

6.3 Descubrimiento de dianas antibacterianas inspiradas en bacteriófagos

Diapositiva 1

Bienvenido a la clase online sobre el descubrimiento de dianas antibacterianas inspiradas en bacteriófagos. La primera parte de la clase abordará el por qué es tan necesario el descubrimiento de nuevas dianas antibacterianas y la definición de diana antibacteriana. En la segunda parte, se explicará paso a paso la búsqueda de dianas antibacterianas utilizando los fagos como fuente de inspiración. Finalmente, comentaremos brevemente cómo se utilizan las dianas antibacterianas en el diseño de nuevos antibióticos para luchar contra las infecciones bacterianas.

Diapositiva 2

Recientemente, los medios de comunicación se han hecho eco del problema que supone la creciente resistencia de patógenos bacterianos frente a los antibióticos actualmente disponibles. Esto significa que las bacterias se han hecho insensibles a los antibióticos en uso, de modo que las infecciones bacterianas son mucho más difíciles de combatir. Por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud ha solicitado ayuda recientemente para publicar una lista de las bacterias frente a las cuales se necesitan nuevos antibióticos urgentemente. Entre otras, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* constituyen el grupo más peligroso de bacterias resistentes, frente a las cuales son esenciales nuevos antibióticos. El objetivo de esta lista es alentar a los investigadores a desarrollar nuevos antibióticos, que inhiban de forma específica dianas antibacterianas. Estas dianas se definen como proteínas o procesos que son esenciales para la supervivencia bacteriana, como por ejemplo la pared celular o los ribosomas. Además, las dianas deben ser susceptibles a la inhibición, de modo que los nuevos antibióticos deben inhibir la proteína o el proceso, y en último término, el crecimiento bacteriano. Una forma de encontrar nuevas dianas antibacterianas es el uso de bacteriófagos como fuente de inspiración. Como enemigos naturales de las bacterias, los fagos expresan varias proteínas tóxicas durante el ciclo de infección, que inhiben procesos esenciales bacterianos y convierten al hospedador en una máquina de producir fagos. Las proteínas fágicas tóxicas han sido seleccionadas durante el proceso evolutivo y son, por lo tanto, muy eficientes. La identificación de las dianas bacterianas de las proteínas tóxicas y la mimetización de su efecto tóxico pueden facilitar desarrollo de nuevos antibióticos.

Diapositiva 3

El descubrimiento de las dianas antibacterianas que son inhibidas por las proteínas fágicas tóxicas se puede dividir en tres etapas: Primero se secuencian los fagos específicos de cada especie bacteriana y después se lleva a cabo la predicción de los genes. Luego se identifican aquéllos que ejercen efecto antimicrobiano y, finalmente, se localizan las dianas bacterianas de los genes que codifican proteínas tóxicas. Estas tres etapas se discutirán ahora en detalle.

Diapositiva 4

Primero se elige un fago que infecte a la bacteria frente a la cual se quiere desarrollar un nuevo antibiótico. Por ejemplo, un fago que infecte a *Pseudomonas aeruginosa*. Después de obtener varios fagos de este tipo, se extrae el ADN fágico y se determina la secuencia de nucleótidos. En las etapas finales, se utilizan programas informáticos para predecir los genes que codifican las proteínas fágicas.

Diapositiva 5

En la segunda etapa se pretende averiguar qué genes fágicos codifican proteínas tóxicas para la bacteria de interés. Primero se construye un plásmido de expresión para cada uno de los genes fágicos predichos. Se trata de una pequeña molécula de ADN circular que contiene un único gen fágico. Después, se introducen los plásmidos en el citoplasma de la bacteria diana mediante transformación. A continuación, se activa la expresión de los genes fágicos, dando lugar a la producción de proteínas fágicas en el citoplasma bacteriano. Finalmente, para identificar las

proteínas que son tóxicas para la bacteria, se determina el crecimiento de la bacteria que contiene una determinada proteína fágica.

Diapositiva 6

La determinación del crecimiento bacteriano con objeto de identificar las proteínas fágicas tóxicas se puede realizar del siguiente modo: se observa tanto el crecimiento de la bacteria que no expresa la proteína como el de la que la expresa. Se supone que la bacteria que contiene el plásmido sin el gen tóxico crecerá normalmente. Por otro lado, para las bacterias que producen las proteínas fágicas existen dos opciones. Si pueden crecer con normalidad, las proteínas producidas no son tóxicas. Sin embargo, las bacterias no podrán crecer si las proteínas son tóxicas. Llevando a cabo este ensayo de crecimiento para cada gen fágico identificado, se pueden seleccionar los genes que codifican las proteínas fágicas tóxicas.

Diapositiva 7

Y ahora, ¿cómo podemos encontrar las proteínas bacterianas diana que son inhibidas por las proteínas fágicas tóxicas? Una manera de hacer esto es mediante un experimento de captura. En este experimento, una determinada proteína fágica tóxica se utiliza como cebo para capturar su proteína diana en la bacteria. Para ello, se inmoviliza la proteína fágica en una columna. A continuación se recoge una mezcla de todas las proteínas producidas por la bacteria de interés y se añade a la columna, permitiendo que interaccionen con las proteínas fágicas inmovilizadas. Las proteínas bacterianas que son reconocidas por proteínas fágicas serán retenidas en la columna, mientras que el resto se eluyen. Finalmente, las proteínas bacterianas retenidas pueden ser eluidas e identificadas. También pueden utilizarse otras técnicas para identificar las dianas antibacterianas, una vez que se ha determinado una proteína fágica tóxica. Un ejemplo lo constituye la técnica de interacción proteína-proteína denominada “sistema de doble híbrido” utilizada con este objetivo en el artículo de Wagemans y col.

Diapositiva 8

¿Cómo se utilizan las dianas antibacterianas de las proteínas fágicas tóxicas para desarrollar un nuevo antibiótico? Esto incluye la identificación de una pequeña molécula que mimetiza la acción de la proteína fágica tóxica, lo que significa que dicha molécula ejerce un efecto inhibitorio similar sobre la diana bacteriana. Las proteínas fágicas no pueden ser utilizadas directamente como antibióticos porque las proteínas son degradadas rápidamente durante la digestión en el tracto intestinal y no pueden penetrar en las células bacterianas. Las moléculas pequeñas, por otro lado, no pueden ser digeridas y son lo bastante pequeñas para penetrar en las células bacteriana y ejercer su efecto tóxico.

Diapositiva 9

Si os apeteciese leer más sobre resistencia a antibióticos y el uso de las proteínas fágicas tóxicas para nuevas dianas antibacterianas, se recomienda la siguiente bibliografía. Gracias por seguir esta clase online.