PERCEPCIÓN DE LUZ EN EL PATÓGENO HUMANO *Acinetobacter baumannii*: CONTRIBUCIÓN DEL GEN CRIPTOCROMO/FOTOLIASA

Pizzi, Abril[1]; Barbeito, Alma[2]; Giordano, Rocío[3]; Mussi, María Alejandra[4]; Perez Mora, Bárbara [5]

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI-CONICET) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FBIOyF-UNR)

Contacto: Abril_loana@hotmail.com

Palabras claves : A. baumannii, Sensibilidad, H_2O_2 , Fotoliasa, Fotorreparación

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii es un patógeno humano asociado a infecciones de alta morbilidad y mortalidad. Nuestro Grupo de Investigación ha demostrado que la luz azul modula globalmente la fisiología de *A. baumannii* a 23 °C mediante el fotorreceptor BlsA pero estudia, además, los mecanismos de percepción lumínica que suceden a diferentes temperaturas, independientes de BlsA. Se conoce que en el genoma de *A. baumannii* se encuentra codificada una proteína del tipo criptocromo/fotoliasa que podría estar involucrada en la regulación lumínica de la bioquímica y fisiología de este patógeno.

OBJETIVO

Evaluar el posible papel de la proteína criptocromo-fotoliasa (Cry) en respuesta al daño inducido por radiación ultravioleta y al estrés inducido por peróxido de hidrógeno sobre diferentes cepas de *A. baumannii* V15 y cepas mutantes para el gen que codifica a Cry.

METODOLOGÍA

Las cepas en estudio (crecimiento a 24° y 28°C) fueron:

- Cepa de *A. baumannii* **V15** (Wild Type WT)
- Cepa mutante por deleción del gen que codifica para la proteína criptocromo-fotoliasa (***Δcry***)
- Cepas wild type y mutante complementada con dicho gen para su sobreexpresión (**V15+pCry y *Δcry*+pCry**, respectivamente)
- Cepas control portadoras del plásmido vacío (**V15+pv y *Δcry*+pv**)

Daño por radiación UVB



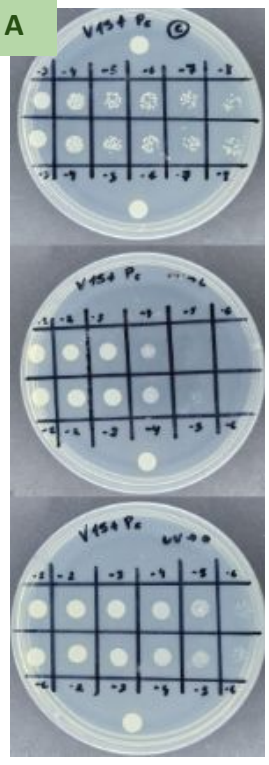
Figura 1. Ensayo de supervivencia frente al daño producido al ADN por la radiación UVB.
1: Overnight de la cepa a 37°C en el shaker. 2: medición de la DO. 3: dilución seriada con NaCl 0,9%. 4: sembrado de alícuotas de 10 ul en placas de LB. 5: se exponen a luz UVB por 2hs. 6: se las coloca a 28°C, una expuesta a luz azul y la otra en oscuridad por 1h. 7: se incuban en oscuridad a 28°C hasta el dia siguiente que se observan y cuentan las colonias. Las placas control se procesan de la misma manera que las placas tratadas con UVB, salvo la exposición a la luz UVB.

Estrés por Peróxido de Hidrógeno



Figura 2. Ensayo de sensibilidad frente al estrés provocado por peróxido de hidrógeno. 1: Overnight de la cepa a 37°C en el shaker. 2: medición de DO para llevarlo a 0,2 con LB. 3: se colocan 10 ml de soft agar en un falcon con 500 ul de la cepa. 4: se colocan 5 ml en cada placa con LB-agar. 5: una placa se lleva a temperatura (28 o 24°C) con luz azul y la otra en oscuridad. 6: se coloca discos con peróxido de hidrógeno 3% en cada placa. 7: se incuban las placas en oscuridad a temperatura (28 o 24°C) hasta el dia siguiente para observar los halos de inhibición del crecimiento de la cepa.

RESULTADOS PRELIMINARES



Cuantificación de UFC/ml de *A. baumannii* luego de ser expuestas a UVB-luz y UVB-oscuridad

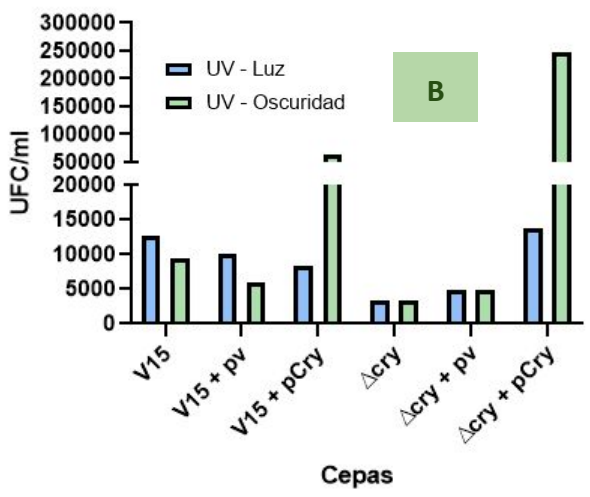


Figura 3. A: Crecimiento bacteriano de la cepa V15+pCry luego del tratamiento con UVB luz-oscuridad a 28°C.

B: Supervivencia de las cepas luego de ser expuestas a radiación UVB expresada en UFC/ml.

Inhibición del crecimiento de *A. baumannii* después de ser expuesta a *Luz-H_2O_2* y *Oscuridad-H_2O_2*

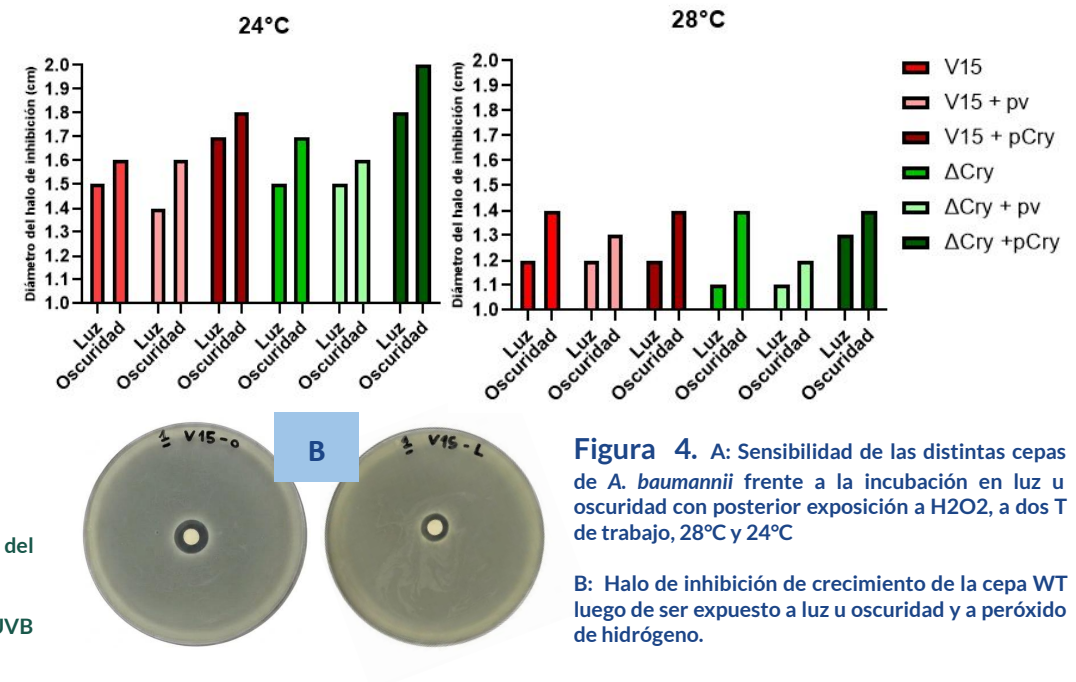


Figura 4. A: Sensibilidad de las distintas cepas de *A. baumannii* frente a la incubación en luz u oscuridad con posterior exposición a H2O2, a dos T de trabajo, 28°C y 24°C

B: Halo de inhibición de crecimiento de la cepa WT luego de ser expuesto a luz u oscuridad y a peróxido de hidrógeno.

CONCLUSIÓN

El gen *cry* desempeñaría un rol diferencial frente al daño inducido por radiación UVB y la posterior recuperación de las cepas en luz u oscuridad a 28°C. Las cepas V15+pCry y *Δcry*+pCry presentaron mayor sobrevida en oscuridad respecto a las cepas wild type y *Δcry*, sugiriendo que *cry* podría otorgar protección o participar en la reparación del daño inducido por UVB al DNA.

Respecto al estrés generado por peróxido de hidrógeno a 28°C, la sobreexpresión de *cry* no parecería desempeñar un papel diferencial. Sin embargo, se observó una mayor resistencia al H_2O_2 en los cultivos incubados previamente en luz respecto a los incubados en oscuridad. Este comportamiento también se observó a 24°C, aunque con menor magnitud. Cabe destacar que a esta temperatura, V15+pCry y *Δcry*+pCry presentaron mayor sensibilidad que WT y *Δcry*, sugiriendo que la sobreexpresión de *cry* aumenta la sensibilidad al estrés por H_2O_2.

En conjunto, los resultados sugieren una participación diferencial de Cry en la respuesta al daño por UVB y al estrés oxidativo, dependiendo de la iluminación y temperatura pero se requieren estudios adicionales para dilucidar su mecanismo de acción en ambos procesos.