



Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología del CHUAC-INIBIC

Área de Investigación

Silenciamiento de dianas terapéuticas de *Acinetobacter baumannii*

Silencing of therapeutic targets of *Acinetobacter baumannii*

Silenciamiento de dianas terapéuticas de *Acinetobacter baumannii*

Alejandro Cés Martínez

Trabajo de fin de Máster

Fecha de defensa: 8 de septiembre de 2017

Dirigido por la Dra. Margarita Poza Domínguez

Trabajo Fin de Máster

La Dra. Margarita Poza Domínguez autoriza la presentación del trabajo de fin de máster “Silenciamiento de dianas terapéuticas de *Acinetobacter baumannii*” presentado por Alejandro Cés Martínez para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 1 de septiembre de 2017

Asdo.: Dra. Margarita Poza Domínguez

Asdo: Alejandro Cés Martínez

Índice

| | |
|--|---|
| <u>Resumen/Abstract</u> | 1 |
| <u>Palabras clave/Keywords</u> | 2 |
| <u>Introducción</u> | 3 |
| 1. <i>Acinetobacter baumannii</i> | 3 |
| 2. Dianas terapéuticas de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 4 |
| 2.1. MurA..... | 4 |
| 2.2. LpxB..... | 5 |
| 3. Moléculas antisentido de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 5 |
| 3.1. siRNA..... | 7 |
| 3.2. PNA..... | 7 |
| 3.3. BNA..... | 8 |
| <u>Objetivos</u> | 9 |

| | |
|--|----|
| <u>Material y Métodos</u> | 10 |
| 1. Cepas y condiciones de cultivo..... | 10 |
| 2. Diseño y síntesis de moléculas antisentido..... | 10 |
| 3. Experimento <i>in vitro</i> | 11 |
| 3.1. Clonación..... | 11 |
| 3.2. Extracción..... | 12 |
| 3.3. Expresión..... | 13 |
| 4. Western blot..... | 15 |
| <u>Resultados y Discusión</u> | 17 |
| 1. Silenciamiento del gen <i>murA</i> | 17 |
| 2. Silenciamiento del gen <i>lpxB</i> | 18 |
| <u>Conclusiones</u> | 20 |
| <u>Agradecimientos</u> | 21 |
| <u>Bibliografía</u> | 23 |

Resumen

Acinetobacter baumannii es un patógeno muy problemático debido a su alta tasa de multi-resistencia que aparece especialmente en el ambiente hospitalario. En el presente trabajo se estudia una nueva terapia con moléculas antisentido diseñadas para bloquear determinadas dianas terapéuticas. Para ello, hemos utilizado las moléculas antisentido siRNA y PNA dirigidas hacia los genes *murA* y *lpxB* implicados en la formación de la pared celular bacteriana y esenciales para la vida de la bacteria. Los datos muestran que es posible un silenciamiento de ambas dianas mediante las moléculas antisentido diseñadas.

Abstract

Acinetobacter baumannii is a very problematic pathogen due to its high multi-resistance rate that appears especially in the hospital environment. In the present work we study a new therapy with antisense molecules designed to block certain therapeutic targets. We work with the antisense molecules siRNA and PNA directed towards *murA* and *lpxB* target genes involved in the formation of the bacterial cell wall and essential for bacterium life. The data show that a silencing of both targets is possible using the designed antisense molecules.

Resumo

Acinetobacter baumannii é un patóxeno moi problemático debido á súa alta taxa de multi-resistencia que aparece especialmente no ambiente hospitalario. No presente traballo estúdase unha nova terapia con moléculas antisentido deseñadas para bloquear determinadas dianas terapéuticas. Traballamos coas moléculas antisentido siRNA e PNA dirixidas cara aos xenes *murA* e *lpxB* implicados na formación da parede celular bacteriana e esenciais para a vida da bacteria. Os datos mostran que é posible un silenciamiento de ambas dianas mediante as moléculas antisentido deseñadas.

Palabras Clave / keywords

Acinetobacter baumannii, PNA, siRNA, silenciamiento, silencing, antisentido, antisense, *murA* y *lpxB*.

Introducción

1. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo gram-negativo, estrictamente aerobio, no fermentador, catalasa positivo, oxidasa negativo, carente de movilidad y con un contenido de G+C en su DNA que oscila entre un 39% - 47%. Es un patógeno oportunista que tiene alta incidencia sobre pacientes inmunodeprimidos, especialmente los que permanecen durante largos periodos de tiempo en el hospital (1). Comúnmente está asociado a ambientes acuáticos (2) y se ha demostrado que ha colonizado la piel y secreciones respiratorias y orofaríngeas de los individuos infectados (3). A nivel clínico es un microorganismo preocupante debido a la capacidad de multi-resistencia a antibióticos (Figura 1) (4). En los años 70 *A. baumannii* era sensible a la mayor parte de los antibióticos empleados (5). Sin embargo, en los últimos años la organización mundial de la salud ha incluido a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter sp.*, acuñados bajo el acrónimo de ESKAPE (6), entre los microorganismos más preocupantes para la salud humana (7). Este hecho nos hace reflexionar sobre la importancia de la concienciación sobre el uso correcto de los antibióticos, dada la repercusión que conlleva la aparición de resistencias en el ámbito sanitario.

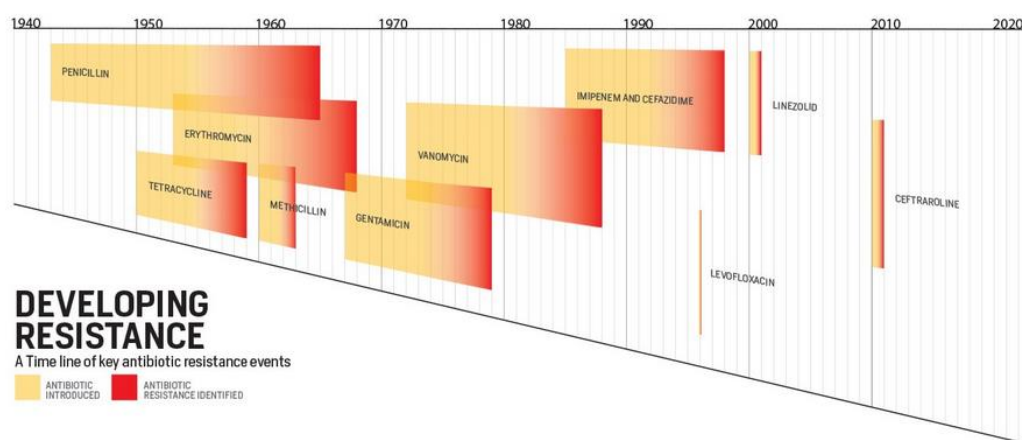


Figura 1. Historia de los antibióticos. Creación de estos y aparición de resistencias. Disponible a 17/08/2017 en:

<https://medium.com/@fernnews/imaging-the-post-antibiotics-future-892b57499e77>

Un ejemplo de los problemas que pueden causar las cepas multi-resistentes de *A. baumannii* se ha podido observar entre los años 2006 y 2008 en el hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Todo comenzó en febrero, cuando un paciente fue colonizado por una de estas cepas, concretamente la cepa AbH12O-A2. Esta se expandió rápidamente por el hospital dando lugar a un brote que persistió durante más de 30 meses. Un estudio realizado tras este brote informó que esta cepa muestra un amplio perfil de resistencia a los fármacos antimicrobianos, presentando resistencia a carbapenemas y susceptibilidad sólo a tigeciclina y colistina. Fue aislada en un total de 290 pacientes y, solamente después de la reforma de la UCI en julio del año 2007, se consiguió reducir su persistencia (8).

2. Dianas terapéuticas de *Acinetobacter baumannii*

En el trabajo nos planteamos el bloqueo de dianas terapéuticas de *A. baumannii* por medio de la utilización de moléculas antisentido que bloquean el RNA mensajero. Para ello, hemos elegido las siguientes dianas:

2.1. MurA

El peptidoglicano es una estructura única presente sólo en procariotas. Es un componente esencial de la pared celular que proporciona integridad estructural a las bacterias contra la presión osmótica interna y es responsable de mantener la forma de la célula (9). Las enzimas ligadas a la síntesis de peptidoglicano se conservan entre las especies bacterianas a lo largo de la evolución, por lo que las enzimas encargadas de la síntesis de este compuesto son muy atractivas como dianas terapéuticas antimicrobianas.

El precursor clave de peptidoglicano es UDP-N-acetilmuramato que se sintetiza en un proceso de dos etapas por la acción de enzimas citoplasmáticas, UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa (MurA) y UDP-N-acetil enolpiruvilglucosamina reductasa (MurB). MurA cataliza la transferencia de un grupo enolpiruvilo de fosfoenolpiruvato a UDPN-acetilglucosamina para formar enolpiruvato de UDP-N-acetilglucosamina. En el siguiente

paso, MurB reduce el enolpiruvato de UDP-N-acetilglucosamina utilizando NADPH para formar UDP-N-acetilmuramato (10).

La terapia antimicrobiana llevada a cabo mediante tecnología antisentido podría silenciar el gen que codifica la enzima MurA impidiendo la correcta formación de la pared bacteriana, lo cual repercutiría en la viabilidad celular.

2.2. LpxB

El lípido A o lipopolisacárido es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Está compuesto por una parte lipídica y otra que contiene cadenas de oligosacáridos y polisacáridos. LpxB es una enzima intermediaria que participa en la formación del lípido A, concretamente es la quinta enzima implicada, y tiene función disacárido sintasa. Aunque existen cepas de *A. baumannii* capaces de crecer aún careciendo del lípido A, como es el caso de la cepa ATCC 19606, se ha observado que ante la ausencia de otras enzimas que participan en esta ruta, como es el caso de LpxH, los productos intermedios generados y no procesados generan una toxicidad que inhibe el crecimiento de la bacteria. En esta misma cepa se ha observado que LpxK es esencial para la supervivencia de la misma ya que su ausencia provoca la acumulación de productos intermediarios parecidos a detergentes (11).

El silenciamiento de LpxB mediante compuestos antisentido podría ser una nueva herramienta para combatir al patógeno *A. baumannii* al nivel de la síntesis del lípido A.

3. Moléculas antisentido de *A. baumannii*

En los últimos años, ha ocurrido un gran desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, basadas principalmente en el avance de la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con la infección.

Desde el punto de vista farmacológico, el desarrollo de las nuevas estrategias terapéuticas se enfrenta a varios desafíos importantes. Muchos de los objetivos están

localizados intracelularmente, requiriendo la penetración a través de membrana por parte del fármaco. Otros desafíos implican a la estabilidad, la disponibilidad y la vida media del compuesto, así como cuestiones de seguridad. Para abordar estos desafíos, se están explorando varias vías principales, incluyendo moléculas pequeñas (sintéticas), mAbs (anticuerpos monoclonales) y estrategias antisentido. La tecnología antisentido se utiliza principalmente para interferir directamente en la maquinaria de producción de proteínas diana mediante la inactivación de ARN mensajero que codifica la proteína diana. La gran ventaja de esta tecnología radica en la alta especificidad sobre la diana.

El término moléculas antisentido comprende varias clases de moléculas oligonucleotídicas que contienen complementariedad de secuencias con moléculas de ARN diana, tales como ARN mensajero, ARN vírico u otras especies de ARN, inhibiendo su función después de su unión específica.

Se han descrito al menos 4 clases principales de moléculas antisentido: oligodesoxirribonucleótido antisentido (ODN), es decir, moléculas de ADN de cadena sencilla, moléculas pequeñas de ARN de interferencia (siRNA), ribozimas y ADN-enzimas. La aplicación más frecuentemente utilizada de moléculas antisentido terapéuticas consiste en reducir los niveles de expresión de proteína responsables de la patogenicidad y virulencia. En este sentido, las moléculas antisentido se unen a los ARN mensajeros que han sido generados a través de la transcripción de la información genética. Estos ARN mensajeros codifican la formación de proteínas durante la traducción. La unión de moléculas antisentido al ARN mensajero puede inhibir eficazmente este proceso de traducción. Por lo tanto, el nivel de expresión de ARN mensajeros permanece intacto mientras que los niveles de proteínas codificadas se reducen mediante una acción antisentido eficaz. Sin embargo, también pueden desarrollarse estrategias antisentido para interferir con otros aspectos funcionales de las moléculas de ARN, tales como la interferencia con plegamiento apropiado, competencia con la unión de proteínas a secuencias de ARN, antagonismo de las actividades de microARN e inhibición de la actividad telomerasa mediada por ARN (12).

La perspectiva de futuro, observada a través de los ensayos publicados recientemente, indica un creciente interés en la aplicación clínica de las estrategias antisentido. Las áreas de enfermedades tratadas en estos ensayos comprenden enfermedades infecciosas,

enfermedades inflamatorias crónicas (incluyendo alergias y asma), enfermedades metabólicas, y varios trastornos neurológicos.

3.1. siRNA (small interference RNA)

Los siRNA representan pequeñas moléculas dúplex de ARN cortas de 21 a 25 bases de longitud. Para su correcta funcionalidad necesitan la generación de un complejo silenciador. Este complejo está inducido por el sistema RISC (RNA-induced silencing complex). Hasta la fecha, se han desarrollado una gran variedad de modificaciones de los siRNAs destinados a aumentar su estabilidad. Las modificaciones también deben potenciar la biodisponibilidad de estas moléculas, especialmente para uso terapéutico, y mejorar la unión e inactivación del ARN diana. Las ventajas más destacables de los siRNA son: la posibilidad de ser generados intracelularmente a partir de precursores más grandes por la enzima Dicer y que produce la degradación del ARN mensajero. Entre las desventajas encontradas se observan efectos fuera de destino, dificultades a la hora de ser producidos, potencial de penetración celular limitado y que su actividad es dependiente de las enzimas intracelulares (12).

Hasta la fecha, no se ha podido emplear siRNA para bloquear dianas bacterianas.

3.2. PNA (peptide-nucleic acid)

Ante la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, los PNAs surgen como una alternativa atractiva basada en la tecnología antisentido con ácidos nucleicos peptídicos. Los PNAs son análogos sintéticos de ADN de cadena sencilla (con una longitud de 10 a 20 bases) con un esqueleto pseudo-peptídico no cargado. Estos compuestos tienen una alta estabilidad química y metabólica, y puede unirse fuertemente a la hebra complementaria de ADN o ARN. Debido a estas propiedades, los PNAs han sido investigados por su potencial como agentes terapéuticos antisentido para el cáncer y las enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y parásitos. Se ha demostrado que los PNAs pueden inhibir tanto la transcripción como la traducción de los genes diana, lo que conduce a la inhibición del crecimiento microbiano. La inhibición del crecimiento ha sido demostrada en varias

especies de bacterias utilizando PNAs dirigidos a los ARN mensajeros y ribosómicos de genes esenciales para el crecimiento (13).

Goh y colaboradores (14) demuestran que al incubar las bacterias en presencia del PNA dirigido al gen *murA* se produce una reducción de la expresión de este gen y que esta reducción es dependiente de la concentración de PNA. Estos resultados son comparables a los resultados obtenidos en este estudio (Figura 2).

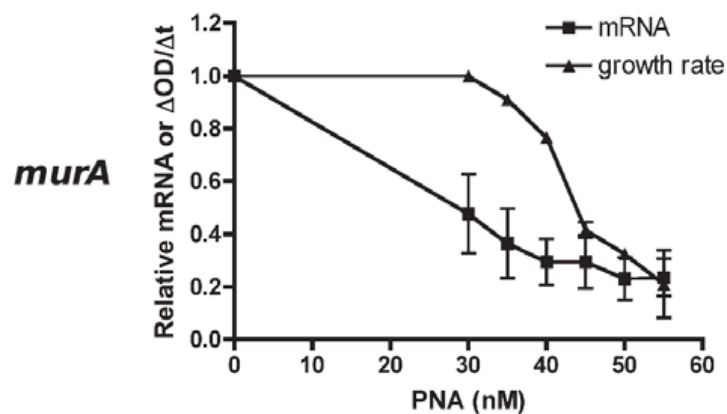


Figura 2. Efecto del PNA frente al crecimiento bacteriano y la expresión de mRNA procedente de MurA (14).

3.3. BNA (bridget-nucleid acid)

Los BNAs son análogos relacionados con LNAs (moléculas híbridas que contienen un ácido nucleico bloqueado). Los BNAs son compuestos resistentes a la actividad nucleasa. Poseen dos puentes que se incorporan sintéticamente en la posición 2' y 4' de una ribosa y de esta manera forman un monómero 2', 4'-BNA. En su estructura llevan residuos de ácidos nucleicos y desoxirribonucleótidos. A mayores poseen un péptido con función permeabilizante que facilita la internalización de la molécula en el interior de la célula. Los BNA son compuestos antisentido más modernos que los PNAs y muestran afinidades de unión y estabilidad aumentadas (15). Un ejemplo de utilización de BNAs en *A. baumannii* consiste en la inhibición de el compuesto AAC(6')-Ib que media la resistencia a amikacina donde el BNA se une al codón de iniciación impidiendo la traducción *in vitro* (15).

Objetivo

- Evaluación de la capacidad de silenciamiento de los compuestos antisentido siRNA y PNA sobre los genes *murA* y *lpxB* del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*.

Materiales y Métodos

1. Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 y *Escherichia coli* TOP10 se cultivaron rutinariamente en caldo de cultivo Luria-Bertani (LB). Se añadió agar al 2% cuando fue necesario. Todas las cepas se cultivaron a 37 °C en agitación (180 rpm) y se congelaron a -80°C en medio LB con un 10% de glicerol. Se utilizó una concentración de 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) para seleccionar las cepas transformantes (16).

2. Diseño y síntesis de moléculas antisentido

Las moléculas antisentido (siRNAs y PNAs) se diseñaron a partir de los genes *murA* y *lpxB* (Figura 3), con códigos de acceso del Genbank A1S_0685 y A1S_1668, respectivamente, encontrados en la cepa 17978 de *A. baumannii* 17978 (Código de acceso del Genbank NC_009085.1).

| <i>murA</i> | <i>lpxB</i> |
|---|--|
| 1 atggataaat ttttaatcac gggcgggtgtt aagctcgaag gggaagtacg catttctggt | 1 ttggcaaac gaaaacttaa aataggcatt gtagttggag aagttctgg agatagctc |
| 61 gctaaaaatg cggctttacc gttacttgcg gcaatgattc ttgctgactc tccaattaca | 61 ggcgtaaac tcatcgtag ttttcgag cagggaaatc atgctgaatt tgaggaatc |
| 121 ttaaccaatg ttcaaatct taaagatga aatactttgg taaaattaat cggtggaactg | 121 ggtggccctc aatgattgc ggaagtttt aacagtatt acccaatgga aactctgct |
| 181 ggtgttaca ttagttatga aatgacacg gtaaggcgg atacttctac tttagataac | 181 gtgatggca ttgtgaagt attaaaagac ttaaaaaaac tattcgctg acgtgatggc |
| 241 cagttgctc ctatgagct tgcataaaca atgctgcat ctattttggt attaggcca | 241 ttaattaatc aatggactca gcatccagtt gatatttta ttgattga tgcaccagac |
| 301 ttattagcgc gttacgaaa tgcgaagtt tcaattacct gtggatgctc tattggctct | 301 tttaacctca gactttgaa aagatcaaa gaaaagaatc ttcaaata aacagtcaa |
| 361 cgtccagtag atcaaacctt aaaagccta gaagcattgg gtgcacatat cgaagttgaa | 361 tatgtgagtc catcagttg ggcatgggc caagggcag tacatggcat caaacaagt |
| 421 aatggttatg tacatgccac tgttgatgg cgtctgaaag gcggcgaagt ggttttgat | 421 atagatttag tacttgctt atttctttt gaaaaagtt tttatgaaca atatgaagt |
| 481 atggttactg ttggtgctc gaaaaattt ttaatggcag ctgcttggc agacgggtga | 481 ccagcggcat ttgtaggcca tccattagct aacaattac cgcttgagaa ccctattcaa |
| 541 accacaattc gtaatgctc acgtaaacct gaaattactg atcttgcca aatgcttatt | 541 attgctaac aagaattggg tttgatgaa aatcaaaaac atattgctt gttgccggt |
| 601 aaaaatggcg caaaaattga agtttagat acggatacat tggttttac tgggtgaa | 601 agccgcaagg gtgaagtaga aaggcttct cctatgctat tggggcagc caatattttg |
| 661 agtctacatg gctgtgaata tgcagttggt gcagaccgca tcgaaacagg ttctactta | 661 cataaaaa atccagatat tcagtttta attccggcaa ttaatgatgc gcgcaaacg |
| 721 gctgctgctg cgattactg ttggactgta aaaaccacc atacagatcc ttacttctt | 721 cagattgagc aggggttga acaattagca ccgagttaa aagcaaaaat tcatattta |
| 781 gaggctgtt tagataagt tgaagaatg ggtgctgaag ttaccgtgg cgatgactgg | 781 gaaaatcag atagtgaatc gaaaattgt cgtatgctca tgaacgagac tgacattatt |
| 841 attgaattg atattgtgg taagctctc aaagcagtaa gttttagaac actacctc | 841 gcttagctg ctggaacggc gacattagaa gcaatgctca tgcatagacc aatgctcact |
| 901 ccagaattc cgactgacat gcaagcaca attatggctg taaatgcaat tggcgtggg | 901 ttctataaac tgcattggct aactattta attgctaaat tcttgtagaa aatacctat |
| 961 ttgcaacga ttccgagac catttttga aatcgttca tgcatttcc tgaattgca | 961 tactcttgc caaatatcat cgcgggtaaa aaagtattg aagagctgat tcagcagat |
| 1021 cgtatgggtg ctaaatatca ggtcgaaggc catgatgctg ttgtgacggg tttgaaaaa | 1021 gcaacacctg aaaatttagc ggctgaaata gaaaaactaa tgaatgtaga aaccgctcaa |
| 1081 ttacaagcag cactgtaat gcaacagat ttactgctc catttcttt ggttttagcg | 1081 attcaagtaa tgcacattt aactatgcat aaacagctta ttctggaaa tacagaagat |
| 1141 gctttggtg ctgaagtgta tacatattt gaccgtatct accatattga ccgtggttat | 1141 ccggttcaag ccattttgca atgtttgaat agctaa |
| 1201 gagcatgctg aagaaaaact tcaagttta ggtgcacaaa ttaagcagat aagttaa | |

Figura 3. Secuencia nucleotídica de los genes *murA* (izquierda) y *lpxB* (derecha).

Los siRNAs se encargaron al servicio externo Dharmacon, los PNAs al servicio externo PNA Bio.

3. Experimento *in vitro*

3.1. Clonación

Los genes diana *murA* y *lpxB* se amplificaron a partir del ADN genómico de *A. baumannii* ATCC 17978 (Código de acceso del Genbank NC_009085.1) utilizando los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados en este estudio.

| | |
|------------|----------------------------------|
| MurA | Fw: ATGGATAAATTTTAATCACG |
| | Rv: ACTTACTCGCTTAATTTTGGC |
| LpxB | Fw: ATGCGTAGTTTTTCGTGAGC |
| | Rv: GCTATTCAAACATTGCAAAAT |
| Primers T7 | Fw: TAATACGACTCACTATAGGG |
| | Term Rv: ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTC |

Se clonaron los genes en el plásmido comercial pEXP5-CT/TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante. La construcción se empleó para transformar células de *E. coli* TOP 10. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB con ampicilina y se confirmaron mediante PCR utilizando la pareja de primers T7 Fw y T7 Term Rvn (Tabla 1).

3.2. Extracción

Para realizar la extracción del plásmido se utilizó el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente. Todas las centrifugaciones fueron realizadas en una microcentrífuga a $\geq 12.000 \times g$ (10.000-14.000 rpm, según el tipo de rotor).

Se recolectó el cultivo bacteriano por centrifugación a 8000 rpm (6800 $\times g$) en una microcentrífuga durante 2 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y se eliminó todo el medio restante.

Se resuspendieron las células en 250 μL de solución de resuspensión en un tubo de microcentrífuga. Hay que asegurarse de la total resuspensión. Para ello se utilizó un sistema de agitación.

Se añadieron 250 μL de solución de lisis y se mezcló por inversión el contenido de tubo de microcentrífuga. Se invirtió el tubo entre 4 y 6 veces, hasta que la solución se volvió viscosa y ligeramente clara.

Se agregaron 350 μL de la solución de neutralización y se mezcló inmediata y completamente invirtiendo el tubo 4-6 veces.

Se centrifugó durante 5 min para sedimentar restos celulares y ADN cromosómico.

Se transfirió el sobrenadante a la columna de centrifugado GeneJET por decantación o pipeteado. Hay que evitar perturbar o transferir el precipitado blanco.

Se centrifugó durante 1 min. Se desechó el flujo y se colocó la columna en el mismo tubo de recogida.

Se añadieron 500 μL de la solución de lavado (diluida con etanol antes del primer uso) a la columna de centrifugación GeneJET. Se centrifugó durante 30-60 s y se descartó el sobrenadante. Se colocó la columna de nuevo en el mismo tubo de recogida.

Se repitió el procedimiento de lavado utilizando 500 μL de la solución de lavado.

Se desechó el flujo y se centrifugó durante 1 min adicional para eliminar la solución de lavado residual. Este paso es esencial para evitar el etanol residual en las preparaciones de plásmido.

Se transfirió la columna de centrifugado GeneJET en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1,5 mL. Se añadieron 50 μL del tampón de elución al centro de la membrana de la columna de giro GeneJET para eluir el ADN del plásmido. Hay que tener cuidado de no tocar la membrana con la punta de la pipeta. Se realizó una incubación durante 2 min a temperatura ambiente y por último se centrifugó durante 2 min.

Para cuantificar las muestras se utilizó un BioDrop μLITE (Isogen Life Science). La concentración obtenida mínima debe ser de 500 ng/ μL .

3.3. Expresión

Se utilizó el siguiente protocolo para sintetizar las proteínas recombinantes a partir del molde de ADN.

En primer lugar se preparó la mezcla descrita en la Tabla 2. Las cantidades que se muestran en dicha tabla corresponden al control sin las moléculas antisentido. En los ensayos, las muestras contienen además, los compuestos antisentido siRNA y PNA a una concentración de 55 mM.

Tabla 2: Mezcla de reacción control para llevar a cabo la síntesis de la proteína recombinante a partir del ADN molde.

| Reactivo | Cantidad |
|--|---------------------------------------|
| <i>E. coli slyD</i> -Extract | 20 μ L |
| 2.5X IVPS <i>E. coli</i> Reaction Buffer (-A.A.) | 20 μ L |
| 2X IVPS Feed Buffer | 25 μ L |
| 50 mM Amino Acids (-Met) | 2.5 μ L |
| 75 mM Methionine | 2 μ L |
| T7 Enzyme Mix | 1 μ L |
| DNA Template | 1 μ g |
| DNase/RNase-free Distilled Water | Hasta un volumen final de 100 μ L |

Las muestras se incubaron a 300 rpm y 37 °C durante un tiempo de 30 min y se congelaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

4. Western blot

En primer lugar se escogieron los cristales y se limpiaron con alcohol antes de montarlos en el soporte para hacer geles de acrilamida. Se mezclaron los reactivos del gel separador y se añadieron al soporte. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se añadió isopropanol [100%] por encima del gel para eliminar las burbujas que se forman. Se dejó solidificar el gel durante una hora aproximadamente, se lavó con agua destilada y se secó con un papel de filtro. A continuación se añadió el gel concentrador y se colocó el peine para crear los pocillos.

Los reactivos utilizados para la elaboración de geles al 12,5% de acrilamida fueron los descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos utilizados para la elaboración de geles al 12,5% de acrilamida.

| Fase gel separador | Fase gel concentrador |
|---------------------------|------------------------------|
| 3.12 g de urea (6M) | - |
| 5.35 mL de acrilamida 40% | 1.07 mL acrilamida 40% |
| 4.28 mL de buffer B | 1.78 mL buffer C |

| | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 7.52 mL H ₂ O destilada | 4.28 mL H ₂ O destilada |
| < 200 µL APS 10% | < 92 µL APS 10% |
| 30 µL TEMED | 30 µL TEMED |

Para la preparación de las muestras, las proteínas se precipitaron con acetona, se añadió el tampón de carga, se desnaturalizaron por calor y se cargaron en el gel de acrilamida dejándolo correr durante 3 horas aproximadamente a 140 V. Una vez el gel terminó de correr se transfirieron las proteínas del gel de acrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) por acción de un campo eléctrico. La membrana que contiene las proteínas se incubó toda la noche en tampón fosfato salino (PBS) con leche al 5% para bloquear los sitios libres y evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Se hicieron dos lavados con tampón de lavado 1X (10X 500 mL; Tris base 12.1 g, NaCl 14.6 g y Tween 20 2.5 mL a pH 7.5 ajustado antes de añadir el tween con HCl al 35%) y se incubó dos horas con un anticuerpo comercial específico el cual tenía unido la enzima peroxidasa. Después de la incubación se hicieron dos lavados con tampón de lavado y se reveló la membrana gracias a la actividad de la peroxidasa que cataliza una reacción quimioluminiscente.

Resultados y discusión

1. Silenciamiento del gen *murA*

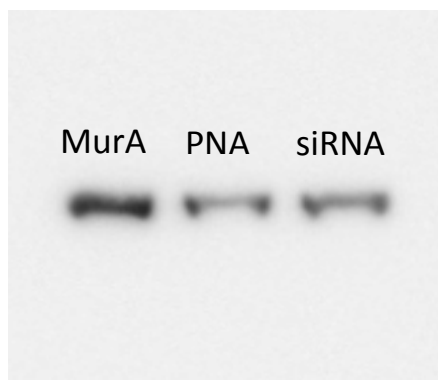


Figura 4. Western blot en el que se analiza la expresión de la proteína MurA, así como el efecto inhibitor de los compuestos antisentido (PNA y siRNA).

Se probaron dos tipos diferentes de moléculas antisentido diseñadas para bloquear el gen *murA*. La reacción de síntesis de proteínas *in vitro* seguida de un western blot demostró la capacidad de ambas moléculas de inhibir parcialmente la síntesis de la proteína MurA (Figura 4). La banda de la izquierda corresponde al control de expresión. En ella se observa la expresión basal de la proteína MurA. La banda central corresponde a la reacción de expresión de la proteína tratada con la molécula PNA. Se observa que esta banda es más fina que la banda control lo que implica una menor expresión de la proteína MurA debido al silenciamiento ocasionado por el PNA. Por último, la banda de la derecha corresponde a la expresión de la proteína MurA incubada en presencia de la molécula siRNA. En este caso, se observa una inhibición parcial de la expresión de la proteína MurA similar a la muestra incubada en presencia del PNA.

Goh y colaboradores (14) realizaron estudios de silenciamiento del gen *murA* utilizando moléculas antisentido tales como PNA. En su trabajo analizaron el nivel de expresión de este

gen a través de qRT-PCR. La relación entre la disminución del ARN mensajero y la disminución de la tasa de crecimiento refleja el grado de esencialidad o rigurosidad de un gen esencial, que se define aquí por el nivel mínimo de transcripción para una reducción del 50% en la tasa de crecimiento (MTL50).

En la bibliografía no existen datos acerca de silenciamiento de genes utilizando siRNA en bacterias. Este hecho se debe a que teóricamente las bacterias no poseen la maquinaria necesaria para estabilizar y mantener la función del siRNA. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos observado que el siRNA diseñado para bloquear el gen *murA* exhibe un silenciamiento parcial sobre la traducción de la proteína MurA (Figura 4).

2. Silenciamiento del gen *lpxB*

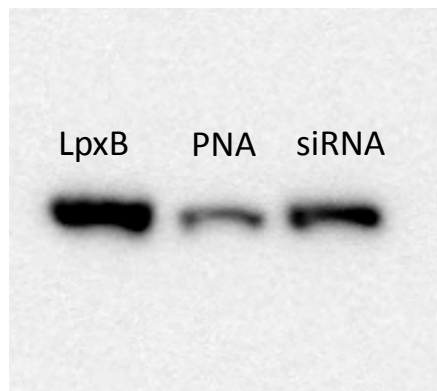


Figura 5. Western blot en el que se analiza la expresión de la proteína LpxB, así como el efecto inhibitor de los compuestos antisentido (PNA y siRNA).

En el caso del gen *lpxB* también se probaron las moléculas antisentido PNA y siRNA. La reacción de síntesis de proteínas *in vitro* seguida de un western blot demostró la capacidad de ambas moléculas de inhibir parcialmente la síntesis de la proteína LpxB (Figura 5). La banda de la izquierda corresponde al control de expresión. En ella, se observa la expresión basal de la proteína LpxB. La banda central corresponde a la reacción de expresión de la proteína tratada con la molécula PNA. Esta banda central es más fina que la banda control lo

que indica que existe una menor expresión de la proteína LpxB debido al silenciamiento ocasionado por el PNA. Por último, la banda de la derecha corresponde a la expresión de la proteína LpxB incubada en presencia de la molécula antisentido de siRNA. En este caso, se observa una inhibición parcial de la expresión de la proteína LpxB. El grado de inhibición es inferior al producido por el efecto del PNA.

No encontramos en la bibliografía entradas que reflejen trabajos de silenciamiento mediante PNA o siRNA sobre el gen *lpxB* en *A. baumannii*. Sin embargo, sí aparecen ejemplos de mutantes en otros genes que codifican proteínas involucradas en la ruta de síntesis del lípido A. Este es el caso del gen *lpxK*, enzima esencial para la viabilidad celular en *A. baumannii* ATCC 19606 (11). A microscopía electrónica, los mutantes de *lpxK* revelan cambios morfológicos relacionados con la envoltura celular. Se describe que tiene lugar una acumulación tóxica de intermediarios del lípido A que impiden el crecimiento de la bacteria.

Conclusiones

- Las moléculas antisentido PNA y siRNA son capaces de inhibir parcialmente la expresión de la proteína MurA.
- Las moléculas antisentido PNA y siRNA son capaces de inhibir parcialmente la expresión de la proteína LpxB.
- Las moléculas de PNA son moléculas antisentido más eficaces sobre los genes *murA* y *lpxB* que las moléculas de siRNA.

Agradecimientos

La realización de este trabajo no habría sido posible sin la enseñanzas, tanto vitales como de la materia en cuestión, y el apoyo de un conjunto de personas que se pueden dividir en tres grupos sociales que aportan valores muy diferentes al igual que importantes a un servidor, estos grupos son: familia, amigos y trabajo.

En primer lugar quiero agradecerse a mi familia que me ha criado y me lo ha dado todo desde el momento de mi nacimiento. A mis padres Paloma y Arturo, por absolutamente todo, el valor de la fuerza de voluntad os lo debo a vosotros. A mis abuelos Milagros, Pilar y Manuel que me han cuidado en mis etapas iniciales y desde niño me han aportado valores tan importantes como la educación y el respeto y siempre se han preocupado por mi situación en el colegio, en un principio, y ahora en la facultad. A mi madrina Sita, solamente gracias a ti he podido financiarme este máster. A mis tíos Eugenia y Alberto, por ser unos referentes para mí a la hora de formarme y por aportarme un punto de vista respecto a la vida diferente al resto. A mi hermano Javi, gracias por esas tardes inolvidables de juegos. Y tampoco puedo olvidarme de ti, muchas gracias Bea, juntos podemos todo.

En segundo lugar quiero agradecerse a mis amigos Rubén, Javi, Manu, David, Jorge A., Jorge V., Carlos y Eloy. Cada uno con su punto fuerte como referencia estudiantil, diversión o salir a tomar algo. Gracias por estar aquí estos años, hacerme la vida más llevadera en los malos momentos y una locura en los buenos, sois todos y cada uno a su manera una fuente de felicidad.

Por último quiero agradecer este trabajo en primer lugar a todos los profesores, a mis compañeros del Máster de biología Molecular, Celular y Genética Ana, Blanca, Edu, Kelly, Marta, Patri, Pilar Robin, María, Paula, Lorena y Rebeca, hicimos un buen grupo humano nos ayudamos los unos a los otros y todos hemos conseguido sacar adelante este máster. Por otro lado tengo que agradecerles este trabajo a todas las personas del laboratorio de microbiología CHUAC-INIBIC, en especial a las siguientes personas del grupo de investigación: Soraya, Eva, Clara, Mariló, Juan, Astrid, Juan Carlos, Marta y Alex. Gracias por todo. Me he sentido realmente cómodo, he aprendido mucho y he conocido como funciona

un gran grupo humano que trabaja por y para la ciencia. Y como me iba a olvidar de vosotras, quiero hacer una mención especial para la Dra. Margita Poza, mi tutora del TFM, fuiste tú la que me has dado la oportunidad de poder vivir esta gran experiencia, muchas gracias. Laura, me has tenido que sufrir como novato y has sido la encargada de enseñarme, guiarme, solucionar dudas y vivir en tus propias carnes mis errores en los experimentos, muchas gracias por tu paciencia y por poner una sonrisa a cada error.

Gracias a todos.

Bibliografía

- 1- Montefour K, Frieden J, Hurst S, Helmich C, Headley D, Martin M, Boyle DA. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Crit Care Nurse* 2008; 28:15-25, quiz 26. PMID: 18238934
- 2- Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ, Pike R, Scott PT, Fishbain J, Craft D, Deve G, Riddell S, Lindler LD, Pitt TL. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2630-4. PMID: 16825400; <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00547-06>
- 3- Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin Infect Dis* 2008; 47:444-9. PMID: 18611157; <http://dx.doi.org/10.1086/590568>
- 4- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:538-82. PMID: 18625687; <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- 5- Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangerot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2006; 2:e7. PMID: 16415984; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>
- 6- Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 2008; 197:1079-81. PMID: 18419525; <http://dx.doi.org/10.1086/533452>
- 7- Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M. New treatment options against gram-negative organisms. *Crit Care* 2011; 15:215. PMID: 21457501; <http://dx.doi.org/10.1186/cc9997>

- 8-** Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, Chaves F, Bou G. Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 Carbapenemase, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17:1064-7. PMID: 21749771
- 9-** Al-Sweih NA, Al-Hubail MA, Rotimi VO. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *J Chemother* 2011; 23(1):13-6. PMID: 21482488
- 10-** Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32(2):149-67. PMID: 18194336
- 11-** Wei J-R, Richie DL, Mostafavi M, Metzger IV LE, Rath CM, Sawyer WS, Takeoka KT, Dean CR. LpxK Is Essential for Growth of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606: Relationship to Toxic Accumulation of Lipid A Pathway Intermediates. *mSphere* 2017; 2:e00199-17. PMID: 28815210
- 12-** Potaczek DP, Garn H, Unger SD, Renz H. Antisense molecules: A new class of drugs. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 137(5):1334-46. PMID: 27155029
- 13-** Wang H, He Y, Xia Y, Wang L, Liang S. Inhibition of gene expression and growth of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by antisense peptide nucleic acids. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(11):7535-41. PMID: 25091942
- 14-** Goh S, Boberek JM, Nakashima N, Stach J, Good L. Concurrent Growth Rate and Transcript Analyses Reveal Essential Gene Stringency in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 2009; 4(6): e6061; PMID: 19557168; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006061>
- 15-** Lopez C, Arivett BA, Actis LA, Tolmasky ME. 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):5798-803. PMID: 26169414
- 16-** Álvarez-Fraga L., Pérez A., Rumbo-Feal S., Merino M., Vallejo J. A., Ohneck E. J., Edelmann R, E., Beceiro A., Vázquez-Ucha J. C., Valle J., Actis L. A., Bou G., Poza M. Analysis of the role of the LH92-11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii*

strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence* 2016; 4:443-455;
PMID: 26854744; <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1145335>