro expandido pertenecientes a la familia CTX-M que son capaces de degradar cefalosporinas de tercera generación. La expansión de estas resistencias está mediada por THG y constituye una severa preocupación en el ámbito clínico [26]. En el caso de la modificación del antibiótico la misma hace que éste pierda afinidad por el sitio blanco, logrando así que el microorganismo disminuya, parcial o totalmente, la susceptibilidad al antibiótico. La resistencia a los aminoglicósidos es un ejemplo de este caso y la dispersión también está dada por THG [27, 28].

En un medio en donde existe una fuerte presión de selección la rápida diseminación de genes que confieren resistencia a antibióticos es mejor explicada por la transferencia horizontal de genes que por la expansión clonal de cepas seleccionadas a partir de mutantes [12] sin desestimar la importancia de este último fenómeno. Los mecanismos que permiten el pasaje de elementos genéticos de una célula a otra son los clásicamente conocidos como: transformación, transducción y conjugación. Estos conforman lo que se denomina mecanismos de dispersión a nivel celular [5].

Se describen someramente a continuación los mecanismos mencionados. En la **transducción** se da el pasaje de ADN de una bacteria (dadora) a otra (receptora) utilizando como intermediario a un fago. Esto sucede cuando en el proceso de empaquetamiento del genoma del fago se incorporan fragmentos de ADN de la bacteria dadora a la cápside del fago, y que luego, cuando el fago infecta a la bacteria receptora ésta recibe ADN de la primera [29, 30]. La **transformación** implica la incorporación de ADN desnudo desde el medio extracelular y sucede durante un estado fisiológico transitorio denominado competencia que ocurre como respuesta a señales de *quórum sensing* o al hambreado [31-34]. Finalmente, la **conjugación** implica el pasaje de ADN del citoplasma de una bacteria dadora directamente al citoplasma de la bacteria receptora, para lo cual se genera un canal. La molécula que se transfiere, generalmente es un plásmido (aunque pueden ser otras, como por ejemplo los elementos integrativos conjugativos ICE) [35, 36]. Siempre hay que tener en cuenta que para que la resistencia se exprese y el genotipo resistente se mantenga en la descendencia el material genético ingresado a la célula debe estar incorporada en un replicón estable, como un plásmido o un cromosoma. Para lo cual, luego de adquirido el ADN debe ser incorporado a algún replicón estable mediante mecanismos de recombinación, la que puede estar asociada al movimiento de **elementos genéticos móviles** tales como integrones [37], ICEs y transposones [38, 39].

Las enfermedades infecciosas causadas por organismos resistentes a los antibióticos han sido identificadas por la Organización Mundial de la Salud como una de las mayores amenazas a la salud global. Tal es la magnitud de la problemática que se cree que la humanidad puede ingresar pronto en una era post-antibióticos, en la cual una simple infección o una herida leve puedan generar graves complicaciones en la salud humana [40, 41]. A su vez, el escaso desarrollo de nuevos antibióticos para su tratamiento y la rápida aparición de resistencias a los mismos, oscurecen más el panorama [42]. Es por esto que resulta imperiosa la necesidad de desarrollar nuevos antimicrobianos como así también nuevas estrategias terapéuticas [2, 43].

### **Silenciamiento génico en bacterias**

El silenciamiento génico es una herramienta empleada en diversos tipos de organismos, generalmente con el objetivo de estudiar la función de los diferentes productos génicos a través de las consecuencias causadas por la ausencia de su expresión.

Con la emergencia de infecciones causadas por bacterias multirresistentes la utilización de los antibióticos tradicionales para su tratamiento se encuentra seriamente comprometida [41, 43]. Los antibióticos empleados en la clínica en su mayoría son metabolitos provenientes de microorganismos -en general del suelo- o modificaciones químicas de éstos. Sin embargo ante la preocupante situación de las múltiples resistencias y el bajo número de nuevos antibióticos desarrollados (Figura 3) [7] es necesario aunar esfuerzos para identificar nuevos compuestos y mecanismos de acción antimicrobiana [2, 42]. En este sentido, se encuentra en proceso el desarrollo de péptidos antimicrobianos [44-46] y el estudio de nuevos blancos de acción como factores de virulencia o factores involucrados en la interacción con el hospedador [2, 47] y de los genes que codifican para éstas, como así también genes esenciales.

Ante la necesidad de desarrollo de nuevas drogas se ha considerado la posibilidad de emplear técnicas de silenciamiento génico mediadas por ARNs antisentido, debido a su alta especificidad de acción, requerimiento muy importante para el desarrollo racional de nuevas drogas, ya que maximiza las capacidades curativas y minimiza los efectos colaterales [48]. Los blancos de silenciamiento en estos casos podrían ser genes de resistencia a antimicrobianos, genes que codifiquen para factores de virulencia o genes esenciales [49].

Existen varias estrategias antisentido (AS) basadas en la degradación de ARN mensajeros específicos o en el impedimento estérico de la traducción del ARNm. Entre estas estrategias se encuentra la expresión a través de un vector de un ARN AS de tamaño largo que actúa desencadenando la degradación del blanco mediada por ARNasas específicas para ARN doble cadena. Si el ARN AS es dirigido

contra la región 5', actúa bloqueando el codón de inicio o el sitio de unión al ribosoma; es decir generando un impedimento estérico del ensamblado o de la actividad ribosomal [48, 50]. Este último efecto también puede obtenerse mediante el empleo de AS cortos compuestos por análogos de ácidos nucleicos resistentes a nucleasas [51, 52].

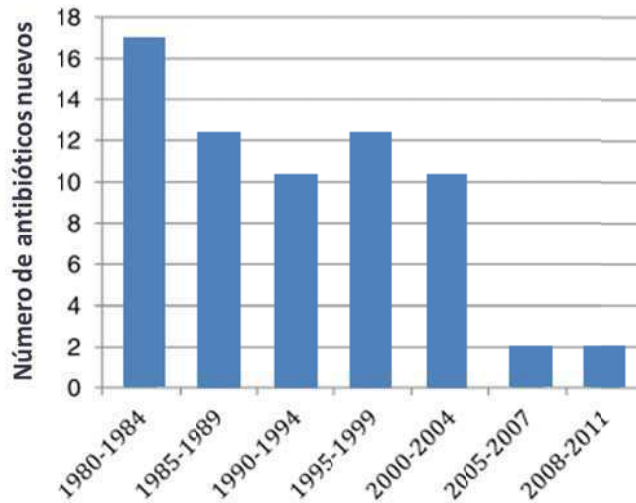


Figura 3. Número de de antibióticos aprobados desde la década de 1980 en EE. UU. Se observa un notorio descenso a partir del año 2005. Tomado y modificado de Bassetti y colaboradores, 2013.

Otras dos técnicas de silenciamiento que implican el uso de oligonucleótidos pequeños como moléculas antisentido comprenden la mediada por la ARNasa H y la mediada por la ARNasa P. La ARNasa H es una enzima involucrada en la replicación, la transcripción y la reparación del ADN en bacterias que es capaz de reconocer apareamientos ARN-ADN y cortar el ARN [53, 54]. El mecanismo de silenciamiento mediado por la ARNasa P es conocido como tecnología EGS y se tratará en los siguientes apartados.

En la Figura 4 se ilustran los diferentes mecanismos artificiales para la inhibición de la expresión de genes bacterianos mediante tecnología antisentido.

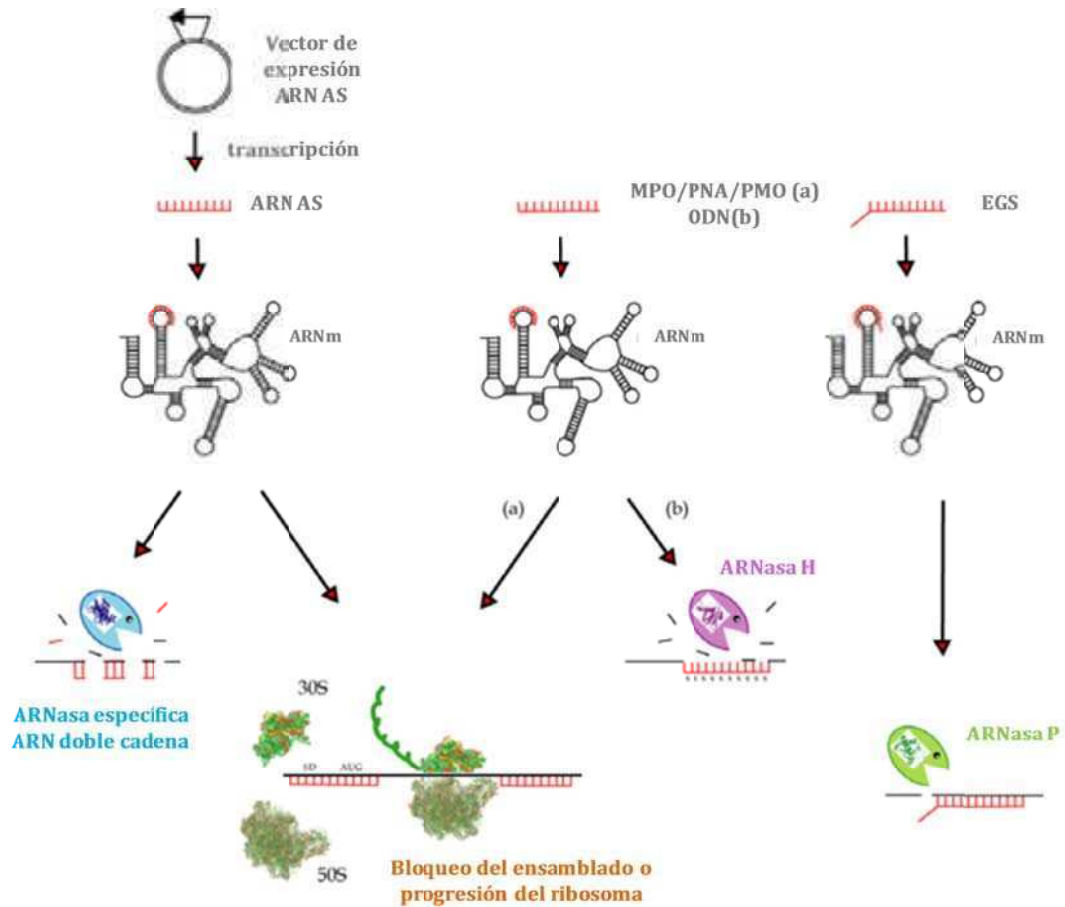


Figura 4. Mecanismos artificiales para la inhibición de la expresión de genes bacterianos mediante tecnologías antisentido. Estos incluyen el bloqueo de la traducción dado por impedimento estérico del ensamblado ribosomal o de la progresión del ribosoma, generado por ARNs AS o análogos de ácidos nucleicos. La degradación del ARN blanco por parte de nucleasas específicas para ARN doble cadena. Los ODN promueven el corte del ARNm mediado por la ARNasa H. Los EGS desencadenan el corte del ARN blanco mediado por la ARNasa P. Tomado y adaptado de Rasmussen 2007.

De las metodologías descritas la correspondiente a la expresión de un ARN AS largo es la más simple. La misma se lleva a cabo expresando el ARN AS desde un plásmido y bajo un promotor fuerte. El mecanismo de acción consiste en la degradación del blanco por parte de nucleasas específicas contra ARN de doble cadena. Esta estrategia se ha empleado mayoritariamente para estudios genéticos. Por otra parte se ha demostrado que ARNs AS cortos dirigidos contra el

inicio de la traducción o la región 5' no codificante cercana al sitio de unión al ribosoma del ARNm blanco han sido efectivos. Sin embargo estos ARNs poseen la desventaja de ser muy cortos (entre 14-20 nucleótidos) por lo que son fácilmente degradados por nucleasas inespecíficas presentando por lo tanto una vida media muy baja en el citoplasma bacteriano. Es por este motivo que en su reemplazo se ha probado el silenciamiento génico empleando análogos de ácidos nucleicos no degradables por nucleasas bacterianas. Ejemplos de estos son los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) u oligonucleótidos de fosfoamidatos de morfolinos (PMOs), generalmente conjugados a péptidos permeabilizantes, el mecanismo de acción continúa siendo el impedimento del ensamble o de la actividad ribosomal. Esta última estrategia permitió la inhibición del crecimiento de bacterias en cultivo y en modelos animales [51, 55-57] .

### **Ribozima P**

La ARNasa P o ribozima P es una ribonucleoproteína compuesta por una subunidad ARN y entre una y nueve subunidades proteicas. La subunidad ARN es la que posee actividad catalítica y fue la primer ribozima descrita capaz de actuar en *trans* [58]. El número de subunidades proteicas varía según el dominio, siendo: una en bacterias, cuatro en arqueas y hasta nueve en eucariotas. Si bien su rol no está completamente dilucidado se cree que interviene en la estabilización de la ribozima, en el aumento de la afinidad por el sustrato y en evitar la religación del producto. La subunidad proteica es esencial para las reacciones in vivo [59, 60].

Respecto a la subunidad ARN catalítica, estudios filogenéticos del ARN de la ARNasa P indican que la actividad catalítica reside en su estructura secundaria, que se encuentra conservada y que desde el punto de vista funcional puede ser dividida en dos regiones: la región de especificidad denominada S -responsable de la unión al sustrato- y la región catalítica, denominada C. En bacterias, la estructura secundaria define dos tipos principales de ARN de la ribozimaP: las de tipo A (tipo ancestral) y las de tipo B (tipo *Bacillus*). Ambos tipos poseen un modelo de estructura tridimensional similar en el cual los nucleótidos evolutivamente conservados se encuentran prácticamente en las mismas

posiciones [58, 61-65]. En un estudio llevado a cabo con el objetivo de identificar en la subunidad ARN catalítica un *core* universalmente conservado se analizaron las secuencias obtenidas de organismos pertenecientes a los tres dominios filogenéticos primarios (prokarya, eukarya y archea) y de una organela (mitocondria). A pesar de la baja similitud global entre secuencias, se encontraron cinco regiones estrictamente conservadas, a las que se denominó regiones universalmente conservadas (CR) nombradas de la I a la V (CRI, CRII, CRIII, CRVI, CRV) [66]. Estas CR a pesar de que se encuentran distantes en secuencia se agrupan espacialmente formando dos módulos muy conservados [67] que contienen los elementos catalíticos esenciales comunes a todos los dominios [66].

En *Escherichia coli* la ribozima P cuenta con una subunidad de ARN de tipo A que se transcribe desde el gen *rnpB*, posee 377 nucleótidos y se denomina M1. Mientras que la subunidad proteica es una sola, está codificada por el gen *rnpA*, tiene 119 aminoácidos, un peso molecular aproximado de 15 kDa y se denomina C5 [68, 69].

La ARNasa P es vital ya que se encarga de procesar los ARN de transferencia clivando el extremo 5' de su precursor (pre-ARNt) que es su sustrato natural, aunque también puede procesar otros ARNs celulares [58]. En todos los casos el sustrato lleva la secuencia RCCA en su extremo 3' (donde R es una purina) que interacciona con la secuencia nucleotídica GGU presente en el dominio catalítico de la subunidad de ARN de la ribozima (Figura 5). En el caso del corte del pre-ARNt la ribozima P es capaz de reconocer al tallo aceptor y, también probablemente al *stem loop* que se encuentra inmediatamente hacia el 5' de éste [67]. En experimentos realizados en *E. coli* para determinar cuáles eran los dominios que necesariamente tenían que estar presentes en el pre-ARNt para que la ribozima P pudiera generar el corte simple endonucleolítico del extremo 5' se estableció que la mayoría de la molécula del pre-ARNt podía ser removida. Estos experimentos también demostraron que cualquier sustrato bimolecular, con la estructura adecuada, podía ser reconocido por la ribozima P como sustrato. Es más esa molécula complementaria (antisentido) era la única molécula necesaria

para guiar a la ribozima P en el procesamiento de su molécula blanco. Cuando la molécula antisentido está separada del blanco se la denomina secuencia guía externa o EGS (*External Guide Sequence*) [70-72].

El mecanismo de reacción de la ARNasa P incluye iones metálicos divalentes (como  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ) y se cree que sigue una mecánica de tipo SN2 (sustitución nucleofílica bimolecular) en la que se produce un corte endonucleolítico del sustrato. Los productos quedan luego con un fosfato en el extremo 5' y un hidroxilo en el 3' [58].

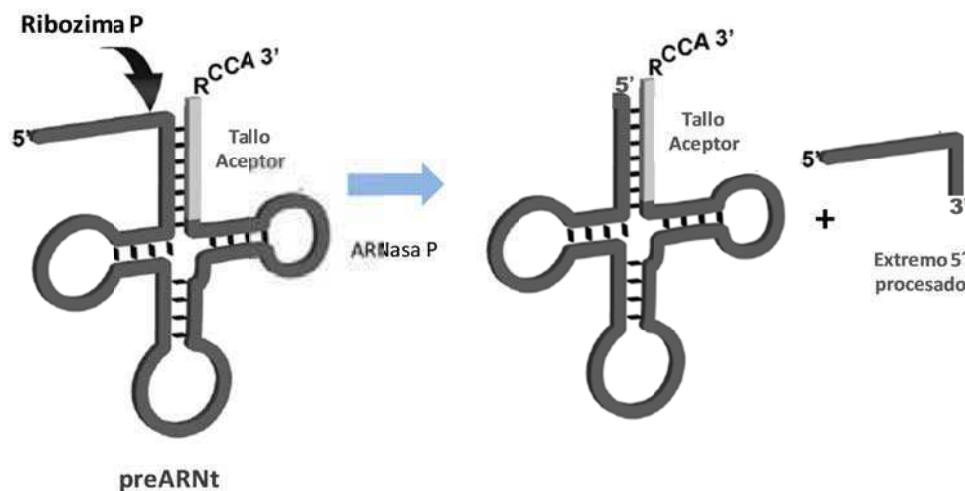


Figura 5. Corte del preARNt llevado a cabo por la ribozima P. La flecha negra indica el sitio de acción de la ribozima sobre el preARNt, el segmento en gris claro representa el tallo aceptor.

### Tecnología EGS: disminución de la expresión génica mediada por la Ribozima P

La ribozima P puede ser utilizada para disminuir la expresión génica a través del corte de un determinado mensajero u otro ARN blanco [73-75]. Para esto, hay que considerar que el sustrato de la enzima puede simplificarse a dos moléculas nucleotídicas complementarias que cuando están apareadas pueden ser reconocidas por la ARNasa P endógena de la célula, desencadenándose el corte endonucleolítico de una de ellas y disminuyendo así su expresión. Para que esto suceda, una de ellas debe llevar la secuencia de reconocimiento RCCA.



La tecnología EGS (del inglés *External Guide Sequence*) consiste en emplear EGSs que son oligonucleótidos complementarios al ARN cuya expresión se desea disminuir. Los EGSs contienen dos regiones: una en el 5' de entre 13 y 15 nucleótidos complementarios a la molécula blanco seguida de otra compuesta por cuatro nucleótidos portando la secuencia consenso RCCA (R: purina), en el extremo 3'. Esta secuencia consenso es la que interacciona con la secuencia nucleotídica GGU presente en el dominio catalítico de la subunidad ARN de la ribozima [76]. En la Figura 6 se encuentra esquematizada la acción de la ARNasa P sobre un sustrato ARNm-EGS.

Los EGSs son diseñados específicamente contra el ARN blanco, por lo cual es necesario conocer las regiones potencialmente accesibles a estos oligonucleótidos. Para esto se realizan mapeos de la estructura secundaria del mensajero –u otro ARN- a silenciar, mediante técnicas bioquímicas o modelado *in silico* [53, 77, 78] en los que se intenta establecer cuáles son las regiones del blanco que se encuentren como simple cadena. Antes de ser probada su actividad *in vivo*, los EGSs son sometidos a una serie de ensayos *in vitro* tendientes a seleccionar aquellos que pudieran ser funcionales en la célula. Estos ensayos permiten establecer la capacidad de corte del ARN blanco y la capacidad de unión al mismo [79].

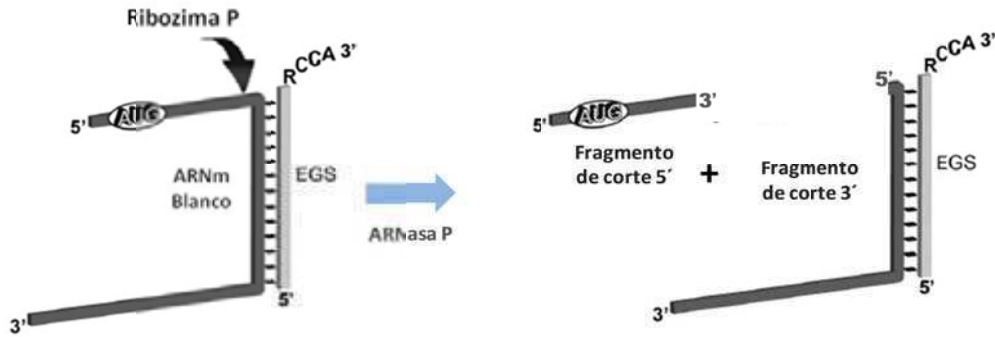


Figura 6. Esquema del corte de un ARN mensajero mediado por la Ribozima P. Se forma un complejo entre el ARNm blanco y el EGS que puede ser reconocido como sustrato por parte de la ARNasa P.

Para los ensayos in vivo los factores a considerar con respecto a los EGSs están relacionados con la capacidad de ingresar a la célula y con la estabilidad y durabilidad del oligonucleótido una vez adentro de la célula blanco. Para esto se han esgrimido varios abordajes metodológicos. Uno de ellos comprende la expresión del EGS desde un plásmido en el cual el oligorribonucleótido sea transcrito desde un promotor fuerte y esté rodeado por el *core* de una ribozima cabeza de martillo, una pequeña ribozima capaz de autoclavar y que al hacerlo libera el EGS al citoplasma [79, 80]. De esta manera la inestabilidad de los EGSs por su naturaleza química (oligorribonucleótidos susceptibles de ser degradados por nucleasas) se encuentra compensada por la alta transcripción de los mismos. Otra estrategia consiste en utilizar análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables. En tal sentido se han diseñado EGSs de ADN con reemplazos de ácidos nucleicos cerrados (LNA) que lograron con éxito silenciar al gen blanco al ser administrados exógenamente en una cepa de *E. coli* hiperpermeable [81]. El desafío principal en este segundo tipo de abordaje reside aún en encontrar formas de ingreso de los EGSs a bacterias con baja permeabilidad a los mismos.

La tecnología EGS se ha empleado con éxito para reducir la expresión génica de diversos genes pertenecientes a diferentes bacterias Gram negativas patógenas, [73-75, 79, 81, 82] logrando reducir la viabilidad de las mismas en los

casos en los que los EGSs fueron dirigidos contra ARNm de genes vitales y consiguiendo también revertirse el fenotipo de resistencia a más de un antibiótico.

Un ejemplo de aplicación de tecnología EGS fue desarrollado en nuestro laboratorio y consistió en inhibir la expresión de *aac(6)'-Ib* que codifica para una acetiltransferasa del tipo AAC(6)'-I. Estas acetiltransferasas confieren resistencia a la amikacina, que es un aminoglucósido semisintético cuyo mecanismo de acción se basa en la unión de este antibiótico a la subunidad 30S del ARN ribosómico, impidiendo el correcto reconocimiento entre el ARNm y el ARNt. Estas acetiltransferasas catalizan la transferencia de un grupo acetilo a una amina primaria presente en la molécula del antibiótico, haciendo que éste no reconozca su sitio blanco. La dispersión de la resistencia a amikacina se debe en muchos casos a la aparición del gen *aac(6)'-Ib* en elementos genéticos móviles de bacterias multirresistentes pertenecientes a los géneros *Vibrionaceae*, *Pseudomonaceae* y *Klebsiella*. En el mencionado ejemplo se diseñaron EGS contra el mensajero *aac(6)'-Ib* compuestos por ARN o por análogos de ácidos nucleicos. En ambos casos se logró revertir el fenotipo de resistencia a la amikacina [79, 81].

### **FtsZ**

FtsZ es un análogo bacteriano de la tubulina altamente conservado en el dominio bacteria y cuya concentración es clave para la división celular. La proteína purificada de *E. coli* (de 383 aminoácidos) es capaz de unir e hidrolizar GTP. La unión de GTP induce la autoagregación en proteofilamentos con un ordenamiento cola-cabeza formando así un polímero lineal, tal como se muestra en la Figura 7 [83, 84]. Dentro de la célula bacteriana FtsZ se ensambla formando el anillo Z, estructura ubicada en el centro de la célula en división y que constituye un anclaje para gran parte de las proteínas que conforman el divisoma, determinando la posición en la cual éste se va a establecer. El ensamble del anillo Z ocurre casi simultáneamente con la finalización de la replicación cromosómica, a

lo que le sigue la invaginación de la pared celular que conlleva finalmente a la división celular [85, 86].

El ensamblaje del anillo Z es un evento muy regulado en tiempo y espacio. Un sistema inhibitorio espacial muy importante es el denominado Sistema Min que inhibe la polimerización de FtsZ en los polos celulares. Otro sistema inhibitorio tempororo-espacial independiente de Min es el llamado *Nucleoid Occlusion* que previene el ensamblado de FtsZ en regiones donde se encuentra el cromosoma sin replicar. Como resultado de esto, el anillo Z no puede formarse en el centro celular hasta tanto los cromosomas duplicados no se ubiquen en los polos. En ausencia del sistema Min pueden formarse anillos Z en regiones de la célula libres de ADN, mientras que si el sistema *Nucleoid Occlusion* se encuentra inactivado la formación de los anillos Z ocurre sobre cromosomas no particionados [84, 87, 88].

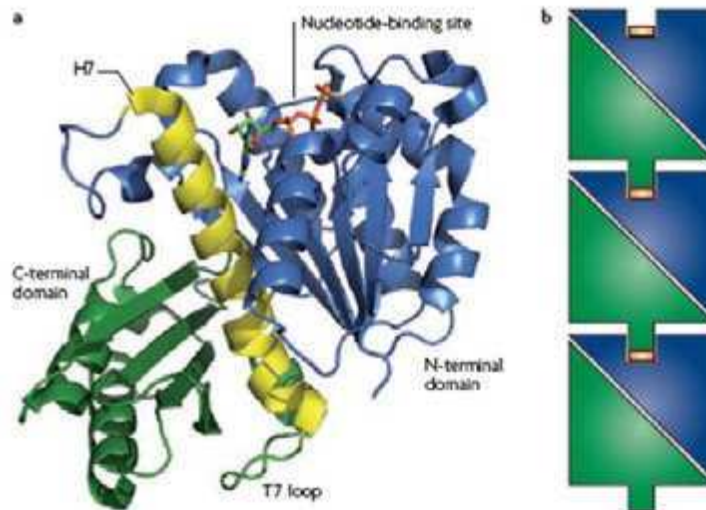


Figura 7. Estructura de FtsZ. A la izquierda (a) puede observarse un modelado de un monómero de la proteína FtsZ unido a GTP de *Bacillus subtilis* en la que se representan los distintos dominios de la misma: el bucle T7, el sitio de unión a GTP, el extremo amino terminal y el extremo carboxi terminal, que funciona como sitio de anclaje para muchas de las proteínas que conforman el divisoma. FtsZ se polimeriza mediante una asociación cola-cabeza de los distintos monómeros (b) en los que el bucle T7 de un monómero se inserta en el sitio de unión a GTP de otro. Tomado de Adams y Errington.

Entre los reguladores recientemente descritos en *Bacillus subtilis* se incluye a UgtP, una UDP-glicosiltransferasa que inhibe la polimerización de FtsZ hasta tanto la célula no haya alcanzado un tamaño adecuado para la división cuando la bacteria se cultiva en un medio rico. Este sistema se encuentra inhibido cuando el cultivo se encuentra en un medio bajo en nutrientes. Se observó también que células de *E. coli* que carecen de la Pgm, análogo de UgtP, presentan un fenotipo similar al de aquellas células de *B. subtilis* crecidas con bajos nutrientes, sugiriendo que este mecanismo regulatorio se encuentra ampliamente conservado [89]. Otro inhibidor que se produce en respuesta al daño del ADN como parte de la respuesta SOS en *E. coli* es Sul A. Sul A es un potente inhibidor de la polimerización de FtsZ in vitro, mientras que in vivo actúa tanto desensamblando los anillos Z formados como evitando la generación de nuevos anillos [88].

La cantidad de FtsZ presente en el citoplasma bacteriano es crítica para la división normal. En *E. coli* la concentración es de aproximadamente 10  $\mu$ M, lo cual representa entre 5000 y 15000 moléculas por célula [90]. Se observó que las mutantes condicionales termosensibles de este gen forman filamentos bacterianos (de allí el nombre FtsZ por filamentos termosensibles), mientras que la sobreexpresión del gen *ftsZ* en *E. coli* induce la aparición del fenotipo minicélulas [91]. Por todo esto, la cantidad de FtsZ y su relación con las otras proteínas del divisoma es clave para la determinación del tamaño celular y la viabilidad de la bacteria.

El gen *ftsZ* mapea a 2,5 minutos del origen del cromosoma de *E. coli* inmediatamente después de los genes *ftsQ* y *ftsA* en la parte más distal del *cluster dcw*. Este grupo de genes se encuentra compuesto por 16 genes cuyos productos están involucrados en la división celular o en la síntesis de la pared. El gen *ftsZ* puede ser transcrito a partir de cinco promotores diferentes (Figura 8); sin embargo, se determinó que aproximadamente el 95% de los transcritos tiene, en su extremo 5', 200 nucleótidos río arriba del codón de inicio de *ftsZ* en una zona que coincide con un sitio de corte para la ARNasa E. Este mensajero contiene en

total 1373 nucleótidos los cuales comprenden: 160 nucleótidos de la porción 3' del gen *ftsA* (que se encuentra inmediatamente río arriba de *ftsZ*), una región intergénica de 61 nucleótidos y a continuación los 1152 nucleótidos correspondientes a *ftsZ* [92].

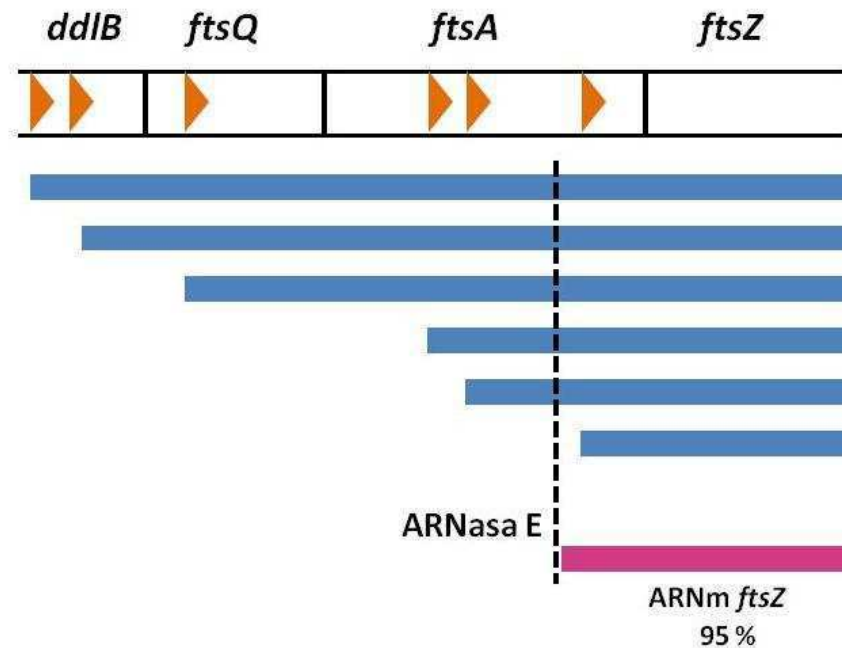


Figura 8. Esquema de la región *fts* del cromosoma de *E. coli*. Aquí pueden observarse los cinco promotores a partir de los cuales puede transcribirse *ftsZ*. La zona de inicio de la transcripción está indicada por los triángulos naranja. Se muestran los transcritos surgidos a partir de cada uno y se señala el sitio con la señal consenso de corte para la ARNasa E que da lugar a la isoforma del mensajero *ftsZ* predominante en el citoplasma bacteriano (95 %).

En un trabajo llevado a cabo por Goh y colaboradores [50] se estudió el efecto sobre el crecimiento celular, del silenciamiento del gen *ftsZ* de *E. coli* mediante una molécula antisentido extensa (más de 120 nucleótidos) dirigida contra la región 5'UTR y parte de la zona de inicio de la traducción. La expresión del ARN AS desde un plásmido indujo la formación de filamentos bacterianos y generó una disminución en la viabilidad celular. La formación de los filamentos bacterianos analizada por microscopía de epifluorescencia se muestra en la Figura 9.

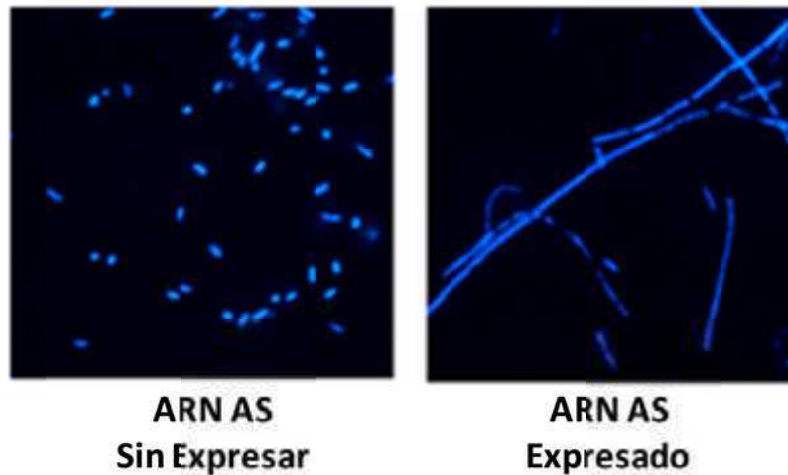


Figura 9. Efecto sobre la morfología celular de la inhibición de la expresión de *ftsZ* por moléculas antisentido en cepas de *E. coli*. La inhibición de la expresión de *ftsZ* se evidencia por la aparición de filamentos (células que no pueden completar su división). Tomado de Goh 2009.

### **Internalización de oligómeros compuestos por ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos**

Como se mencionó anteriormente las tecnologías antisentido consisten en la utilización de oligonucleótidos con el objetivo de interferir con la expresión de un determinado gen de interés. Actualmente existe una droga (fomivirsén) conformada por un AS que está aprobada para su uso en pacientes y que actúa en células eucariotas contra la retinitis producida por el citomegalovirus (CMV) [93]. También otras drogas *antisense* se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos [94]. Sin embargo, el principal desafío que permita aplicar este tipo de terapias en infecciones bacterianas continúa siendo la baja permeabilidad de estos organismos a los oligonucleótidos, lo cual impide que lleguen a su sitio de acción en el interior celular. Particularmente en las aplicaciones contra bacterias Gram negativas se han reportado algunos casos de permeabilidad de estos compuestos [34]; sin embargo, la penetración de estos compuestos desnudos al citoplasma bacteriano continúa siendo baja en muchas bacterias.

Varias estrategias se han elucubrado para intentar sortear este inconveniente, una de las más exitosas ha sido la utilización de análogos de ácidos nucleicos neutros conjugados a péptidos permeabilizantes [57, 95] y la adición de grupos catiónicos como N-(6-gunidinohexanoil)piperazina al *linker* de fosforodiamidato [52]. Se demostró que oligómeros compuestos por péptidos permeabilizantes y fosforodiamidatos de morfolinos fueron capaces de penetrar al interior de células bacterianas e inhibir su crecimiento debido al bloqueo de la función ribosomal [51, 96] o actuando como EGSs [82].

Los oligómeros híbridos compuestos por ADN y LNA (ácidos nucleicos cerrados) son una nueva generación de oligonucleótidos químicamente modificados. Estos compuestos poseen una gran afinidad de unión a ARN o ADN complementarios, son muy resistentes a la digestión por nucleasas bacterianas [81] y poseen baja toxicidad [97, 98]. Recientemente se ha demostrado que un EGS compuesto por ADN y LNA ha sido eficiente para disminuir la expresión del gen *aac(6)'-Ib* (que confiere resistencia a amikacina) y devolver la sensibilidad a este antibiótico cuando cepas hiperpermeables de *E. coli* fueron tratadas con estos compuestos [81]. Sin embargo, los intentos por conjugar estos oligonucleótidos a péptidos permeabilizantes no han sido exitosos hasta el momento, probablemente debido a su estructura química y a la carga negativa total que tienen estas moléculas. También se han descrito avances en el silenciamiento génico de células eucariotas mediante el uso de moléculas antisentido conformadas por una nueva generación de análogos de ácidos nucleicos llamados BNA (*Bridged Nucleic Acids*) [99] y muy recientemente se ha descrito el uso de este análogo para silenciamiento génico en procariontes [100]. Sin embargo a pesar del avance de las enfermedades causadas por bacterias multirresistentes y de la potencialidad de desarrollar tratamientos en contra de estas utilizando estrategias antisentido, aún no se conoce con detalle la capacidad de permeabilidad de los diferentes tipos de compuestos antisentido. La descripción e implementación de un método capaz de cuantificar el ingreso y de conocer la localización de estos compuestos en el interior celular, constituyen un paso importante para el estudio sistemático de los mismos.



***Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* pertenece al filo Proteobacteria, al orden Pseudomonadales, a la familia Moraxellaceae y al género *Acinetobacter*. Son bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, catalasa positivas, oxidasa negativas y no fermentadoras [101]. El nombre del género deriva del vocablo griego *Akineto* que significa sin movimiento, este nombre le fue dado debido a que no poseen flagelo. Sin embargo, se observó que estas bacterias tienen la capacidad de desplazarse debido a movilidad de tipo *twitching* probablemente asociada a la presencia de un pilus de tipo IV [102, 103].

La mayoría de las acinetobacterias son organismos de vida libre, saprofitos y universalmente distribuidos. Están presentes en el suelo y en el agua, pero también fueron encontradas en pequeños animales como piojos, pulgas y garrapatas [104]. Esta versatilidad y adaptabilidad a múltiples ambientes, está principalmente dada por su plasticidad genómica y su capacidad metabólica [101]. *Acinetobacter baumannii* se ha encontrado en ámbitos hospitalarios alrededor del mundo y su creciente protagonismo como agente causal de infecciones multirresistentes es motivo de extrema preocupación y alerta en el ámbito sanitario [105-107]. Se lo encuentra asociado a neumonías –nosocomiales y de la comunidad-, enfermedades del tracto urinario, bacteremia, meningitis, endocarditis y heridas de la piel y el tejido blando [108-110].

Entre los aspectos que contribuyen al éxito y a la adaptación de *A. baumannii* en el ámbito nosocomial se encuentran su plasticidad genómica y la gran capacidad de adquirir diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos. Esto lo realiza tanto por mutación en elementos en su genoma como por la adquisición mediante THG de elementos genéticos móviles tales como plásmidos, integrones, transposones e islas genómicas. Esto explica la aparición cada vez más frecuente de cepas con múltiples y variadas resistencias [102, 111].

ATCC 17978 fue la primera cepa secuenciada perteneciente a la especie *A. baumannii* y cuyo genoma completo estuvo a disposición de la comunidad científica. Al realizarse comparaciones genómicas de *A. baumannii* con otras especies de su género no patogénicas, como por ejemplo *A. baylyi*, se identificaron en el genoma de las primeras, múltiples islas genómicas que albergan elementos genéticos que les conferirían adaptabilidad a la vida patogénica, como genes relacionados con resistencia a antibióticos, secreción de proteínas, bombas de eflujo, *quórum sensing* y *uptake* de hierro [101, 112].

Otro de los aspectos que aportan al éxito de *A. baumannii* son los relacionados con la capacidad de perdurar en el ambiente. Entre estas se encuentra la supervivencia a la desecación: se determinó que existen aislamientos clínicos que llegan a resistir hasta 32 días en condiciones de baja humedad [113]. Por otra parte, *A. baumannii* también posee la capacidad de formar *biofilms* en superficies abióticas como poliestireno y vidrio como así también en superficies bióticas como piel y filamentos fúngicos (Figura 10) [114].

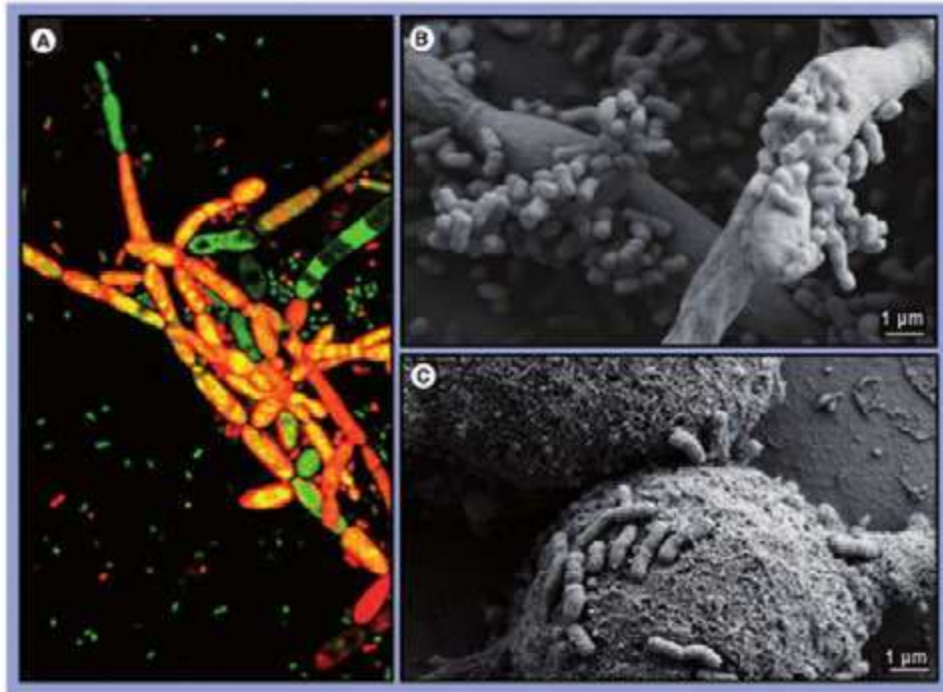


Figura 10. Análisis por microscopía de células de *Acinetobacter baumannii* 19606 adheridas a células eucariotas. A) Microscopía confocal de células teñidas con colorante vital. Células de *A. baumannii* adheridas a filamento de *Candida albicans* *tup 1*. Bacterias en verde (vivas) adheridas a filamentos en rojo (muertos), amplificación 400 X. B) Microscopía electrónica de scaneo (SEM) de células bacterianas adheridas a filamentos de *C. albicans*. C) SEM de *A. baumannii* adheridas a células de epitelio alveolar humano A549. Tomado de Gaddi & Actis 2009.

La gran adaptación de *A. baumannii* a nichos presentes en ámbitos intrahospitalarios hizo de esta bacteria, prácticamente ignota en la clínica hasta fines de los años 70, en una de las especies más temidas por su capacidad de ser refractaria a tratamientos con antimicrobianos [105, 110]. *A. baumannii* además forma parte del llamado grupo ESKAPE, que debe su denominación a la primera letra de los cinco géneros/especies que lo forman: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.. Este grupo es causante de la mayor parte de las enfermedades intrahospitalarias que justamente pueden “escapar” al tratamiento con drogas antibacterianas. Tal es la gravedad de la

situación, que en la última década han fallecido en los hospitales de EE. UU. más personas por causa de los patógenos ESKAPE que por VIH-SIDA y tuberculosis sumados [41]. Lo expuesto refleja la alarmante situación sanitaria causada por estas bacterias multirresistentes. Además, refuerza la importancia del apoyo oficial a proyectos de investigación que tienen como objetivo comprender los determinantes moleculares de mecanismos de resistencia y dispersión y otros aspectos como el impacto clínico y epidemiológico. Finalmente, lo descrito en los últimos párrafos, denota la urgencia de identificar o desarrollar antibióticos n6veles como así tambi6n la necesidad de establecer nuevos tratamientos quimioterap6uticos. En este contexto se enmarca la implementaci6n, a modo de prueba de concepto, de la tecnolog6a EGS [7].

# Objetivos e Hipótesis

## Objetivos e Hipótesis

El objetivo general de la línea de trabajo es el desarrollo de estrategias antisentido como herramientas que permitan prolongar el uso de los antibióticos ya conocidos y simultáneamente explorar el empleo de estas tecnologías antisentido como nuevos agentes antimicrobianos.

Un objetivo particular de este trabajo de tesis doctoral consiste en inhibir la expresión de un gen bacteriano vital mediante el uso de tecnología EGS antisentido. El blanco seleccionado es al ARN mensajero del gen *ftsZ* que codifica para la proteína FtsZ, esencial para la división celular. Se trabajará a modo de prueba de concepto con la bacteria *Escherichia coli*.

Para cumplir este objetivo particular se llevarán a cabo los siguientes enfoques:

- a) Modelado de la estructura del mensajero *ftsZ* y diseño de EGSs contra el mismo.
- b) Ensayo de la actividad in vitro de los EGSs diseñados contra el ARNm *ftsZ*: capacidad de unión del EGS al mensajero y capacidad del EGS diseñado de desencadenar el corte del blanco mediado por la ribozima P.
- c) Ensayos de actividad in vivo de los EGSs seleccionados en b). Para lo cual se emplearán dos métodos diferentes: EGS compuestos por ARN y expresados desde un plásmido en el citoplasma bacteriano y EGS resistentes a nucleasas bacterianas (compuestos por ADN y LNA un análogo de ácidos nucleicos), agregándolos al medio de cultivo.
- d) Ensayo para probar la capacidad de los EGS compuestos por ADN y LNA de ser internalizados por bacterias.

La cantidad de proteína FtsZ es clave para la división celular y por lo tanto para la posterior supervivencia de la bacteria. La tecnología EGS antisentido puede lograr la disminución de la expresión génica mediante la simple

administración endógena o exógena de oligonucleótidos u oligómeros compuestos por análogos de ácidos nucleicos. Por lo tanto se propone como hipótesis principal que la inhibición de la expresión de *ftsZ* mediante tecnología EGS producirá una alteración en la división celular y por consiguiente una disminución en la viabilidad bacteriana. Esto podría constituirse en un nuevo agente antimicrobiano.

El segundo objetivo particular de este trabajo consiste en aplicar la tecnología EGS a una bacteria con relevancia creciente en el ámbito clínico como *Acinetobacter baumannii*. Para esto es necesario poder contar con un sistema de evaluación in vitro de los EGSs candidatos contra los mensajeros blanco seleccionados, para lo cual es necesario obtener la ribozima P de *A. baumannii* purificada.

Para cumplir este objetivo particular se trabajará con la cepa de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 cuyo genoma se encuentra secuenciado y anotado. Se implementarán las siguientes acciones:

- a) Identificar en el genoma, clonar, transcribir y purificar la subunidad ARN catalítica de la ARNasa P de *A. baumannii*.
- b) Identificar en el genoma, clonar, inducir la expresión y purificar el subunidad proteica de la ribozima P de *A. baumannii*.
- c) Ensamblar los componentes previamente purificados de la ribozima P. Realizar ensayos in vitro con un sustrato natural, un pre-ARNt. Ensayar la capacidad de corte de la ribozima obtenida sobre un sustrato bimolecular, compuesto por un ARNm y un EGS.

# **Materiales y Métodos**



## Materiales y Métodos

### Procedimientos y consideraciones para el trabajo con ácidos ribonucleicos (ARN)

Dado que las moléculas de ARN son susceptibles a la degradación por nucleasas se tuvieron cuidados especiales al trabajar con las mismas. Para todos los experimentos se utilizó material de plástico y drogas libres de ARNasas. Los materiales de vidrio y metal se liberaron de ARNasa mediante el horneado durante 3 horas a 180 °C. El agua se trató con dietilpirocarbonato (DEPC) de la siguiente manera: se agregó 1 ml de DEPC a 1000 ml de agua MQ se agitó vigorosamente y se dejó reposar toda la noche. Luego se autoclavó y se almacenó a -20° C hasta su uso. Las micropipetas, propipetas, mesadas y superficies donde se trabajó se limpiaron con solución de SDS 0,5% y NaOH 0,1mM y luego fueron enjuagadas con agua MiliQ dos veces. Las muestras con ARN se mantuvieron en hielo durante su manipulación y se almacenaron a -20 °C ó a -80 °C.

### Transcripción in vitro

Las moléculas de ARN sintetizadas in vitro en este trabajo se generaron mediante el empleo de los kits comerciales *MEGAscript™ high yield transcription T7 kit* o *MEGAscript™ high yield transcription T7 kit (Ambion)*, siguiendo las instrucciones estipuladas por el fabricante.

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 el gen *rnpB* bajo el promotor del fago T7. Su digestión 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 un tamaño que concuerda con los 377 nucleótidos esperados.

Para la transcripción in vitro del ARNm *ftsZ* se utilizó como molde el ADN producto de la PCR descrita anteriormente en la que se utilizaron los cebadores *ftsZ-T7-MET Forward*, que posee el promotor de la T7 ARN polimerasa, y *ftsZ-MET reverse*.

El ARNm de *aac(6')-Ib* se transcribió utilizando 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 junto con otras bandas de menor tamaño de naturaleza desconocida. Se purificó la banda de 750 nts se realizó un PAGE preparativo poliacrilamida 5%, se tiñó con bromuro de etidio y la banda con el ARN del tamaño de interés fue recortada y colocada en un tubo eppendorf. Posteriormente la banda se trituró y se resuspendió en 500 µl de una solución 0,4M NaAco pH 5. Se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos y se recuperó el sobrenadante donde se encuentra el ARN en solución. Se agregan dos volúmenes y medio de etanol absoluto frío y se incubó en hielo 20 minutos. Finalmente se centrifuga a máxima velocidad por 15 minutos a 4 °C, se lavó el precipitado con una solución 80% etanol fría, se dejó secar y se resuspendió en 15 -20 µl de agua DEPC.

Para la transcripción in vitro del precursor del ARN de transferencia que luego será cargado con el aminoácido tirosina (pre-ARNt<sup>Tyr</sup>) se empleó el plásmido pTyr. Este vector está basado en el plásmido pUC19 y contiene clonado el locus que codifica para el pre-ARNt<sup>Tyr</sup> bajo el promotor T7. Para la transcripción in vitro el molde empleado fue preparado a partir de la digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción FokI.

### **Marcación radiactiva de las moléculas**

Se empleó 1 µg de la molécula a marcar y se trató en primer término con fosfatasa alcalina (*New England Biolabs* 2UE) en su buffer de reacción en un volumen final de 20 µl y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Luego se realizó una extracción con fenol y cloroformo (ver más adelante). Posteriormente se llevó a cabo la reacción con T4 polinucleótido kinasa (*New England Biolabs* 2 UE), en el buffer suplementado por el fabricante y 0,5 ó 1 µl de 100 µCi de <sup>32</sup>P-γ-ATP (*Perkin Elmer*). Se incubó 90 minutos a 37 °C. Con el objetivo de purificar el ARN marcado de los nucleótidos radiactivos y otros reactivos se utilizó una columna de sefrosa provista en el kit comercial *illustra MicroSpin G-50 Columns* (*GE Healthcare*)

quedando las muestras purificadas en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para el marcado de los oligonucleótidos obtenidos por síntesis química se omitió el tratamiento con fosfatasa alcalina.

### **Extracción de ARN con fenol-cloroformo**

A la muestra de ARN solubilizado a purificar se le agregó un volumen de agua DEPC y luego se adicionó un volumen de fenol-cloroformo (1:1) previamente mezclado. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa –donde se encuentra el ARN- a la que se adicionó un volumen de cloroformo y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a máxima velocidad. Finalmente se extrajo la fase acuosa que es la que contenía la muestra a purificar.

### **Protocolo de purificación de ARN por precipitación con etanol**

Para una muestra de ARN en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O se le agregan 57,5  $\mu$ l de agua DEPC y 7,5  $\mu$ l de acetato de amonio 3M ó acetato de sodio 3M (a una concentración de 0,15 M final). Se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto (150  $\mu$ l) y se incuba al menos 30 minutos a -20° C (aunque para un mejor rendimiento es mejor que la incubación se realice ON). Luego se centrifuga a máxima velocidad durante 15 minutos y se retira el sobrenadante con micropipeta. Se deja secar el pellet durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se resuspende en agua DEPC.

### **Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida**

Para la preparación 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 6% de acuerdo al tamaño de fragmentos a resolver, utilizando agua DEPC y *buffer*. En el caso de geles desnaturizantes se agregó urea sólida hasta una concentración final de 7M. A la mezcla de componentes se agregó 1/1000 volumen de TEMED y 1/200 volumen de 10% persulfato de amonio (PSA). Se emplearon diferentes *buffers* tanto de armado como de corrida, TAE, TBE o bien

GTG (USB Corporation). Para los *buffers* de corrida se mezclaron los componentes con agua DEPC de modo tal de obtener una solución final 1X. Para la resolución de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida se empleó el equipo *Miniprotean III* de *BioRad*. Las corridas se hicieron a voltaje constante (entre 100 y 125 V, según el ensayo).

Para las electroforesis en las que se resolvieron muestras de ARN se empleó el marcador de peso molecular *RNA Century Marker Plus* (*Ambion*).

### Cepas bacterianas utilizadas

En la presente tesis se emplearon las cepas bacterianas, que se listan junto a sus principales características en la tabla a continuación:

Cepa	Características Genotípicas Relevantes
<b><i>Escherichia coli</i> DH5α</b>	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-
<b><i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)</b>	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<b><i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) T7A49</b>	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) rnpATS. Termosensible, a temperaturas > 42 °C no crece.
<b><i>Escherichia coli</i> TOP 10</b>	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 λ <sup>-</sup>
<b><i>Escherichia coli</i> AS19</b>	F- λ- ilvG- ,rfb-50, rph-1. Deriva de K12 por mutagénesis química. Fenotipo de hiperpermeabilidad, por una mutación que revierte con alta frecuencia. Sensible a la lisozima.
<b><i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC17978</b>	
<b><i>Escherichia coli</i> pFC276</b>	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) T7A49 transformada con el plásmido pM1Ab.

Tabla 1: Cepas utilizadas en este trabajo

### Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* y *A. baumannii* fueron cultivadas en el medio correspondiente en una incubadora a 37 °C ó 28 °C durante el tiempo indicado en cada ensayo (en general de 16 a 24 hs), con agitación de entre 200 y 250 rpm/min.

La composición de los medios de cultivo empleados se detalla a continuación:

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

**Medio Mínimo M9 (M9):** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NaCl 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl 1 g, 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 MgSO<sub>4</sub>, 20% glucosa, 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 100 mM tiamina-HCl.

**Medio Superóptimo con represión Catabólica (SOC):** 2% Triptona, 0,5% Extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, se llevó a volumen con agua bidestilada y se autoclavó. 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Luego se le agrega una solución de glucosa previamente filtrada hasta una concentración final de 20 mM.

Para obtener los medios en estado sólido, se agregó ágar al 1,7% .

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 g/ml e IPTG 20 g/ml. Para la inducción de cultivos líquidos se empleó un stock 1M de IPTG estéril a la concentración final indicada en cada caso.

### 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 20 % en criotubos conservados a –80 °C.

### **Preparación de células electrocompetentes**

Se prepararon las células empleando un protocolo de electrotransformación de alta eficiencia. Para esto, se genera un pre-inoculo con las células de interés en 5-25 ml de LB líquido y se incuba a 37 °C con agitación toda la noche. Luego, con 5 ml de ese cultivo, se inoculan 500 ml de medio 2X YT y se incuba a 37 °C con agitación hasta que la Densidad Óptica medida a una longitud de onda de 600 nm ( $OD_{\lambda 600}$ ) sea de 0,6. Inmediatamente el cultivo se fracciona en recipientes estériles adecuados para su posterior centrifugación y se lo coloca en hielo por 30 minutos. Luego las células se cultivan mediante una centrifugación a 3000 g durante 20 minutos a 4 °C. El *pellet* es luego resuspendido en 200 ml de glicerol 10 % enfriado a 4 °C, se incuba en hielo 30 minutos y se centrifuga a 3000 g durante 20 minutos a 4 °C. Este procedimiento se reitera tres veces. Finalmente el último *pellet* se resuspende en una volumen equivalente de glicerol 10% frío (aproximadamente 1 ml) y se alícuota de a 50 µl en tubos eppendorf estériles que inmediatamente son almacenados a -80 °C.

### **Electroporación**

En el procedimiento de transformación se utilizó un electroporador *Gene Pulser Transfection Apparatus* (Bio-Rad). En cada electroporación se emplearon 40 µl de suspensión de células electrocompetentes y 0,1-1 µg de ADN disuelto en agua milliQ o buffer. 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 (2,5 Kv, 200 Ohm, 25 µF para *E. coli*). Tras el pulso eléctrico rápidamente se agregaron 0.95 ml de medio estéril SOC y se colocaron las células a 37 °C por 40 minutos a 200 rpm. Finalmente las células se plaquearon en medio sólido selectivo y se incubaron toda la noche a 37° °.

## Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados se detallan en la tabla a continuación

Plásmido	Características principales	Origen/Referencia
pBBR1MCS-2	Vector de clonado de número medio de copias, de amplio rango de hospedador. Km <sup>R</sup> .	Kovach et al 1994
pET-22b(+)	Vector de clonado de proteínas bajo promotor inducible Novagen por IPTG, con fusión a HisTag en el C-terminal. Ap <sup>R</sup>	Novagen
pCR2.1-TOPO	<i>Plac lacZa f1ori pMB1ori</i> . Km <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	Invitrogen
pEGS	Plásmidos empleados para la expresión de EGSs en <i>E.coli</i> BL-21 (DE3) (pNW1). Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pJA2'	<i>rnpB PT7 pMB1ori lacZa</i> , Ap <sup>R</sup>	Vioques et al 1988
pTyr	<i>tRNATyr PT7 pMB1ori lacZa</i> Ap <sup>R</sup>	Roberton et al 1972
pYM201	Inserción de 857 pb de <i>aac(6')-Ib</i> en pZero-1 [ <i>Plac lacZa PSp6 PT7 ccdB f1ori pMB1ori (Zcr Akr)</i> ] Zeo <sup>R</sup>	Lab Dr. Tolmasky
pM1Ab	pCR2.1-TOPO con in la secuencia codificante para la subunidad M1 de la ribozima P de <i>A. baumannii</i> flanquada por las enzimas de restricción Hind III y BamHI. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pM1Ashort	pCR2.1-TOPO con secuencia codificante para la subunidad M1 de la ribozima P de <i>A. baumannii</i> . Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pBBR1MCS-2pM1Ab	pBBR1MCS-2 con con inserto constituido por la secuencia codificante para la subunidad M1 de la ribozima P de <i>A. baumannii</i> flanquada por las enzimas de restricción Hind III y BamHI. Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pET-22b(+) C5Ab	pET-22b(+) con inserto la secuencia codificante para la subunidad proteica C5 de la ribozima P de <i>A. baumannii</i> ATCC 17978.	Este trabajo
pEGSb1	pEGS portando la secuencia codificante para el EGSb1	Este trabajo
pEGSb1S	pEGS portando la secuencia codificante para el EGSb1sense	Este trabajo

Tabla2: la tabla contiene diferentes plásmidos empleados en este trabajo.

### **Soluciones *Buffer***

**TAE** (Tris-Acetato-EDTA): Para preparar 1 litro de una solución stock 50X (40 mM tris-acetato y 1 mM EDTA) se utilizaron 242g de Tris, 57,1 ml ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5M (pH = 8,0).

**PBS** (Fosfato Salino): Para la preparación de un litro se emplearon 8 g NaCl (173 mM), 0,2 g KCl (2,7 mmol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,4 g (10 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,24 g (1,8 mM).

**TBE** (Tris-Borato-EDTA): Para preparar un litro una solución stock 5X (45 mM tris-borato y 1 mM EDTA) se mezclaron 54g de Tris con 27,5g de ácido bórico y 20ml de EDTA 0,5M (pH = 8,0).

**GTG** (Gel-tolerante al Glicerol): Se utilizó el *buffer* comercial GTG 20X fabricado por *USB corporation*. Se empleó con la siguiente concentración final: 89 mM Tris, 29 mM taurina y 0,5 mM EDTA.

### **Procedimientos generales con ácido desoxirribonucleico (ADN)**

Para la purificación de ADN a partir de geles de agarosa 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. Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron empleando el kit comercial QIASpin Wizard(R) Plus Minipreps DNA Purification System de Promega, con columnas Econospin; o siguiendo el siguiente protocolo de purificación (con P1, P2, P3): Se cosecharon por centrifugación las células cultivadas durante unas 16-18 horas, se resuspendieron en 1 volumen de la solución P1 (50 mM Tris, 0 mM EDTA, pH 8.0) y se incubaron en hielo 5 a 10 minutos. Luego se agregó 1 volumen de la solución P2 (0.1 M NaOH and 1% SDS) y se incubó a temperatura ambiente entre 5 y 10 minutos. Se agregó 1 volumen de solución P3 (1.5 M Potassium Acetate, pH 5.5) y se incubó 5 a 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a alta velocidad (16000 g) se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se agregaron 0,9 volumen de etanol absoluto frío. Se incubó a -20 °C 30 minutos, se centrifugó a alta velocidad a 4 °C, se



descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70% frío, se retiró el sobrenadante. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió en agua o *buffer* TE, según el uso posterior.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

En las reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó enzima *Taq* polimerasa de las marcas Invitrogen, Promega o Pegasus de PB-I. Para las reacciones de clonado se utilizó enzima con actividad *proof reading*. Los cebadores empleados en cada reacción se detallan en las secciones siguientes y en la Tabla 3. Las mezclas de reacción contenían 0,5 a 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 μM de cada cebador y 0,2 mM de dNTPs en un buffer suplementado por la compañía proveedora de la enzima. El volumen final se fijó entre 10 y 50 μl por reacción según el destino. Como molde se empleó ADN de diversas fuentes: minipreparaciones de plásmidos, ADN cromosómico o extractos celulares. Estos últimos fueron generados por resuspensión de una poca colonia de un microorganismo en 50 μl de agua MQ, seguido de un calentamiento a 100 °C durante 5 minutos y su centrifugación por 1 minuto a unos 3000 g. Estas reacciones a partir de extractos celulares se denominan “colony PCR”.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *Mastercycler* de Eppendorf o en termociclador Perkin-Elmer. El programa utilizado comprende cinco etapas: desnaturalización inicial (5 minutos a 94 °C), el ciclo (30 repeticiones) de las etapas de Desnaturalización (30 segundos a 94 °C), Hibridación (30 segundos a 55 °C) y polimerización o amplificación (60 segundos por cada Kpb a amplificar a 72 °C) seguidos por una Extensión Final de 10 minutos a 72 °C. La temperatura de desnaturalización puede variar acorde a la naturaleza y composición del molde, la de hibridación varía en relación a los cebadores utilizados y la de extensión en relación a la enzima empleada.

### **Extracción de ADN genómico total**

Se realizaron cultivos de las cepas a extraer ADN genómico en 5 ml de medio líquido LB durante 24 hs a 37 °C en agitación a 200 r.p.m. Se cosecharon las

células y se realizó extracción de ADN genómica total mediante la utilización del kit comercial MasterPure DNA Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies).

### Nombre y Secuencia de los cebadores utilizados

Para el diseño y el análisis de los diferentes cebadores empleados en este trabajo se utilizaron los programas Oligo Perfect Design (Invitrogen) y Oligo Analyzer (IDT), ambos de uso libre y disponibles en internet. A continuación se muestra en la tabla los cebadores utilizados:

Nombre	Secuencia
ftsZ Forward	AGAATTATGCTCAGGAGCCGTATTATTCG
ftsZ-T7-MET Forward	TTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTATGCTCAGGAGCCGTATTATTCG
ftsZ-MET Reverse	TTAATCAGCTTGCTTACGCAGGAA
T7 promoter	GTTTAACGTTTGACATGAGGGC
M1 Abaumannii T7F	GCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGGAAGTGAGCCGGATGGTC
M1 Abaumannii R	GCAGGATCCAGGTGAAGTGAGCCTATAAGCC
M1AbT7 F-Short	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGTGAGCCGGATGGTC
M1Ab R-Short	AGGTGAAGTGAGCCTATAAGCC
C5 A baumannii F	GCCCATATGGTGCATCAACCCATTTTT
C5 A baumannii R	GAACCTCGAGATTCTGCGAGGTTGGGACA
ACCA1 protein	GTTTAACGTTTGACATGAGGGC

Tabla 3: Nombre y secuencia de los cebadores utilizados

### Análisis bioinformáticos

Para los análisis bioinformático se emplearon diversos programas y servidores en según la naturaleza de las muestras y el objetivo del análisis. Para el análisis de de secuencias primarias de aminoácidos se utilizó el Clustal W2 y Clustal Omega.

Para el análisis electrofenogramas de reacciones de secuenciación se empleó Chromas Lite. En el ensamblado de secuencias se utilizó SeqMan (Lasergene) y para el análisis de plásmidos Vector NTI (Invitrogen Life Technologies). Para el análisis de estructura secundaria de ácidos nucleicos se empleó el Mfold webserver. También se utilizaron bases de datos y programas de modelado de proteínas como: Swissprot, Pfam y ProtParam.

### **Modelado *in silico* de estructura secundaria de ARN mensajero**

Para la determinación de regiones simple cadena en el ARN mensajero de *ftsZ* se empleó el servidor disponible en internet denominado *Mfold web server* versión 2.3 para plegamiento de ARN [115, 116]. Se emplearon los siguientes parámetros: temperatura 37<sup>o</sup> C, secuencia lineal y fuerza iónica NaCl 1M sin iones divalentes (prefijado por el servidor). En la Figura 11 se muestra un esquema del código de colores que el servidor asigna a cada nucleótido según su probabilidad de encontrarse como simple cadena en la secuencia de ácidos nucleicos analizada (Zuker, 2003).

Dado que *ftsZ* se transcribe desde al menos seis promotores, se trabajó con la secuencia correspondiente a la subespecie de ARNm *ftsZ* que se determinó se encuentra en mayor proporción (95% de los transcriptos) y que cuenta con 1373 nucleótidos [92]. La secuencia se obtuvo a partir del genoma de *Escherichia coli* K-12, de la base Entrez Genome (ID Project: 225 correspondiente a *E. coli* K-12 MG 1655, University of Wisconsin, Madison EE. UU).

Color	Hex	% P-num % ss-count	Probability	Color	Hex	% P-num % ss-count	Probability
	ff0000	0.0-2.5	0.999		00ffff	50.0-52.5	0.500
	ff1f00	2.5-5.0	0.998		00bfff	52.5-55.0	0.366
	ff3f00	5.0-7.5	0.997		007fff	55.0-57.5	0.269
	ff5f00	7.5-10.0	0.997		003fff	57.5-60.0	0.197
	ff7f00	10.0-12.5	0.995		0000ff	60.0-62.5	0.144
	ff9f00	12.5-15.0	0.994		1f00ff	62.5-65.0	0.106
	ffb000	15.0-17.5	0.991		3f00ff	65.0-67.5	0.077
	ffd000	17.5-20.0	0.988		5f00ff	67.5-70.0	0.057
	fff000	20.0-22.5	0.984		7f00ff	70.0-72.5	0.042
	dfff00	22.5-25.0	0.978		9f00ff	72.5-75.0	0.031
	bfff00	25.0-27.5	0.969		bf00ff	75.0-77.5	0.022
	9fff00	27.5-30.0	0.958		df00ff	77.5-80.0	0.016
	7fff00	30.0-32.5	0.943		af00cf	80.0-82.5	0.012
	5fff00	32.5-35.0	0.923		7f009f	82.5-85.0	0.009
	3fff00	35.0-37.5	0.894		5f007f	85.0-87.5	0.006
	1fff00	37.5-40.0	0.856		3f005f	87.5-90.0	0.005
	00ff00	40.0-42.5	0.803		1f003f	90.0-92.5	0.003
	00ff3f	42.5-45.0	0.731		09001f	92.5-95.0	0.003
	00ff7f	45.0-47.5	0.634		040009	95.0-97.5	0.002
	00ffbf	47.5-50.0	0.500		000000	97.5-100.0	0.001

Figura 11. Código de colores. A cada nucleótido se le asignó un color según la probabilidad de que esté como simple cadena. Los tonos rojos indican los nucleótidos con mayor probabilidad de estar como simple cadena siendo esta de entre 0.999 y 0.997, mientras que los grises oscuro y negro indican a los que poseen menor probabilidad siendo esta de entre 0,001 y 00,3. El resto de los colores representa probabilidades intermedias. Tomado de Mfold web server 2.3.

### Ensayos de unión al mensajero

Se realizaron ensayos de cambio de movilidad en gel (EMSA) para determinar la unión de los EGS (compuestos por ARN o por LNA/ADN) al mensajero. Para ello se mezclaron en un volumen final de 10  $\mu$ l, 10 pmol (1  $\mu$ M) de oligómeros marcados radiactivamente con  $^{32}$ P en el 5' con concentraciones crecientes de mensajero marcado de *ftsZ* (de 0; 0,6; 6; 60 y 300 ng) en *buffer* STE (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8) durante 2 horas a 25°C. La reacción se detuvo agregando un volumen de glicerol 10% (10  $\mu$ l) y 4  $\mu$ l *Buffer* de carga III 6X. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en *buffer* TBE no desnaturante a 100 V constante durante 25 minutos (se sembraron sólo 10  $\mu$ l

de la reacción). Tras secar los geles por 1 hora a 80 °C, los resultados fueron analizados con el sistema *Phosphoimager* (*Storm 840, Molecular Dynamics*).

### **Ensayos de corte mediado por la Ribozima P de *Escherichia coli***

Para los ensayos de corte de ARNm, se realizó en primer término un ensamble del sustrato: la coincubación de 2,5 pmol de ARNm *ftsZ* con 50 pmol de EGS en un volumen de 3 µl durante 30 minutos a 25 °C. Paralelamente se realizó el ensamble de la ARNasa P: se colocaron 2.5 pmol de ARN M1 y 70 pmol de proteína C5, 7 µl de un *buffer* compuesto por 20 mM Hepes-KOH (pH 8.0), 400mM acetato de amonio, 10 mM acetato de magnesio y 5% glicerol agregándose un inhibidor de ARNasas (0,25 µl de *Ribolock* de *Fermentas*). Luego de incubar por 15 minutos a 37 °C se agregó esta mezcla enzimática a la del sustrato, resultando un sistema de reacción de volumen 10 µl que se incubó durante 90 minutos a 37° C. Luego se purificó la muestra con el protocolo de extracción con fenol-cloroformo seguido de precipitación con etanol (en el caso del mensajero *ftsZ* sólo se realizó la precipitación con etanol). Finalmente 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 3 minutos a 95 °C. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 6% GTG durante 90-150 minutos a 110 V. Tras el secado del gel, los resultados fueron analizados revelados mediante el sistema *Phosphoimager* (*Storm 840, Molecular Dynamics*).

### **Ensayos *in vivo* con EGSs compuestos por ARN dirigidos contra el mensajero *ftsZ***

#### **Generación de los plásmidos que expresan el EGS-ARN**

Los plásmidos capaces de expresar los EGSs compuestos por ARN (pEGS) se basan en el vector pUC57 y fueron encargados de manera tal que porten una construcción específica que permita la eficaz expresión de los EGSs. Estos pEGS llevan clonados secuencia genérica 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. La parte variable de esta construcción fue la correspondiente al EGS. A su vez se emplearon controles llevando la secuencia *sense* o EGS dirigidos contra otros genes.

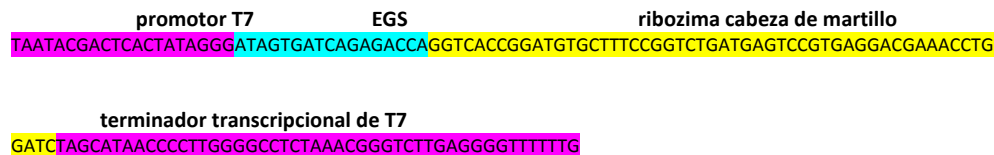


Figura 12. Esquematación del constructo que llevan los plásmidos de expresión pEGS, a partir de los cuales se transcriben los EGSs en el citoplasma bacteriano.

En un contexto genético que permita la expresión del promotor T7 -como lo es el de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)-, estos plásmidos generan un transcripto que va desde el +1 del EGS hasta el terminador de la transcripción, incluyendo la secuencia antisentido, la secuencia ACCA y la ribozima cabeza de martillo. Luego, la ribozima cabeza de martillo se autoescinde del transcripto junto al terminador de la transcripción. De esta forma el EGS, compuesto por la secuencia antisentido y el ACCA se liberan al citoplasma bacteriano [80].

### Inducción de la expresión de los EGSs de ARN

Células *E. coli* BL21(DE3) (pLysS) transformadas con los plásmidos recombinantes pEGS portando la secuencia correspondiente al EGS de interés o su secuencia *sense* como control, fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 mg/ml y con cloranfenicol a 20 mg/ml, a 37 °C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica ( $OD_{\lambda 600}$ ) de 0,15-0,2. En ese momento, con el objetivo de inducir la expresión del EGS, se agregó a los cultivos isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranosido (IPTG) a concentraciones de 1 mM ó 100 mM y se incubó por 90 minutos a 37 °C con agitación.

### **Determinación de Unidades Formadoras de Colonias**

Para la determinación de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se empleó la técnica de recuento en microgota. Luego de la incubación con IPTG las células fueron serialmente diluidas en *buffer* PBS y las microgotas-entre 4 y 5 por dilución, por réplica y tratamiento- fueron depositadas en placas de LB agar e incubadas a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se llevó a cabo el recuento del número de colonias formadas. Los experimentos fueron repetidos tres veces, una por cuadruplicado y dos por sextuplicado. La significancia estadística se analizó mediante una prueba t despareada de dos colas, mediante el programa *GraphPad Prism 5*. Se consideró  $P < 0,01$  estadísticamente significativo.

### **Exploración de la morfología bacteriana mediante microscopía**

Para la examinación por microscopía óptica convencional, luego de la inducción de la expresión de los EGS con IPTG, se realizó inmediatamente después de cumplido el tiempo de incubación un preparado de las bacterias tratadas. Para esto, se extendieron 40 µl del cultivo en un portaobjetos de vidrio, se fijó por calor y se realizó una tinción con cristal violeta al 5%. Finalmente se exploró la formación de filamentos bacterianos en un microscopio Zeiss Axioplan suplementado con una cámara Olympus DP72, a una amplificación de 1000X.

Para Microscopía Confocal por Scaneo Láser (LSCM), las bacterias luego del tratamiento con IPTG fueron cosechadas por centrifugación a baja velocidad, lavadas con *buffer* PBS y resuspendidas en 20 µl del mismo. Luego fueron teñidas con el colorante FM 5-95 que fue agregado a una concentración final de 6,5 µg/ml e incubadas 5 minutos en hielo. Luego las células fueron colocadas en una superficie de 1 mm de espesor compuesta por agar 2%, montada sobre un portaobjetos de vidrio. Luego se colocó un cubreobjetos de vidrio y se examinó en microscopio Zeiss Meta a magnificaciones de 400X y 1000X.

## **Ensayos in vivo con EGSs no hidrolizables por nucleasa bacteriana compuestos por LNA y ADN dirigidos contra el mensajero *ftsZ***

### **Prueba de sensibilidad a la lisozima**

Dado que la cepa *E. coli* AS19 tiene una alta frecuencia de reversión de fenotipo, antes de realizar cada ensayo se llevó a cabo una prueba de sensibilidad a la lisozima (según Sekiguchi e Iida, 1967 [117]). En la misma, las células provenientes de un cultivo en LB líquido a 37 °C con agitación son cosechadas a baja velocidad. Luego el pellet bacteriano se resuspende en una solución 2 µg/ml de lisozima de huevo (en 0,05 M Tris-HCl pH 8,0) e inmediatamente la suspensión bacteriana se coloca en una cubeta acrílica para espectrofotometría (L= 1 cm) y se mide la absorbancia (A) a 600 nm en función del tiempo. Se espera que en un cultivo en el que no se encuentren cantidades significativas de células revertantes, la absorbancia disminuya de forma exponencial, durante los primeros dos minutos de incubación.

### **Efectos del tratamiento con agregado exógeno de EGSs no hidrolizables por nucleasas bacterianas**

Cultivos *over night* de *E. coli* AS19 en medio LB a 37 °C con 200 rpm de agitación, fueron diluidos en LB líquido a una cantidad de 10<sup>5</sup> UFC/ml y fueron dispuestos en microplacas de poliestireno. A cada uno de los pocillos se les agregó concentraciones variables de los EGSs compuestos por ácidos nucleicos cerrados (LNA) y ADN y no hidrolizables por nucleasas bacterianas. A su vez se realizaron los controles con las secuencias *sense* y con EGSs aleatorios. Las secuencias de los oligómeros empleados en este ensayo pueden verse en la Tabla 6. Luego de agregados los compuestos se incubó la placa sellada a 37 °C con agitación durante 120 minutos. Luego se procedió a realizar el recuento de unidades formadoras de colonia como así también a cuantificar el efecto del tratamiento en la morfología bacteriana.



### **Determinación de Unidades Formadoras de Colonias**

Para establecer cómo se afectó la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se empleó el recuento en microgota, por lo que luego de realizado el tratamiento con los oligómeros, se llevó a cabo la dilución serial de los cultivos en *buffer* PBS y se incubó en LB agar a 37 °C durante toda la noche. Se llevó a cabo el recuento de colonias formadas. Los experimentos se realizaron por triplicado y la significancia estadística se determinó realizando ANOVA de una vía y un test Dunnet de comparación múltiple.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

### **Determinación de la morfología y el largo celular**

Para analizar la morfología y determinar el largo celular se empleó microscopía óptica. Luego del tratamiento las células fueron cosechadas por centrifugación a baja velocidad (3000 g durante 3 minutos), fueron resuspendidas en 25  $\mu$ l de *buffer* PBS, esparcidas en un portaobjetos de vidrio, fijadas y teñidas con una solución 10 % de cristal violeta. Posteriormente microfotografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss Axioplan equipado con una cámara Olympus DP72, a una amplificación de 1000X. Se empleó el programa *Image J* para analizar las microfotografías y tomar las medidas del largo celular. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el GraphPad Prism 5 mediante un análisis de Kluskal-Wallis y la prueba de Dunn de comparación múltiple.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

### **Ribozima P de *A. baumannii***

#### **Generación de vectores conteniendo la subunidad M1 de *A. baumannii***

Para la generación de los clones conteniendo la subunidad ARN-catalítica (M1) de la ARNasa P de *A. baumannii* se empleó como molde ADN genómico de la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978. Se llevó a cabo una PCR utilizando como cebadores los pares M1 *A.baumannii* T7 F y M1 *A.baumannii* R ó los cebadores M1AbT7 F-Short y M1Ab R-Short. La diferencia entre el primero y el segundo es que, en el caso del

primero, el producto de PCR tendrá un sitio de corte para la enzima de restricción *Hind III* en el extremo 5' y otro sitio de corte para la enzima restricción *Bam HI* el extremo 3'.

Posteriormente con el fragmento M1Ab flanqueado por los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* se realizó un clonado direccionado utilizando como vector al plásmido de expresión pBBR1MCS-2 [118]. Para esto, se cuantificó el producto de PCR por absorbancia a  $\lambda$  260 nm y se digirieron unos 200 ng del mismo, con ambas enzimas de restricción en simultáneo, empleando una unidad enzimática de cada una. En este último procedimiento se realizó una incubación de 120 a minutos a 37 °C, seguido por una inactivación de las enzimas por calentamiento a 65 °C durante 15 minutos. A este producto de PCR digerido de ahora en más lo denominaremos "inserto". A su vez, el vector pBBR1MCS-2 también fue digerido con las enzimas de restricción mencionadas y luego, el vector linealizado fue purificado mediante una electroforesis en gel de agarosa. Después se mezcló el inserto con el vector y se realizó una precipitación con etanol con el objetivo de liberar las muestras de impurezas y concentrar los ácidos nucleicos. Luego se llevó a cabo la ligación del vector y del inserto (que se encontraban en una proporción 10:1) mediante el uso de T4 ligasa (Promega), para lo que se incubó primero 30 minutos a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4 °C. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes, empleando 2  $\mu$ l del producto de ligación. Las células transformantes fueron seleccionadas en placas de LB agar suplementadas con kanamicina a una concentración de 50  $\mu$ g/ml. Algunas de las colonias kanamicina resistentes, se cultivaron y se les realizó una minipreparación para obtener ADN plasmídico, el cual se secuenció con el objetivo de constatar que se trataba del plásmido recombinante portando la secuencia M1Ab. A este plásmido se lo denominó pBBR1MC-2-M1Ab.

Por otra parte el fragmento de ADN M1Ab largo (flanqueado por los sitios para las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*) y corto (sin sitios de corte para las enzimas de restricción) fue clonado en un vector pCR2.1-TOPO (resistente a ampicilina), utilizando el kit TOPO Cloning reaction (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del

fabricante. Una vez obtenido el plásmido recombinante, el mismo se introdujo por transformación química en bacterias *Transform One Shot* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) siguiendo el protocolo indicado por la compañía proveedora. Las bacterias recombinante fueron seleccionadas en placas de LB agar suplementadas con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina, se realizaron minpreparaciones de plásmidos a partir de algunas de ellas y los plásmidos obtenidos se enviaron a secuenciar. Finalmente, se seleccionaron dos plásmidos: uno conteniendo la secuencia M1Ab flanqueado por los sitios de corte para *HindIII* y *BamHI* al que se denominó pM1Ab y otro conteniendo el producto de pCR M1 pero no flanqueado por esos sitios de corte para encimas de restricción. A este último se lo denominó pM1Ab Short.

### **Obtención de la subunidad ARN catalítica M1 de *A. baumannii***

La obtención de la subunidad catalítica de la ARNasa P (M1) de *A. baumannii* se realizó mediante una transcripción *in vitro* de ARN empleando el kit comercial *MEGashortscript™ high yield transcription T7 (Ambion)*, siguiendo las instrucciones estipuladas por el fabricante.

Como molde una digestión con las enzimas *HindIII* y *BamHI* del plásmido pBBR1MC-2-M1Ab, mencionado en el apartado anterior'. Su digestión genera un fragmento lineal que incluye al gen que codifica para la subunidad M1 de *Acinetobacter baumannii* bajo el promotor del fago T7. La transcripción *in vitro* de este molde generó un fragmento de un tamaño que concuerda con los 355 nucleótidos esperados. También se empleó como molde para la transcripción *in vitro* el producto de PCR purificado que fue generado a partir de la utilización de los cebadores F-Short y M1Ab R-Short y el ADN plasmídico de pM1Ab.

### Generación del vector de expresión para la subunidad proteica C5 de *A. baumannii*

Para la obtención de la secuencia codificante correspondiente a la subunidad proteica C5 de *A. baumannii* se empleó la base de datos Genome del NCBI (Número de referencia del NCBI: NC\_009085.1). Por otra parte, como vector de expresión se seleccionó el plásmido pET-22b(+) que cuenta con región de expresión y de clonado múltiple, en la que el inserto puede colocarse río abajo del promotor T7, el operador *lac* y el sitio de unión al ribosoma y río arriba de la cola de seis histidinas que servirá luego para la purificación e identificación del péptido. Un esquema de esta región puede apreciarse en la figura que se muestra a continuación (Figura 13):

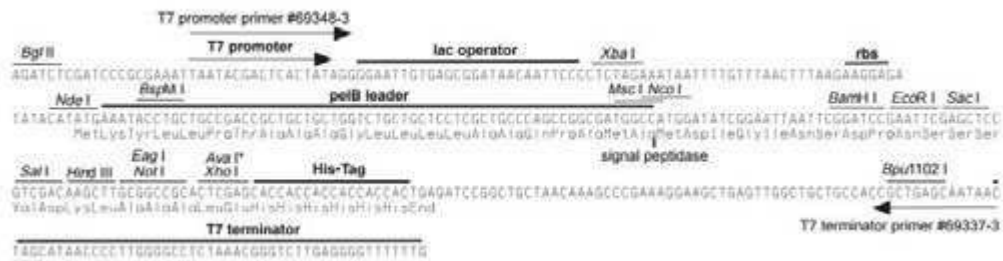


Figura 13. Esquema de la región de clonado y de expresión del plásmido de expresión pET-22b(+). Tomado de Novagen pET System Manual.

Se utilizó ADN genómico de la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 como molde para la PCR y para amplificar la secuencia codificante C5Ab se diseñaron los cebadores C5 A. baumannii F y C5 A. baumannii R, conteniendo la secuencia de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* respectivamente. Por otra parte, se linealizó el vector de expresión pET-22b(+) con *NdeI* y *XhoI* y empleando ambas enzimas se digirió el producto de PCR obtenido previamente. El inserto y el vector se ligaron con T4 ligasa, de manera similar a lo explicado en el apartado anterior y se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes con el producto de ligación. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas en placas LB agar conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, se preparó ADN plasmídico a partir de algunas de estas colonias y se envió a secuenciar. El clon portando el plásmido de

expresión con la secuencia correspondiente a la subunidad proteica C5 de *A. baumannii* seguida en fase por la cola de seis histidinas, se denominó pET22b+-C5Ab.

### **Expresión de la subunidad proteica C5 de *A. baumannii* recombinante**

La sobreexpresión de la subunidad proteica C5 de la ribozima P de *A. baumannii* se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) que posee la secuencia codificante por la polimerasa del fago T7 insertada en su genoma y bajo el promotor *lac*. Esta cepa fue transformada con el plásmido recombinante pET22b+-C5Ab que posee la secuencia codificante para la C5Ab bajo el promotor T7. Por lo que al agregar isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG) se expresa la polimerasa T7 y por ende se genera y transcribe la proteína recombinante. Las condiciones de inducción de la expresión fueron las siguientes: medio rico LB, 28 °C, 200 rpm/min,  $DO_{i\lambda 600} = 0,8$ ; 0,5 mM de IPTG, 90 minutos. Luego se realizó un lisado de bacteria mediante un esquema de lisis por cambio de temperatura seguido por una ruptura a alta presión con un equipo de *french press*. Posteriormente se llevó a cabo un fraccionamiento celular mediante un esquema de centrifugación y ultracentrifugación a distintas velocidades.

El análisis de las fracciones se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) 15%. Seguido por una tinción Azul Coomassie. A su vez también se realizó un ensayo de Western Blot, empleando como anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal que reconoce al hexámero de histidina. Los detalles de cada protocolo se me describen en los apartados a continuación.

### **Fraccionamiento subcelular**

Con el objetivo de separar las fracciones subcelulares de *E. coli* se utilizó el siguiente protocolo, siempre trabajando con las muestras en frío:

- I) Las bacterias de cultivaron hasta alcanzar la DO a  $\lambda$ 600 nm deseada y luego fueron cosechadas por centrifugación (4000 g 15 min, a 4 °C).
- II) Las células fueron resuspendidas en 1-3 ml de Tris HCl 20 mM pH8, PMSF 1 mM.
- III) Se realizó una lisis bacteriana mediante un ciclo de congelamiento y descongelamiento: 10 minutos a -80 °C seguido de 5 minutos a 25 °C.
- IV) Luego se llevó a cabo una lisis mecánica por alta presión: la muestra se pasó 3-5 veces por la mini *french press* a 1000 psi.
- V) Se centrifugó el lisado a unos 5000 rpm 15 min a 4° °C, se conservó el *pellet* (fracción debris). Luego se volvió a centrifugar a 12000 rpm 15 min, a 4 °C se conservó el *pellet* (fracción cuerpos de inclusión). Se centrifugó el sobrenadante a 45000 rpm 1 hora a 4 °C. En este último caso el *pellet* se corresponde con membranas totales y el sobrenadante con la fracción de proteínas citoplasmáticas solubles.

Todos los *pellets* fueron resuspendidos en Tris HCl 20 mM pH8, PMSF 1 mM.

### Electroforesis de proteínas

#### Geles desnaturizantes (SDS-PAGE)

Antes de sembrar las muestras se les agregó 1/2 volumen de Buffer de Crackeo 3X (CB) cuya composición se detalla más adelante. Se calentaron durante 10 minutos a 99 °C. Los marcadores de peso de molecular no preparados previamente, recibieron el mismo tratamiento previo con CB que las muestras.

Para electroforesis de proteínas en gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturizante (agregado de SDS), se empleó el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Tanto para el armado (polimerización) como para la 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 presulfato 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 requerida en cada gel .

Solución Madre	Gel de Resolución 15 %	Gel de apilamiento 5%
<b>H2O dd</b>	1,66 ml	2,89 ml
<b>Tris HCl</b>	1,25 ml de 1,5 M pH=8,8	1,25 ml de 0,5 M pH=6,8
<b>Acrilamida 30% (37,5:1)</b>	2 ml	0,833 ml
<b>SDS 20%</b>	25 µl	25 µl
<b>PSA 10%</b>	50 µl	50 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	5 µl
<b>Volumen Final</b>	5 ml	5 ml

Tabla 4. Reactivos y cantidades empleadas en la preparación de geles discontinuos desnaturizantes para electroforesis de proteínas.

**Buffer de corrida:** 25 mM Tris pH: 8,8, 200 mM glicina, 0,1 % SDS. Para preparar una solución madre 10X: 30.3 g Tris; 144 g glicina, 10 g SDS. Llevar a 1 l con agua.

**Buffer de Crackeo (CB) 3X:** 12 % SDS, 6 % β-mercaptoetanol, 30 % glicerol, 0,05 % azul de bromofenol, 150 mM Tris-Hcl pH = 7, 6 M urea.

#### Geles desnaturizantes con tricina

Con el objetivo de resolver con detalle proteínas de pequeño tamaño se llevaron a cabo electroforesis en gel discontinuo con tricina y SDS (desnaturizante) ya que mejora notablemente la resolución de proteínas con peso molecular menor a 100 kDa. El *buffer* de siembra utilizado fue el mismo que con los geles desnaturizantes tradicionales.

Solución Madre	Gel de Resolución 10 %	Gel de apilamiento
<b>H2O dd</b>	1,61 ml	1,92 ml
<b>Tris HCl</b>	1,25 ml de 3 M pH=8,45	0,77 ml de 0,41 M pH=7,5
<b>Acrilamida 30% (29,2:0,8)</b>	1 ml	0,25 ml
<b>Glicerol</b>	0,66 ml	---
<b>SDS 20%</b>	50 µl	30 µl
<b>PSA 10%</b>	50 µl	30 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	3 µl
<b>Volumen Final</b>	5 ml	5 ml

Tabla 5. Reactivos y cantidades empleadas en la preparación de geles discontinuos desnaturalizantes para electroforesis de proteínas realizados con tricina.

**Buffer de corrida anódico** 1 X: Tris-HCl 0.2 M pH 8.9 **Buffer de corrida catódico** 1 X: 0.1 M Tris, 0.1M Tricina, 0.1% SDS. No es necesario ajustar el pH

### **Tinción con Azul de Coomassie**

Los geles de poliacrilamida empleados en la electroforesis de proteínas se sumergieron en 50 ml de solución colorante y se incubó con agitación orbital 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3-5 lavados de entre 10-20 minutos cada uno con 40 ml de solución decolorante con agitación orbital a temperatura ambiente. Los geles fueron documentados fotográficamente y luego secados en el sistema BioRad a 80 °C constante y con vacío durante 60 minutos.

**Solución colorante:** Coomassie Brilliant Blue R250 0.1% (p/v), etanol 20%, ácido acético al 7%.

**Solución Decolorante:** Ácido acético al 7%

### **Transferencia a membrana de pvdf y ensayo de western blot**

Luego de realizada la separación del extracto proteico en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, se procedió a realizar la transferencia de las misma a una membrana de plovinilideno difluoruro (pvdf) y posteriormente se realizó un ensayo de *western blot*, con el objetivo de detectar a la proteína recombinante C5Ab-(His)<sub>6</sub>.

Para la transferencia se utilizó un sistema de transferencia semi-seco (Hoefer SemiPhor, Pharmacia Biotech). Primero se activó la membrana Hybond por inmersión en metanol y luego se enjuagó en buffer de transferencia (CAPS, metanol 10%). Después se procedió al armado del cassette en el siguiente orden: papel Watman 3MM, gel, membrana, papel Watman 3MM; el papel Watman fue previamente embebido en *buffer* de transferencia. Finalmente se conectó el



equipo a la fuente y se realizó la transferencia a 120 mA durante 45 minutos. Se verificó la transferencia de las proteínas tiñendo la membrana con una solución acuosa de Rojo ponceau que luego fue eluido con abundante agua.

**Buffer de transferencia:** 10 mM CAPS, 10 % metanol.

Para los ensayos de *western blot* se empleó el siguiente portocolo:

- I) Se llevó a cabo el bloqueo, para lo que se incubó la membrana con 50 ml de TBS 1X y leche descremada 5 % (p/v), durante toda la noche a 4 °C con agitación orbital
- II) Se incubó la membrana con el Anticuerpo Primario: anticuerpo monoclonal anti polihistidina producido en ratón(dilución 1/3000 en TBS 1X, leche 3 %, tween 0,05 %). 90 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital.
- III) Se realizaron tres lavados con TBS 1X, Tween 0,05 %, 10 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital.
- IV) Se incubó con el Anticuerpo Secundario contra IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y producido en conejo (dilución 1/3000 en TBS 1X, leche 3 %, tween 0,05 %). 60 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital.
- V) Se realizaron dos lavados con TBS 1X, Tween 0,05 % seguidos por tres lavados con TBS 1X (sin Tween). 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con agitación orbital.

Para el revelado incubó la membrana con buffer fosfatasa alcalina 5 minutos (15 ml). Primero se agregaron 60 µl de NBT (50 mg/ml), se agitó y luego agregaron 30 µl de BCIP (25mg/ml) sin dejar de agitar suavemente. Se incubó en oscuridad 5-15 minutos hasta la aparición del color y se frenó la reacción por enjuague con agua destilada.

### Purificación de la proteína C5Ab

La proteína C5Ab recombinante llevando el *tag* de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal fue expresada a partir del plásmido pET22b+-C5Ab tal como se explicara en un apartado anterior y luego fue purificada mediante una cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) en un sistema de incubación en *batch* en condiciones desnaturalizantes y elusión por centrifugación.

Se utilizó una columna pre empaquetada conteniendo resina de agarosa 6% entrecruzada cargada con níquel ácido nitriilotriacético (Thermo Scientific HisPur Ni-NTA Spin Column).

En la cromatografía se utilizaron los siguientes *buffers*:

-*Buffer* de Siembra: PBS, 5 M cloruro de guanidinio, 10 mM Imidazol, pH 7,4

-*Buffer* de Lavado: PBS, 6 M cloruro de guanidinio, 25 mM Imidazol, pH 7,4

-*Buffer* de Elusión: PBS, 6 M cloruro de guanidinio, 0,5 M Imidazol, pH 7,4

La fracción del extracto de células provenientes de la expresión de C5Ab recombinante insertada en la columna se corresponde con la obtenida en el sobrenadante de centrifugación a 12000 rpm, a la que se le agregó cloruro de guanidinio e imidazol hasta alcanzar las concentraciones indicadas para el *buffer* de siembra.

El procedimiento empleado para la purificación de proteínas portando el *tag* de histidina con las columnas mencionadas anteriormente, es el siguiente:

- 1) Se equilibró la columna con la temperatura de trabajo (temperatura ambiente) y se preparó el extracto con el *buffer* de siembra. Se tomó una alícuota que se denominó Fracción Extracto. Se eluyó el líquido de almacenamiento de la columna y se equilibró con *buffer* de siembra.
- 2) Se eluyó el *buffer* de siembra y se cargó la columna con el extracto. Se incubó durante 30 minutos con agitación suave a temperatura ambiente.

- 3) Se eluyó la columna por centrifugación. A la muestra colectada se la denominó Fracción Flow Through.
- 4) Se lavó la resina con dos volúmenes de *buffer* de lavado. Se repitió el procedimiento tres veces. A cada uno de los volúmenes de líquido colectados se los denominó Fracción de Lavado1, Lavado2 y Lavado3.
- 5) Luego se realizó la elusión de la proteína C5Ab recombinante por competencia con el imidazol, para lo que se agregaron 2 volúmenes de *buffer* de elusión. El procedimiento se repitió cuatro veces y a cada una de las fracciones se las denominó Eluato1, Eluato2, Eluato3 y Eluato4.

Las elusiones se realizaron por centrifugación a 700 g, 2 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras fueron dializadas contra 600 ml de PBS 1X a 4 °C durante 12 horas. Finalmente las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y tinción con azul de coomassie y *western blot*.

La determinación de la concentración de proteínas presente en la fracciones eluato se realizó por medición de la absorbancia a  $\lambda$  280 nm, utilizando como coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) el coeficiente teórico calculado para C5Ab recombinante en el programa ProtParam que resultó ser  $6990 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **Determinación de la funcionalidad de la subunidades ARN-catalítica (M1Ab) y proteica (C5Ab) de la ribozima P de *A. baumannii***

#### **Sustrato unimolecular**

Con el objetivo de determinar la capacidad de la subunidad M1Ab clonada y transcripta de llevar a cabo el corte simple endonucleolítico de una molécula blanco se empleó un sustrato natural unimolecular de la ribozima P: el pre-ARNt<sup>Tyr</sup>. Para esto se incubó 80 pmol de ARN pre-ARNt<sup>Tyr</sup> con 40 pmol de M1Ab en ausencia o presencia de 100 pmol de la subunidad C5 de *E. coli* ó 45 pmol de la subunidad C5 de *A. baumannii*; en un *buffer* compuesto por 20mM Hepes-KOH

(pH 8.0), 400mM acetato de amonio, 10mM acetato de magnesio y 5% glicerol, durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se frenó agregando un volumen de fenol:cloroformo seguido de una extracción con estas sustancias y una purificación por precipitación con etanol. Luego 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 3 minutos a 95 °C. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en TBS ó GTG durante 60 minutos a 110 V. Los geles revelados mediante tinción con una solución de bromuro de etidio y fotografiados luego ser expuestos a luz ultravioleta.

### **Sustrato bimolecular**

Se quiso determinar si la subunidad M1Ab clonada y transcripta es capaz de desencadenar el corte simple endonucleolítico de un sustrato bimolecular compuesto por un ARNm y un EGS. Para primero se realizó ensamble del sustrato: la coincubación de 40 pmol de ARNm *ftsZ* con 50 pmol de EGS en un volumen de 3 µl durante 10 minutos a 25 °C. Paralelamente se realizó el ensamble de la ARNasa P: se colocaron 40 pmol de ARN M1Ab y 100 pmol de proteína C5, 7 µl de un *buffer* compuesto por 20 mM 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*). Luego de incubar por 15 minutos a 37 °C se agregó esta mezcla enzimática a la del sustrato, resultando un sistema de reacción de volumen 10 µl que se incubó durante 90 minutos a 37° C. Luego se purificó la muestra con el protocolo de extracción con fenol-cloroformo seguido precipitación con etanol). Finalmente 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 3 minutos a 95 °C. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 6% GTG durante 120 minutos a 110 V.

### Ensayos de complementación heteróloga

Se trabajó con la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) T7A49 que posee una mutación puntual en la secuencia codificante de la subunidad ARN catalítica de la ribozima P (Guerrier-Takada, 1995). Esta cepa es una mutante condicional termosensible, ya que no crece a temperaturas restrictivas (por encima de los 42 °C). Esta cepa fue transformada con el plásmido pM1Ab, dando lugar a la cepa pFC276. A su vez se empleó como control la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) y la misma cepa transformada con el plásmido pM1Ab (cepa pFC276).

Todas las cepas fueron incubadas en simultáneo en las siguientes condiciones: 28 °C ó 43 °C con o sin agregado de IPTG a una concentración final de 0,1 mM. Para esto, cada cepa fue repicada en 2 ml de medio LB líquido y se incubó a la temperatura indicada con 200 rpm de agitación durante 24 horas. Cada tubo fue hecho por duplicado y cada experimento se repitió tres veces. Luego de la incubación se constató la presencia o no de turbidez en el medio y se determinó la densidad óptica a  $\lambda$  600 nm de cada cultivo. La significancia estadística se realizó mediante un ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunnett, se consideró  $P < 0,05$  estadísticamente significativo.

### Internalización de oligómeros

Para los ensayos de internalización se emplearon células de *E. coli* Top 10 se emplearon dos oligómeros isosecuenciales, pero con distinta composición química, conjugados al fluoróforo Alexa 488 : Alexa Fluor 488- CAAGTACTgttccACCA (fLNA/DNA) y Alexa Fluor 488-ODN (fODN).

Las células se cultivaron en medio rico LB durante 18 horas a 37 °C con agitación, hasta que llegaron a fase estacionaria. Luego se cosecharon, se lavaron con buffer PBS y se encubaron con fLNA/DNA o fODN en *buffer* PBS durante 30 minutos a 37 °C. Luego se lavaron con PBS y se incubaron con el colorante de membrana FM5-95 a una concentración final de 5  $\mu$ g/ml y luego se analizaron por citometría de flujo, en un citómetro BD o por microscopía confocal (LSCM) en un microscopio Zeiss Meta o Zeiss pascal. Los datos de citometría de flujo se analizaron mediante

el programa CellQues, se tomaron  $10^5$  eventos. La viabilidad de las células fue ensayada de igual manera, pero agregando yoduro de propidio en lugar del tratamiento con FM 5-95. Se realizaron siete repeticiones y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba t desapareada de dos colas con corrección de Welch.

### Oligómeros Utilizados

A continuación se encuentran listados los oligómeros empleados en el presente trabajo. Se detalla su secuencia y su composición, como así también el mensajero blanco.

Oligómero	Secuencia y Química*	Mensajero Blanco
EGSa1	AUAGUGAUCAGAGACCA	<i>ftsZ</i> 697–709
EGSa2	GAUAGUGAUCAGAGAACCA	<i>ftsZ</i> 696–710
EGSa1S	CTCTGATCACTATACCA	Control <i>sense</i>
EGSb1	CCGUUUCGAACUCACCA	<i>ftsZ</i> 1041–1053
EGSb1S	GAGUUCGAAACGGACCA	Control <i>sense</i>
EGSAP	AGGCATCTATACCACCA	Control dirigido a <i>PhoA</i>
EGSa1L	<u>ATAGTgatcagagACCA</u>	<i>ftsZ</i> 697–709
EGSa1SL	<u>CTCTGatcactatACCA</u>	Control <i>sense</i>
EGSb1L	<u>CCGTTtgaactcACCA</u>	<i>ftsZ</i> 1041–1053
EGSb1SL	<u>GAGTTcgaaacggACCA</u>	Control <i>sense</i>
EGSAPL	<u>AGGCAtctataccACCA</u>	Control dirigido a <i>PhoA</i>
EGSC3	CAAGUACUGUCCACCA	<i>aac(6)'-Ib</i>
EGSA2	CGATATGAGATCGACCA	<i>aac(6)'-Ib</i>
*Mayúsculas: ARN; Minúsculas: ADN; Subrayado: LNA		

Tabla 6. Listado de oligómeros utilizados en este trabajo. Se indica el nombre, la secuencia y la composición química.

# Resultados: Capítulo I

## Capítulo I: Tecnología EGS en *Escherichia coli*

### A) Diseño de EGSs contra el mensajero *ftsZ* y evaluación de su

#### actividad *in vitro*

##### Modelado de la estructura secundaria del ARN mensajero *ftsZ*

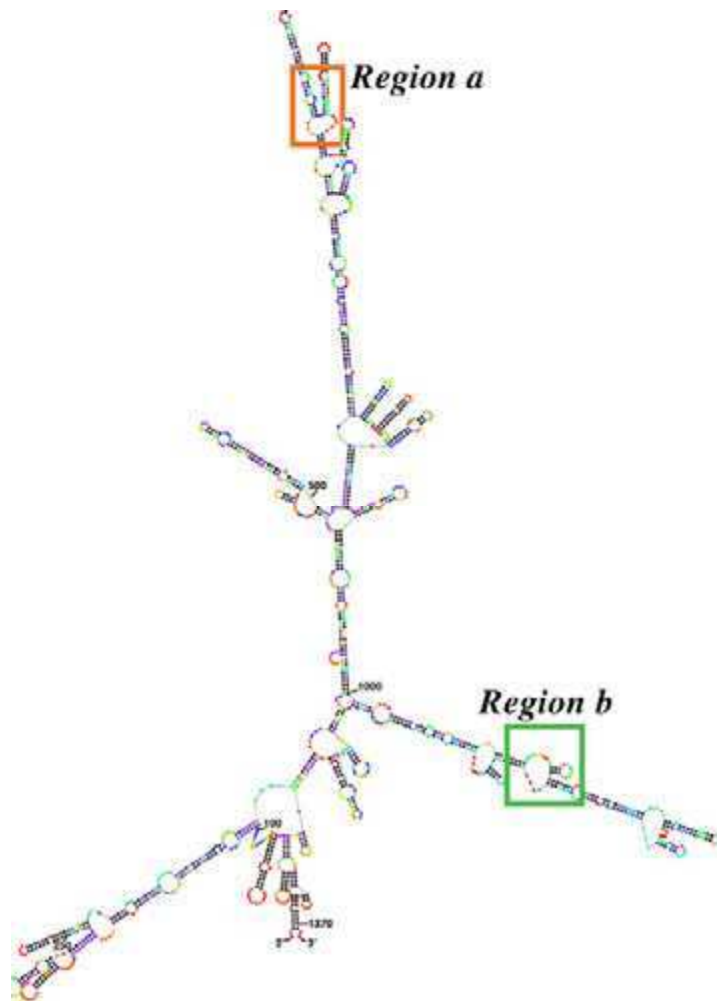
Es conocido que moléculas de ARN simple cadena, como por ejemplo un ARN mensajero, forman estructuras secundarias y terciarias a partir de las interacciones entre sus monómeros. Este tipo de arreglos espaciales, puede generar que determinadas zonas de un ARNm sean inaccesibles a moléculas antisentido, impidiendo su apareamiento. Es por esto que para inhibir la expresión de un gen a través del uso de la tecnología EGS es necesario conocer las regiones que se encuentran como simple cadena (ss) en el mensajero blanco, de manera de diseñar moléculas antisentido dirigidas hacia estas zonas.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis es inhibir la expresión del gen *ftsZ* a través del uso de tecnología EGS. Para ello, es necesario conocer las regiones simple cadena del mensajero blanco. Entonces, con el propósito de conocer la estructura secundaria del mensajero *ftsZ* se empleó el *Mfold web server 2.3* para plegamiento de ARN [115, 116] desarrollado por Michael Zuker que predice la estructura secundaria de un ARNm basándose en el principio de minimización de la energía libre (dG) total de la molécula y de cada par de nucleótidos que la componen. A su vez, también determina la probabilidad que posee cada uno de los nucleótidos integrantes del ARNm de estar como simple cadena.

Dado que el gen *ftsZ* posee múltiples sitios de inicio de la transcripción se analizó la secuencia correspondiente a la isoforma de ARNm que se encuentra en mayor proporción en el citoplasma de *E. coli* (95% de los transcriptos) y que cuenta con un total de 1373 nucleótidos [92]. Como puede observarse en la Figura 8 de la Introducción este transcripto incluye un segmento 3' del ARNm *ftsA* seguido por un segmento abajo de la totalidad de la secuencia *ftsZ*, ambos separados por una pequeña región no codificante.



A través del modelado *in silico* se obtuvieron 33 estructuras secundarias posibles del ARNm *ftsZ*. El esquema que genera el programa de la estructura energéticamente más favorecida de estas (la que posee menor energía libre de Gibbs) puede observarse en la Figura 14. Cada color representa la probabilidad de ese nucleótido de encontrarse como simple cadena, siendo rojo más probable y negro más improbable. La tabla con cada uno de los colores puede verse en la sección Materiales y métodos en la Figura 11.



señalaron dos de ellas que cuentan con nucleótidos con alta probabilidad de estar como simple.

A su vez para cada uno de los nucleótidos que conforma el mensajero *ftsZ* se determinó la frecuencia en la que se encuentran como simple cadena entre los 33 plegamientos posibles. Esto puede verse representado mediante un diagrama de puntos en la Figura 15.

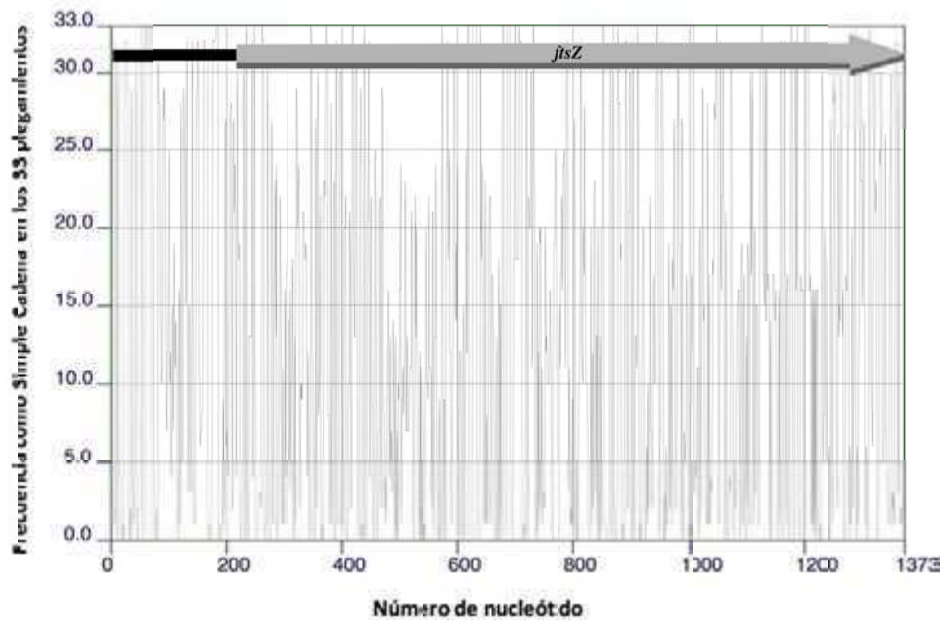


Figura 15. Diagrama de puntos que indica la frecuencia que posee cada nucleótido como simple cadena. Utilizando el programa *mfold webserver 2.3* se determinó la frecuencia con que un dado nucleótido se encuentra como simple cadena considerando las 33 posibles estructuras secundarias del mensajero de *ftsZ* con menor energía. En el eje X se indica a cada uno de los nucleótidos y en Y se grafica la cantidad de evento registrados en las que cada uno de ellos aparece como simple cadena. Para facilitar la interpretación, en la parte superior de la figura se colocó un esquema del mensajero *ftsZ* con la región codificante como una flecha gris y con la región 5' no codificante como una barra negra.

### Diseño de los EGSs a partir del mapeo de la estructura secundaria del ARNm *ftsZ*

Con el objetivo de encontrar una o más regiones del mensajero *ftsZ* a las cuales dirigir los EGSs, se examinaron las regiones de la zona codificante del ARNm. Para cada una se analizó la cantidad de nucleótidos involucrados en la formación del bucle y la probabilidad de que cada uno de ellos se encuentre como simple cadena. Esta última información se obtuvo del gráfico de plegamiento generado por el servidor *Mfold* en el cual cada nucleótido se representa con una esfera de un color diferente según la probabilidad de encontrarse como simple cadena (Figura 14 y Figura 11). En base a esto, las dos regiones seleccionadas para diseñar los EGSs antisentido fueron la región a comprendida entre los nucleótidos 690 y 710 y la región b que abarca los nucleótidos 1040 a 1070. Ambas regiones se encuentran señaladas en la Figura 14. El gráfico detallado de las mismas puede observarse en la Figura 16. Como se observa en estos gráficos, se diseñaron dos EGSs contra la región a (EGSa1 y EGSa2) y otro EGS contra la región b (EGSb1).

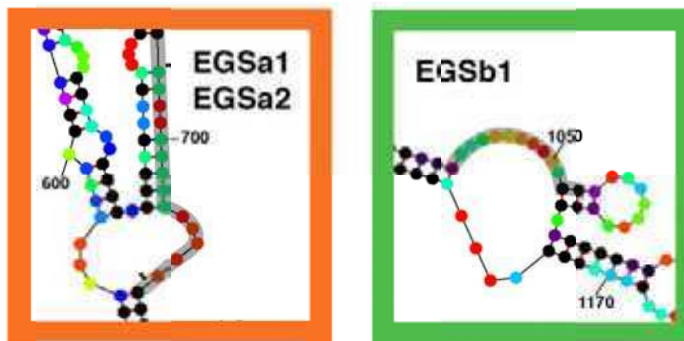


Figura 16. Detalle de la estructura secundaria de dos regiones del ARNm *ftsZ*. Puede observarse que cada nucleótido posee un color según la probabilidad de estar como simple cadena. Se muestran la Región a (izquierda) y la Región b (derecha), seleccionadas para dirigir los EGSs a1 y a2 y b respectivamente. En cada caso se indica con una línea sombreada las bases con las que se aparea el EGS.

## **B) Evaluación de la actividad de los EGSs compuestos por ARN contra el mensajero *ftsZ***

### **Evaluación de la actividad in vitro de los EGSs**

En la sección anterior se describió el procedimiento llevado a cabo mediante el cual se diseñaron las moléculas guía antisentido denominadas EGSs. El objetivo final de este enfoque experimental es obtener EGSs que sean capaces de disminuir la expresión del gen vital *ftsZ* en *E. coli* in vivo. Se conoce que la capacidad de los EGSs de unirse al mensajero blanco como así también de desencadenar su corte mediado por la ribozima P no es uniforme. Además, se observó que una actividad *in vitro* efectiva está directamente relacionada con una aceptable actividad in vivo [79]. Es por esto que en primer término se procedió a realizar ensayos con el fin de evaluar la actividad in vitro de los EGSs diseñados sobre el mensajero *ftsZ*. Estos ensayos fueron: medición de la capacidad de los EGSs de unirse al mensajero blanco y evaluación de la eficiencia de desencadenar el corte del ARNm mediado por la ribozima P.

### **Ensayos de unión al mensajero**

Con el objetivo de verificar la capacidad de unión de los EGSs al ARNm *ftsZ* se llevó a cabo un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA). El ensayo consiste en incubar el EGS marcado radioactivamente con el ARNm sin marcar y luego someter la mezcla a una electroforesis en condiciones nativas. En el caso que produzca una interacción EGS-mensajero la movilidad del EGS se vería retardada en el gel, respecto del EGS que se encuentra libre. Un esquema del ensayo puede observarse en la Figura 17.

El mensajero ARNm *ftsZ* se obtuvo mediante transcripción in vitro y los EGSs fueron marcados radiactivamente, en ambos casos siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos.

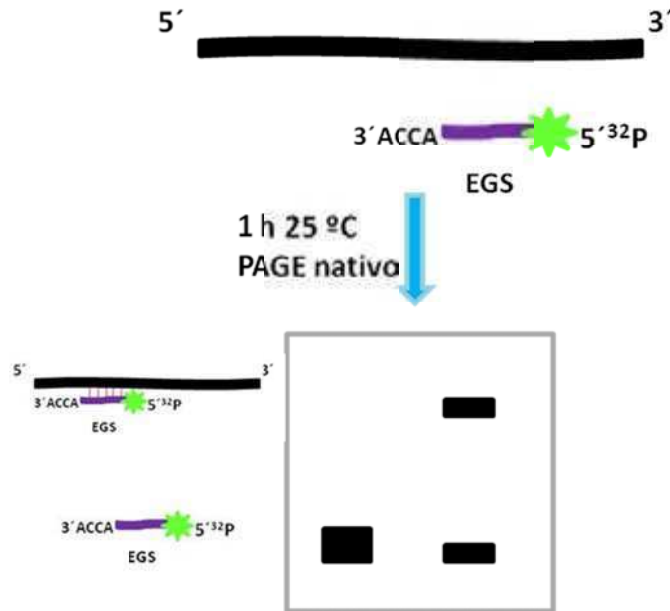


Figura 17. Esquema de un ensayo de determinación capacidad de unión de un EGS a un ARNm. El mismo se lleva a cabo evaluando el cambio de movilidad electroforética (EMSA) del EGS marcado en presencia del mensajero. Si el EGS interactúa con el mensajero, la movilidad del EGS se ve retrasada (calle de la derecha); si no hay interacción la movilidad del EGS no se ve afectada (calle de la izquierda).

Oligómero	Secuencia	Mensajero Blanco
EGSa1	AUAGUGAUCAGAGACCA	<i>ftsZ</i> 697–709
EGSa2	GAUAGUGAUCAGAGAACCA	<i>ftsZ</i> 696–710
EGSb1	CCGUUUCGAACUCACCA	<i>ftsZ</i> 1041–1053
EGSAP	AGGCATCTATACCACCA	Control dirigido a <i>PhoA</i>

Tabla 7. EGS de ARN utilizados en los ensayos de evaluación de la actividad in vitro de los EGSs.

Para el ensayo se incubó una cantidad fija (10 pmol) de EGS marcado radiativamente con  $^{32}\text{P}$  en 5' con cantidades crecientes de mensajero *ftsZ* (0; 0,6; 6; 60 y 300 ng) durante una hora a 25 °C. Luego se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 6% TBE no desnaturizante. Los EGSs ensayados fueron:

EGSa1, EGSa2 y el EGSAP complementario al gen de la fosfatasa alcalina como control negativo, ya que se esperaba no se uniera al mensajero *ftsZ*.

Los resultados de la Figura 18 indican que tanto los EGSs dirigidos contra la región a como el dirigido contra la región b poseen capacidad de unión al mensajero blanco, indicando que ambas regiones del ARNm son accesibles a los EGSs diseñados. Por otro lado, la diferencia de longitud de nucleótidos entre el EGSa1 y EGSa2 no parece tener un efecto considerable sobre la capacidad de unión al mensajero. Finalmente, tal cual lo esperado, el EGS AP que se incluyó como control negativo no mostró unión al ARNm *ftsZ*.

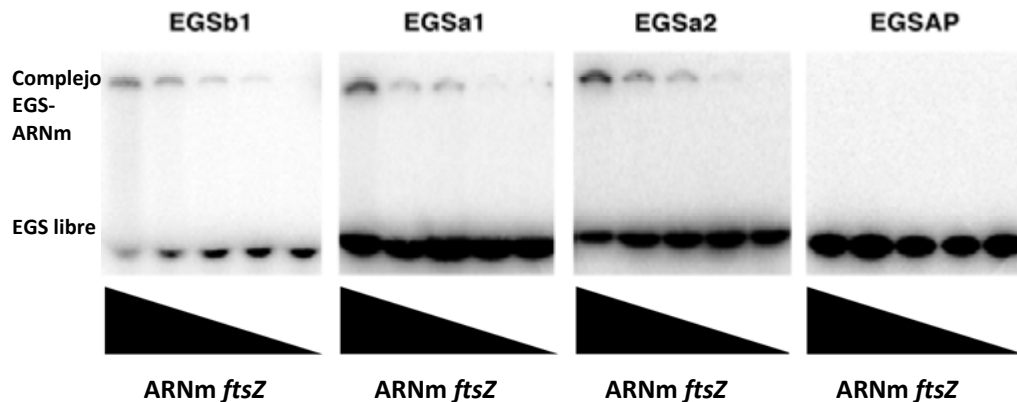


Figura 18. Evaluación de la actividad in vitro de los EGSs. Unión de los EGS al ARNm *ftsZ*. Los oligorribonucleótidos fueron marcados en su extremo 5', mezclados con diferentes cantidades de mensajero (de izquierda a derecha 0, 1, 10, 100 ó 500 ng) y analizados por electroforesis nativa en poliacrilamida 6%.

#### **Evaluación de la actividad de los EGSs diseñados: capacidad de inducir el corte del ARNm *ftsZ* in vitro en presencia de la ARNasa P**

Se determinó la capacidad de los EGSs diseñados de inducir la reacción de corte del mensajero *ftsZ* mediado por la ARNasa P. Para evaluar esta actividad, se incubó el ARNm *ftsZ* marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5' con los EGSs complementarios a las regiones a y b sin marcar. Los detalles de las condiciones de reacción se encuentran en la sección Materiales y Métodos [119].

Para la reacción en presencia del EGSa1 se predice que el producto de corte por ARNasa P es un fragmento marcado radiactivamente de 696 nucleótidos y otro sin marca de 678 que no se detectaría. Mientras que cuando la reacción se realiza en presencia del EGSb1 se espera que el producto conteniendo el extremo 5' marcado tenga 1041 nucleótidos y el restante 333 nucleótidos. La presencia de los fragmentos 5' marcados se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida 6% GTG y posterior revelado mediante sistema *Phosphoimager*. El procedimiento experimental y los resultados esperados se esquematizan en la Figura 19.

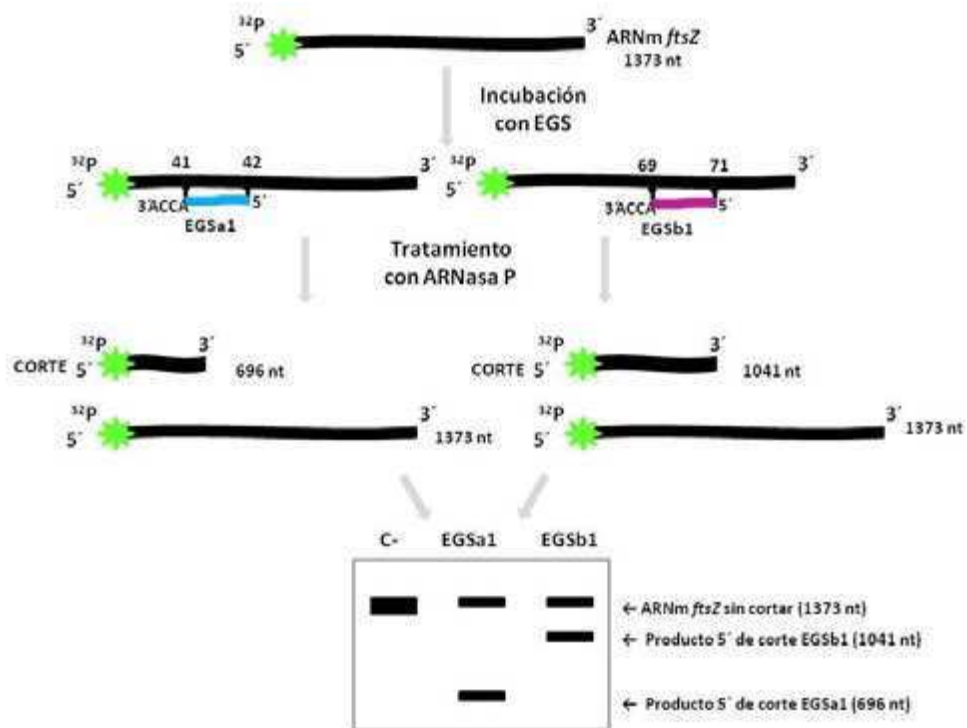


Figura 19. Esquema de los resultados esperados en el ensayo de actividad de los EGSs diseñados (capacidad de inducir el corte del ARNm *ftsZ* in vitro en presencia de la ARNasa P).

Los resultados que se muestran en la Figura 20 indican que los EGSs compuestos por ARN y diseñados los EGSs compuestos ARN diseñados para aparearse con las regiones a y b del mensajero (señaladas en la Figura 17) son capaces de desencadenar el corte del mismo en presencia de la ribozima P.

En la calle donde le mensajero fue tratado con el EGSb1 se observa una banda de aproximadamente 1050 nt, consistente con el tamaño esperado para el producto de corte (1041 nucleótidos de longitud). En el caso de los EGSs complementarios a la región a del mensajero, EGSa1 y EGSa2, se observa una banda de aproximadamente 700 nucleótidos, siendo esto consistente con lo predicho (696 y 697 nucleótidos, respectivamente). En la calle donde no se agregó EGS pero sí ARNasa P y en la calle correspondiente a la reacción donde la ARNasa P no estuvo presente pero sí hubo un EGS no se observa presencia de producto de corte alguno. Esto indica que estos EGSs ensayados tienen la capacidad de desencadenar el corte del mensajero *ftsZ* de manera dependiente de la presencia de la ribozima P y que, por lo tanto, son candidatos a ser probados en ensayos in vivo.

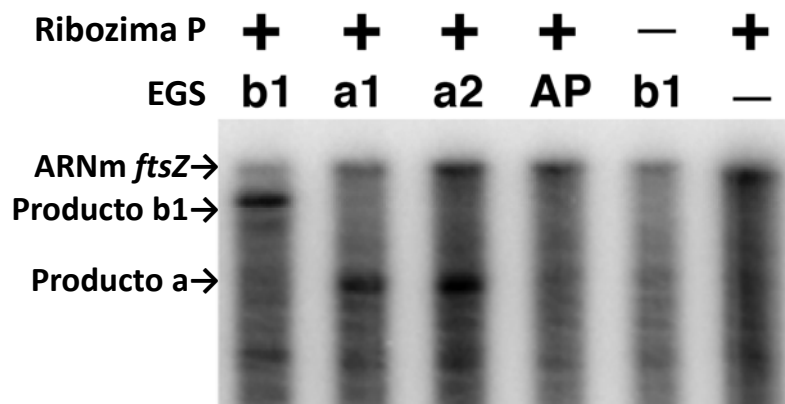


Figura 20. Ensayo actividad in vitro de los EGSs. Capacidad de inducir el corte del mensajero *ftsZ* en presencia de la ARNasa P. Se ensayaron los EGSs complementarios a las regiones a y b. En la calle correspondiente a los EGSs dirigidos a la región 1 se observa la presencia de una banda radiactiva de aproximadamente 700 nt, indicando que estos EGSs son capaces de activar el corte del mensajero por parte de la ARNasa P. Para el EGSb1 se observa un producto de corte de unos 1050 nt (para ser consistente con el texto), de tamaño acorde al esperado. Electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.



**Evaluación de la actividad in vivo de los EGSs ARN contra el ARNm de *ftsZ*.**

Para evaluar el efecto in vivo de los EGSs diseñados contra el mensajero *ftsZ* se seleccionó el EGSb1. Para lo que se generó un plásmido recombinante en base al vector pUC57 (de alto número de copia y cuyo marcador de selección es la resistencia a la ampicilina) con un inserto que incluye al promotor T7 seguido de la región codificante del EGSb1, la secuencia ACCA -necesaria para el reconocimiento del sustrato por parte de la ARNasa P- y la secuencia correspondiente a la ribozima cabeza de martillo. Esta secuencia es la requerida para generar una ribozima cabeza de martillo de manera tal de obtener un extremo 3' correcto para el EGSb1 transcripto por un corte en *cis* dado por la ribozima cabeza de martillo [74] [80] a este plásmido se lo denominó pEGSb1. Como control se empleó un plásmido con la misma construcción pero con la secuencia *sense* del EGSb1 al que se denominó pEGSb1S. El esquema del constructo se muestra en la Figura 12 de la sección Materiales y Métodos.

Células *E. coli* BL21(DE3)(pLysS) competentes fueron transformadas con pEGSb1 o con pEGSb1S (control). Esta cepa contiene en su cromosoma el gen que codifica para la T7 ARN polimerasa bajo el promotor pLac. Con el objetivo de inducir la transcripción de la T7 ARN-pol se agregó IPTG a los cultivos en fase exponencial (DO a  $\lambda=600$  nm de 0,2), se incubaron por 90 minutos y luego fueron analizados por microscopía óptica tradicional y microscopía confocal. También se determinó la viabilidad celular mediante un recuento en placa tal como se detalla en Materiales y Métodos.

En las imágenes de microscopía se puede observar la constante aparición de filamentos en las células que llevan el plásmido PEGSb1 con respecto a las que llevan el plásmido control (pEGSb1S), lo que indica un claro efecto de elongación celular mediado por el EGSb1 en las células (Figura 21 A). Por otra parte, al teñir las células con el colorante de membrana FM5-95 y observar los filamentos mediante microscopía confocal no se evidencia la presencia de septos, sugiriendo

que son células individuales y que la presencia del EGSb1 estaría alterando la normal división e las mismas (Figura 21 B).

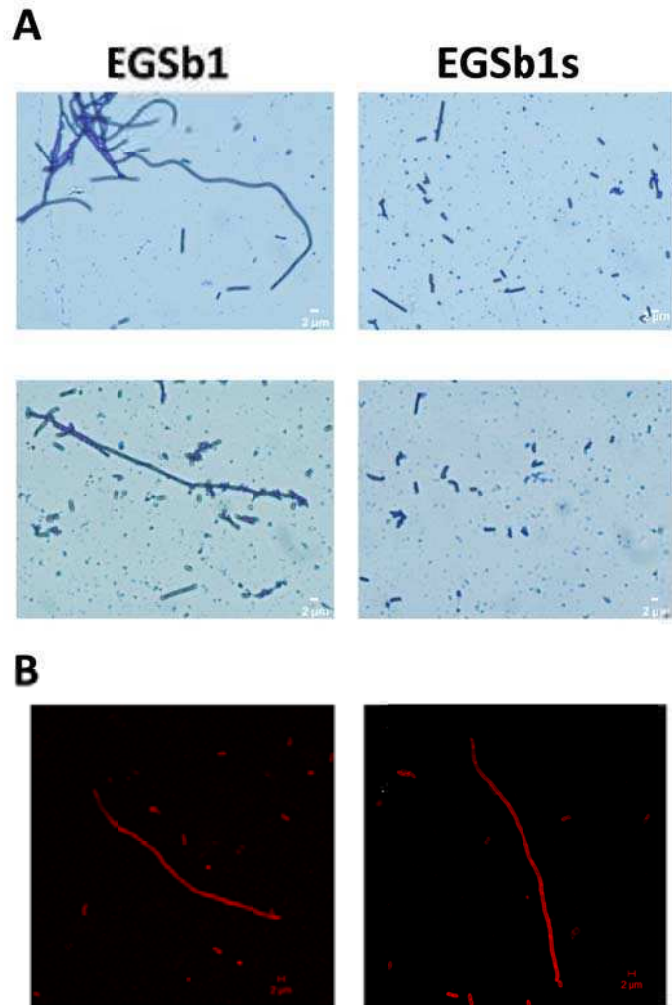


Figura 21. Efecto del EGSb1 en la división y en la viabilidad celular. **A.** El inductor IPTG (1 mM) fue agregado a cultivos de *E. coli* BL21(DE3)(pLysS) que contiene el plásmido recombinante pEGSb1 o pEGSb1S cuando la  $OD_{600}$  alcanzó 0,2. Las células bacterianas se incubaron con el inductor por 60 minutos, fijadas con calor, teñidas con cristal violeta y observadas al microscopio de transmisión (aumento 1000x). **B.** Células teñidas con el colorante de membrana FM5-95 y examinadas por microscopía confocal.

Finalmente se determinó la cantidad de Unidad Formadoras de Colonia por ml (UFC/ml) para ambos cultivos de *E. coli* BL21(DE3)(pLysS) transformadas con pEGSb1 o pEGSb1S, luego de la inducción con IPTG. Tal como se muestra en la

Figura 22 se observó una reducción significativa de las CFU/ml en las células que producen el EGSb1 con respecto a las que llevan el EGS control (ESGb1S). El análisis se realizó mediante una prueba t desapareada de dos colas,  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

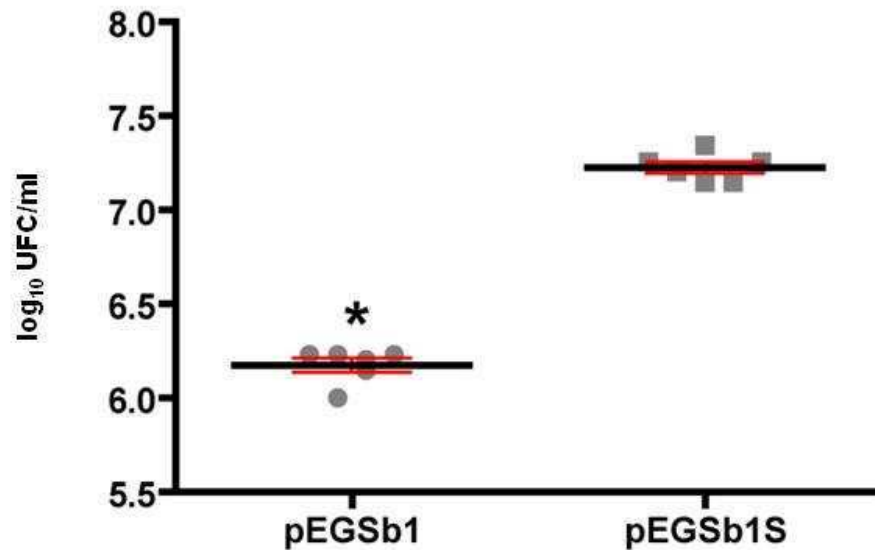


Figura 22. Efecto de la expresión del EGSb1 o EGSb1Sense en la viabilidad celular. Los resultados se expresan como log<sub>10</sub> de la media de UFC/ml  $\pm$ SD. Resultados similares fueron observados en 3 experimentos independientes. \* $P < 0,01$ .

Los resultados descritos en las Figuras 21 y 22 confirman que el EGSb1 (compuesto por ARN) expresado desde un plásmido en el citoplasma bacteriano posee un efecto negativo para la supervivencia de las células que lo portan, debido probablemente a una inhibición en la división celular.

### C) Evaluación de la actividad de los EGSs compuestos por análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables por nucleasas contra el mensajero *ftsZ*

En este apartado se describen ensayos de funcionalidad efectuados empleando EGSs no hidrolizables por nucleasas bacterianas. Estos EGSs están compuestos por una combinación de ADN y un análogo de ácido nucleico: LNA (del inglés *Locked Nucleic Acid*, o ácido nucleico bloqueado). En la Figura 23 puede observarse una representación de la estructura química de monómeros de LNA, ADN y ARN.

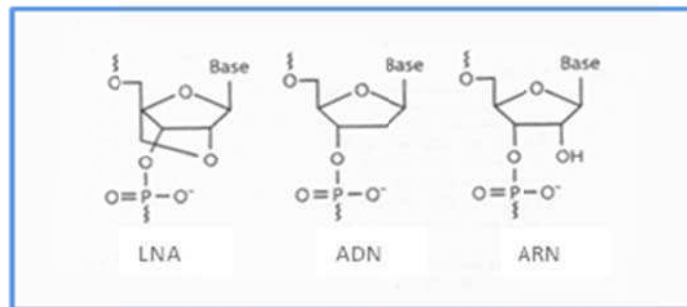


Figura 23. Esquema de la estructura química de monómeros de LNA, ADN y ARN, los tres forman parte de llos EGSs empleados en este trabajo.

#### Diseño de EGSs no hidrolizables por nucleasas bacterianas. Ensayos de actividad ARNasa P: efecto *in vitro* de los EGSs sobre el ARNm *ftsZ*

Se diseñaron EGSs isosecuenciales a los EGSs compuestos por ARN y cuya funcionalidad se demostró anteriormente (EGSb1 y EGSa2), pero con la siguiente configuración (de 5' a 3'): 5 nucleótidos de LNA seguido por 8 nucleótidos de ADN seguido por 4 nucleótidos de LNA. La elección de esta configuración se basó en observaciones obtenidas con anterioridad en nuestro laboratorio que indicaban que esta configuración es la que genera una mayor eficiencia de corte de mensajero *in vitro*. En la Tabla 8 se encuentran los EGSs diseñados, su secuencia y su composición química.

EGS	Secuencia	Región en el ARNm <i>ftsZ</i>
EGSb1L	<u>CCGTT</u> cgaactc <u>ACCA</u>	1041 - 1053
EGSb1SL	<u>GAGTT</u> cgaaacgg <u>ACCA</u>	No aplica (control)
EGSa1L	<u>ATAGT</u> gatcagag <u>ACCA</u>	697–709
EGSa1SL	<u>CTCTG</u> atcactat <u>ACCA</u>	No aplica (control)
EGSAPL	<u>AGGCA</u> tctatacc <u>ACCA</u>	No aplica (control)

Tabla 8. EGSs dirigidos al ARNm *ftsZ*: secuencia y región blanco. EGSAPL está dirigido contra el gen *phoA*. EGSb1SL tiene la secuencia complementaria al EGSb1L. EGSa1SL tiene la secuencia complementaria al EGSa1L Mayúsculas subrayado: LNA (*Locked Nucleic Acids*). En minúsculas: ADN.

**Evaluación de la actividad de los EGSs compuestos por ADN/LNA diseñados: capacidad de inducir el corte del ARNm *ftsZ* in vitro en presencia de la ARNasa P**

Posteriormente se ensayó la capacidad de los EGSs compuestos por LNA/DNA de desencadenar el corte endonucleolítico del mensajero *ftsZ* mediado por la ARNasa P, in vitro. Para esto, se incubó el EGSb1L ó el EGSa1L junto con el ARNm marcado radiactivamente y los componentes de la Ribozima P durante 90 minutos a 37 °C. Tanto el RNA M1 como la proteína C5 fueron generados en el laboratorio ya que no se encuentran comercialmente disponibles. . Luego se detuvo la reacción por tal como se indicó en Materiales y Métodos, se purificó el ARNm y se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, revelándose el gel mediante el sistema *Phosphoimager*.

En la Figura 24 puede observarse el desencadenamiento del corte del mensajero *ftsZ* en presencia de tres concentraciones diferentes de EGSb1L (0,05; 0,5 y 5  $\mu$ M), se detecta un banda radioactiva de unos 1050 nucleótidos de acuerdo a lo predicho También se observa que a concentraciones mayores, la presencia de EGSb1L induce además la aparición de una banda adicional de unos 750 nts,

sugiriendo que dicho EGS procesa al mensajero en una locación diferente de la posición esperada en el blanco. Este fenómeno fue observado anteriormente y podría producirse como consecuencia de la unión del EGS compuesto por ADN y LNA a una región alternativa del ARNm debido a un incremento en la afinidad del compuesto *antisense* por la presencia de monómeros de LNA en el mismo [120]. Una región que presente una estructura tridimensional del ARNm similar a la que corresponde a la secuencia blanco, aunque no sea perfectamente complementaria y una alta termoestabilidad del complejo LNA/DNA y el ARN del mensajero pueden resultar en una interacción productiva. Tal cual lo esperado, los controles negativos (EGSb1sL, ESGAPL, y EGSb1L sin enzima) no indujeron la degradación del mensajero *ftsZ*. Mientras que el control positivo, tratamiento con EGSb1, resultó en el corte del mensajero en la posición esperada.

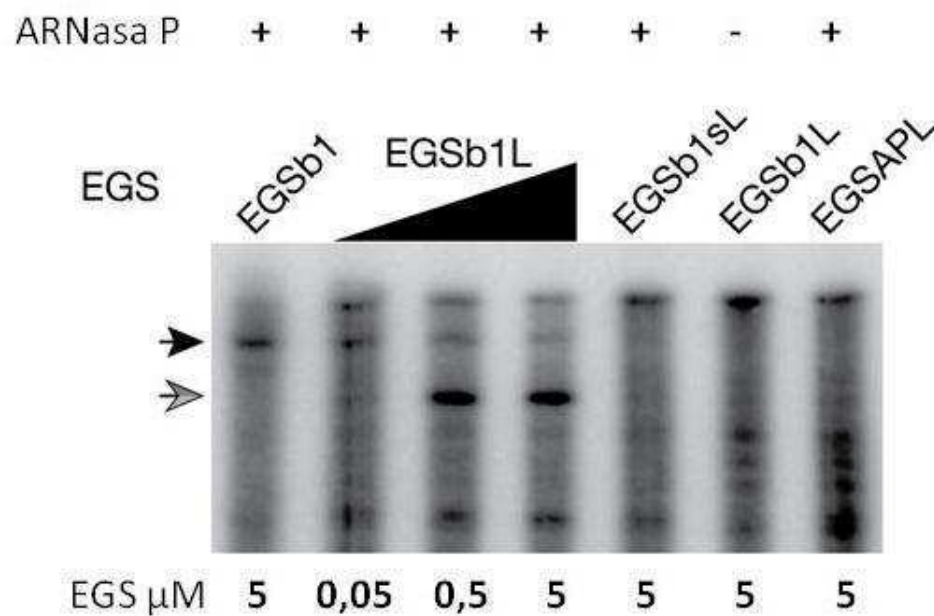


Figura 24. Corte del ARNm *ftsZ* mediado por la ARNasa P en presencia del EGS<sub>LNA/DNA</sub> EGSb1L. Los componentes de la ARNasa P (ARN M1 y proteína C5) fueron preincubados 15 min a 37 °C y el mensajero -marcado con <sup>32</sup>P en el extremo 5' junto con el EGS<sub>LNA/DNA</sub> fueron también preincubados a 25 °C por 15 min. Luego, ambas soluciones fueron mezcladas e incubadas 90 minutos a 37 °C. La reacción se frenó y se analizó en poliacrilamida 6% en condiciones desnaturantes (urea 7 M).

En la Figura 25 se muestra el ensayo de corte del mensajero *ftsZ* en presencia de cantidades crecientes de EGSa1L. Nótese que el aumento en la concentración del compuesto antisense no desencadena un aumento considerable en la cantidad de ARNm cortado. Los controles negativos (EGSb1L, EGSAP y ausencia de ribozima) no produjeron el corte del mensajero, acorde a lo esperado.

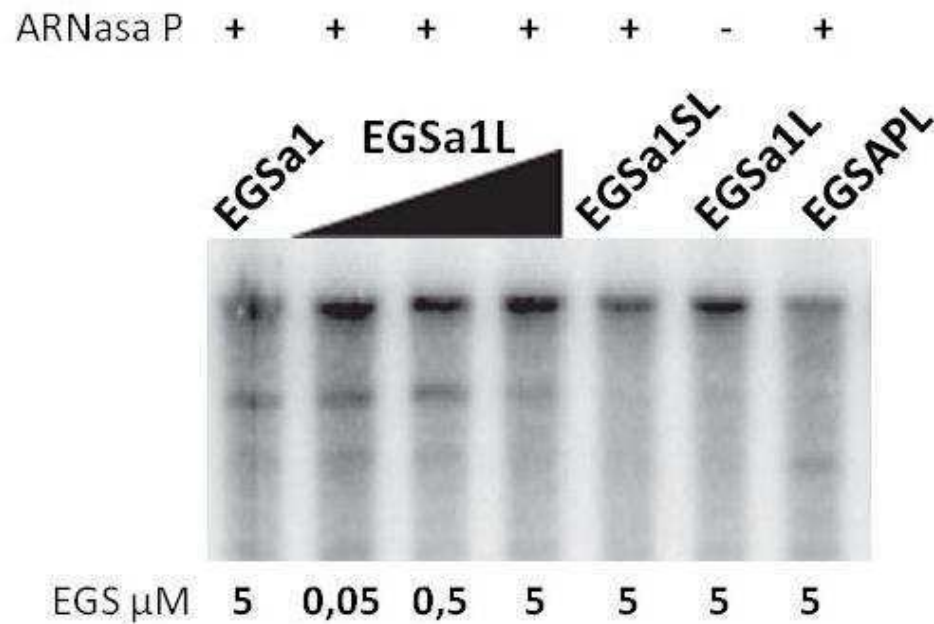


Figura 24. Corte del ARNm *ftsZ* mediado por la ARNasa P en presencia del EGSa1L. Se emplearon cantidades crecientes de EGSb1L (0,05; 0,5 y 5  $\mu$ M). Reacción analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en condiciones desnaturalizantes (urea 7 M).

#### Evaluación de la actividad in vivo de los EGSs compuestos por LNA/ADN

En este apartado se describen ensayos de funcionalidad in vivo de los EGSs antes descritos, basados en una estrategia de *delivery* diferente a la empleada anteriormente y que consiste en la administración exógena del EGS compuesto por ADN y el análogo de ácidos nucleicos y LNA. Dado que estos EGSs son resistentes a nucleasas bacterianas es posible administrarlos exógenamente a un cultivo bacteriano. Por otro lado se utilizó la cepa *E. coli* AS19 que es hiperpermeable a compuestos de diferente estructura química. Como ya se

mencionó en la introducción, uno de los principales desafíos para la utilización de EGSs como mecanismo de inhibición de genes bacterianos mediante tecnología antisentido es el éxito en el diseño de estrategias que permitan que dichos compuestos atraviesen la envoltura bacteriana que suele ser refractaria a un amplio rango de compuestos químicos.

Se ensayó la actividad in vivo del EGSb1L con el objetivo de verificar si este compuesto posee actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano. Tal como se mencionó, se empleó la cepa AS19 de *Escherichia coli*, cuya capacidad de internalizar oligonucleótidos híbridos de LNA/ADN fue demostrada previamente [81]. El protocolo se encuentra detallado en la sección de materiales

Para la viabilidad de la cepa AS19 luego del tratamiento, diluciones seriadas de los cultivos fueron sembradas en placas de LB e incubadas a 37 °C durante 16 horas. Luego se procedió al recuento de UFC. Los experimento fueron realizados por triplicado y los resultados se expresan como la media (UFC/ml) ± SD. La significancia estadística fue analizada mediante ANOVA de un factor y la prueba de Dunnette de comparación múltiple.  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los resultados pueden observarse en la Figura 26.



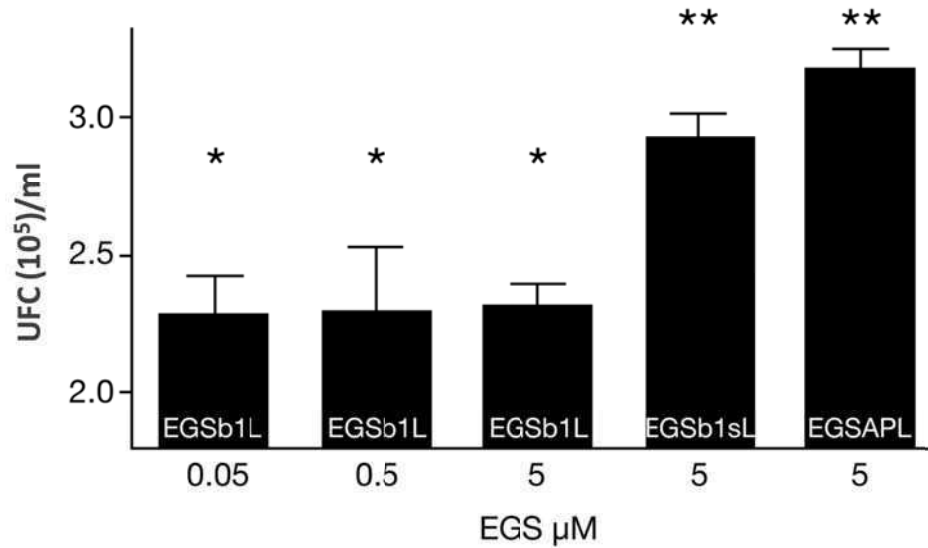
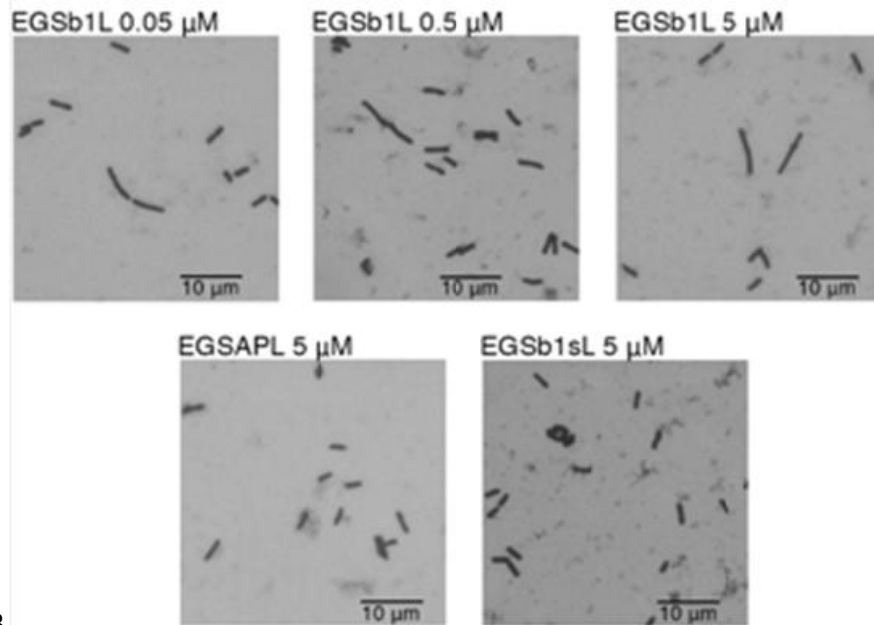


Figura 26. Viabilidad celular luego del tratamiento con EGSs. Células de *E. coli* AS19 fueron tratadas con tres concentraciones diferentes del EGSb1L tal como se indica en el texto. También se efectuaron tratamientos con EGSb1sL y EGSAPL. Las barras con un asterisco presentan diferencias significativas con aquellas que poseen dos asteriscos ( $P < 0,05$ ).

Con el fin de evaluar si el EGS LNA/ADN dirigido contra el mensajero del gen *ftsZ* produce un efecto fenotípico asociado a la división celular se evaluó la longitud de las células en presencia y ausencia del EGS por microscopía. Luego de la incubación de *E. coli* AS19 con los compuestos las células fueron teñidas con cristal violeta y examinadas por microscopía óptica convencional (aumento 1000X). Las medidas fueron obtenidas con el software Image J y la significancia estadística fue analizada mediante Kluskal-Wallis. La prueba de comparación múltiple de Dunn ( $n=50$ ).  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los resultados se muestran en la Figura 27.

A



B

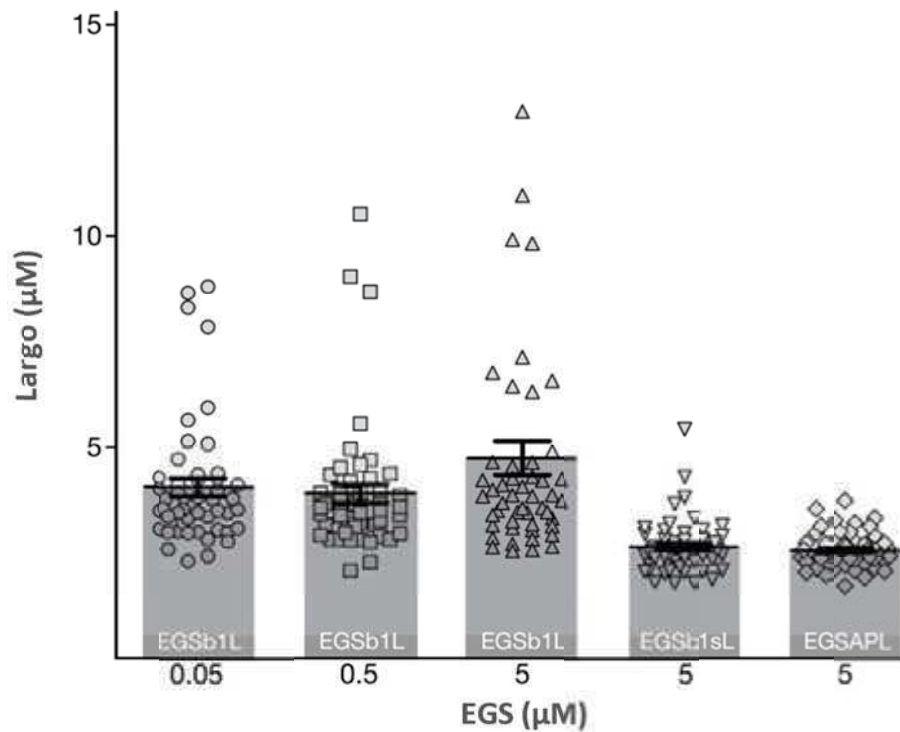


Figura 27. Morfología y longitud celular. **A.** Microfotografías de *E. coli* AS19 con los distintos tratamientos (Zeiss Axioplan. Aumento: 1000X). **B.** Medición del largo celular con el software Image J. El largo de las células tratadas con el EGSb1L a distintas concentraciones difiere significativamente del largo de las células tratadas con el EGSb1sL o con el EGSAPL ( $P < 0,005$ ).

Como puede observarse en la Figura 26 concentraciones tan bajas como 50 nM producen un efecto tóxico que se evidencia por la reducción significativa en el recuento de UFC en los cultivos tratados con el EGSb1L respecto de aquellos tratados con los EGS control (b1SL y APL). Asimismo, con respecto al largo de esas células en cultivo se observó que en presencia del EGSb1L una proporción significativa de las células presentó una longitud mayor comparadas con las células bacterianas de los experimentos control, en los cuales las bacterias se cultivan en presencia de un EGS *sense* o dirigido contra un ARNm no relacionado (Figura 27). Es llamativa la dispersión que se observa en la medida de la longitud celular en las tratadas con EGSb1L -y que no se evidencia en las tratadas con los EGSs control-. Esta dispersión en los datos podría deberse a la existencia de subpoblaciones dentro del cultivo con mayor susceptibilidad al tratamiento que otras. Algunas de las posibles causas podrían ser: una mayor permeabilidad a los compuestos empleados, menor capacidad de expulsar los mismos del interior celular, o bien que la subpoblación menos susceptible haya evolucionado adquiriendo algún tipo de resistencia al compuesto *antisense*, ya sea por la adquisición de mecanismos que induzcan menor permeabilidad, eflujo o por mutación del sitio blanco.

Estos resultados indican que la presencia del EGSb1L formado por un híbrido de LNA/DNA no hidrolizable por nucleasas bacterianas dirigido contra *ftsZ*, cuando es agregado al medio de cultivo, genera una reducción en la viabilidad celular probablemente debida a una alteración del proceso de división celular.

## D) Internalización de oligómeros en *Escherichia coli*

La internalización de oligonucleótidos resistentes a nucleasas es uno de los obstáculos que aún no ha podido ser superado en la aplicación terapéutica de tecnologías antisentido en sistemas procariotas. A pesar que se han realizado avances en la internalización de PNAs (*Peptide Nucleic Acids*) y oligómeros de morfolino fosforodiamidato conjugándolos a péptidos permeabilizantes [49, 51, 55, 95, 96, 121], aún no se han desarrollado estrategias biotecnológicas que permitan que oligonucleótidos cargados negativamente accedan al interior celular.

Se ha demostrado en esta tesis que los oligómeros conformados por ADN y LNA que funcionan como secuencias guía de la ribozima P, son compuestos prometedores como antimicrobianos o en combinación con antibióticos tradicionales [81]. Sin embargo, es necesario encontrar estrategias que permitan su *delivery* al interior de las células procariotas. Por su parte, recientemente se ha reportado la internalización de oligómeros LNA en células eucariotas sin el uso de agentes transfectantes. A este proceso se lo ha denominado gimnosis [122, 123].

Para evaluar si oligómeros compuestos por ADN y LNA pueden ser internalizados por células de *E. coli*, se emplearon dos abordajes complementarios: citometría de flujo y microscopía confocal. Se conjugó un oligómero de LNA y DNA con el fluoróforo Alexa Fluo 488, dando lugar al fLNA/DNA, derivado fluorescente que fué incubado con células de *E. coli* tal como se describe en la sección Materiales y Métodos. También se empleó un oligómero de ADN conjugado con Alexa Fluo 488, el fODN. El porcentaje de células asociadas al oligómero fluorescente fue determinado por citometría de flujo. En la Figura 28 se muestra un diagrama de puntos y un histograma típicos [124].

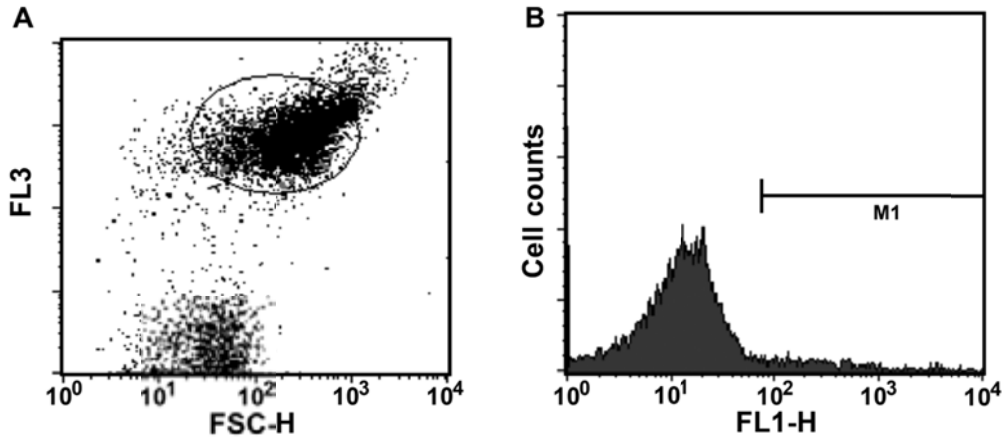


Figura 28. Citometría de flujo de la internalización del oligómero fLNA/DNA. **A.** Diagrama de puntos representando la luz dispersada hacia adelante (FSC-H) en función de la fluorescencia emitida por el FM5-95 (FL3 canal rojo). Las células analizadas son las que se encuentran en el interior del ovalo. **B.** Histograma que muestra el número de células contadas en función de la fluorescencia del fLNA/DNA (FL1-H). M1, el área que representa el porcentaje de células asociadas a Alexa Fluor 488.

Se realizaron siete repeticiones independientes con el fLNA/DNA y se llevaron a cabo seis repeticiones con el fODN. En la Figura 29 se muestra la cuantificación del porcentaje de células asociadas al fluoróforo. Mientras que es claro que la cantidad de células asociadas al fODN es prácticamente nula, en el caso de las células tratadas con el fLNA/ODN, el  $13,96 \pm 5,12$  % se encontraron asociadas al oligómero.

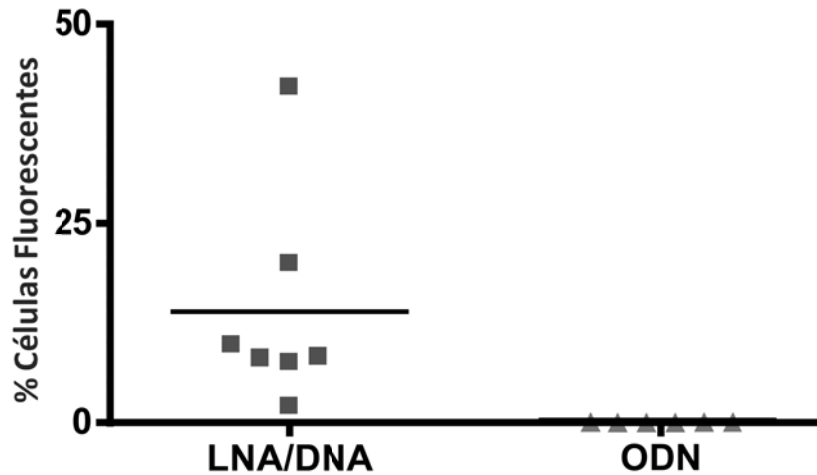


Figura 29. Cuantificación de las células de *E. coli* asociadas a oligómeros fluorescentes. Comparación del porcentaje de células fluorescentes en los cultivos tratados con fLNA/DNA ó con fODN. La media se indica con una barra horizontal y los valores son  $13,96 \pm 5,12$  para el fLNA/DNA y  $0,05 \pm 0,01$  para fODN. Prueba t desapareada de dos colas con corrección de Welch otorgó un valor P de 0.0349,  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

La citometría de flujo constituye una herramienta muy útil debido a la robustez de la información que aporta ya que permite adquirir una gran cantidad de datos en escaso tiempo. Sin embargo, en este caso sólo informa la colocalización de las células con la fluorescencia proveniente del oligómero, pero poco aporta acerca de la localización subcelular del fLNA/DNA. Con el objetivo de determinar si las moléculas de fLNA/DNA penetraron la pared bacteriana y llegaron al citoplasma, o si, alternativamente, permanecieron en el espacio periplásmico o simplemente quedaron asociadas a la cápsula exterior, las células fueron examinadas mediante microscopía confocal. En la Figura 30 se pueden observar imágenes de la localización del oligómero asociado a las bacterias. En las mismas se puede observar que en aquellas células en las que se logra detectar al oligómero fluorescente, éste se encuentra localizado en el citoplasma bacteriano.

Los resultados mostrados indican que el oligómero híbrido formado por LNA/DNA puede ser internalizado en el interior bacteriano y que la cantidad de fluorescencia asociada a este oligómero dentro de las células bacterianas fue tres

órdenes de magnitud mayor que la fluorescencia correspondiente al control de oligómero de ADN (ODN) (Figura 29).

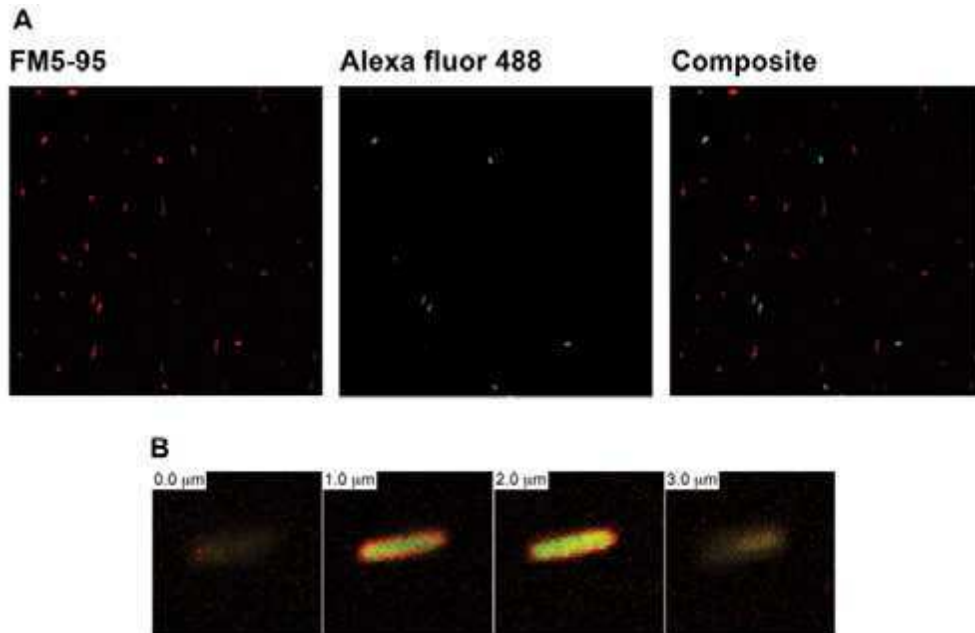


Figura 30. Internalización de fLNA/DNA en células de *Escherichia coli*. **A.** Células en fase estacionaria fueron incubadas con el oligómero fluorescente, teñidas con FM5-95 y analizadas mediante microscopía confocal. **B.** Apilamiento de imágenes en el plano z donde se detalla una célula tipo con fLNA/DNA internalizado.

Se desconoce el mecanismo por el cual el oligómero de LNA/DNA fue capaz de ingresar al interior de las células. Por otro lado, se ignoran los posibles sistemas de eflujo que potencialmente puedan expulsar este tipo de moléculas. La diferencia significativa en la cantidad del oligómero de LNA/ADN en el interior celular respecto de la cantidad ODN podría deberse a la capacidad de resistir a la degradación por nucleasas bacterianas, lo que corrobora su estabilidad y lo convierte en un buen candidato para generar compuestos antisentido antimicrobianos. De todas maneras, es necesario incrementar la eficiencia en el *delivery*; una posibilidad es conjugar los oligómeros a otros compuestos, como por ejemplo a péptidos permeabilizantes. También será necesario indagar sobre otros aspectos intrínsecos de la moléculas, tales como el rol que juegan la longitud del oligómero y la configuración LNA/DNA.

# Resultados: Capítulo II



## Capítulo II: Ribozima P en *Acinetobacter baumannii*

Tal como se describió en la Introducción *Acinetobacter baumannii* es una especie bacteriana que ha tomado relevancia clínica en la últimas décadas, debido a su protagonismo en numerosos brotes infecciosos asociados a resistencias múltiples [105, 125-127]. En los resultados mostrados en las secciones previas se evaluó la posibilidad de emplear una tecnología de silenciamiento génico mediada por moléculas antisentido como potencial antimicrobiano. Hasta aquí en este trabajo de tesis se utilizó a la bacteria *Escherichia coli* y a su ribozima P como modelo para llevar a cabo tanto ensayos in vivo como in vitro. Este modelo es el único descrito del que se tenga conocimiento en bibliografía para tecnología EGS en procariontes. Es por esto que se planteó la necesidad de explorar la posible aplicación de la tecnología EGS en bacterias con relevancia clínica creciente como *A. baumannii*. Para esto se propuso como objetivo específico de esta tesis avanzar en el conocimiento del sistema de ARNasa P de esta especie.

En este capítulo se describen los avances realizados con el objetivo de identificar y aislar los componentes de la ARNasa P de *Acinetobacter baumannii*, para luego ensamblarlos y generar un sistema ribozima P in vitro. El propósito (fuera del alcance de esta tesis) será realizar la evaluación de la capacidad de corte de esta ribozima en presencia de EGSs dirigidos contra distintos mensajeros de esta especie bacteriana. Para lo que es necesario obtener la ribozima purificada y completa.

La ribozima P procarionte está compuesta por una subunidad ARN catalítica y una subunidad proteica, que en *E. coli* se denominan M1 y C5, respectivamente. En este trabajo se empleó la cepa de referencia de *A. baumannii* ATCC 17978 (Número de referencia en NCBI: NC\_009085.1) tanto para la búsqueda de secuencia y los análisis bioinformáticos, como para el trabajo de bioquímica y biología molecular (Figura 31).

Organism Overview | Genome Project Report | Genome Annotation Report | Plasmid Annotation Report

## Acinetobacter baumannii

Causes opportunistic infections in hospitals

Lineage: Bacteria[146]; Proteobacteria[179]; Gammaproteobacteria[708]; Pseudomonadales[126]; Moraxellales[54]; Acinetobacter[30]; Acinetobacter calcoaceticus baumannii complex[5]; Acinetobacter baumannii[1]

**Acinetobacter baumannii** This bacterium is commonly isolated from the hospital environment and hospitalized patients. It is an aquatic organism, and is often cultured from liquid medical samples such as respiratory secretions, wounds, and urine. Acinetobacter also colonizes irrigating solutions and intravenous solutions. Although [More...](#)

### Representative

Community selected: Acinetobacter baumannii ATCC 17978

### Dendrogram (based on genomic BLAST)



Figura 31. Árbol filogenético de cepas secuenciadas *A. baumannii*. En la figura se observa una captura de pantalla de la base de datos Genome del NCBI con un árbol filogenético correspondiente a varias de las cepas de *A. baumannii* cuyos genomas de encuentran secuenciados. En un óvalo rojo se indica la posición de la cepa ATCC 17978, utilizada en este trabajo.

### Localización de la subunidad ARN catalítica en el genoma de *A. baumannii*

La secuencia nucleotídica correspondiente al transcrito de la subunidad ARN-catalítica de la ribozima P de *A. baumannii* (M1Ab) no se encontraba anotada en ninguno de los genomas de esta especie presentes en la base de datos del NCBI. Como se trata de una ARN que luego de transcrito no es traducido, la secuencia no posee las características típicas de un marco abierto de lectura y por esta razón la localización es más compleja y no pudo realizarse en base a anotaciones o marcos abiertos de lectura. La identificación de la subunidad ARN se realizó con el programa Blast del NCBI utilizando como *query* la secuencia correspondiente al gen *rnpB* de *E. coli* que codifica para la subunidad M1 (número de acceso NC\_000913.2:3270216-3270592), contrastándola contra la base de datos *nucleotide collection* restringiendo la búsqueda al organismo *A. baumannii*. Se localizó una región con 80% de identidad en el genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 en la cadena positiva comprendida entre 987928 y 988235. Seguidamente, con el propósito de determinar la longitud del transcrito M1Ab y localizar el

nucleótido +1, se realizaron múltiples alineamientos con las secuencias de los transcritos M1 de *E. coli* y de *K. pneumoniae* y su región promotora (Figura 32).

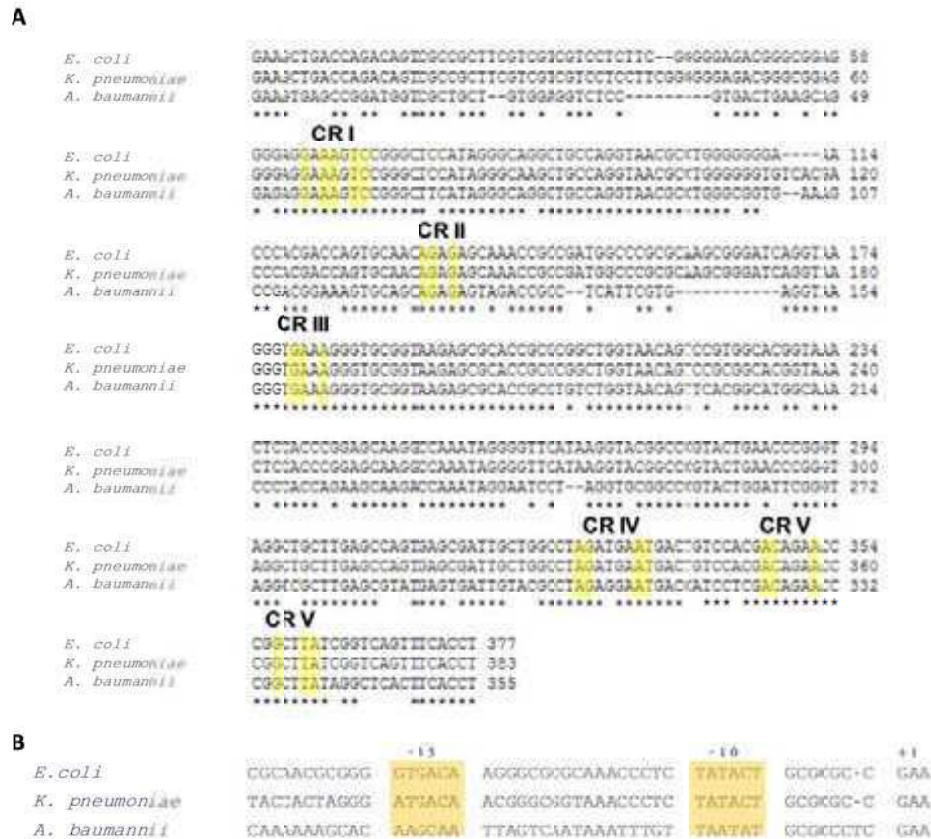


Figura 32. Alineamiento de las secuencias correspondientes al gen y a la región promotora de la subunidad ARN catalítica (M1) de la ribozima P de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*. **A.** Alineamiento de las secuencias génicas de M1. En amarillo se destacan los nucleótidos correspondientes a las regiones universalmente conservadas (CR) descritas en Chen y Pace (RNA, 1997), indicadas con números romanos. **B.** Alineamiento de las secuencias de la región promotora del gen a partir del que se transcribe M1. En naranja se indican los elementos -10 y -35. Al igual que los descrito previamente para *E. coli* y *K. pneumoniae* en Lawrence, et al (PNAS, 1987) se observa una zona rica en GC entre la *Pribnow box* (elemento -10) y el +1 en el genoma de *A. baumannii*.

De la comparación genómica surgió que la secuencia M1Ab localizada puede ser clasificada como la subunidad ARN catalítica de la ribozima P de

*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 ya que cuenta con las regiones universalmente conservadas (CR), regiones presentes en las subunidades ARN-catalítica de todos los dominios de la vida [66]. Además es una ribozima P de tipo A [61] y presenta alta similitud con la ribozima de otras bacterias Gram negativas que son patógenos oportunistas como *E. coli* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, mientras las secuencias de estas dos últimas son prácticamente idénticas, M1Ab presenta dos gaps de 9 y 11 nucleótidos localizados río arriba de la Región Universalmente Conservada I (CRI) y entre las regiones CRI y CRII, respectivamente [66].

**Identificación de la subunidad proteica de la ribozima P de *A. baumannii* (C5Ab)**

Se trabajó con el genoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 (Número de Referencia del NCBI: NC\_009085.1) en el cual se identificó un marco abierto de lectura concordante con el componente proteico de la Ribozima P, previamente anotado. Este marco de lectura abierto se comparó tanto con la secuencia nucleotídica como con la aminoacídica de C5 de *E. coli*. Del análisis se predijo que la subunidad proteica de la ARNasa P de *A. baumannii* (C5Ab) es un péptido de 102 aminoácidos, rico en aminoácidos básicos, que incluye un core conservado de unos 30 aminoácidos con respecto a la proteína de *E. coli*, como puede observarse en la Figura 33.

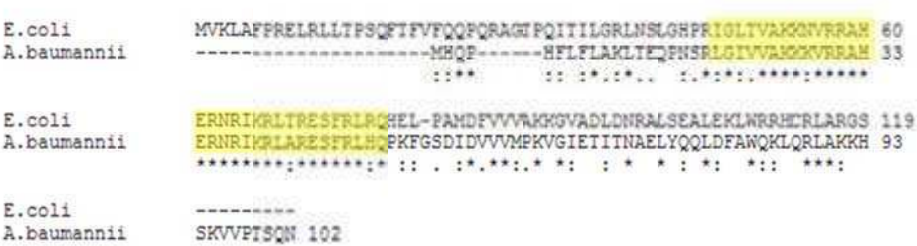


Figura 33. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína C5 de *Escherichia coli* y de la secuencia de *Acinetobacter baumannii* predicha a partir de su genoma. Con un asterisco se señalan los aminoácidos estrictamente conservados. Números de Acceso en la base de datos del NCBI: NP\_418159.1 y YP\_001085988.1, respectivamente. El alineamiento se realizó utilizando ClustalW con los parámetros preestablecidos.

Por otra parte, empleando el programa ProtParam, se predijo que este péptido posee un punto Isoeléctrico (pI) teórico elevado -de un valor de 10,8- característico de proteínas que unen ácidos nucleicos y un peso molecular teórico de 11922,9 Da. Además, mediante análisis bioinformático se identificó en la secuencia del péptido un único dominio perteneciente a la familia de la Ribonucleasa P comprendido desde el aminoácido 2 al 86 (Pfam 27.0). Finalmente, se realizó un modelado por homología de la estructura tridimensional de C5Ab (SwissProt), resultando C5 de *E. coli* como la proteína con mayor homología estructural de las presentes en la base de datos.

### **Obtención de la subunidad ARN catalítica M1Ab**

La región cuyo transcripto corresponde a la subunidad ARN-catalítica de la ribozima P de *A. baumannii* (M1) fue amplificada a partir de ADN genómico de *A. baumannii* ATCC 17978 y clonada inmediatamente río abajo del promotor de la ARN polimerasa del fago T7 en un vector pCR2.1-TOPO, generándose el plásmido pM1Ab cuya descripción se encuentra en Materiales y Métodos. Luego, se realizó una transcripción in vitro utilizando como molde el plásmido PM1Ab “linealizado” con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* (ver Materiales y Métodos). Posteriormente el producto de la transcripción in vitro (ARN) se analizó en un gel de poliacrilamida TBE 5% en condiciones desnaturalizantes (urea 7M) como puede observarse en la Figura 34. El tamaño del producto de transcripción coincidió con el tamaño esperado para la subunidad ARN-catalítica de la ribozima P de *A. baumannii* (355 nucleótidos).

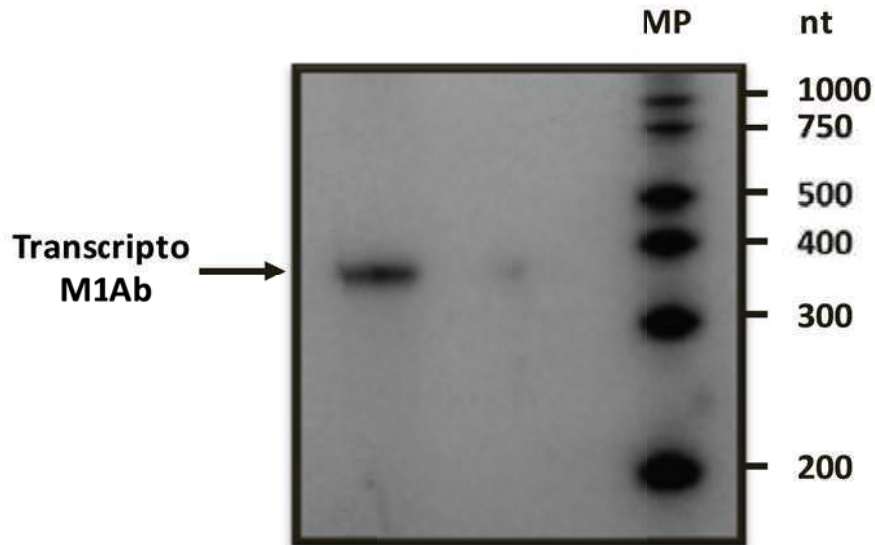


Figura 34. Transcripción in vitro de la subunidad ARN catalítica de la ribozima P de *Acinetobacter baumannii* (M1Ab). Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Tinción con bromuro de etidio. Calle izquierda: producto de transcripción; calle derecha: marcador de peso molecular para ARN, los números indican la cantidad de nucleótidos correspondientes a cada banda. El tamaño del producto de transcripción coincide con el tamaño esperado para la subunidad ARN-catalítica de la ribozima P (355 nucleótidos).

#### **Obtención de la subunidad proteica de la Ribozima P de *A. baumannii* (C5Ab): clonado, expresión y purificación**

La secuencia codificante de C5Ab se amplificó a partir de ADN genómico de *A. baumannii* ATCC 17978, se clonó en el vector de expresión pET22b(+) bajo el promotor de la ARN polimerasa del fago T7. En el extremo 3' de la región codificante de C5Ab se colocó en el mismo marco de lectura una secuencia de 6 codones que codifican para histidina, los detalles se encuentran en la sección Materiales y Métodos. A este plásmido se lo denominó pET-22b(+) C5Ab.

Luego se realizó la inducción de la expresión de la proteína. Esto se llevó a cabo transformando una cepa *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido codificante para C5Ab recombinante. Las condiciones de inducción de la expresión fueron puestas a punto y luego de varios ensayos se seleccionaron las más convenientes para

seguir con el paso de purificación. Las siguientes condiciones fueron las elegidas: medio rico LB, 28 °C, 90 min, 200 rpm/min, DO inicial  $\lambda_{600} = 0,8$ ; 0,5 mM de IPTG.

Posteriormente se realizó un fraccionamiento subcelular con el propósito de dilucidar la localización de las proteínas expresadas (solubles en citoplasma, en cuerpos de inclusión). Esto se hizo mediante un esquema de centrifugación y ultracentrifugación cuyos detalles pueden consultarse en Materiales y Métodos. Las proteínas totales obtenidas en cada fracción fueron normalizadas, luego solubilizadas y desnaturalizadas en *buffer* en presencia de SDS y finalmente sometidas a electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Uno de los geles, cuya fotografía puede apreciarse en la Figura 35 fue sometido a una tinción con Azul de Coomassie. En el mismo se observa una banda proteica prominente que migra una distancia mayor que la recorrida por la proteína de 15 KDa del marcador de peso molecular. Esta banda se encuentra presente en todas las fracciones analizadas, excepto en la correspondiente a la fracción sin inducir y la distancia migrada se corresponde con el peso molecular esperado para C5Ab recombinante que es de unos 12 kDa.

Luego, con el objetivo de determinar si la banda de entre 10 y 15 kDa correspondía efectivamente a la proteína C5Ab recombinante, se realizó un ensayo de *Western blot* sobre los extractos proteicos, empleando como anticuerpo primario un anticuerpo dirigido contra el *tag* de poli-histidina presente en el extremo carboxilo terminal. Este anticuerpo comercial fue generado en ratón y como anticuerpo secundario se empleó otro producido en conejo asociado a fosfatasa alcalina. Los resultados pueden verse en la Figura 36.

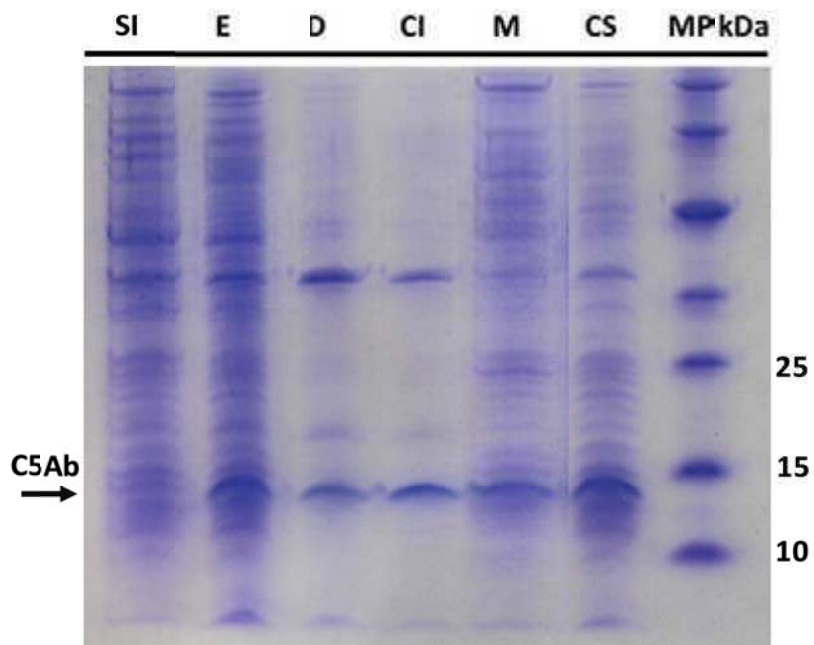


Figura 35. Sobreexpresión de la proteína C5 de *A. baumannii* recombinante. SDS-PAGE del Fraccionamiento subcelular. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% - SDS y tinción con Azul de Coomassie. Están presentes las fracciones: SI: extracto sin inducir; E: extracto inducido; D: debris celular; CI: cuerpos de inclusión; M: membranas totales y CS: proteínas citoplasmáticas solubles. MP: marcador de peso molecular de proteínas (en kDa). Se observa una banda engrosada que migra entre los 10 y 15 kDa presente en todos los extractos, excepto en la fracción del extracto sin inducir.

En la Figura 36 puede observarse que mediante *Western blot* se detectó una única banda que migra con un peso molecular de entre 10 y 15 kDa consistente con el observado en los geles teñidos con Azul de Coomassie. Por lo que puede afirmarse que la proteína C5Ab recombinante llevando el *tag* de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal pudo expresarse a partir del plásmido pET22b+-C5Ab.



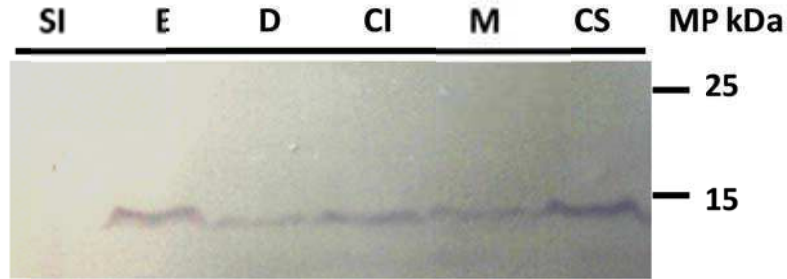


Figura 36. *Western blot* del Fraccionamiento subcelular. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y transferencia a membrana de PVDF. La membrana fue revelada con un anticuerpo monoclonal comercial contra el *tag* de poli-histidina, seguido de un anticuerpo secundario anti ratón, conjugado con fosfatasa alcalina. Se analizaron las siguientes fracciones: SI: extracto sin inducir; E: extracto inducido; D: debris celular; C: cuerpos de inclusión; M: membranas totales y CS: proteínas citoplasmáticas solubles. MP: marcador de peso molecular de proteínas (en kDa).

Luego de constatar que la proteína C5Ab fuera expresada satisfactoriamente, se procedió a purificarla mediante una cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) en un sistema de incubación con la resina en *batch* en condiciones desnaturalizantes y elusión por centrifugación.

Se utilizó una columna pre-empaquetada conteniendo resina de agarosa 6% entrecruzada cargada con níquel ácido nitrilotriacético (Thermo Scientific HisPur Ni-NTA Spin Column La fracción que se utilizó en este paso de purificación fue la correspondiente a las proteínas citoplasmáticas solubles. Se le agregó cloruro de guanidinio e imidazol hasta alcanzar las concentraciones indicadas para el *buffer* de siembra. La elusión se realizó con un gradiente escalonado de imidazol (de 10 mM hasta 0,5 M). Las fracciones fueron dializadas -para despojar la muestra de cloruro de guanidinio e imidazol- y luego fueron concentradas. Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de con SDS. El gel fue teñido en con Azul de Coomassie. Los resultados se muestran en la Figura 37.

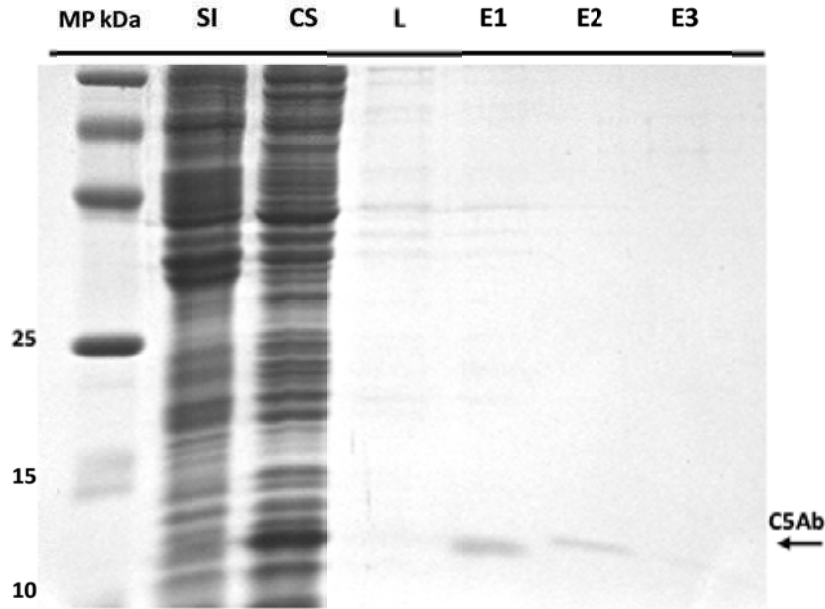


Figura 37. Purificación de la proteína C5Ab recombinante mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) en condiciones desnaturalizantes (cloruro de guanidinio 6M). El ligando se desplazó mediante un gradiente discontinuo de imidazol. Las fracciones fueron analizadas mediante un SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie. SI: extracto sin inducir; CS: proteínas citoplasmáticas solubles, L: Lavado; E1: eluato 1; E2: eluato 2; E3: eluato 3;. MP: marcador de peso molecular de proteínas (en KDa).

En la Figura 37 puede observarse que la banda proteica diferencial que migra entre los marcadores de peso molecular entre 10 kDa y 15 kDa, que se encuentra presente en el extracto correspondiente a proteínas citoplasmáticas solubles pero no en la fracción sin inducir, es la banda ampliamente mayoritaria en las fracciones eluato 1 y eluato 2. Por lo tanto puede afirmarse que la proteína C5Ab recombinante es la que encuentra en las fracciones E1 y E2 de forma mayoritaria.

La determinación de la concentración de proteínas presente en las fracciones E1 y E2 se realizó por medición de la absorbancia a  $\lambda$  280 nm, utilizando como coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) el coeficiente teórico calculado para C5Ab

recombinante (ProtParam  $\epsilon$ : 6990 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Las concentraciones obtenidas resultaron 15,6  $\mu$ M para la E1 y 13,4  $\mu$ M para la E2.

### **Funcionalidad de la subunidad ARN catalítica de *A. baumannii***

#### **Ensayos de funcionalidad in vitro**

Para constatar si el transcripto obtenido a partir de pM1Ab presenta actividad ARN-catalítica, se realizaron ensayos de corte empleando un sustrato unimolecular natural de la enzima y otro sustrato bimolecular, conformado por un ARNm y un EGS.

En cuanto al ensayo con sustrato unimolecular, se empleó el precursor del ARN de transferencia para tirosina pre-ARNt<sup>Tyr</sup>. La subunidad M1Ab se pre-incubó con la subunidad C5 de *E. coli* por 15 minutos a 37 °C. Luego, la ribozima heteróloga se incubó con el sustrato, el pre-ARNt<sup>Tyr</sup> y por 30 minutos a 37 °C. La reacción se frenó agregando fenol/cloroformo y los productos de la reacción se purificaron mediante extracción con estos solventes, seguida de una precipitación con etanol. Los detalles se encuentran en la sección Materiales y Métodos. Finalmente los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (urea 7 M). El resultado puede observarse en la Figura 38.

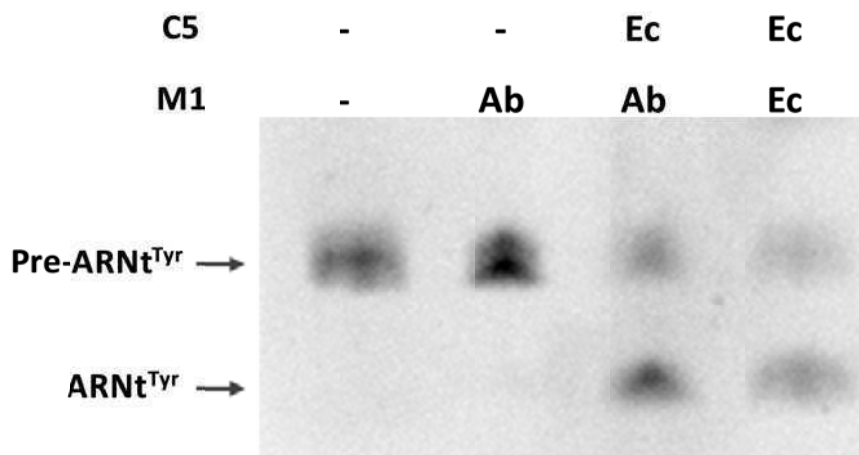


Figura 38. Actividad in vitro de la Subunidad ARN catalítica de la ribozima P de *Acinetobacter baumannii* (M1Ab). Se empleó como sustrato una molécula de pre-ARN<sup>Tyr</sup>. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (7 M urea) seguido de una tinción con bromuro de etidio. A la izquierda se indican con flechas el sustrato y el producto de corte esperado.

En la Figura 38 se observa que la subunidad M1Ab presenta actividad sobre el sustrato unimolecular al incubarse en presencia de la subunidad proteica C5 de *E. coli*. Mientras que en ausencia de C5 no se observa el corte del sustrato. Se empleó como control positivo M1 y C5 de *E. coli*.

Posteriormente se realizó un ensayo para probar la funcionalidad de la subunidad M1Ab, pero empleando un sustrato bimolecular compuesto por el ARNm *aac(6)'-Ib* y el EGSA2, dirigido contra este último [78, 79]. El gen *aac(6)'-Ib* codifica para la acetiltransferasas AAC(6)'-Ib que confiere resistencia a amikacina. En el ensayo, se preincubó el mensajero con el EGS a temperatura ambiente mientras que separadamente la subunidad M1Ab se incubó junto con la subunidad C5 de *E. coli* por 15 minutos a 37 °C. Luego el sustrato y la holoenzima se juntaron y la reacción se llevó a cabo por 90 minutos a 37 °C. Finalmente se frenó la reacción, se purificó y los productos de la misma se analizaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (urea 7 M). Los detalles del procedimiento y de las secuencias empleadas se encuentran descritos en la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura 39 se observa la acción de M1Ab sobre el mensajero *aac(6)'-lb*. Al incubarse el ARNm en ausencia de M1Ab, ausencia de EGS o en ausencia de la subunidad proteica C5, el mensajero permanece intacto. Sin embargo al ser incubado el sustrato bimolecular completo (ARNm-EGS) en presencia de la ribozima completa (M1Ab-C5) se observa el corte simple endonucleolítico del mensajero, dando lugar a dos productos: el fragmento 5' que migra a la altura del marcador de peso molecular de 200 nt y el fragmento 3' que migra entre las bandas de 500 nt y 750 nt del mismo marcador. Ambos se encuentran indicados en el sector derecho de la figura. El mismo corte se registra cuando la enzima empleada está compuesta por las subunidades M1 y C5 de *E. coli* que se emplearon como control positivo.

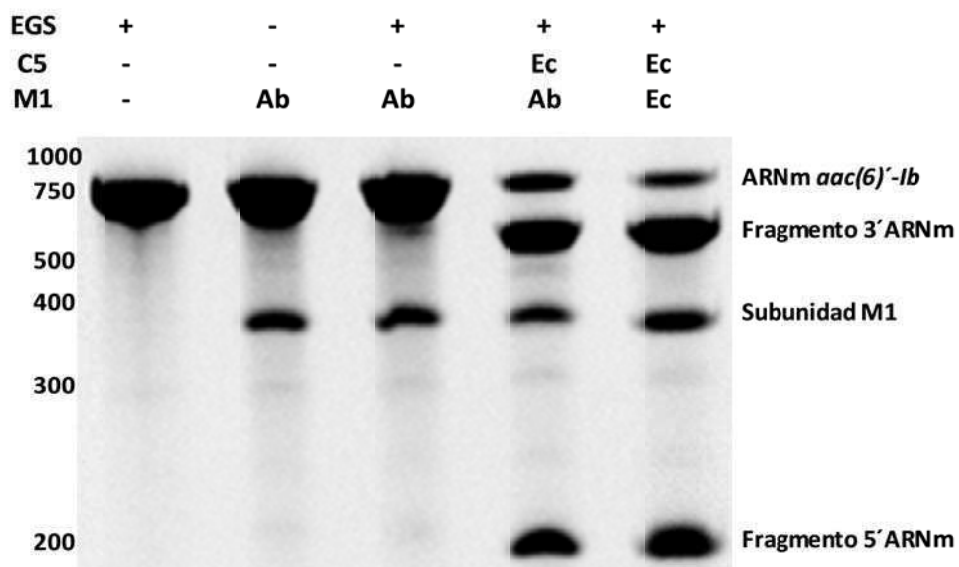


Figura 39. Actividad in vitro de la Subunidad ARN catalítica de la ribozima P de *Acinetobacter baumannii* (M1Ab) en presencia de un sustrato bimolecular. El sustrato está conformado por el ARNm *aac(6)'-lb* y el EGSA2. La reacción se analizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (urea 7M), teñido con bromuro de etidio. En el margen derecho del gel se encuentran indicados el sustrato, la subunidad M1 de la ribozima y los productos de corte. A la izquierda, con números la posición de los marcadores de peso molecular.

Los resultados mostrados en la Figura 39 indican que la Ribozima P heteróloga conformada por la subunidad M1Ab y la C5 proveniente de *E. coli*

posee la capacidad de desencadenar el corte del sustrato bimolecular, de la misma forma que lo hace la ribozima P de *E. coli*. Esto es, la subunidad M1Ab obtenida por transcripción in vitro posee las características de subunidad ARN catalítica propias de la ribozima P.

### **Ensayos de complementación heteróloga**

Con el objetivo de confirmar que el ARN predicho como M1Ab de *A. baumannii* ATCC 17978 posee funcionalidad in vivo como subunidad ARN catalítica de la ribozima P, se decidió llevar a cabo un ensayo de complementación heteróloga. Con este fin, se empleó la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) T7A49 que posee una mutación puntual en el gen *rnpB*, que codifica para la subunidad ARN catalítica de la ribozima P [80]. Esta mutación genera que la cepa sea una mutante condicional termosensible ya que temperaturas restrictivas (por encima de los 42 °C) no presenta crecimiento. La importancia de las funciones vitales del producto del gen *rnpB*, hace que no sea posible generar mutantes por delección o inactivación completa del locus. Dicha cepa termosensible fue transformada con el plásmido pM1Ab, dando lugar a la cepa pFC276, mutante condicional de la subunidad ARN catalítica de *E. coli*, portando un plásmido con la secuencia M1Ab bajo el promotor T7. También se empleó como control la cepa *E. coli* BL21(DE3), que a su vez fue transformada con el plásmido pM1Ab (cepa pFC276).

Todas las cepas fueron incubadas en simultáneo a temperatura no restrictiva (28 °C) o a temperatura restrictiva (43 °C), con o sin agregado de inductor de la transcripción (IPTG), a 200 rpm de agitación durante 24 horas. Cada tratamiento fue hecho por duplicado y cada experimento se repitió tres veces. Los resultados se muestran en la Figura 40.

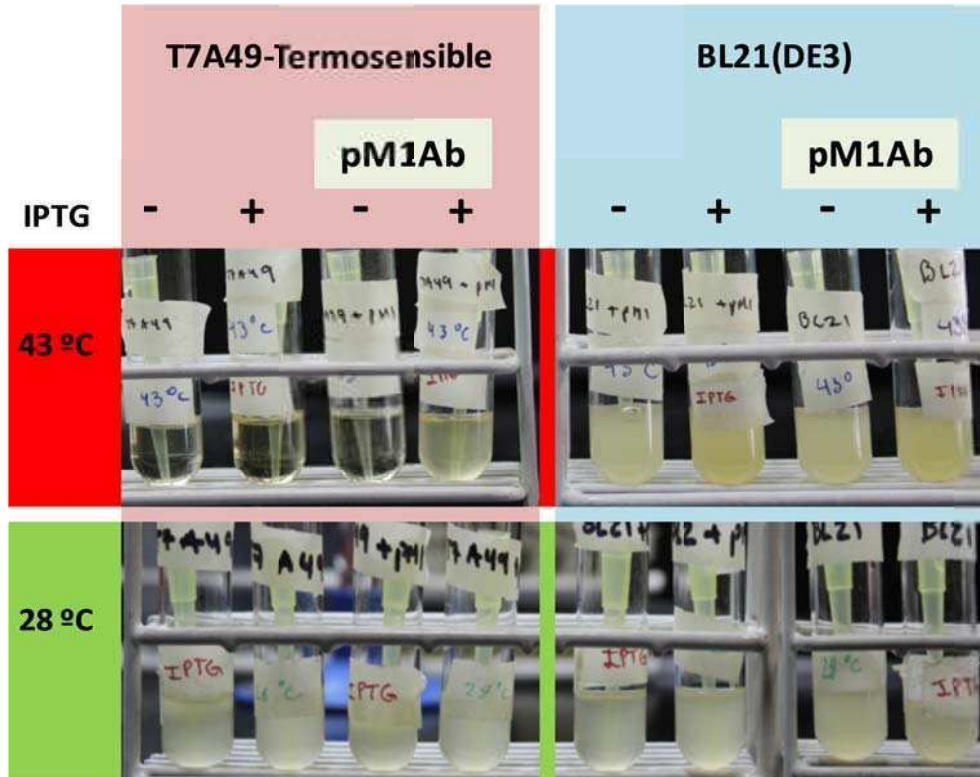


Figura 40. Complementación heteróloga de una cepa mutante en el gen *rnpB* de *E. coli* BL21(DE3) con la subunidad ARN catalítica de la ribozima P de *A. baumannii* (M1Ab). M1Ab complementa parcialmente la mutación de *E. coli*.

Luego de la incubación se constató la presencia o no de turbidez en el medio y se determinó la densidad óptica a  $\lambda$  600 nm de cada cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 41. La significancia estadística se analizó a través de un ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunnett, se consideró  $P < 0,05$  estadísticamente significativo.

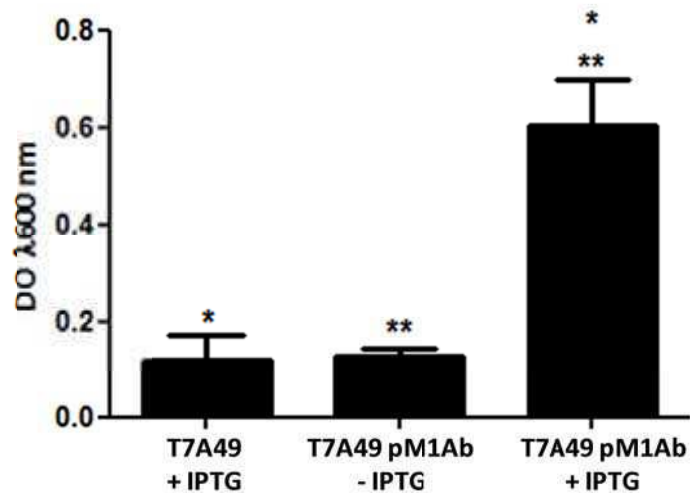


Figura 41. Determinación de la densidad óptica (DO) del cultivo de la cepa mutante en el gen *rnpB* de *E. coli* BL21(DE3) T7A49 complementada de manera heteróloga con la subunidad ARN catalítica de la ribozima P de *A. baumannii* (M1Ab). La DO se midió a  $\lambda$  600 nm. ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Dunnett. \* y \*\*:  $P < 0,05$ , estadísticamente significativo.

De la observación de las Figuras 40 y 41 se puede observar un aumento en la turbidez, corroborado por un aumento en la DO de la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) T7A49 que porta el plásmido pM1Ab y que fue incubada junto con IPTG a 43 °C, respecto de la misma cepa a la que no se le adicionó IPTG o de la cepa mutante que no porta el plásmido. Esto es, al agregar el agente inductor, se transcribe la polimerasa del fago T7 presente en el genoma de BL21(DE3) que luego transcribe, partir del promotor T7, a la secuencia M1Ab presente en el plásmido pM1Ab. Esto indica que el transcripto generado a partir la secuencia nucleotídica clonada en el plásmido pM1Ab posee la capacidad de complementar la función de la subunidad ARN catalítica de la Ribozima P de *E. coli*.

Los resultados mostrados en este capítulo indican que el ARN predicho de acuerdo al genoma de la cepa de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, en la cadena positiva entre 987928 y 988235:

-Posee las seis regiones universalmente conservadas (CR) propias de las subunidad ARN catalíticas de las ribozimas P de todos los dominios de la naturaleza.



-Es capaz de desencadenar el corte de un sustrato natural de la ARNasa P como el ARN pre-ARNt<sup>Tyr</sup>, en condiciones in vitro.

-Puede emplearse en el corte endonucleolítico de un sustrato bimolecular conformado por un ARNm y un EGS, en condiciones in vitro.

-Complementa de manera heteróloga la subunidad ARN catalítica de *E. coli* en cepas mutantes.

Por lo tanto, estas observaciones confirman la funcionalidad de M1Ab como la subunidad ARN catalítica de la ribozima P *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978.

### **Ensamble de los componentes de la ribozima P de *A. baumannii***

Luego de identificar, clonar y aislar los componentes de la ARNasa P de *A. baumannii* por separado y de probar la funcionalidad de la subunidad ARN catalítica en conjunto con la subunidad proteica C5 de *E. coli*, se procedió a ensamblar los componentes de la ribozima P M1Ab y C5Ab y a ensayar la funcionalidad en conjunto.

Se empleó como sustrato el pre-ARNt<sup>Tyr</sup> [71] [128]. Para esto se pre-incubó M1Ab en presencia de la subunidad C5Ab de *A. baumannii* durante 10 minutos a 37 °C, luego la enzima ensamblada se incubó con el pre-ARNt<sup>Tyr</sup> durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo agregando una mezcla de fenol y cloroformo seguido de una extracción con estos solventes y una purificación por precipitación con etanol. Luego se agregó un volumen de *Buffer* de Carga II y se desnaturalizó por calor. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (urea 7 M). El gel fue revelado mediante tinción con una solución de bromuro de etidio (Figura 42).

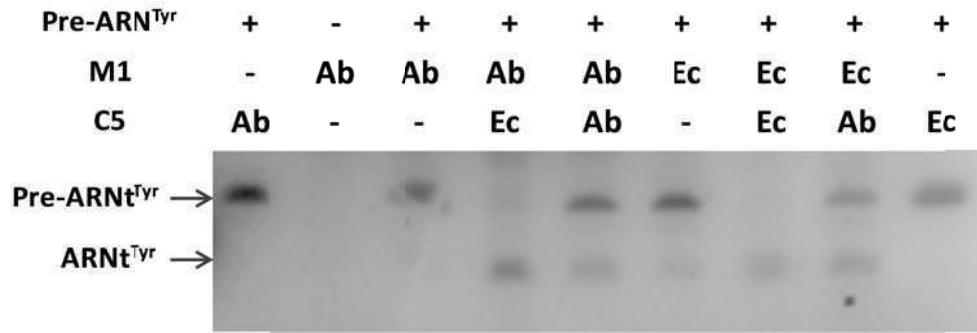


Figura 42. Ensamble de los componentes de la Ribozima P de *A. baumannii* y ensayo de funcionalidad in vitro. Se utilizó como sustrato pre-ARNt<sup>Tyr</sup>. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (7M urea) y tinción con bromuro de etidio. En la parte derecha se indican el sustrato y el producto de corte esperado. Se emplearon como control positivo las subunidades M1 y C5 de *E. coli*.

En la Figura 42 se observa el ensayo de corte mediado por la ARNasa P sobre un sustrato unimolecular, el pre-ARNt<sup>Tyr</sup>. Al tratar al sustrato sólo con la subunidad M1Ab o sólo con la subunidad C5Ab, no se registró producto de corte. Sin embargo, al incubar el pre-ARNt<sup>Tyr</sup> con las subunidades M1Ab y C5Ab, se produjo el corte endonucleolítico del sustrato. Esto es, la ribozima P producida y ensamblada a partir de componentes genéticos de *A. baumannii*, posee actividad in vitro. A su vez la subunidad M1 de *E. coli* ensamblada con la subunidad C5Ab también presenta actividad de corte. La presencia del *tag* de histidina no parece afectar la actividad in vitro de la subunidad C5Ab, lo que fue descrito para la subunidad C5 de la ribozima P de *Thermotoga marítima* [129, 130].

Los resultados indican que la ribozima P reconstruida a partir de las predicciones genómicas de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 presenta funcionalidad, siendo capaces de desencadenar el corte de un sustrato in vitro. Estos resultados ofrecen la posibilidad de contar con un sistema de ARNasa P in vitro para evaluar EGSs dirigidos contra ARNs blanco pertenecientes a *A. baumannii*. Además, permitió identificar *loci* vitales para la supervivencia de esta bacteria.

# Conclusiones y Discusión

## Conclusiones y Discusión

La resistencia a los antimicrobianos ha sido identificada como una de las mayores amenazas a la salud global, tal es la magnitud de la problemática que se cree que la humanidad pueda ingresar pronto en una era post-antibióticos, en la cual una simple infección o una herida leve puedan generar graves complicaciones en la salud humana. Como se describió en la Introducción, el rápido incremento en el número de cepas resistentes, junto con el bajo número de compuestos en desarrollo para combatirlos exigen que se busquen alternativas en el diseño de nuevos compuestos antimicrobianos. FtsZ se ha propuesto y se ha utilizado numerosas veces como blanco en el desarrollo de antibióticos [131-137]. Además, las tecnologías antisentido se han propuesto como una herramienta en el desarrollo de nuevas drogas mediante diseño racional [48, 98, 137]. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento la inhibición de la expresión para este gen involucrado en la división celular no se ha llevado a cabo mediante el uso de la tecnología EGS.

En este trabajo se aplicó la tecnología EGS para disminuir la expresión de un gen vital bacteriano, como es *ftsZ*. Se realizó un modelado *in silico* de la estructura secundaria del ARNm *ftsZ* con el objetivo de encontrar regiones a las cuales direccionar los EGSs. Se diseñaron secuencias guía externas que tienen como blanco dos regiones diferentes del mensajero. Luego se ensayó *in vitro* su capacidad de unión al mensajero como así también la capacidad de generar la degradación del mismo mediante la ribozima P. Este primer paso es necesario para seleccionar candidatos para una posterior aplicación *in vivo*. Tanto los EGSs diseñados contra la región a como los diseñados contra la región b mostraron capacidad de unión al mensajero, como también capacidad de inducir el corte del mismo llevado a cabo por la ribozima P.

Uno de los EGSs compuesto por ARN, el EGSb1, fue empleado para evaluar su actividad *in vivo*. Células de *E. coli* BL21(DE3) que portaban el plásmido pEGSb1 –a partir del cual se transcribe el EGSb1 bajo el promotor T7- mostraron filamentación al adicionarse IPTG al medio de cultivo. Este fenotipo fue previamente observado cuando se empleó otra estrategia que implicaba la

expresión de un ARN AS largo dirigido al extremo 5' del mensajero *ftsZ* [50]. Además, éste es el fenotipo esperado debido a que una correcta división celular requiere de una determinada y ajustada dosis de la proteína FtsZ [90, 91, 138].

Tal cual lo esperado, la expresión del EGSb1 también resultó en una disminución del crecimiento del cultivo, evidenciado por el descenso significativo en el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) respecto de los cultivos con bacterias empleadas como control. Las bacterias control portaban un mismo plásmido llamado pEGSb1S, de iguales características que el pEGSb1 pero que codifica para un EGS de secuencia complementaria al EGSb1 y que por lo tanto se esperaba no tuviera efecto. Estos resultados indican que el tratamiento empleado en *E. coli* es efectivamente secuencia-específico y la alteración en la división celular y la disminución en el recuento de colonias se desencadenan exclusivamente por la presencia del EGS codificado en el plásmido.

Dado que la expresión de los EGSs a partir de un plásmido no es por el momento una estrategia terapéutica viable, se propuso ensayar otra estrategia que permita administrar los EGSs directamente en el medio de cultivo. La estrategia consistió en utilizar EGSs compuestos por análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables por nucleasas bacterianas [81, 120, 139]. Se empleó un EGS isosecuencial al EGSb1 pero conformado por un *gapmer* de LNA (ácido nucleico cerrado, un análogo de ácidos nucleicos) y ADN. El tratamiento con este EGS produjo una disminución en el crecimiento del cultivo que se evidenció en una reducción de las UFC/ml, respecto de las células tratadas con EGSs control. Por otro lado, la observación microscópica de las células mostró un cambio en su morfología y tamaño; las mismas presentaron una mayor longitud en promedio que las células sin tratar o tratadas con los EGSs control, aunque no se observó filamentación. Esto puede deberse a que la concentración efectiva de los EGSs en el citoplasma sea menor en este caso que cuando los mismos son expresados desde un plásmido en el interior celular. Otro aspecto llamativo de esta observación es la dispersión en los datos respecto de la medida de la longitud celular en las bacterias tratadas con el EGSb1L en el experimento control. Esta

disparidad podría explicarse por diferencias de concentración intracitoplasmática del EGS entre los diferentes individuos, lo cual podría deberse a la presencia dentro del cultivo de subpoblaciones de bacterias más permeables a estos compuestos.

Los resultados anteriores indican de que a pesar de que la tecnología EGS se encuentra en una etapa muy temprana, el desarrollo de EGSs apropiados que puedan inhibir la expresión de genes de resistencia o que puedan actuar como antimicrobianos por sí mismos, podría ser una forma de mantener activa la competencia entre la disponibilidad de nuevos antibióticos y el desarrollo de la multirresistencia. En este camino, la mayor dificultad reside en encontrar una estrategia para que estos oligómeros compuestos por ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos logren atravesar la envoltura bacteriana y así acceder al citoplasma celular, donde ejercen su efecto.

En este sentido se desarrolló un método para analizar la capacidad de las bacterias de internalizar oligómeros compuestos por ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos resistentes a nucleasas, en este caso acoplados a un fluoróforo. Posteriormente se llevó a cabo, mediante citometría de flujo, una cuantificación de la cantidad de bacterias asociadas al oligómero. Simultáneamente se empleó la microscopía confocal para verificar la localización de los oligómeros y si los mismos habían alcanzado efectivamente el citoplasma bacteriano.

Los ensayos de internalización se realizaron en *Escherichia coli* como una primer prueba de concepto y puesta a punto del método. Los mismos arrojaron como resultado la presencia del oligómero compuesto por ADN y LNA en una cantidad de células cuatro órdenes de magnitud mayor que la cantidad de oligómero de ADN detectado en cultivos de la misma cepa (Figura 29). Estos resultados indican claramente que el oligómero compuesto por análogos de ácidos nucleicos resistentes a nucleasas bacterianas son más eficientemente internalizados por *E. coli* que oligómeros isosecuenciales pero conformados sólo por ácidos nucleicos. Resta saber si este efecto se debe a una mayor

permeabilidad de las bacterias a oligómeros LNA/ADN respecto a la permeabilidad a oligómeros de ADN, o si la causa reside en una mayor estabilidad de estos oligómeros tanto en el interior de las bacterias como en el medio extracelular. Otras preguntas que aún quedan por responder son las referidas al mecanismo de ingreso y de eflujo para estos compuestos.

La importancia del método desarrollado para la cuantificación del ingreso de derivados de oligonucleótidos no hidrolizables (citometría de flujo) radica en que el mismo permite analizar y cuantificar un gran número de células en poco tiempo. Esto permitirá en el futuro determinar la capacidad que tienen distintas especies y cepas de internalizar diferentes oligómeros que podrían utilizarse en estrategias de silenciamiento antisentido. Por ejemplo, se podría evaluar la eficiencia de internalización de oligómeros con diferencias tanto en la naturaleza de la composición química de los mismos, como en la longitud o en la secuencia. Esto puede ser relevante si se analiza el efecto de la internalización de compuestos antisentido en cepas de relevancia clínica.

El único sistema de ribozima P bacteriano del que se tiene conocimiento es el perteneciente a *E. coli* y es el que se implementó en la primera parte de este trabajo a modo de prueba de concepto. Dado que la tecnología EGS es una de las estrategias antisentido con aplicación potencial en su utilización como un nuevo agente antimicrobiano, otro objetivo de este trabajo tesis consistió en la generación de un sistema ARNasa P para una bacteria de importancia clínica. Es por esto que seleccionó una bacteria Gram negativa de creciente importancia clínica como *A. baumannii* [107] para poder así en un futuro realizar la evaluación de la capacidad de corte de los EGSs in vitro, paso necesario antes de llevar a cabo las pruebas in vivo. Como fue anteriormente mencionado, para los ensayos in vitro se necesita tener los componentes de la ribozima P purificados. Se procedió entonces a identificar los componentes de la ribozima P de *A. baumannii*: la subunidad ARN catalítica, a la que nombró como M1Ab y la subunidad proteica, que se denominó C5Ab. Se trabajó con la cepa de *A. baumannii* ATCC 17978 cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado. Los componentes de la ribozima

se identificaron mediante la búsqueda de secuencias por homología a cada uno de los componentes de la ARNasa P de *E. coli*. En el caso particular de la secuencia codificante para M1Ab al no tratarse de un marco abierto de lectura, la búsqueda de la región promotora y del inicio de la transcripción fue más dificultosa y debió realizarse por comparación con la región promotora de otras bacterias Gram negativas, además de *E. coli* [140]. Una vez identificadas las secuencias de M1Ab y C5Ab se procedió a clonarlos en vectores apropiados. M1Ab fue luego transcrito y purificado. Mientras que C5Ab fue clonado en un vector de expresión llevando un *tag* de histidina, fue luego sobreexpresado y purificado mediante una cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente la subunidad ARN-catalítica fue testeada para constatar su funcionalidad in vitro. Para esto se reconstituyó una ribozima P heteróloga compuesta por M1Ab y la subunidad C5 de *E. coli* y se determinó que la misma posee la capacidad de generar el corte endonucleolítico de un sustrato unimolecular, el pre-tRNA<sup>Tyr</sup>. Asimismo se ensayó la habilidad de actuar sobre un sustrato bimolecular compuesto por el ARNm de *acc(6)-Ib* y un EGS diseñado contra éste, resultando también este último ensayo exitoso.

Luego, con el objetivo de confirmar que el M1Ab transcripto que presenta actividad in vitro también posee funcionalidad in vivo como subunidad ARN catalítica de la ribozima P, se realizó un ensayo de complementación heteróloga. Para esto se empleó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) T7A49 que posee una mutación termosensible en el gen *rnpB* (que codifica para M1) y por lo tanto no crece a temperaturas mayores a 42 °C. La cepa mutante transformada con el plásmido pM1Ab que codifica para M1Ab fue capaz de crecer a temperaturas restrictivas, lo que indica que el transcripto M1Ab complementa la mutación y por ende, presenta funcionalidad como subunidad ARN catalítica de la ribozima P in vitro. Sin embargo mediante esta complementación heteróloga sólo se restauró el fenotipo parcialmente, debido a que el crecimiento de la cepa mutante complementada, cuantificado en DO, fue menor que el de la cepa salvaje. Este fenómeno ya fue observado con anterioridad en complementaciones interespecie llevadas a cabo entre los componentes de la ribozima P bacteriana [141, 142]. Si



bien el componente ARN-catalítico endógeno de la ribozima P presenta similitud de secuencia y de estructura con el heterólogo (M1Ab) y la funcionalidad in vitro de la ribozima quimérica es óptima, las diferencias que existen entre ambas secuencias sean las que expliquen la diferencia en el *fitness* entre la cepa salvaje y la complementada heterológicamente.

Por otra parte la secuencia identificada como C5Ab fue clonada sobreexpresada y purificada. Finalmente se procedió a ensamblar los componentes de la ribozima P M1Ab y C5Ab y a ensayar la funcionalidad en conjunto. Se determinó que ambos son capaces de desencadenar el corte simple endonucleolítico de un sustrato natural, el pre-ARN<sup>Tyr</sup>. De esta manera logró reconstituirse funcionalmente la ribozima P de *A. baumannii*. La identificación de los componentes de la ribozima P de *A. baumannii* constituyen un importante aporte al conocimiento de la genética y de la biología molecular básica de una bacteria con una relevancia cada vez mayor en el ámbito clínico. La reconstitución in vitro de la RNasa P constituye la piedra angular para el desarrollo de la tecnología EGS y de sus posibles aplicaciones como antimicrobiano en el tratamiento de enfermedades generadas por cepas multirresistentes de esta especie.

En cuanto a las perspectivas futuras de este trabajo la más inmediata consiste en probar el sistema de ribozima P in vitro de *A. baumannii* con EGSs compuestos por análogos de ácidos nucleicos. Restaría seleccionar los mensajeros blanco. Entre los posibles *targets* podría incluirse el ARNm del gen vital que codifica para AcpP, *acyl carrier protein*, cuyo silenciamiento se conoce es letal para la bacteria [143]. Otro blanco interesante podría estar constituido por el mensajero de algún gen que esté involucrado en la formación del biofilm. En tal sentido se propone como candidato al ARNm del gen codificante para la (p)ppGpp sintasa, enzima responsable de la generación de (p)ppGpp un mensajero secundario con efecto pleotrópico cuya síntesis se desencadena por señales tales como el hambre y que se sabe interviene en la regulación de la formación del biofilm en distintas especies bacterianas [144].

Con respecto a la pregunta de qué otras posibles alternativas deberían considerarse para identificar nuevos antimicrobianos, una respuesta podría encontrarse en los mecanismos a través de los cuales las bacterias causan las infecciones. En efecto, una posibilidad sería enfocarse en embestir contra las causales de la patogénesis, como por ejemplo los factores de virulencia o la interrupción de la interacción del microorganismo con su hospedador [2, 47]. Otra estrategia a considerar podría ser la implementación de terapias con bacteriófagos que sean capaces de infectar bacterias patógenas. Este enfoque tendría la ventaja de poseer especificidad de hospedador y así eliminar únicamente a la bacteria de interés [30, 145]. También se encuentran avanzados estudios sobre el empleo de péptidos antimicrobianos, algunos de los cuales poseen un amplio espectro de microorganismos blanco [44, 46].

En lo que concierne a los mecanismos de silenciamiento mediante moléculas antisentido, la principal ventaja que poseen es su especificidad [48, 49], dado que pueden diseñarse para actuar contra uno o un grupo determinado de patógenos sin dañar a los integrantes de la microbiota normal. La tecnología EGS en particular posee la ventaja además de ser exclusivamente específica para el dominio contra el cual se diseñó la molécula antisentido, dado que los EGSs reconocidos por la ribozima P bacteriana son diferentes de los que puede reconocer la ARNasa P eucariota. Las desventajas principales que poseen son dos: por un lado están las referidas a la capacidad de los microorganismos de evadir la acción mediante mutaciones en el ADN que codifica el ARN blanco y por el otro está el problema de la internalización de la molécula antisentido y de su estabilidad una vez dentro del citoplasma. En cuanto a esto último, como ya se mencionó, se podría resolver empleando análogos de ácidos nucleicos no hidrolizables por nucleasas bacterianas.

Respecto de la internalización resta aún mucho trabajo por realizar, a modo de ejemplo puede mencionarse el acople de las moléculas antisentido a péptidos permeabilizantes, lo cual ha resultado en un método efectivo [55, 56, 100, 121, 146-151]. También en lo referido a la internalización de las moléculas

antisentido, sería interesante explorar la posibilidad de llevar a cabo una internalización de los ARNs AS a través de bacteriófagos recombinantes, específicamente diseñados para este fin.

### Comentario final:

La situación actual de las enfermedades causadas por bacterias multirresistentes es muy preocupante. Esta preocupación se incrementa aún más si se tienen en cuenta la baja cantidad de nuevos antibióticos disponibles en las últimas dos décadas y los pocos avances realizados en nuevas terapias antimicrobianas. Los factores que aportan a este hecho son múltiples y diversos, sólo para mencionar algunos podemos considerar el uso indiscriminado de antibióticos, el origen ancestral y la ubicuidad de las resistencias, así como también la baja inversión privada en el desarrollo de antimicrobianos y el poco interés gubernamental. La realidad parece abrumadora, tanto que ya se considera la posibilidad del advenimiento de una era post-antibiótica como un hecho cercano e inminente. Queda en todos y cada uno de quienes tienen conocimiento de esta problemática darle difusión y visibilidad, para encontrar soluciones a la misma.

# Bibliografía

## Bibliografía

1. Gould, K., *Antibiotics: from prehistory to the present day*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(3): p. 572-5.
2. Clatworthy, A.E., E. Pierson, and D.T. Hung, *Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(9): p. 541-8.
3. Davies, J., *Antibiotic resistance and the golden age of microbiology*. Ups J Med Sci, 2014. **119**(2): p. 65-7.
4. Armstrong, G., et al., *Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century*. JAVA, 1999.
5. Davies, J., *Where have all the antibiotics gone?* Can J Infect Dis Med Microbiol, 2006.
6. Magiorakos, A.P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(3): p. 268-81.
7. Bassetti, M., et al., *New antibiotics for bad bugs: where are we?* Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2013.
8. D'Costa, V.M., et al., *Antibiotic resistance is ancient*. Nature, 2011. **477**(7365): p. 457-61.
9. D'Costa, V.M., et al., *Sampling the antibiotic resistome*. Science, 2006. **311**(5759): p. 374-7.
10. Fitzpatrick, D. and F. Walsh, *Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes*. FEMS Microbiol Ecol, 2016. **92**(2).
11. Finley, R.L., et al., *The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(5): p. 704-10.
12. Nesme, J. and P. Simonet, *The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria*. Environ Microbiol, 2015. **17**(4): p. 913-30.
13. Pallecchi, L., et al., *Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1179-84.
14. Canton, R., *Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15 Suppl 1**: p. 20-5.
15. Nemeth, J., G. Oesch, and S.P. Kuster, *Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(2): p. 382-95.
16. Aminov, R.I. and R.I. Mackie, *Evolution and ecology of antibiotic resistance genes*. FEMS Microbiol Lett, 2007. **271**(2): p. 147-61.
17. Wichmann, F., et al., *Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure*. MBio, 2014. **5**(2): p. e01017.
18. Dahms, C., et al., *Epidemiology and zoonotic potential of multiresistant bacteria and Clostridium difficile in livestock and food*. GMS Hygiene and Infection Control, 2014.
19. Lu, A.D., *Antimicrobial Resistance Gene Delivery in Animal Feeds*. Emerging Infectious Diseases, 2004.
20. Aminov, R.I., *The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature*. Environ Microbiol, 2009. **11**(12): p. 2970-88.

21. Manten, A., *The Non-medical Use of Antibiotics and the Risk of Causing Microbial Drug-resistance*. Bulletin of the WHO, 1963.
22. Nikaido, H., *Porins and Specific Diffusion Channels in Bacterial Outer Membrane*. Journal of Biological Chemistry, 1994.
23. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*. Drugs, 2009. **69**(12): p. 1555-623.
24. Drlika, K., *Quinolones: Action and Resistance Updated*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2009.
25. Nikaido, H., *Multidrug resistance in bacteria*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 119-46.
26. Livermore, D.M., et al., *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(2): p. 165-74.
27. Garneau-Tsodikova, S. and K.J. Labby, *Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives*. Medchemcomm, 2016. **7**(1): p. 11-27.
28. Vong, K. and K. Auclair, *Understanding and overcoming aminoglycoside resistance caused by N-6'-acetyltransferase*. MedChemComm, 2012. **3**(4): p. 397.
29. Muniesa, M., M. Colomer-Lluch, and J. Jofre, *Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes*. Future Microbiology, 2013. **8**(6): p. 739-751.
30. Chaturongakul, S. and P. Ounjai, *Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 442.
31. Mell, J.C. and R.J. Redfield, *Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity*. J Bacteriol, 2014. **196**(8): p. 1471-83.
32. Matthey, N. and M. Blokesch, *The DNA-Uptake Process of Naturally Competent *Vibrio cholerae**. Trends in Microbiology. **24**(2): p. 98-110.
33. Mao, J. and T. Lu, *Population-Dynamic Modeling of Bacterial Horizontal Gene Transfer by Natural Transformation*. Biophysical Journal. **110**(1): p. 258-268.
34. Ramirez, M.S., et al., *Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1488-90.
35. Cabezón, E., et al., *Towards an integrated model of bacterial conjugation*. FEMS Microbiol Rev, 2015. **39**(1): p. 81-95.
36. Norman, A., L.H. Hansen, and S.J. Sorensen, *Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1527): p. 2275-89.
37. Mazel, D., *Integrins: agents of bacterial evolution*. Nat Rev Micro, 2006. **4**(8): p. 608-620.
38. Peters, J.E., *Tn7*. Microbiol Spectr, 2014. **2**(5).
39. Mullany, P., E. Allan, and A.P. Roberts, *Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function*. Res Microbiol, 2015. **166**(4): p. 361-7.
40. Organization, W.H., *WHO Antimicrobial resistance global report on surveillance*. 2014.
41. Boucher, H.W., et al., *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(1): p. 1-12.
42. Fischbach, M.A. and C.T. Walsh, *Antibiotics for emerging pathogens*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1089-93.
43. Giamarellou, H., *Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36 Suppl 2**: p. S50-4.
44. Bahar, A.A. and D. Ren, *Antimicrobial peptides*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(12): p. 1543-75.

45. Aoki, W. and M. Ueda, *Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(8): p. 1055-81.
46. Malmsten, M., *Antimicrobial peptides*. Ups J Med Sci, 2014. **119**(2): p. 199-204.
47. Cegelski, L., et al., *The biology and future prospects of antivirulence therapies*. Nat Rev Microbiol, 2008.
48. Rasmussen, L.C., H.U. Sperling-Petersen, and K.K. Mortensen, *Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition*. Microb Cell Fact, 2007. **6**: p. 24.
49. Good, L. and J.E. Stach, *Synthetic RNA silencing in bacteria - antimicrobial discovery and resistance breaking*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 185.
50. Goh, S., et al., *Concurrent growth rate and transcript analyses reveal essential gene stringency in Escherichia coli*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6061.
51. Geller, B.L., et al., *Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer inhibits viability of Escherichia coli in pure culture and in mouse peritonitis*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(6): p. 983-8.
52. Mellbye, B.L., et al., *Cationic phosphorodiamidate morpholino oligomers efficiently prevent growth of Escherichia coli in vitro and in vivo*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(1): p. 98-106.
53. Kauffmann, A.D., et al., *Improvement of RNA secondary structure prediction using RNase H cleavage and randomized oligonucleotides*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(18): p. e121.
54. Lee, K.-H., et al., *A molecular nanodevice for targeted degradation of mRNA during protein synthesis*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 20733.
55. Tilley, L.D., et al., *Gene-specific effects of antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer-peptide conjugates on Escherichia coli and Salmonella enterica serovar typhimurium in pure culture and in tissue culture*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(8): p. 2789-96.
56. Panchal, R.G., et al., *Peptide conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers increase survival of mice challenged with Ames Bacillus anthracis*. Nucleic Acid Ther, 2012. **22**(5): p. 316-22.
57. Mellbye, B.L., et al., *Variations in amino acid composition of antisense peptide-phosphorodiamidate morpholino oligomer affect potency against Escherichia coli in vitro and in vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2): p. 525-30.
58. Kirsebom, L.A., *RNase P RNA mediated cleavage: substrate recognition and catalysis*. Biochimie, 2007. **89**(10): p. 1183-94.
59. Lai, L.B., et al., *Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects*. FEBS Lett, 2010. **584**(2): p. 287-96.
60. Reiter, N.J., et al., *Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA*. Nature, 2010. **468**(7325): p. 784-9.
61. Mondragon, A., *Structural studies of RNase P*. Annu Rev Biophys, 2013. **42**: p. 537-57.
62. Wu, S., et al., *Cleavage mediated by the catalytic domain of bacterial RNase P RNA*. J Mol Biol, 2012. **422**(2): p. 204-14.
63. Brown, J., et al., *Comparative Analysis of Ribonuclease P RNA using genes sequences from natural microbial population reveals tertiary structure elements*. PNAS, 1996.
64. Brown, J., *The Ribonuclease P Database*. Nucleic Acids Res, 1999.
65. Brown, H.a., *Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs*. Nucleic Acids Research, 1998.
66. Pace, L.C.a., *Identification of the Universally Conserved core of ribonuclease P RNA*. RNA, 1997.

67. Torres-Larios, A., et al., *Crystal structure of the RNA component of bacterial ribonuclease P*. *Nature*, 2005. **437**(7058): p. 584-587.
68. Altman, S., *Ribonuclease P*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011. **366**(1580): p. 2936-41.
69. Jovanovic, M., et al., *Elucidation of Structure Function relationships in the protein subunit of bacterial RNase P using a genetic complementary approach*. *Nucleic Acids Research*, 2002.
70. McClain, W.H., C. Guerrier-Takada, and S. Altman, *Model substrates for an RNA enzyme*. *Science*, 1987. **238**(4826): p. 527-530.
71. Guerrier-Takada, C., W.H. McClain, and S. Altman, *Cleavage of tRNA precursors by the RNA subunit of E. coli ribonuclease P (M1 RNA) is influenced by 3'-proximal CCA in the substrates*. *Cell*. **38**(1): p. 219-224.
72. Forster, A.C. and S. Altman, *External guide sequences for an RNA enzyme*. *Science*, 1990. **249**(4970): p. 783-786.
73. KO, J., et al., *Dual Function of RNase E for Control of M1 RNA Biosynthesis in Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2008.
74. McKinney, J., et al., *Inhibition of Escherichia coli viability by external guide sequences complementary to two essential genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6605-10.
75. Xiao, G., et al., *Inhibition of expression in Escherichia coli of a virulence regulator MgIB of Francisella tularensis using external guide sequence technology*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3719.
76. Gopalan, V., A. Vioque, and S. Altman, *RNase P: variations and uses*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(9): p. 6759-62.
77. Lundblad, E.W., et al., *Rapid selection of accessible and cleavable sites in RNA by Escherichia coli RNase P and random external guide sequences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(7): p. 2354-7.
78. Sarno, R., et al., *Inhibition of Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase Type Ib-Mediated Amikacin Resistance by Antisense Oligodeoxynucleotides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003. **47**(10): p. 3296-3304.
79. Soler Bistue, A.J., et al., *External guide sequences targeting the aac(6')-Ib mRNA induce inhibition of amikacin resistance*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(6): p. 1918-25.
80. Guerrier-Takada, C., et al., *Artificial regulation of gene expression in Escherichia coli by RNase P*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995.
81. Soler Bistue, A.J., et al., *Inhibition of aac(6')-Ib-mediated amikacin resistance by nuclease-resistant external guide sequences in bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(32): p. 13230-5.
82. Shen, N., et al., *Inactivation of expression of several genes in a variety of bacterial species by EGS technology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(20): p. 8163-8.
83. Margolin, W., *Sculpting the bacterial cell*. *Curr Biol*, 2009. **19**(17): p. R812-22.
84. Margolin, W., *FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(11): p. 862-71.
85. Goley, E.D., et al., *Assembly of the Caulobacter cell division machine*. *Mol Microbiol*, 2011. **80**(6): p. 1680-98.
86. Mingerance, J., et al., *Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria*. *Trends Microbiol*, 2010. **18**(8): p. 348-56.
87. Errington, J., R.A. Daniel, and D.J. Scheffers, *Cytokinesis in Bacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003. **67**(1): p. 52-65.
88. Adams, D.W. and J. Errington, *Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring*. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(9): p. 642-53.



89. Weart, R.B., et al., *A metabolic sensor governing cell size in bacteria*. Cell, 2007. **130**(2): p. 335-47.
90. Tamura, M., et al., *RNase E maintenance of proper FtsZ/FtsA ratio required for nonfilamentous growth of Escherichia coli cells but not for colony-forming ability*. J Bacteriol, 2006. **188**(14): p. 5145-52.
91. Ward, J.E., Jr. and J. Lutkenhaus, *Overproduction of FtsZ induces minicell formation in E. coli*. Cell. **42**(3): p. 941-949.
92. Vicente, F.G., *Contribution of individual promoters in the ddlB-ftsZ region to the transcription of the essential cell-division gene ftsZ in E. coli*. Molecular Microbiology, 1997.
93. Marwick, C., *First "antisense" drug will treat cmv retinitis*. JAMA, 1998. **280**(10): p. 871-871.
94. Kole, R., A.R. Krainer, and S. Altman, *RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(2): p. 125-140.
95. Nikravesh, A., et al., *Antisense PNA accumulates in Escherichia coli and mediates a long post-antibiotic effect*. Mol Ther, 2007. **15**(8): p. 1537-42.
96. Wesolowski, D., et al., *Basic peptide-morpholino oligomer conjugate that is very effective in killing bacteria by gene-specific and nonspecific modes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(40): p. 16582-7.
97. Crinelli, R., et al., *Design and characterization of decoy oligonucleotides containing locked nucleic acids*. Nucleic Acids Research, 2002.
98. Chabot, S., et al., *LNA-based oligonucleotide electrotransfer for miRNA inhibition*. Mol Ther, 2012. **20**(8): p. 1590-8.
99. Yamamoto, T., et al., *Cholesterol-lowering Action of BNA-based Antisense Oligonucleotides Targeting PCSK9 in Atherogenic Diet-induced Hypercholesterolemic Mice*. Mol Ther Nucleic Acids, 2012. **1**: p. e22.
100. Lopez, C., et al., *Inhibition of AAC(6')-Ib-mediated resistance to amikacin in Acinetobacter baumannii by an antisense peptide-conjugated 2',4'-bridged nucleic acid-NC-DNA hybrid oligomer*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(9): p. 5798-803.
101. Vallenet, D., et al., *Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1805.
102. Roca, I., et al., *The Acinetobacter baumannii Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 148.
103. Harding, C.M., et al., *Acinetobacter baumannii strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility*. MBio, 2013. **4**(4).
104. Raoult, L.S.a., *Acinetobacterbaumannii in Human Body Louse*. Emerging Infectious Diseases, 2004.
105. Lee, K., et al., *Multidrug-resistant Acinetobacter spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens*. Yonsei Med J, 2011. **52**(6): p. 879-91.
106. Visca, P., H. Seifert, and K.J. Towner, *Acinetobacter infection--an emerging threat to human health*. IUBMB Life, 2011. **63**(12): p. 1048-54.
107. Howard, A., et al., *Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen*. Virulence, 2012. **3**(3): p. 243-50.
108. Fishbain, J. and A.Y. Peleg, *Treatment of Acinetobacter infections*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(1): p. 79-84.
109. McConnell, M.J., L. Actis, and J. Pachon, *Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models*. FEMS Microbiol Rev, 2013. **37**(2): p. 130-55.

110. Towner, K.J., *Acinetobacter: an old friend, but a new enemy*. J Hosp Infect, 2009. **73**(4): p. 355-63.
111. Imperi, F., et al., *The genomics of Acinetobacter baumannii: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity*. IUBMB Life, 2011. **63**(12): p. 1068-74.
112. Smith, M.G., et al., *New insights into Acinetobacter baumannii pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis*. Genes Dev, 2007. **21**(5): p. 601-14.
113. Jawad, A., et al., *Survival of Acinetobacter baumannii on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates*. Journal of Clinical Microbiology, 1998.
114. Gaddy, J.A. and L.A. Actis, *Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation*. Future Microbiol, 2009. **4**(3): p. 273-8.
115. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(13): p. 3406-3415.
116. Mathews, D.H., et al., *Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7287-92.
117. Iida, S., *MUTANTS OF ESCHERICHIA COLI PERMEABLE TO ACTINOMYCIN*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967.
118. Kovach, M., et al, *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes*. Gene, 1995.
119. Sala, C.D., et al., *Inhibition of cell division induced by external guide sequences (EGS Technology) targeting ftsZ*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47690.
120. Petersen, M. and J. Wengel, *LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics*. Trends in Biotechnology. **21**(2): p. 74-81.
121. Eriksson, M., P.E. Nielsen, and L. Good, *Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into Escherichia coli*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7144-7.
122. Torres, A., et al., *Potent and sustained cellular inhibition of miR-122 by lysine-derivatized peptide nucleic acids (PNA) and phosphorothioate locked nucleic acid (LNA)/2'-O-methyl (OMe) mixmer anti-miRs in the absence of transfection agents*. Artificial DNA: PNA & XNA, 2011.
123. !!! INVALID CITATION !!!
124. Traglia, G.M., et al., *Internalization of Locked Nucleic Acids/DNA Hybrid Oligomers into Escherichia coli*. Biores Open Access, 2012. **1**(5): p. 260-3.
125. Gordon, N.C. and D.W. Wareham, *Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: mechanisms of virulence and resistance*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(3): p. 219-26.
126. Coyne, S., P. Courvalin, and B. Perichon, *Efflux-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter spp*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(3): p. 947-53.
127. Zarrilli, R., et al., *Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages*. Int J Antimicrob Agents, 2013. **41**(1): p. 11-9.
128. Guerrier-Takada, C., et al., *Cleavage of tRNA Precursors by the RNA Subunit of E. coli Ribonuclease P (MI RNA) Is Influenced by 3'9Proximal CCA in the Substrates*. Cell, 1984.
129. Paul, L.a.A., *Characterization of RNase P from Thermotoga maritima*. Nucleic Acids Research, 2001.
130. Krivenko, A.A., et al., *Expression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of RNase P protein from Thermotoga maritima*. Acta Crystallographica Section D, 2002. **58**(7): p. 1234-1236.

131. Ojima, I., et al., *Drug discovery targeting cell division proteins, microtubules and FtsZ*. Bioorg Med Chem, 2014. **22**(18): p. 5060-77.
132. Haydon, D.J., et al., *An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity*. Science, 2008. **321**(5896): p. 1673-5.
133. Schaffner-Barbero, C., et al., *Targeting the assembly of bacterial cell division protein FtsZ with small molecules*. ACS Chem Biol, 2012. **7**(2): p. 269-77.
134. Sass, P. and H. Brotz-Oesterhelt, *Bacterial cell division as a target for new antibiotics*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(5): p. 522-30.
135. Liang, S., et al., *Inhibiting the growth of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro with antisense peptide nucleic acid conjugates targeting the ftsZ gene*. Int J Infect Dis, 2015. **30**: p. 1-6.
136. Wang, J., et al., *Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44424-8.
137. Rajasekaran, P., et al., *Peptide nucleic acids inhibit growth of Brucella suis in pure culture and in infected murine macrophages*. Int J Antimicrob Agents, 2013. **41**(4): p. 358-62.
138. Jimenez, M., et al., *Reconstitution and organization of Escherichia coli proto-ring elements (FtsZ and FtsA) inside giant unilamellar vesicles obtained from bacterial inner membranes*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11236-41.
139. Stein, C.A., et al., *Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(1): p. e3.
140. Lawrence, N., et al., *Heterologous enzyme function in Escherichia coli and the selections of genes encoding the catalytic RNA subunit of RNase P*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987.
141. Turrini, P.C., J.L. Loveland, and R.L. Dorit, *By any other name: heterologous replacement of the Escherichia coli RNase P protein subunit has in vivo fitness consequences*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32456.
142. Loveland, J.L., et al., *Essential is not irreplaceable: fitness dynamics of experimental E. coli RNase P RNA heterologous replacement*. J Mol Evol, 2014. **79**(3-4): p. 143-52.
143. Geller, B.L., et al., *Gene-silencing antisense oligomers inhibit acinetobacter growth in vitro and in vivo*. J Infect Dis, 2013. **208**(10): p. 1553-60.
144. de la Fuente-Núñez, C., et al., *Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response*. PLOS Pathogens, 2014.
145. Wyszynska, J., *The Decline of Antibiotic Era- New Approaches for Antibacterial Drug Discovery*. Polsh Journal of Microbiology, 2008.
146. Said Hassane, F., et al., *Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(5): p. 715-26.
147. Sawyer, A.J., et al., *A peptide-morpholino oligomer conjugate targeting Staphylococcus aureus gyrA mRNA improves healing in an infected mouse cutaneous wound model*. Int J Pharm, 2013. **453**(2): p. 651-5.
148. Ezzat, K., et al., *PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(12): p. 5284-98.
149. Guterstam, P., et al., *Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(12): p. 2509-17.

150. Bai, H., et al., *Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene*. *Biomaterials*, 2012. **33**(2): p. 659-67.
151. Mondhe, M., et al., *Species-selective killing of bacteria by antimicrobial peptide-PNAs*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e89082.

## Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

AS: antisentido

BNA: ácido nucleico bloqueado

CR: regiones universalmente conservadas

Da: Dalton

DO<sub>λ600</sub>: Densidad óptica a 600 nm

EGS: secuencia guía externa

LNA: ácido nucleico cerrado

nt: nucleótidos

ODN: oligodeoxinucleótido

ORF: marco abierto de lectura

pb: pares de bases

PDVF: fluoruro de polivinilideno

PMO: fosfoamidatos de morfolinos

PNA: ácido nucleico peptídico

MDR: multirrsistente

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDR: panrresistente

SDS: dodecil sulfato de sodio

THG: transferencia horizontal de genes

UFC: unidades formadoras de colonias

XDR: extensamente resistentes

°C: grados Celsius

μg: microgramo

μl: microlitro

μm: micrómetro

μM: micromolar