UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Purificación e identificación de una proteína de unión al gen *ica*A, relacionada con la formación de biofilm en la cepa USA300 de *Staphylococcus aureus.*

Katterine Del Rosario Ospina García

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Biología
Instituto de Biotecnología
Maestría en Ciencias Microbiología
Bogotá, Colombia
2017

Purificación e identificación de una proteína de unión al gen *ica*A, relacionada con la formación de biofilm en la cepa USA300 de *Staphylococcus aureus.*

Katterine Del Rosario Ospina García

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Director:

JAVIER ANTONIO ESCOBAR PÉREZ, PhDc

Codirector:

JAIME EDUARDO CASTELLANOS PARRA, PhD

Línea de Investigación:

Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias.

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana

Universidad Nacional De Colombia
Facultad De Ciencias
Instituto De Biotecnología
Maestría Ciencias Microbiología
Bogotá D.C.
2017

No está en la naturaleza de las cosas que el ser humano realice un descubrimiento súbito e inesperado; la ciencia avanza paso a paso y cada persona depende del trabajo de sus predecesores

Ernest Rutherford

Agradecimientos

Al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque por brindarme el espacio y el apoyo necesarios para el desarrollo de este trabajo.

Al profesor Javier Antonio Escobar por sus enseñanzas y por contribuir con una parte fundamental de mi formación como profesional durante el proceso.

Al Laboratorio de Instrumentación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, en especial a la doctora Ana Lucia Castiblanco por su incondicional colaboración.

Al programa de Maestría Ciencias Microbiología, en especial a la doctora Marta Raquel Fontanilla Duque, por su ejemplo y motivación para realizar las cosas con pasión y entrega. Y a Socorro Prieto por su compromiso y apoyo fundamental con los estudiantes.

A Dios, a mis padres y a mis hermanas, les debo todo son la parte más importante de mi vida el motivo para mirar siempre más allá, soñar y alcanzar cada objetivo.

Resumen

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista de gran importancia clínica por su capacidad de causar infecciones agudas y crónicas. Este microorganismo tiene una extraordinaria capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos, dificultando su tratamiento. Adicionalmente, *S. aureus* puede formar biofilm (o biopelícula) por medio del operon *ica*, el cual está conformado por los genes *icaA, icaD, icaB e icaC*. Estudios previos analizando el gen *icaA* permitieron encontrar una secuencia palindrómica (SP) en su interior, la cual se encuentra altamente conservada en diferentes especies de *Staphylococcus* spp. Debido al reconocido papel de las secuencias palindrómicas en diversos procesos celulares, el objetivo de este trabajo fue determinar e identificar alguna proteína que se uniera a ésta secuencia palindrómica. Para lograrlo, se realizó un proceso de purificación de proteínas de unión a esta SP por medio de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés). El seguimiento de la proteína de unión (DNA-proteína) se realizó por medio de la técnica de cambio en la movilidad de la electroforesis (EMSA por sus iniciales en inglés) utilizando un oligonucleótido marcado que simulaba esta SP. Después del proceso de purificación, la proteína fue identificada a través de espectrometría de masas (MALDI-TOF). Una proteína hipotética de 114 aminoácidos fue identificada in *S. aureus* y un análisis bioinformático permitió establecer una alta homología con la proteína YheA de *Bacillus subtilis* y la presencia de un dominio YlbF. Este dominio es característico de las proteínas YheA, YlbF y YmcA, las cuales son reguladores transcripcionales relacionados con la formación del biofilm en *Bacillus subtilis*. Este estudio permitió la identificación de una nueva proteína (YheA), la cual puede estar involucrada en la regulación de la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* a través de la unión al gen *icaA*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus, biofilm, operón ica***,**

Abstract

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen of great clinical importance for its ability to cause acute and chronic infections. *Staphylococcus aureus* has an extraordinary ability to acquire resistance to antibiotics, making more difficult to treat its infections. In addition, this bacterium can form bioflm through the *ica* operon, which is constituted by the *icaA, icaD, icaB, and icaC* genes. A previously analysis of *icaA* gene has allowed to find an internal palindromic sequence (PS), which is highly conserved among different species of *Staphylococcus* spp. As it is known, the palindromic sequences play an important role between several cellular processes, in this sense, the aim of this study was to identify if any protein recognizes and binds to this PS. The identification process consisted of the following steps: first, purification by fast liquid chromatography of proteins (FLPC), the target protein was followed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a labeled oligonucleotide that mimicked this PS and second, target protein was identified by mass spectrometry (MALDI-TOF). A hypothetical protein of Amino acids 114 was identified in *S. aureus* and a bioinformatic analysis allowed to establish a high homology with the YheA protein from *Bacillus subtilis* and the presence of an YlbF domain. This domain is characteristic of YheA, YlbF, and YmcA proteins, which are transcriptional regulators related to the formation of the biofilm in *Bacillus subtilis*. This study allowed the identification of a protein new (YheA), which may be involved in the regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* through binding to the *icaA* gene.

Keywords: *Staphylococcus aureus, biofilm, ica operón*, *icaA.*

Contenido

Pág.

Resumen ..... **VIII**

Abstract ..... **IX**

Contenido ..... **X**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XVII**

Introducción **1**

1. Marco teórico y antecedentes **3**
1.1 Estado actual del tema de investigación 3
1.1.1 Generalidades de *Staphylococcus aureus* 3
1.1.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y el clon USA300 4
1.1.3 Características generales del biofilm en bacterias Gram positivas 6
1.1.4 Biofilm en *Staphylococcus aureus* y mecanismo de regulación 8
1.1.5 Secuencias palindrómicas y asociación DNA-proteínas 11
1.2 Antecedentes 12
1.2.1 Análisis de la secuencia palindrómica del gen *icaA* 12

2. Objetivos **14**
2.1 Objetivo general 14
2.2 Objetivos específicos 14

3. Materiales y métodos **16**
3.1 Estrategia experimental general 16
3.2 Cepa de referencia 17
3.3 Extracción de proteínas de *Staphylococcus aureus* USA300 17
3.3.1 Extracto de proteínas de *S. aureus* en crecimiento planctónico 17
3.3.2 Extracción de proteínas totales de S. aureus formando biofilm 18
3.3.3 Cuantificación de extractos de proteínas 18
3.4 Detección y seguimiento de la proteína por EMSA 19
3.4.1 Perfiles de proteínas de los extractos por SDS-PAGE 19
3.5 Purificación de la proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *icaA* por FPLC 20
3.5.1 Tratamiento de los extractos con sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) 20

3.5.2 Separación de proteínas por filtración en gel 21
3.5.3 Separación de proteínas por intercambio aniónico.....21
3.6 Identificación de la proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *icaA* 22
3.7 Análisis "*In silico*" de la proteína identificada.....22

4. Resultados.....25
4.1 Extractos de proteínas totales de bacterias en crecimiento planctónico y formando biofilm.....25
4.2 Detección de la interacción DNA-proteína entre la secuencia palindrómica del gen *icaA* y los extractos de proteínas de *Staphylococcus aureus* USA300 27
4.2.1 Detección optima de la sonda de DNA biotinilado (secuencia palindrómica) por quimioluminiscencia.....27
4.2.2 Detección de la interacción entre proteína y DNA en ensayos de EMSA 28
4.3 Purificación de una proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *icaA* de *Staphylococcus aureus* clon USA300.....29
4.3.1 Tratamiento con sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$).....29
4.3.2 Purificación por medio de cromatografía de filtración en gel.....30
4.3.3 Purificación por medio de cromatografía de intercambio aniónico.....32
4.3.4 Procedimiento completo de purificación de las proteínas de unión a la secuencia palindrómica.....32
4.4 Identificación de proteínas de las fracciones positivas en ensayos plantónicos y biofilm.....38
4.4.1 Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF 38
4.5 Análisis "*in silico*" de la proteína hipotética de *Staphylococcus aureus* USA300.....40
4.5.1 Búsqueda de homólogos en otras bacterias.....40
4.5.2 Función de las proteínas con el dominio YlbF en *Bacillus subtilis* 40
4.5.3 Proteínas asociadas el dominio YlbF en el genoma de *Staphylococcus aureus* USA300.....44
4.5.4 Predicción de la estructura secundaria, dominios transmembrana y relación YheA y YheB de USA3000 45
4.5.5 Predicción de la estructura terciaria de YheA de *Staphylococcus aureus* 48

5. Discusión.....52

6. Conclusiones y recomendaciones.....57
6.1 Conclusiones.....57
6.2 Recomendaciones.....58

A. Anexo: condiciones del corrido de FPLC en la columna de filtración en gel 59

B. Anexo: condiciones del corrido de FPLC columna de intercambio aniónico....61

C. Anexo: cromatografía de intercambio aniónico de un extracto total de proteínas con la columna UNOQ de BioRad. 62

Bajo el mismo protocolo usado con la columna anterior, se realizó la prueba para la columna de BioRad. Las fracciones fueron evaluadas mediante el seguimiento por EMSA y en el pico E en rojo, con un 38% de buffer B se obtuvo señal positiva. 62

D. Anexo: reproducibilidad de la técnica FPLC por filtración en gel para extractos totales de *Staphylococcus aureus* USA300 63

Bibliografía 65

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*, señala factores asociados con adherencia celular, invasión y daño de tejido, moduladores de la respuesta inmune. tomado de (21)..... 4
Figura 1-2 Ondas de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Desde la introducción de la penicilina la resistencia de *Staphylococcus aureus* se ha documentado en 4 ondas que incluyen: 1. Resistencia a penicilina, 2. Resistencia a meticilina (SCCmec), 3. Aparición variantes de SCCmec (II y III) 4. SCCmec IV y primeras cepas asociadas a la comunidad. Modificado de (28) 6
Figura 1-3 Esquema general de los pasos para la formación de biofilm en *Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus*. Se describen los pasos generales de la formación de biofilm que incluyen, adhesión celular, acumulación del biofilm, maduración y disrupción celular. Las células desprendidas del biofilm pueden dispersarse y colonizan nuevas superficies, iniciando un nuevo ciclo de formación de biofilm. Modificada de (45) (47). 8
Figura 1-4 Estructura del operón *ica*. Organización de los genes *ica* dentro del operón y principales reguladores de la transcripción y asociación de la función de las proteínas codificadas por sus genes *icaA, icaB, icaC* e *icaD,* con la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular PIA. Modificado (50). 9
Figura 1-5 Red de señalización multifactorial que regula la expresión del biofilm. Mecanismos de inhibición y activación de genes relacionados con la formación de biofilm, destacando procesos dependientes e independientes del operón *icaADBC* estudiados en *Staphylococcus aureus*. 11
Figura 1-6 Análisis de la secuencia palindrómica. Alineamiento múltiple de 6 especies de *Staphylococcus spp*. (*Staphylococcus aureus* USA300, *S. capitis, S. caprae, S. haemolyticus, S. epidermidis* y *S. lugdunensis*). El recuadro amarillo resalta la secuencia palindrómica de 12 nucleótidos que se conserva en las 6 especies y la flecha negra señala la sonda diseñada con la secuencia palindrómica encontrada. 13
Figura 3-1 Esquema metodológico general del proyecto...... 16
Figura 4-1 Seguimiento del proceso de extracción de proteínas de bacterias en crecimiento planctónico y formando biofilm. A. Tinción Gram de bacterias sin tratamiento (T0), Bacterias después de la digestión enzimática (T1) y Bacterias tratadas con lisis enzimática y un proceso de sonicación al 30% de amplitud (T2) . **B.** crecimiento

de células en biofilm a, 24, 48 y 72 horas. **C.** Adherencia del biofilm a las 24 horas, desprendimiento de las células adheridas para obtener los extractos de proteínas. 26
Figura 4-2 Perfil de proteínas de extractos de USA300 obtenidos con diferentes métodos de extracción y ajuste del ciclo de sonicación. 1. Extracción por lisis enzimática y ciclo de sonicación 30% de amplitud tiempo inicial, 15 s y tiempo final 30 s. **2.** Extracción por medio del reactivo B-PER. **3.** Lisis enzimática y ciclo de sonicación 70% de amplitud con tiempo inicial de 30 s y final de 30 s. **4.** Marcador de peso molecular de proteínas.....27
Figura 4-3 Detección de la señal de la sonda biotinilada por quimioluminiscencia. A. Ensayo de "*dot blot*" con diferentes cantidades de la sonda biotinilada, 100, 200, 500, 800, 1500 y 2000 fmoles respectivamente. El control positivo (C+) corresponde a la sonda concentrada (0.1 nmol/µl) **B.** Detección de diferentes cantidades de sonda de DNA (100, 300, 500, 800 y1500 fmoles), después de una separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (7%) y transferencia a membrana de nylon. 28
Figura 4-4 Migración diferencial de la sonda con diferentes cantidades de proteína. A. Cambio en la señal de la sonda con diferentes cantidades de proteína (mg) obtenidas en crecimiento planctónico. **B.** Retardamiento de la sonda con proteínas obtenidas en crecimiento planctónico (PL), EP1 y EP2 (extracto planctónico 1 y 2) y formando biofilm (BF), EB1 y EB2 (extracto en biofilm 1 y 2) utilizando 0,40 mg de proteína. C1 y C2 representan los complejos 1 y 2; respectivamente.....29
Figura 4-5 Comportamiento de la solubilidad de la proteína de unión a la sonda con diferentes porcentajes de saturación de sulfato de amonio. Se muestran los diferentes porcentajes de saturación evaluados en la fracción soluble y en la precipitada (P).....30
Figura 4-6 Separación de un extracto total de proteínas de USA300 por cromatografía de filtración en gel. A. Los números indican la localización de las fracciones representativas de cada pico que fueron evaluadas en el ensayo de retardamiento. **B**. EMSA de las fracciones de los diferentes picos obtenidos. La escala se manejó en unidades de absorbancia (UA). 31
Figura 4-7 Separación de un extracto total de proteínas de USA300 por cromatografía de intercambio aniónico. A. Cromatograma con el perfil de separación de proteínas obtenido. Las líneas discontinuas señalan el porcentaje del gradiente en que son eluidas las proteínas de los picos D y E en rojo. **B.** EMSA, de las fracciones 19 a 26 (70% a 85% del gradiente). Se utilizó como control positivo (+PL) un extracto de proteínas totales planctónico.....33
Figura 4-8 Separación de la proteína de interés en cromatografía de filtración en gel a partir de extractos planctónico y biofilm A. Cromatograma con el perfil de separación del extracto de proteínas planctónicas, 6 picos (A-F), el pico B en rojo señal las fracciones positivas (14,15 y 16). Escala en unidades de absorbancia (0-1,00 UA), **B.** seguimiento de la proteína en fracciones del pico B, PL+ (control positivo, extracto total plantónico), con la señal de los dos complejos (C1 y C2), **C.** perfil de separación del extracto de proteínas en biofilm, con 6 picos (A-F), el pico B en rojo señal las fracciones positivas (14,15 y 16) Escala en unidades de absorbancia (0-2,00 UA). **D** seguimiento de la proteína en las fracciones obtenidas a partir de un extracto de biofilm. Fracciones del pico B. BF (control positivo, extracto total de bacterias en biofilm).....35

Figura 4-9 Separación de proteínas de las fracciones positivas en filtración en gel (planctónicas) por intercambio aniónico y seguimiento de la proteína de interés. A. perfil de separación de las fracciones positivas en filtración en gel, las líneas discontinuas marcan el gradiente de B (88%) que coincide con el pico B en rojo con las fracciones analizadas (51 a 53). **B.** Seguimiento de las fracciones después de un corrido en la columna de intercambio aniónico, fracciones 51 y 52 positivas (C1). **C.** perfil de separación de las fracciones positivas en el EMSA, la flecha en rojo muestras las bandas representativas del corrido y a las cuales se realizó el proceso de secuenciación. 36
Figura 4-10 Separación por cromatografía de intercambio aniónico y seguimiento de la proteína de interés, a partir de fracciones de filtración en gel (biofilm). A. Cromatograma de intercambio aniónico de las fracciones positivas en filtración por gel de extractos en biofilm. Las líneas discontinuas señalan el porcentaje de buffer B (38%) del pico C en rojo, de las fracciones analizadas. **B.** Seguimiento por EMSA de las fracciones después de un corrido de intercambio. **C.** perfil de separación de las fracciones positivas en el EMSA, por SDS-PAGE, la flecha en rojo muestra la banda seleccionada para secuenciación por MALDI-TOF. 37
Figura 4-11 Identificación de la proteína P1. A. Espectro de masas del péptido M.AVNLYDYANQLEQALR.E, uno de los péptidos usados para la identificación de la proteína P1. **B.** Secuencia completa de la proteína P1 identificada. Los aminoácidos en rojo muestran los péptidos obtenidos en masas, las líneas moradas y amarillas indican los cortes con tripsina y el tamaño de cada péptido, con una cobertura de 71% de los 114 aminoácidos que la componen. 39
Figura 4-12 Búsqueda de homólogos para la proteína P1. A. Resultado de la búsqueda en la base de datos del GenBank usando BLAST-P, se destaca las proteínas con dominio YlbF descritas en *B. subtilis*. **B.** Alineamientos pareados de la secuencia P1 con cada una de las proteínas de *B. subtilis* que tienen el dominio YlbF,proteína YlbF (NP_389382.1), YheA (AFQ56895.1) y YmcA (AEP90854.1). Bs (*B. subtilis*), Sa (*S. aureus*). Encima de cada alineamiento se muestran los % de identidad y similitud, respectivamente. (*) Residuos completamente conservados, (:) residuos con propiedades fuertemente similares, (.) residuos con propiedades levemente similares. 41
Figura 4-13 Información de proteínas del dominio YlbF y análisis de YheA en *B. subtilis*. A. posible ruta de acción de YlbF y YmcA en la formación de biofilm de *B. subtilis*. Las líneas truncadas representan represión y las flechas activación. **B.** genes cercanos a la región del gen que codifica para la proteína YheA en el genoma de *B. subtilis* cepa NCIB 3610 (NZ_CM000488.1). En morado se observa la ubicación de YheA y YheB. En azul se señalan ylbF y ymcA. La figura muestra los números de acceso para los genes y proteínas en el NCBI. **C**. resumen de la información encontrada para las proteínas del dominio YlbF. 43
Figura 4-14 Localización de los genes *yheA, ylbf y ymcA* dentro del genoma de la cepa USA300 de *Staphylococcus aureus*. Ubicación de los genes dentro del genoma de USA300, para cada gen se muestra el "*locus_tag*" y el "*Id*" de las proteínas en el GeneBank. El nombre de los genes se encuentra en la parte superior, en azul. Rojo y morado. Las flechas blancas indican la dirección de la transcripción. Y en la parte inferior se encuentra el número de ubicación de cada gen dentro del genoma..... 45

Figura 4-15 Predicción de la estructura secundaria y posibles dominios transmembranales de la proteína YheA y YheB de S. aureus. A. Predicción de la estructura secundaria de YheA. **B.** Predicción de regiones transmembranales para YheA de *S. aureus*. **C.** estructura secundaria de la proteína YheB **D.** predicción de sitios transmembranales de YheB de *S. aureus*. **E.** posible relación de la proteína de interés YheA con YheB. Visualización de la forma de las proteínas con respecto a sus propiedades fueron obtenidas por medio de la herramienta bioinformática Protter. 47
Figura 4-16 Modelamiento de la estructura teciaria de la proteína yhea de *s. aureus*. A. estructura terciaria obtenida en I-tasser a partir de la secuencia de aminoacidos de YheA. modelo 1. (rojo) C-score= 0.46. Modelo 2 (naranja) C-score = -5. C-score, predice la calidad del modelo el valor mas alto representa el nivel mas alto de confianza (rango -5,2). Superposición de los dos modelos. **B.** Modelamiento de la estructura, conformacion de homodímeros de las alfa-hélices, a partir de los modelos 1 y 2. **C**. Rotación de los homodímeros de los modelos de YheA de *S. aureus*.....49
Figura 4-17 Estructura teciaria de las proteínas del dominio YlbF de *Bacillus subtilis* reportadas en el PDB. A Homodímero de la estructura terciaria reportada en PDB para Yhea, por cristalografia de rayos X. **B.** Estrucura tridimensional de YmcA reportada en PDB por cristalografia de rayos X, se reporta de igual forma como un homodímero. 50
Figura 4-18 Superposición de las estructuras homodiméricas de las proteínas del dominio Ylbf de *B. subtilis* y *S. aureus.* Modelamiento de tres estructuras superpuestas que incluyen: la proteína YmcA con estructura reportada, el modelo 1 de YheA en rojo y la proteína YheA con estructura reportada *B. subtilis* (verde). 51

Lista de tablas

Pág.

Tabla 4-1 Proteínas identificadas en las fracciones con retardamiento de la sonda. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (P1-P5). La función de cada una de las proteínas se obtuvo a partir de la consulta de cada una de estas proteínas en la base de datos de Swiss-pro y NCBI. 38
Tabla 4-2 Parámetros fisicoquímicos "*in silico*" de la proteína P1 de *S. aureus* y de las proteínas YlbF, YheA y YmcA de *B. subtilis.* Estos parámetros fueron obtenidos a partir de un análisis en el programa ProtParam disponible en (http://web.expasy.org/protparam). 42

Introducción

Staphylococcus aureus, es uno de los principales agentes etiológicos causante de una amplia variedad de infecciones, como superficiales en la piel y tejidos blandos y otras infecciones potencialmente invasivas que representan mayor riesgo para la vida (1, 2). Una de las características importantes que hacen de *S. aureus* uno de los patógenos humanos más exitoso, es que posee distintos factores de virulencia que le confieren gran capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped, y adquirir cada vez más resistencia a antibióticos y a diferentes agentes antimicrobianos (3). Normalmente coloniza el 30% de la población sana; las personas que siempre están colonizadas por este patógeno representan el 20%, y el 10% son considerados como portadores transitorios del microrganismo (4). Antes de la llegada y el uso clínico de los antibióticos, estas enfermedades eran la causa del 65 al 70% de la mortalidad, actualmente, con el uso de los antibióticos este porcentaje ha disminuido del 20 al 40% y sin embargo sigue siendo considerablemente alto (5). *S. aureus,* es el segundo causante de infecciones adquiridas en el hospital por cepas resistentes a meticilina (SARM-AH) después de las *Enterobacteriaceae* en países en desarrollo (6, 7). Adicionalmente, el surgimiento de *S. aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC) se ha convertido en una gran amenaza a nivel de salud pública en todo el mundo, variando entre el 1 y más del 50% en diferentes países con mayor prevalencia en niños que en adultos (8, 9). En países como, Estados Unidos, Reino Unido, Japón entre otros, parte de la población se encuentra colonizada de manera asintomática, representando una amenaza por la diseminación de infecciones (10). En Colombia también se ha reportado a este patógeno como el cuarto más frecuente en UCI y el segundo en el ambiente de hospitalización (11).

Por otra parte, el uso de dispositivos médicos, como catéteres, prótesis, válvulas cardíacas, ventiladores, entre otros, se ha convertido un factor de riesgo en los últimos años; las superficies de estos dispositivos son susceptibles a ser colonizadas por la bacteria llegando a establecerse y formar biofilm (12-14). *S. aureus* es uno de los principales microorganismos involucrados en infecciones asociadas a biofilm, mediante la formación de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, que conforman una comunidad celular organizada que favorece el éxito y la versatilidad del microorganismo para colonizar, evadir la respuesta inmune del huésped, incrementar la resistencia a agentes antimicrobianos y sobrevivir por largos periodos de tiempo, siendo más difícil de controlar (15). Se conocen diversos componentes moleculares responsables de inducir todas las capacidades de infección, prevalencia y resistencia de este microorganismo. Una red multifactorial de vías regulatorias controla la expresión del biofilm. El operón *icaABDC* es el principal componente genético que regula la expresión de biofilm. Los genes *icaA, icaD, icaB, icaC* e *icaR* codifican las enzimas encargadas de la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular (PIA) (16). Muchas investigaciones se han enfocado en los mecanismos formadores de biofilm, dependientes del operón *ica*. En el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB), de la universidad el Bosque, se identificó una secuencia palindrómica dentro del gen *icaA*, altamente conservada en 6 especies de *Staphylococcus*, de la cual se conoce también que existen proteínas capaces de reconocer esta secuencia. Por tanto, el objetivo de este estudio fue identificar una de las proteínas que podrían estar interactuando con la secuencia palindrómica del gen *icaA*, en la cepa USA300 de *Staphylococcus aureus*. Esta cepa resistente a meticilina, se considera la principal causa de infecciones adquiridas en la comunidad en Estados Unidos, Canadá y Europa (17), es fuertemente formadora de biofilm, contiene el operón *ica* y presenta resistencia a varios grupos de antibióticos (ß-lactámicos, macrólidos y tetraciclinas) (17, 18). De esta manera, la identificación de ésta proteína podría ser el primer paso para obtener información clave para comprender mecanismos que pueden influenciar el desarrollo de las estrategias que tienen patógenos como *Staphylococcus aureus* para evadir la respuesta inmune, hacerse cada vez más resistente y por consiguiente más difícil de tratar y controlar.

1. Marco teórico y antecedentes

1.1 Estado actual del tema de investigación

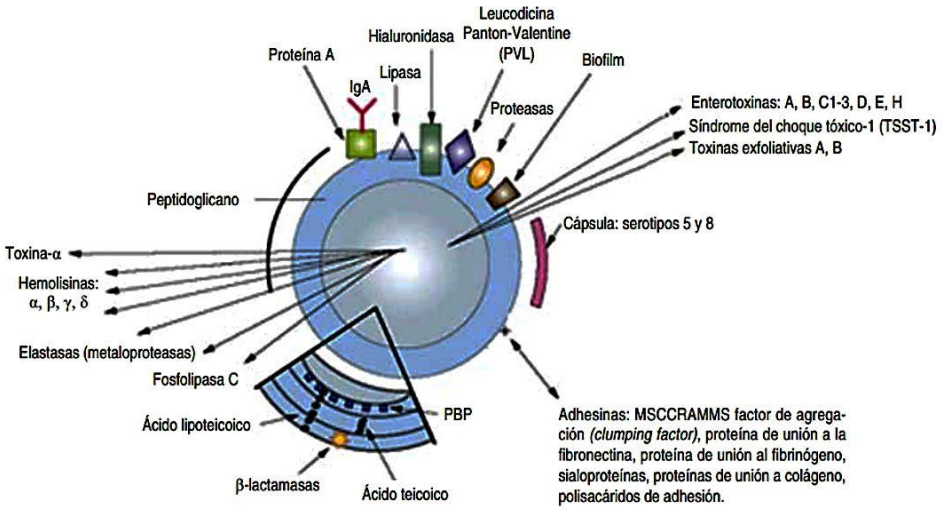
1.1.1 Generalidades de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria oportunista, Gram positiva, con forma de coco, sésil, no formador de esporas, aerobio y anaerobio facultativo y produce las enzimas coagulasa y catalasa, es resistente a condiciones ambientales adversas y a diferentes tipos de antibióticos (19). Fue descrita por primera vez en 1880 por el cirujano escocés Alexander Ogston, quien las observó cómo conglomerados similares a racimos de uvas; Más tarde en 1884, el físico alemán Friedrich Julius Rosenbac clasificó estas bacterias por la coloración que adquirían sus colonias. Una de ellas *S. aureus* (del latín aurum, oro), puede presentar una pigmentación de color amarillo por la presencia de β-carotenos (20, 21). Su genoma está constituido por un cromosoma circular de tres millones de bases y aproximadamente tres mil genes, incluyendo dentro de su genoma elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y el casete cromosómico estafilocócico que le confiere diferentes estrategias de resistencia a antibióticos (17, 22). *S. aureus* es uno de los patógenos que presenta mayor problema en salud pública a nivel mundial, se encuentra altamente diseminado en el ambiente, coloniza el 30% de la población sana, donde el principal nicho anatómico es la cavidad nasal que se reporta como el sitio portador más común. No obstante, también puede colonizar otras partes del cuerpo, como lo son las manos, periné, la faringe, las axilas, el cuello entre otras (4, 5).

Tiene la capacidad de generar un amplio rango de infecciones, algunas de ellas mortales, en pacientes hospitalizados y en personas sanas de la comunidad. Las bacteremias causadas por *S. aureus* son una de las más recurrentes y peligrosas en todo el mundo, estudios reportan que en Estados Unidos el 23% de las bacteremias son causadas por *S. aureus* (23). De igual forma, puede generar otras infecciones desde lesiones en tejidos, hasta enfermedades que amenazan la vida como la neumonía, endocarditis, síndrome de

shock tóxico, osteomielitis y sepsis (24) Estas enfermedades dependen del efecto multifactorial de enzimas y toxinas conocidas como factores de virulencia, que median la colonización del huésped, producen daño en la piel y en las mucosas, favorecen la diseminación del microorganismos y alteran la respuesta inmunológica del huésped. De acuerdo con su función estos factores de virulencia pueden estar involucrados en la adherencia a las células del huésped (proteínas de unión a fibronectina, colágeno y coagulasa), permiten la invasión de células y penetración de tejidos (hemolisinas β, γ y δ y toxina α) o inmunomoduladores (enterotoxinas estafilocócicas, la toxina de shock tóxico 1 TSST-1 y la leucocidina Panton-valentine PVL), (Figura 1-1) (25-27).

Figura 1-1 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*, señala factores asociados con adherencia celular, invasión y daño de tejido, moduladores de la respuesta inmune. tomado de (21).

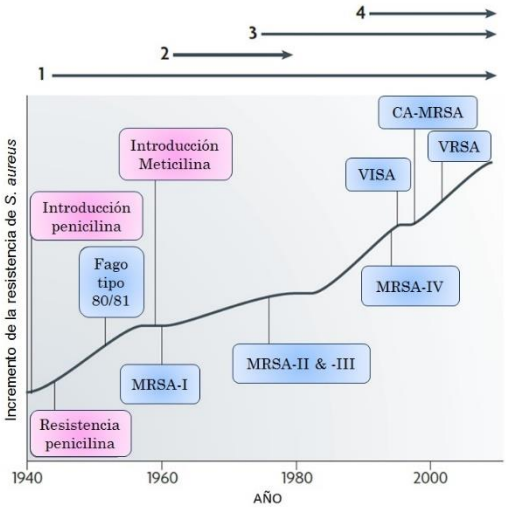


1.1.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y el clon USA300

El impacto clínico de *S. aureus* como principal causante de infecciones a nivel hospitalario y asociado a la comunidad, está relacionado con su capacidad de diseminarse y contaminar dispositivo de uso biomédico; sumado a esto las consecuencias sobre la salud se han incrementado con la resistencia de este microorganismo a múltiples antibióticos. La resistencia bacteriana ha sido un proceso que ha evolucionado continuamente desde el primer uso de la penicilina en la práctica clínica en 1940. A partir de este evento, el cambio en el perfil de resistencia que muestra *Staphylococcus aureus* ha sido descrito en

cuatro ondas de resistencia (Figura 1-2). La primera onda, inicia con la adquisición de un plásmido que codifica para una penicinilasa que hidroliza el anillo β- lactámico, necesario en la actividad antimicrobiana; en 1942 se detectó la primera cepa resistente a penicilina. La segunda onda inicia con el uso de una penicilina sintética en 1959, denominada Meticilina. Las primeras cepas resistentes a meticilina fueron detectadas en 1961, debido a la transferencia horizontal del gen *mecA* transportado por el elemento genético móvil, casete estafilocócico cromosomal (SCCmec, por sus siglas en inglés) (28). Este gen codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP) pero de baja afinidad (PBP, por sus siglas en inglés, PBP2a), que le confiere resistencia a la bacteria contra la mayoría de antibióticos ß-lactámicos (12, 13, 29). La tercera y cuarta onda se destacaron por la aparición de diferentes variantes del *SCCmec*, *SCCmecII, SCCmecIII* (SARM-II y SARM-III) y *SCCmecIV* (SARM-IV) respectivamente. La última onda se caracteriza por la aparición de las primeras cepas asociadas a la comunidad (SARM-AC). Estas cepas se han reportado como altamente virulentas, no presentan resistencia a antibióticos diferentes a los de tipo β-lactámico (fluoroquinolonas, clindamicina y tetraciclinas) y es de genotipo diferente a los reportados en el ambiente hospitalario (12). Estudios epidemiológicos las han reportado como las cepas más prevalentes, amplia y rápidamente distribuidas a nivel mundial (30-32). Existen diferentes clones de SARM que han sido detectados desde la aparición de la primera cepa. Uno de los clones ampliamente estudiados es el clon USA300, que se ha reportado como uno de los más importantes a nivel internacional, relacionándose principalmente con infecciones asociadas a la comunidad (33). USA300 se ha destacado por ser el clon predominante en la mayoría de las infecciones reportadas principalmente en piel y tejidos blandos (34) Reportes recientes han destacado un incremento en los aislamientos de USA300 en infecciones asociadas el uso de dispositivos biomédicos a causa de su capacidad de formar biofilm (35, 36).

Figura 1-2 Ondas de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Desde la introducción de la penicilina la resistencia de *Staphylococcus aureus* se ha documentado en 4 ondas que incluyen: 1. Resistencia a penicilina, 2. Resistencia a meticilina (SCCmec), 3. Aparición variantes de SCCmec (II y III) 4. SCCmec IV y primeras cepas asociadas a la comunidad. Modificado de (28)



1.1.3 Características generales del biofilm en bacterias Gram positivas

El biofilm es definido como una comunidad microbiana altamente estructurada con la capacidad de adherirse a superficies o a un sustrato (puede ser una interface inerte o viviente, son ubicuos), por medio de la auto-secreción de sustancias poliméricas extracelulares, que conforman una matriz de biopolímeros inducida mediante alteraciones en su fenotipo que influyen en el crecimiento, expresión de genes, producción de proteínas y replicación (15, 37, 38). Al adquirir este modo de vida inmóvil los microorganismos inmersos en el biofilm obtienen una ventaja que no tienen las bacterias en estado planctónico, tales como, aumento en la concentración de nutrientes, mecanismos para evadir el ataque del huésped y adquirir mayor resistencia frente a la presencia de antimicrobianos. Estas ventajas hacen que estas bacterias sean difíciles de erradicar, convirtiéndose en un severo problema a nivel de salud pública (39).

De acuerdo al tipo de microorganismo se ha demostrado que el biofilm puede tomar ciertas características particulares. Dentro de las especies más estudiadas se destacan *Bacillus spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp*, y bacterias ácido lácticas que alternan en diferentes formas, componentes de la matriz y fenotipo (15). También se conoce que el

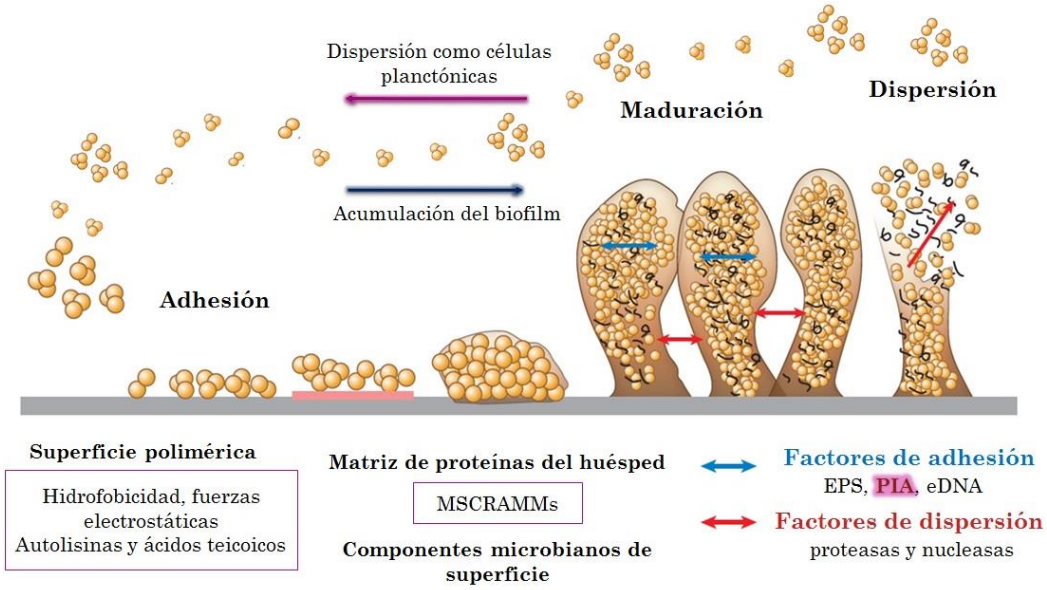
biofilm puede estar conformado por más de una especie —biofilm de especies mixtas— como el de *L. monocytogenes* y *S. aureus* (40).

El biofilm en especies como *B. subtilis* es particularmente diferente al que desarrollan otras especies como *S. aureus*. Formando colonias de biofilm en interfaz aire-agar o flotando en interfaz aire-liquido. El operón *eps* produce el principal componente del biofilm en *B. subtilis* —el exopolisacarido— de igual forma, es importante notar existen células funcionalmente distintas dentro de la matriz, células flageladas y en esporulación, que son expresadas dependiendo de las alteraciones ambientales que este enfrentando el microorganismo (41, 42).

La formación de biofilm es un proceso estructurado y regulado de forma multifactorial, por diferentes mecanismos de comunicación bacteriana como los procesos de "*quorum sensing*" o autoinducción; en este caso un péptido señal es liberado al medio, donde es reconocido por receptores, alterando la expresión de genes que influyen en la manifestación de diferentes fenotipos (43). En diferentes especies de *Staphylococcus*, se ha reportado un sistema de regulación mediado por el gen accesorio regulador *agr* (por sus siglas en inglés), cuya inactividad tiene un impacto positivo en la formación de biofilm (2, 44).

Se han descrito diferentes etapas para la formación del biofilm que conforman un ciclo de procesos organizados, desde la adherencia hasta la dispersión de células que se encargarán de colonizar nuevos lugares. 1. Unión (inespecífica) inicial de las bacterias a la superficie a través de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y fuerzas de Lifshitz - van der Waals (utilizando componentes de la pared bacteriana, como los ácidos teicóicos y el peptidoglicano). 2. Formación de monocapas de bacterias mediante la unión célula-célula, generalmente a través de proteínas de adhesión transmembranales. 3. Maduración del biofilm con la formación de agregados celulares y la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) constituyentes principales de la matriz y 4. Desensamblaje parcial del biofilm, liberación y migración de algunas células, las cuales pueden colonizar otro sitio e iniciar nuevamente el ciclo (45, 46), (Figura 1-3). La activación de la dispersión del biofilm está mediada principalmente por un sistema de "*quorum sensing*", que en bacterias Gram positivas se realiza a través del operón *Agr* (2).

Figura 1-3 Esquema general de los pasos para la formación de biofilm en *Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus*. Se describen los pasos generales de la formación de biofilm que incluyen, adhesión celular, acumulación del biofilm, maduración y disrupción celular. Las células desprendidas del biofilm pueden dispersarse y colonizan nuevas superficies, iniciando un nuevo ciclo de formación de biofilm. Modificada de (45) (47).

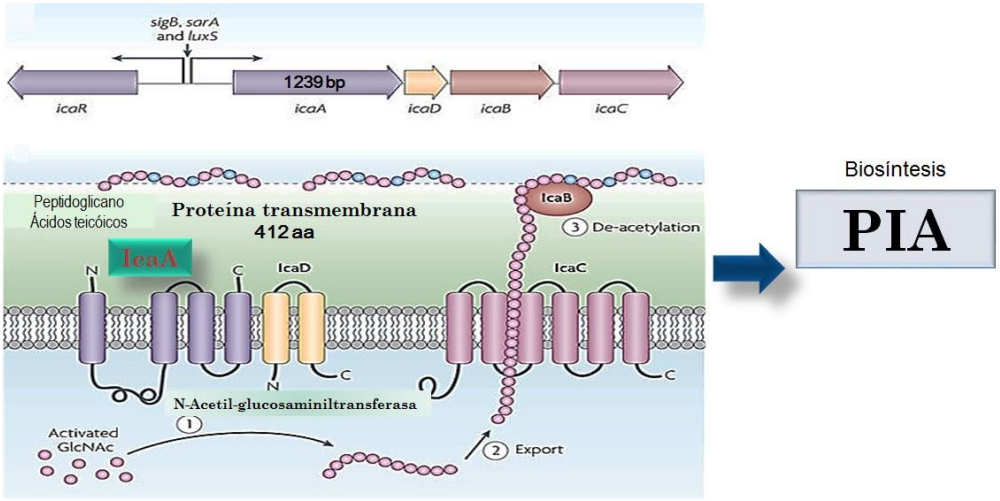


1.1.4 Biofilm en *Staphylococcus aureus* y mecanismo de regulación

El desarrollo de biofilm en *S. aureus* es regulado por complejas interacciones de factores genéticos que controlan la agregación bacteriana dentro de una matriz de polisacáridos extracelulares, DNA extracelular y proteínas, que le permiten adherirse a las superficies, como en el caso las prótesis y otros dispositivos biomédicos. Dentro de estas sustancias, el polisacárido de mayor interés en muchos estudios en biofilm es el polisacárido de adhesión intercelular o poli- N-acetilglucosamina (PIA/PGNA), cuya síntesis y ensamblaje es regulado por el operón *icaADBC*. Este operón ha sido el componente genético relacionado con la formación de biofilm más estudiado; sin embargo, existen otros mecanismos independientes de *ica* que también inducen la formación de biofilm, estos involucran la sobreexpresión de varias proteínas de adhesión como las proteínas de unión a fibronectina A y B (FnBPA, FnBPB) y la proteína asociada a biofilm (Bap). Estos

mecanismos de producción de biofilm pueden además estar influenciados por factores externos en el ambiente generados por el huésped como respuesta al estrés por la infección bacteriana, uno inducido por estrés osmótico (altas concentraciones de NaCl) el cual favorece la activación del operón *ica*; y el otro en condiciones de acidez (dado por concentraciones moderadas de glucosa) involucra principalmente proteínas de adhesión (48, 49).

Figura 1-4 Estructura del operón *ica*. Organización de los genes *ica* dentro del operón y principales reguladores de la transcripción y asociación de la función de las proteínas codificadas por sus genes *icaA, icaB, icaC* e *icaD,* con la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular PIA. Modificado (50).



El mecanismo de formación de biofilm dependiente del operón *icaADBC* está relacionado con la síntesis de PIA —un glicosaminoglicano unido por enlaces β-1,6, frecuentemente encontrados en la naturaleza— fue inicialmente descrito en *Staphylococcus epidermidis*, y hoy se sabe que su función se conserva ampliamente en *S. aureus* (51, 52). El operón ica está conformado por los genes *icaA, icaD, icaB, icaC e icaR*. La trascripción del operón *icaADBC* se inicia a partir del promotor del gen *icaA*, de modo que la inactivación de cualquiera de los genes que conforman el operón reduce la formación de biofilm. El gen *icaA* codifica para una proteína similar a una N-acetilglucosaminiltransferasa, la co-expresión de *IcaA* con *IcaD* incrementa la actividad para producir una cadena activa de monómeros de N-acetilglucosamina (53), cuya elongación depende de la proteína IcaC que al parecer es una proteína integral de membrana y puede estar involucrada en la translocación de PIA a través de la membrana citoplasmática. IcaB está codificada por el

gen *icaB* y es una proteína de superficie que actúa posiblemente como una deacetilasa debido a que en el polisacárido PIA un 15% a 20% de los residuos de azúcar se encuentran desacetilados (49, 50) (figura 1-4).

La transcripción de *icaADBC* está regulada por el gen *icaR*, el cual se encuentra localizado corriente arriba del gen *icaA* y tiene homología con la familia de proteínas de reguladores transcripcionales, TetR. Este gen es transcrito de manera divergente a los genes biosintéticos del operón y ha sido descrito como un regulador negativo de la transcripción, pues codifica para una proteína que se une al promotor del operón ica, exactamente corriente arriba del codón de iniciación de la proteína *IcaA* (49, 54); Jefferson y colaboradores en el 2004 reportaron que mutaciones del gen *icaR*, generan un incremento en la producción de PIA.

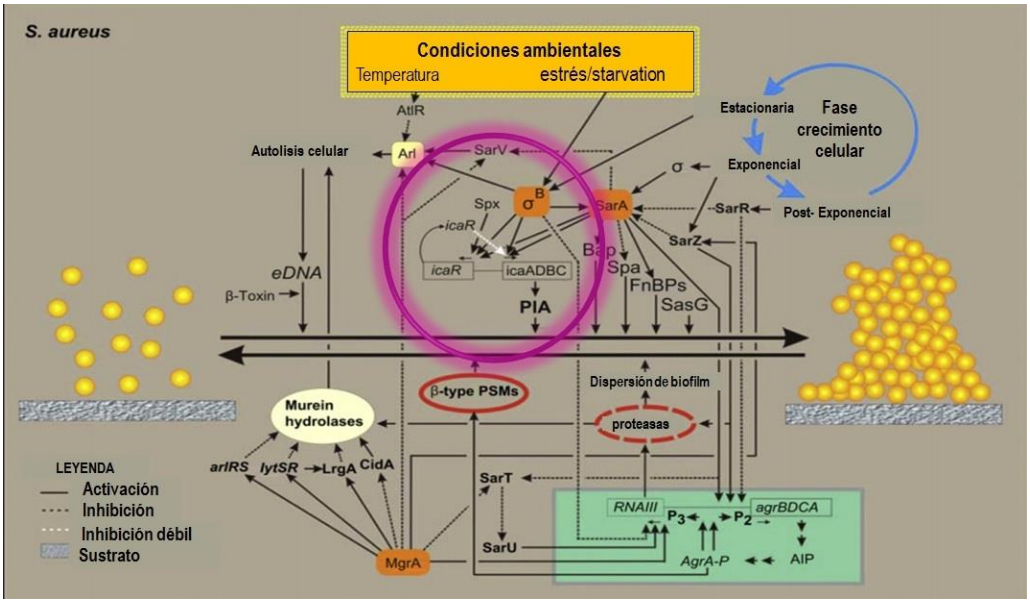
La expresión de otros factores asociados a la regulación de biofilm como el locus *sarA* codifica para la proteína SarA (Staphylococcal accessory regulator A), y es requerida para la transcripción del operón ica en *S. aureus* y *S. epidermidis*, actuando como un regulador positivo de la expresión del operón por un mecanismo independiente de *icaR* (55) otros factores como el gen accesorio regulador sigB, LuxS, TcaR, entre otros, están relacionados con los procesos reguladores de la formación de biofilm a través del operón ica (36, 49).

Recientemente se han estudiado nuevos genes involucrados con la formación de biofilm por mecanismos dependientes de *ica.* Tal es el caso del gen *rbf* que codifica para una proteína de 716 aminoácidos que favorece la formación de biofilm por un proceso de activación indirecta de la expresión de *icaADBC,* mediado por la proteína SarX que se une a la región codificante del gen *icaA,* demostrando que esta proteína junto con Rbf conforman una cascada de regulación que favorece la expresión de PIA (56) (57).

Por otra parte, existen mecanismos de formación de biofilm independientes del operón *icaADBC,* que están principalmente asociados a proteínas de adhesión celular, implicadas en la formación de biofilm (45); dentro de las más estudiadas se encuentra la proteína asociada a biofilm (Bap), estas proteínas se encuentran principalmente ancladas a la pared celular y posiblemente interactúan con otras proteínas de las células cercanas para mantenerlas unidas (58). Las proteínas de unión a fibronectina (FnBPs), se han identificado como un componente proteico del biofilm que se forma en presencia de glucosa y promueve la acumulación intercelular. O' Neill y colaboradores en el 2008 reportaron que mutaciones en FnBPs, reducen la formación de biofilm en cepas SARM y

no en cepas sensibles a meticilina (SASM). Muchos otros mecanismos han sido descritos para el proceso de formación de biofilm en *S. aureus,* Arciola y colaboradores en el 2012 resumen todos estos mecanismos conformando una compleja red de activadores e inhibidores que definen la expresión del fenotipo de biofilm (Figura 1-5).

Figura 1-5 Red de señalización multifactorial que regula la expresión del biofilm. Mecanismos de inhibición y activación de genes relacionados con la formación de biofilm, destacando procesos dependientes e independientes del operón *icaADBC* estudiados en *Staphylococcus aureus*.



1.1.5 Secuencias palindrómicas y asociación DNA-proteínas

Las secuencias palindrómicas son fragmentos de ADN que tienen la misma secuencia en su hebras sentido y anti-sentido leídas desde sus extremos 5’ a 3’. Se han estudiado por estar involucradas en diferentes procesos celulares fundamentales como: el reconocimiento de endonucleasas de restricción y proteínas relacionadas con la fisiología del DNA, la expresión de genes en secuencias policistrónicas y la formación de estructuras secundarias como “harpins” que tienen una importancia funcional a nivel trascripcional; todos estos procesos han sido descritos en bacterias (59-61). Han sido reportadas principalmente en regiones intergénicas como secuencias repetitivas que por su naturaleza

palindrómica y por ser altamente conservadas tienen características apropiadas para el reconocimiento de proteínas y se ha destacado de igual forma que estas secuencias podrían ser las responsables de la expresión diferencial de genes en operones, y se han encontrado también en regiones codificantes (62) (63).

De igual manera, es importante destacar la importancia de estudiar la asociación de DNA-Proteína, teniendo en cuenta que estas no funcionan como unidades biológicas separadas sino que su interacción está involucrada con funciones esenciales de las células. Estos procesos incluyen: Transcripción, traducción, regulación de la expresión génica, empaquetamiento de ácidos nucleicos y formación de la maquinaria celular, como los ribosomas.

El estudio de la interacción DNA-proteína se puede evidenciar de forma experimental. Dentro de las técnicas más utilizadas se encuentran los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), inmunoprecipitación de cromatina convencional (ChIP), cristalografía de rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). A estas técnicas se ha sumado el reciente crecimiento del uso de herramientas bioinformáticas para la predicción de estructuras y funciones, basados en los análisis de las características de la secuencia y homologías (64).

Al comparar las funciones reportadas en las secuencias palindrómicas se destacan muchas de las también mencionadas en la interacción DNA- proteína. De modo que, se debe resaltar por estas razones, la importancia de este estudio como avance preliminar a la descripción de una posible funcionalidad de la proteína identificada y su interacción con el DNA de la secuencia palindrómica del gen *icaA*.

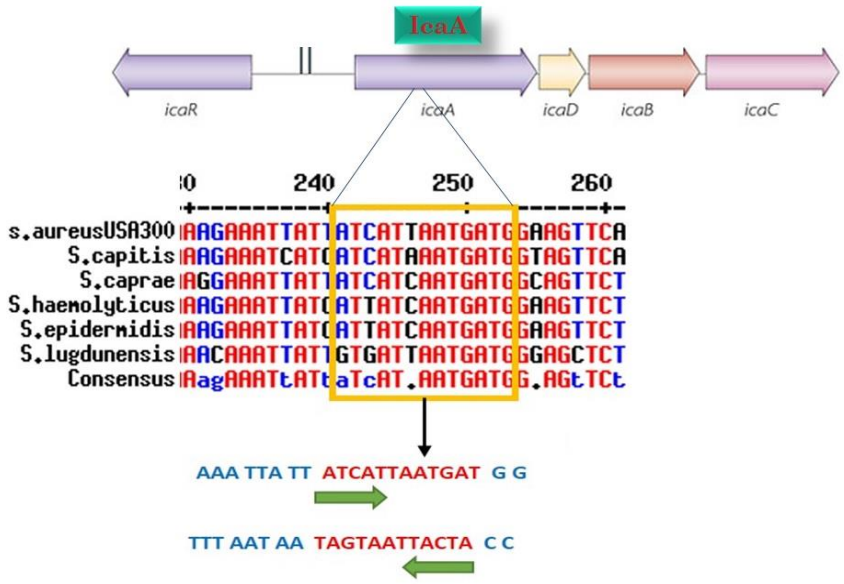
1.2 Antecedentes

1.2.1 Análisis de la secuencia palindrómica del gen *icaA*

Un análisis bioinformático de la secuencia palindrómica encontrada 240 nucleótidos corriente abajo del gen *icaA* de la cepa USA300, mostró que secuencias de este gen disponibles para 6 especies de *Staphylococcus spp* en la base de datos del GeneBank (NCBI), se encuentran altamente conservadas según el alineamiento múltiple realizado en

estos estudios previos (Figura 1-6) a partir de estos hallazgos, fue diseñada una sonda que contiene la secuencia palindrómica para posteriores ensayos de unión a proteínas. Adicionalmente se debe destacar que en estos análisis se encontró que la secuencia es capaz de formar estructuras secundarias y además se encontró en dos regiones intergénicas del genoma de USA300 (65).

Figura 1-6 Análisis de la secuencia palindrómica. Alineamiento múltiple de 6 especies de *Staphylococcus spp*. (*Staphylococcus aureus* USA300, *S. capitis, S. caprae, S. haemolyticus, S. epidermidis* y *S. lugdunensis*). El recuadro amarillo resalta la secuencia palindrómica de 12 nucleótidos que se conserva en las 6 especies y la flecha negra señala la sonda diseñada con la secuencia palindrómica encontrada.



En estos estudios anteriores se demostró experimentalmente que en efecto existen proteínas capaces de interactuar con la secuencia palindrómica en ensayos de EMSA, y la unión al parecer es especifica (65). De esta menara y considerando que la secuencia palindrómica es altamente conservada y podría estar cumpliendo una función importante en la regulación de la formación de biofilm, se plantearon los objetivos de este trabajo enfocados en la identificación de al menos una de estas proteínas con la secuencia estudiada en el gen *icaA* de *S. aureus* USA300.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar una proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *ica*A posiblemente relacionada con la regulación de la formación de biofilm, en el clon USA300 de *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos específicos

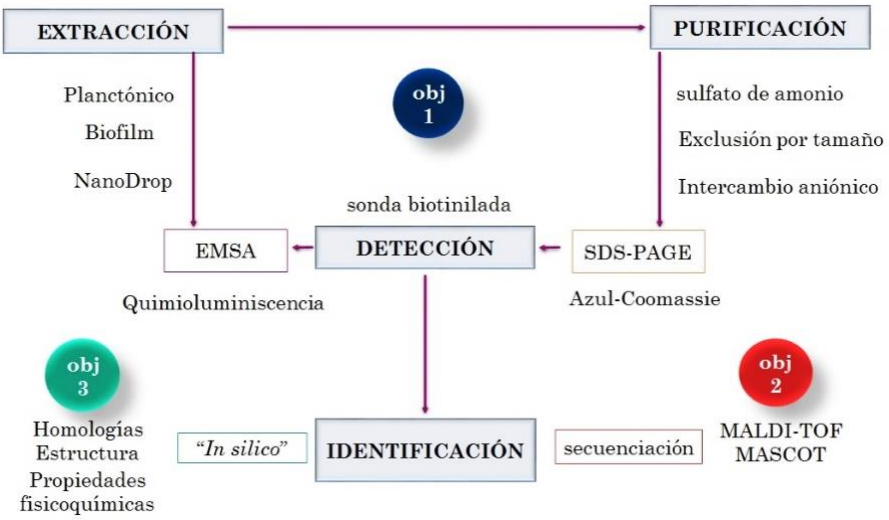
- Purificar al menos una proteína que se asocie a la secuencia del gen *ica*A del clon USA300 de *Staphylococcus aureus,* en estado plantónico y formando biofilm.
- Identificar la proteína purificada que presente sitios de unión al gen *ica*A del clon USA300 de *Staphylococcus aureus*.
- Predecir *in silico* la función hipotética de la proteína y su posible participación en la regulación del operón *ica*

3. Materiales y métodos

3.1 Estrategia experimental general

De acuerdo a los objetivos de este proyecto se identificó una proteína que tiene una posible interacción con la secuencia palindrómica del gen *ica*A. Para ello se obtuvieron extractos de proteínas totales de la bacteria en crecimiento planctónico y formando biofilm, a partir de los cuales se realizó un proceso de purificación incluyendo los siguientes pasos: precipitación con sulfato de amonio y cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés), específicamente, cromatografía de filtración en gel e intercambio aniónico. Después de cada paso de purificación, el seguimiento de la proteína se hizo por medio de EMSA y SDS-PAGE. Posteriormente se realizó una selección de las posibles proteínas de interés purificadas en las cromatografías y separadas en geles de SDS-PAGE 1D, de los cuales fueron seleccionadas las bandas e identificadas a través de espectrometría de masas (MALDI-TOF). Finalmente, se realizó un análisis "*in silico"* de cada una de las proteínas identificadas y se determinó cuál de ellas puede ser la que reconozca la secuencia palindrómica, adicionalmente se hizo una descripción de sus principales características y predicción de su estructura secundaria y terciaria. En la figura 3-1 se muestra un esquema de la metodología general desarrollada durante la investigación.

Figura 3-1 Esquema metodológico general del proyecto.



3.2 Cepa de referencia

En estudio se utilizó la cepa USA300-0114 de *Staphylococcus aureus*, resistente a Meticilina (SARM), principalmente relacionada con infecciones adquirido en la comunidad (SARM-AC). USA300-0114 de *S. aureus*, se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y se ha reportado por presentar una mayor capacidad de virulencia y por ser buena formadora de biofilm (33, 35).

3.3 Extracción de proteínas de *Staphylococcus aureus* USA300

Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos de bacterias en crecimiento planctónico y formando biofilm, como se describe en seguida.

3.3.1 Extracto de proteínas de *S. aureus* en crecimiento planctónico

Debido a que no se conoce ninguna característica específica de la proteína excepto la posible interacción con la secuencia palindrómica del gen *ica*A, la purificación se realizó a partir de extractos de proteína totales de la cepa USA300 en crecimiento planctónico en fase estacionaria. Las bacterias fueron cultivadas en agar BHI (Brain Heart Infusion por sus siglas en inglés) por agotamiento durante 24 horas a 37°C, seguido a esto se seleccionaron dos o tres colonias de esta siembra que fueron inoculadas en 5ml de caldo BHI y se incubaron a 37°C en agitación (200 rpm) por 24 horas. Posteriormente se centrifugó la suspensión bacteriana a 4000 rpm durante 7 minutos, se retiró el sobrenadante y se realizó una digestión enzimática con lisostafina a una concentración final de 50 µg/ml y lisozima a una concentración de 1 mg/ml, adicionalmente se agregó a la reacción un inhibidor de proteasas a 50 µg/ml por cada ml de bacterias. Esta reacción fue incubada por una hora a 37°C y posteriormente se llevó a cama de hielo por 20 minutos. Para obtener el extracto se completó la disrupción celular por medio de una lisis mecánica, en un homogeneizador ultrasónico (socincs, vibra cell VCX130), con ciclos de 2 minutos a una amplitud de 30% con un pulso inicial de 30 segundos y final de 15 segundos cada uno (cada ciclo se repitió 3 veces por extracto) para esto la lisis fue suspendida en 500 µl de buffer de sonicación (Tris HCl 0,1 mM, pH 6,8). La muestra permaneció en hielo durante los ciclos de sonicación, con el fin de disipar el calor generado por el ultrasonido.

Finalmente los extractos fueron centrifugados a 10000 gravedades por 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se descartó el precipitado. Finalmente se realizó un seguimiento de la integridad celular durante el proceso de lisis, por medio de la técnica de tinción de Gram; este procedimiento fue realizado a las células en cultivo, y después de realizar los tratamientos con enzimas y de igual forma después de la sonicación. Adicionalmente se evaluaron otros métodos de extracción utilizando el reactivo B-PER de Thermo Scientific™, según las especificaciones del fabricante. Se basa principalmente en tres pasos; primero, el uso de detergente en Tris Buffer, sin componentes enzimáticos. Segundo, lisis bacteriana. Tercero la limpieza y purificación de cuerpos de inclusión. El otro método evaluado fue una modificación en la amplitud del ciclo de sonicación que fue realizada al 70%. Los efectos en los extractos de cada método fueron verificados mediante el análisis del perfil de separación por SDS-PAGE.

3.3.2 Extracción de proteínas totales de S. aureus formando biofilm

Para obtener las proteínas de *S. aureus* formando biofilm, se sembró una dilución 1:50 en caldo BHI a partir de una suspensión bacteriana con un estándar de turbidez de 0.5 en escala McFarland (10^8 UFC/ml). El medio BHI fue suplementado con glucosa al 1% (66), el crecimiento se realizó en cajas de Petri de poliestireno de 9 cm de diámetro. El cultivo se incubó durante 24, 48 y 72 horas a 37°C (67) con el fin de decidir cuál es mejor condición para el desarrollo del biofilm. Posteriormente se hicieron tres lavados con agua destilada estéril a la superficie del biofilm para remover células no adheridas. Seguido a esto, las células adheridas se desprendieron con la ayuda de una espátula de plástico. Una vez se realizó este proceso, las bacterias fueron colectadas en un tubo ependorff de 2ml, centrifugadas a 10000 gravedades por 10 minutos a 4°C y lisadas mediante digestión enzimática y mecánica, de la misma manera descrita anteriormente. Los extractos fueron centrifugados para remover restos celulares, sustancias y componentes insolubles.

3.3.3 Cuantificación de extractos de proteínas

Los extractos se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) a 280 nm en mg de proteína por ml de extracto. Una vez cuantificados se almacenaron a -80°C hasta su uso o fueron procesados inmediatamente.

3.4 Detección y seguimiento de la proteína por EMSA

La presencia de la proteína de interés durante el proceso de extracción y purificación fue detectada y analizada en cada una de las muestras por medio de un ensayo de cambio en la movilidad de electroforesis. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado en el estudio de interacciones DNA-Proteína, en análisis de regulación de genes, replicación y recombinación del DNA. El EMSA, es un método altamente sensible que se basa en la migración diferencial de un fragmento de DNA marcado (sonda), solo y en presencia de una proteína que se una a él (68, 69). Para esto, se utilizó una sonda de DNA (22 pb) de cadena doble que simula la secuencia palindrómica del gen *ica*A; esta sonda fue diseñada y sintetizada en estudios previos realizados en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad el Bosque, la cual tiene una molécula de biotina unida covalentemente a su extremo 5´. La biotina permitió la detección de la sonda por quimioluminiscencia, para lo cual se realizó un ensayo de "*Dotblot*" con diferentes cantidades de sonda entre 100 y 2000 fmol, para seleccionar la cantidad óptima de detección. Las mismas cantidades de sonda fueron evaluadas tras un proceso de hibridación con cantidades equimolares de las secuencias sentido y anti-sentido de la sonda en buffer TE (1O mM Tris-HCl, pH 7.5. 1mM EDTA), durante 5 minutos a 80°C, seguido de una hora de incubación a temperatura ambiente (70, 71). Para la interacción proteína-DNA, se realizó una mezcla con buffer de unión 5X, BSA (Bovine Serum Albumin, por sus siglas en inglés), la sonda hibridada y el extracto de proteínas que fueron incubados a 37°C por 30 minutos. Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 7% en condiciones no denaturantes. Los complejos de Sonda-proteína se transfirieron a una membrana de Nylon Hybond N^+ (Amersham) para su posterior detección por quimioluminiscencia, con el uso del estuche comercial LightShift™ Chemiluminescent EMSA, según las especificaciones del fabricante (72). Este proceso de seguimiento, se realizó para cada paso de purificación, para lo cual se evaluaron diferente cantidades de proteína y se verificó la cantidad óptima detectada, con extractos de bacterias plantónicas y en biofilm.

3.4.1 Perfiles de proteínas de los extractos por SDS-PAGE

Los perfiles de proteínas fueron evaluados por medio de la técnica de electroforesis en condiciones denaturantes —SDS-PAGE— usando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN® tetra cell de Bio-Rad. El montaje del sistema se realizó de acuerdo a las

condiciones estandarizadas previamente en el laboratorio. Los geles de poliacrilamida, concentrador y separador, fueron preparados a una concentración de 5% y 12% respectivamente. Las muestras se prepararon con la misma cantidad de proteína de acuerdo al volumen total de la mezcla que contiene Buffer Laemmli, SDS 10% y H_2O destilada-desionizada estéril. Posteriormente, las muestras con las proteínas se calentaron durante 10 minutos a 95°C y fueron centrifugadas por un minuto. Se sembraron 15 µl de cada muestra en los pozos y 3 µl del marcador de peso PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Los corridos fueron llevados a cabo con 60 y 80 Voltios durante 1 hora y 20 minutos. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 durante 2 horas a temperatura ambiente (73) y se decoloraron con una solución de ácido acético y metanol.

3.5 Purificación de la proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *icaA* por FPLC

La purificación de la proteína fue desarrollada por medio de una cromatografía rápida líquida de proteínas (FPLC) utilizando primero la exclusión por tamaño y luego las fracciones positivas se separaron por intercambio aniónico (74); Esto previo a un tratamiento con sulfato de amonio como primer paso de purificación. La presencia de la proteína de interés fue evaluada después de cada proceso por medio de un seguimiento por EMSA y SDS-PAGE (69) como se describió anteriormente.

3.5.1 Tratamiento de los extractos con sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$)

Como primer paso del proceso de purificación de la proteína de unión a *ica*A, los extractos totales de proteínas de USA300 fueron tratados con sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación entre el 20 y el 100% de ($(NH_4)_2SO_4$), (teniendo en cuenta las cantidades de sulfato de amonio que serán adicionadas para obtener un porcentaje de saturación a 0°C, según lo reportado por Englard and Seifter (1990), y adaptado por Dawson y colaboradores en 1969, para determinar la concentración a la cual se conserva la solubilidad de la proteína de interés y se mantiene intacta la señal (75, 76) . Seguido a esto los extractos con sulfato de amonio fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C; se rescató el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en buffer TRIS-HCl pH: 7.5.

3.5.2 Separación de proteínas por filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel o exclusión por tamaño, es una técnica que permite la elución diferencial de proteínas de acuerdo a sus pesos moleculares, en este caso las proteínas no tienen ningún tipo de interacción química con la fase estacionaria que conforma una red de poros donde son retenidas. Las moléculas de mayor tamaño no son retenidas, son eluidas en menor cantidad de tiempo a diferencia de las partículas más pequeñas que se retienen por un tiempo prolongado (77). Para esto se utilizó un quipo FPLC BioLogic DuoFlow™ de BioRad, con una columna Superose® 6 HR 10/30 (Pharmacia®), con inyecciones 500ul de muestra conteniendo 3 a 4 mg de proteínas, el corrido se efectuó con un flujo de 0,3 ml/min y se colectaron fracciones de 1 ml como se describe en el protocolo (anexo A). Las proteínas fueron eluidas con buffer A (Tris-HCl 20mM pH 7.5) (78) y el resultado del seguimiento con EMSA arrojó señales de unión sonda - proteína en fracciones que fueron seleccionadas para continuar con el proceso de purificación.

3.5.3 Separación de proteínas por intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio aniónico permite la separación de las proteínas de acuerdo a su carga eléctrica; requiere de una fase estacionaria cargada positivamente que permite el intercambio de iones con las proteínas de carga negativa y las que se quedan unidas electrostáticamente se separan de la matriz estacionaria con la ayuda de un buffer con alta fuerza iónica que neutralice las cargas negativas y permita eluir las proteínas. Se utilizó una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia®), para los ensayos de extractos planctónicos; para los ensayos con biofilm se obtuvo en el laboratorio una nueva columna de intercambio, UNO Q1 BIORAD. El buffer A carga (Tris-HCl 20mM pH7.5) y el buffer B de elusión (Tris-HCl 20 mM pH 7.5 más NaCl 1 M) (78, 79) fueron utilizados para las dos columnas, con un flujo de 1 ml/min y un gradiente lineal de 0 a 100% de buffer B, los detalles del corrido se especifican en el protocolo (anexo B). La presencia de la proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *ica*A y el perfil de proteínas en las fracciones, fueron analizados por EMSA y por SDS-PAGE respectivamente.

3.6 Identificación de la proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *icaA*

Una vez se obtuvo el gel de SDS-PAGE (1D) con el perfil de proteínas separadas de las fracciones positivas para la interacción DNA-proteínas, las bandas de interés fueron escogidas y cortadas, teniendo en cuenta el uso de material completamente, nuevo y libre de contaminantes que interfieran con la identificación, realizada por la técnica de espectrometría de masas (ms/ms), MALDI-TOF-TOF. (80), estos ensayos se realizaron en colaboración con el instituto Pasteur de Uruguay, Montevideo. Realizando una primera disrupción de la secuencia por digestión enzimática con tripsina que realiza cortes en los residuos de lisina y arginina (K y R). Al obtener el patrón del espectro de masas los análisis de estos resultados fueron realizados a través del motor de búsqueda MASCOT, que utiliza el péptido correspondiente a la masa más representativa de cada espectro. A partir de este péptido se realizó un proceso de alineamiento para identificar a que proteína corresponde, y obtener de esta manera la secuencia completa de la proteína de interés.

3.7 Análisis "*In silico*" de la proteína identificada.

Con la proteína identificada se realizó un análisis "*In silico*", para esto se utilizaron herramientas disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov, los alineamientos múltiples fueron ejecutados mediante herramientas de alineamientos de la base de datos EMBL-EBI como Clustal OMEGA para realizar alineamientos múltiples, EMMBOS Water (local) y EMMBOS Needle (global), para los alineamientos pareados. Se evaluaron además, características fisicoquímicas como hidrofobicidad, punto isoeléctrico, masa molecular, contenido de aminoácidos, entre otras, por medio de bases de datos de proteínas como UniProt http://www.uniprot.org/ y la herramienta "ProtParam" de ExPASy. Los dominios, familias y búsqueda de homólogos en otras bacterias, fueron obtenidos con la ayuda de herramientas como BLAST-P y la base de datos Pfam http://pfam.xfam.org/ (81). Para los análisis de estructura y función fueron utilizadas herramientas como TMpred, para la predicción de regiones transmembranales, MINNOU para la predicción de estructuras secundarias y características de la secuencia de aminoácidos, como el nivel de accesibilidad al solvente (82). Para tener un acercamiento a la estructura terciaria y posible

función se utilizó la herramienta de predicción I-TASSER (83); el modelamiento de dímeros y superposiciones de las estructuras se realizó con los programas PyMOL | www.pymol.org versión estudiantil y UCSF Chimera Home Page - RBVI.

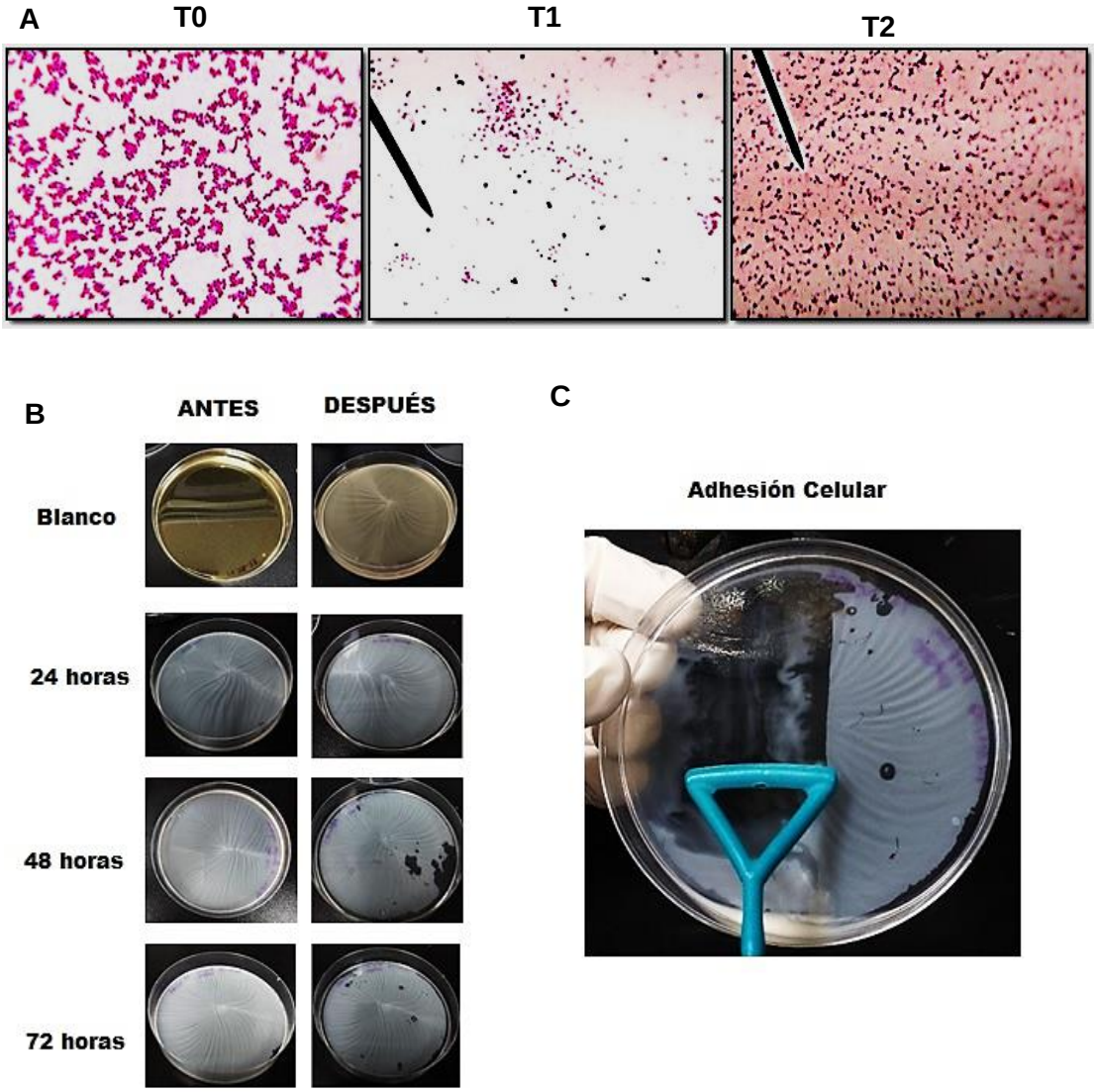
4. Resultados

4.1 Extractos de proteínas totales de bacterias en crecimiento planctónico y formando biofilm

Los extractos de proteínas fueron obtenidos de un cultivo de células bacterianas en crecimiento planctónico y formando biofilm, seguido de una lisis enzimática y mecánica por ultrasonido. Se obtuvieron extractos con concentraciones de aproximadamente 26 mg/ml y 40 mg/ml respectivamente. La integridad bacteriana fue evaluada por medio de la tinción de Gram donde se observó un proceso de degradación de las células bacterianas durante tres tiempos de extracción T0, T1 y T2 (Figura 4-1 A). En T0 es posible observar la morfología característica de bacterias Gram positivas, formando agregaciones celulares similares a racimos de uvas. Después de la lisis enzimática y con el tratamiento por ultrasonido (T1 y T2) se pierden esas agregaciones y finalmente solo se observan únicamente restos celulares.

El biofilm fue evaluado a las 24, 48 y 72 horas, teniendo una mejor adhesión del biofilm a las 24 horas, la cual se conservó aún después de los lavados (figura 4-1 B y C) con 48 y 72 horas las bacterias fueron desprendidas fácilmente después de realizar los lavados, además se tuvo en cuenta que la mayor expresión de genes se da en las primeras horas de la formación del biofilm, como ha sido reportado en la literatura (84). El proceso de degradación celular después de colectar las células en biofilm, fue realizado como se mencionó anteriormente para el ensayo con bacterias planctónicas. Finalmente los extractos fueron realizados con cultivos de biofilm de 24 horas y por cada 5 cajas se obtuvo un extracto de 1ml y 40 mg/ml aproximadamente de concentración de proteínas.

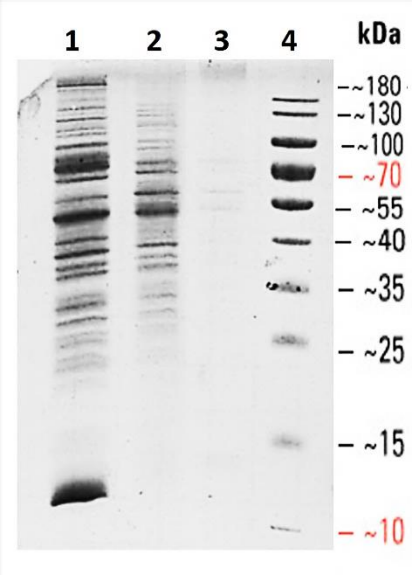
Figura 4-1 Seguimiento del proceso de extracción de proteínas de bacterias en crecimiento planctónico y formando biofilm. A. Tinción Gram de bacterias sin tratamiento (T0), Bacterias después de la digestión enzimática (T1) y Bacterias tratadas con lisis enzimática y un proceso de sonicación al 30% de amplitud (T2) . **B.** crecimiento de células en biofilm a, 24, 48 y 72 horas. **C.** Adherencia del biofilm a las 24 horas, desprendimiento de las células adheridas para obtener los extractos de proteínas.



Adicionalmente, fueron evaluados dos métodos diferentes de extracción de proteínas, con el reactivo B-PER y lisis enzimática (lisozima y lisostafina), con diferentes porcentajes de amplitud al 30 y 70%. Según el perfil de proteínas mostrado en la figura 4-2, el mejor método fue el de la lisis enzimática con un ciclo de sonicación de 30% de amplitud,

permitiendo observar el perfil de proteínas completo comparado con los demás métodos evaluados.

Figura 4-2 Perfil de proteínas de extractos de USA300 obtenidos con diferentes métodos de extracción y ajuste del ciclo de sonicación. 1. Extracción por lisis enzimática y ciclo de sonicación 30% de amplitud tiempo inicial, 15 s y tiempo final 30 s. **2.** Extracción por medio del reactivo B-PER. **3.** Lisis enzimática y ciclo de sonicación 70% de amplitud con tiempo inicial de 30 s y final de 30 s. **4.** Marcador de peso molecular de proteínas.



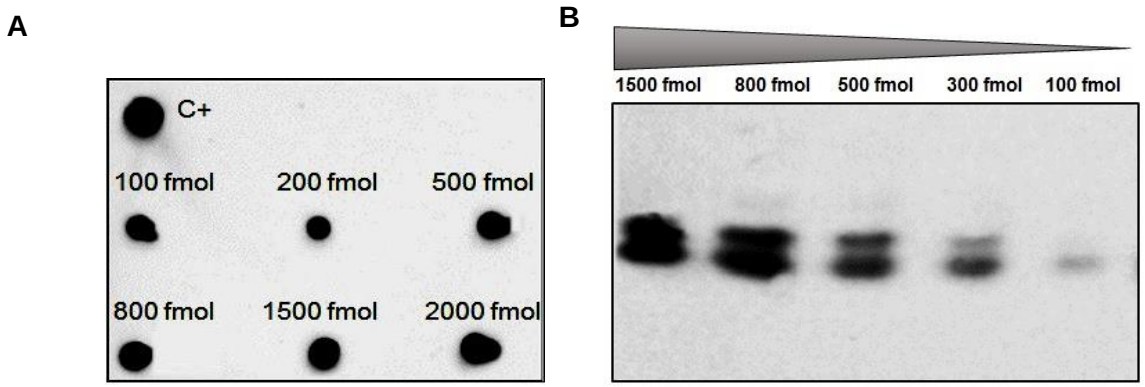
4.2 Detección de la interacción DNA-proteína entre la secuencia palindrómica del gen *icaA* y los extractos de proteínas de *Staphylococcus aureus* USA300

4.2.1 Detección optima de la sonda de DNA biotinilado (secuencia palindrómica) por quimioluminiscencia

Para el seguimiento de la proteína, se utilizó una sonda de DNA (22pb) que incluye la secuencia palindrómica del gen *icaA.* Para evaluar esta unión se determinó experimentalmente la cantidad de sonda mínima que se detecta por medio de un ensayo de "*DotBlot*" en membrana de Nylon y también por separación en gel de poliacrilamida y transferencia a una membrana Nylon. En el primer ensayo, la sonda se puede detectar

desde los 100 fmoles y cambios poco perceptibles pueden observarse desde los 800 fmoles hasta los 2000 fmoles, tal vez ocasionados por la saturación de la quimiolumiscencia (figura 4-3 A). De igual manera en el segundo ensayo, la cantidad mínima de sonda detectada fue de 300 fmoles, con un aumento gradual de la señal hasta los 1500 fmoles (figura 4-3 B). Teniendo en cuenta que en los ensayos de retardamiento la intensidad de la señal de la sonda se dividirá en varias partes del gel, de acuerdo a la cantidad de complejos formados, se decidió utilizar 1500 fmoles de sonda para los experimentos de purificación de sus proteínas de unión.

Figura 4-3 Detección de la señal de la sonda biotinilada por quimioluminiscencia. A. Ensayo de "*dot blot*" con diferentes cantidades de la sonda biotinilada, 100, 200, 500, 800, 1500 y 2000 fmoles respectivamente. El control positivo (C+) corresponde a la sonda concentrada (0.1 nmol/µl) **B.** Detección de diferentes cantidades de sonda de DNA (100, 300, 500, 800 y1500 fmoles), después de una separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (7%) y transferencia a membrana de nylon.

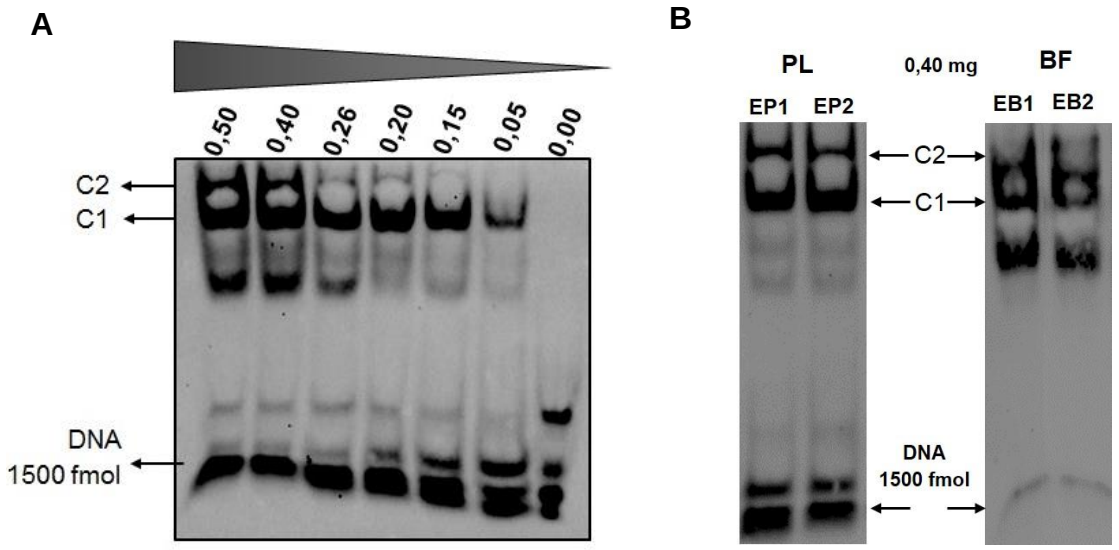


4.2.2 Detección de la interacción entre proteína y DNA en ensayos de EMSA

Con la sonda de DNA y los extractos de proteínas, mediante ensayos de cambio en la movilidad de electroforesis se evaluó la interacción entre la sonda y la proteína con diferentes cantidades de la misma. La detección de la señal de retardamiento dependió de

la cantidad de proteína, observándose un aumento en la detección proporcional a la cantidad de proteína. A partir de los 0,40 mg de proteína se hicieron visibles dos complejos C1 y C2 (figura 4-4 A), con cantidades inferiores solo se detectó el complejo 1, razón por la cual los ensayos posteriores se realizaron 0,40 mg de proteínas totales. Por otro lado, dos complejos de similar migración en gel fueron identificados a partir de un extracto de proteínas de la bacteria formando biofilm (figura 4-4 B)

Figura 4-4 Migración diferencial de la sonda con diferentes cantidades de proteína. A. Cambio en la señal de la sonda con diferentes cantidades de proteína (mg) obtenidas en crecimiento planctónico. **B.** Retardamiento de la sonda con proteínas obtenidas en crecimiento planctónico (PL), EP1 y EP2 (extracto planctónico 1 y 2) y formando biofilm (BF), EB1 y EB2 (extracto en biofilm 1 y 2) utilizando 0,40 mg de proteína. C1 y C2 representan los complejos 1 y 2; respectivamente.



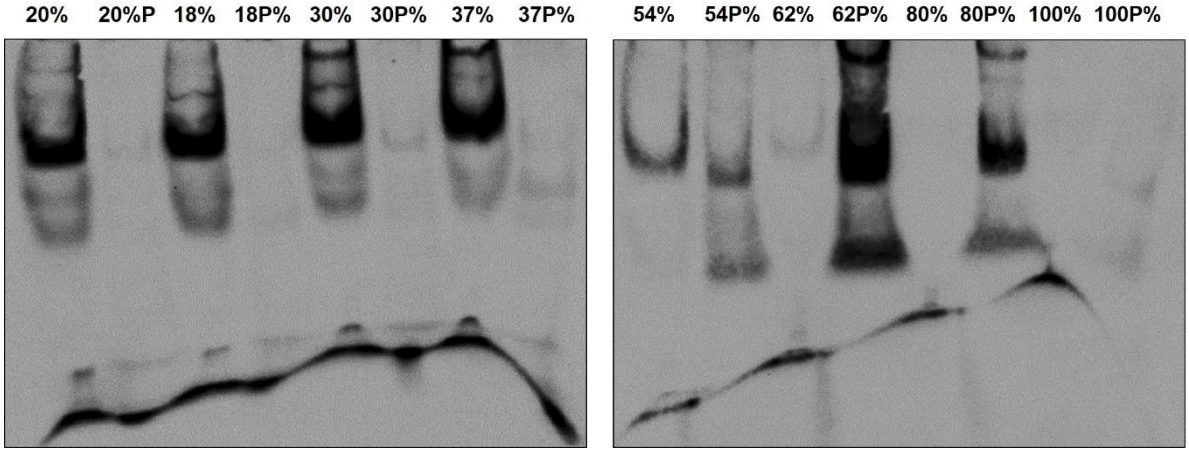
4.3 Purificación de una proteína de unión a la secuencia palindrómica del gen *icaA* de *Staphylococcus aureus* clon USA300.

4.3.1 Tratamiento con sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$).

Como primer paso en el proceso de purificación, se realizó un tratamiento con sulfato de amonio en diferentes porcentajes de saturación con el objetivo de hallar la concentración

máxima a la cual mantener la proteína solubilizada y no precipitada teniendo en cuenta el porcentaje de saturación a 0°C, según lo reportado por Dawson *et al* 1969. Se utilizaron porcentajes de saturación entre el 20 y el 100% de ($(NH_4)_2SO_4$), al realizar el seguimiento por EMSA, se encontró que hasta un 37% de saturación la proteína se encontraba completamente soluble. En contraste, con porcentajes mayores al 50% la proteína comienza a estar en el sobrenadante y el precipitado, al 62% de saturación la señal aparece completamente en el precipitado (figura 4-5).

Figura 4-5 Comportamiento de la solubilidad de la proteína de unión a la sonda con diferentes porcentajes de saturación de sulfato de amonio. Se muestran los diferentes porcentajes de saturación evaluados en la fracción soluble y en la precipitada (P).

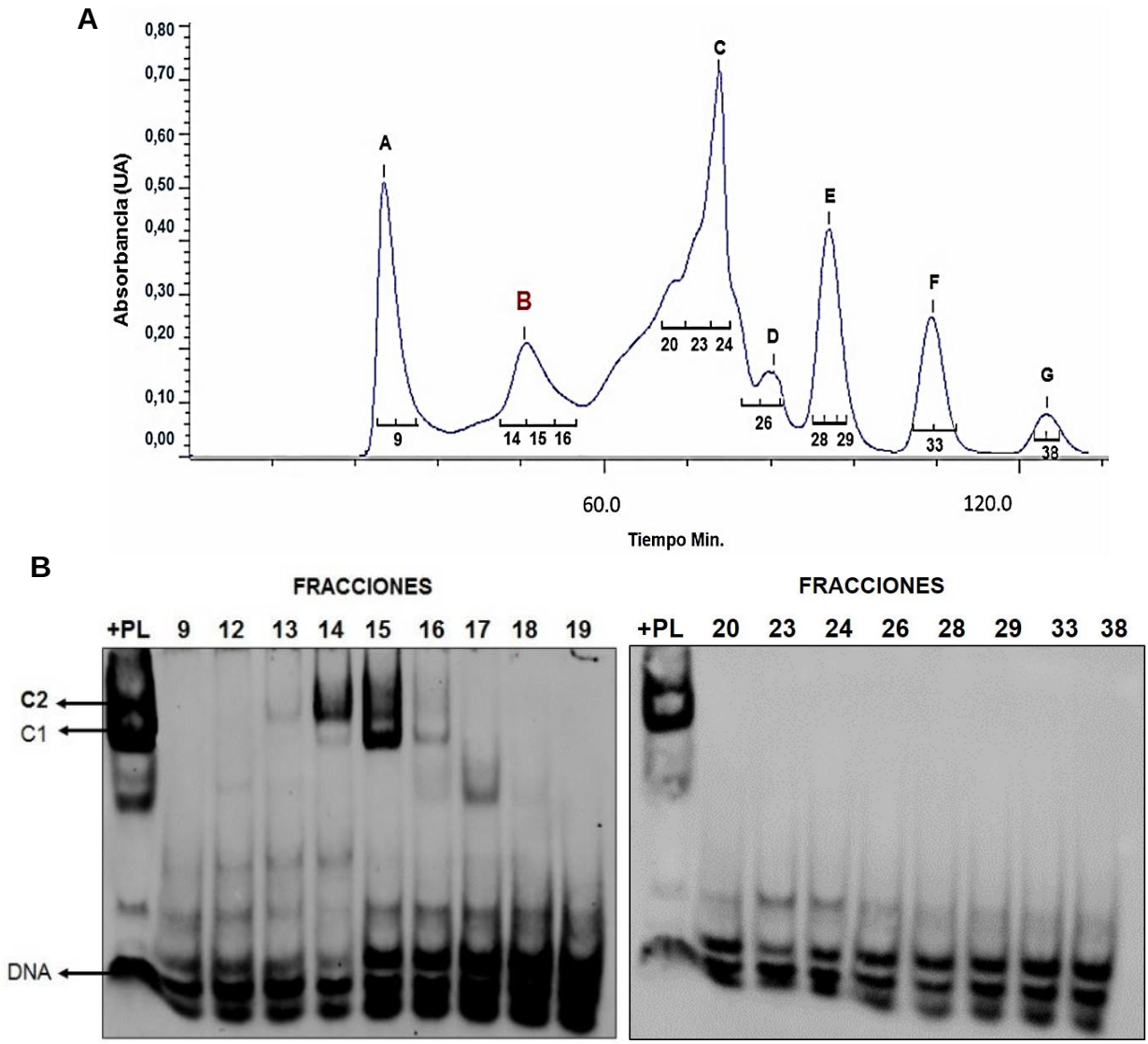


4.3.2 Purificación por medio de cromatografía de filtración en gel

Con el fin de establecer las condiciones experimentales óptimas para la separación de las proteínas totales de *S. aureus* y lograr determinar en qué fracción está la proteína de interés, se inició con una purificación de un extracto total de células planctónicas, sin tratamiento con sulfato de amonio. La cromatografía de filtración por gel se realizó utilizando la columna Superose® 6 HR 10/30 (Pharmacia®), con un volumen de inyección de 500ul, correspondiente a 3mg de proteína, un flujo de 0,3 ml/min y se recolectaron 40 fracciones de 1 ml cada una (ver materiales y métodos). El cromatograma con el perfil de separación de las proteínas puede observarse en la figura 4-6. Se obtuvieron 6 picos en el

cromatograma, lo cual sugiere que hubo una buena separación de las proteínas, Al realizar los ensayos de EMSA con cada una de las fracciones obtenidas se encontró una señal de retardamiento en las fracciones 14, 15, 16 y 17 del pico B (figura 4-6 B), aunque en estas últimas fracciones la señal es más débil.

Figura 4-6 Separación de un extracto total de proteínas de USA300 por cromatografía de filtración en gel. A. Los números indican la localización de las fracciones representativas de cada pico que fueron evaluadas en el ensayo de retardamiento. **B**. EMSA de las fracciones de los diferentes picos obtenidos. La escala se manejó en unidades de absorbancia (UA).



4.3.3 Purificación por medio de cromatografía de intercambio aniónico.

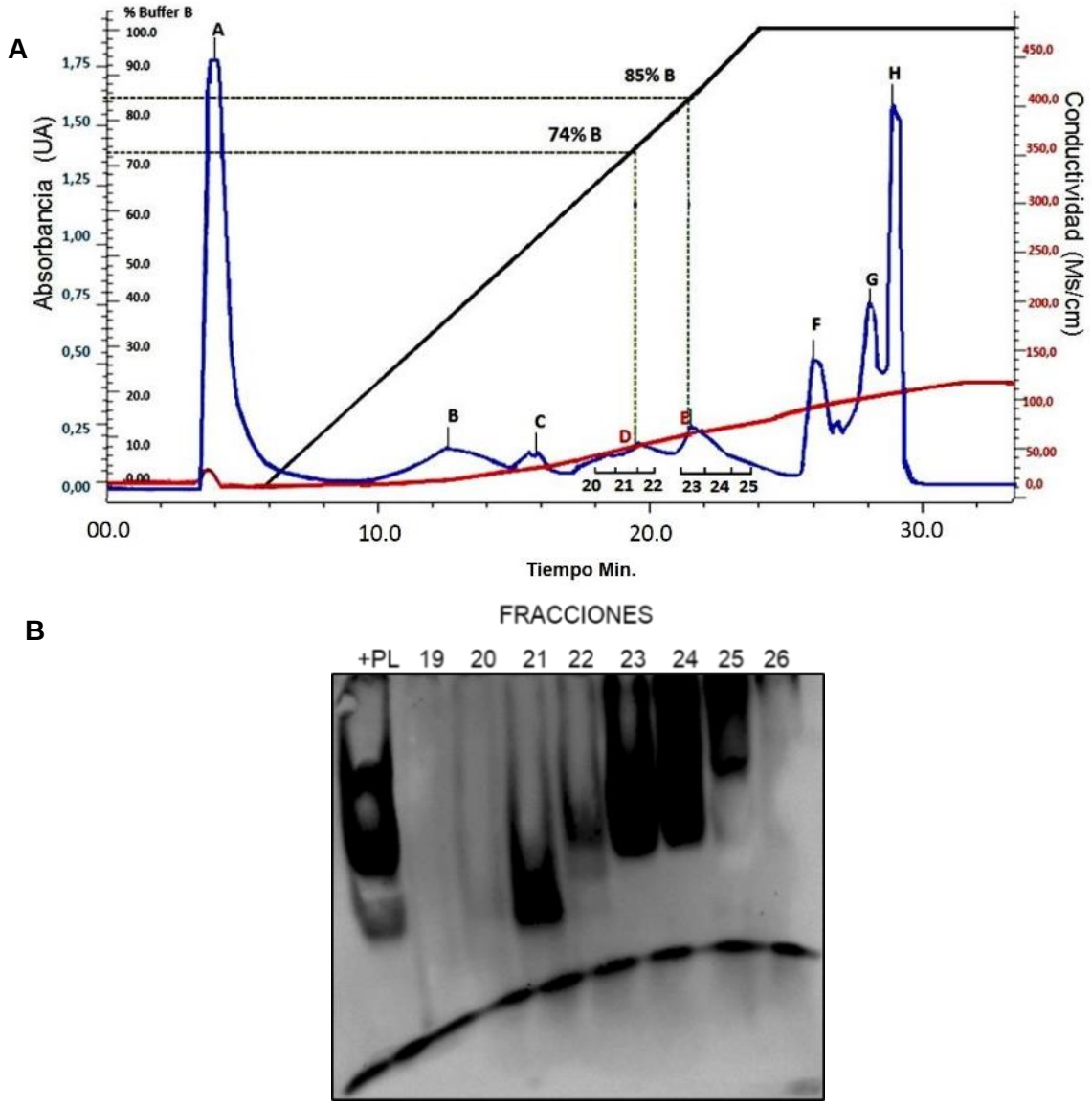
Así como se realizó con la cromatografía de filtración en gel, primero se determinaron las condiciones experimentales óptimas a partir de un extracto total de células planctónicas. Con la columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 (Pharmacia®), se utilizó un volumen de inyección de 500ul, correspondiente a 3mg de proteína, un flujo de 1 ml/min y se recolectaron 40 fracciones de 1 ml cada una (ver materiales y métodos). Se obtuvieron 8 picos en el cromatograma (A-H), el pico A corresponde a las proteínas no retenidas (figura 4-7 A). Al realizar los ensayos de EMSA con cada una de las fracciones obtenidas se encontró una señal de retardamiento en las fracciones 21 a 25 (figura 4-7 B), eluidas en los picos D y E, a 74 y 85 % del gradiente de B respectivamente (figura 4-7 A).

4.3.4 Procedimiento completo de purificación de las proteínas de unión a la secuencia palindrómica.

Una vez establecidas las condiciones experimentales para la purificación de la proteína de unión al gen *icaA*, se procedió a realizar el proceso completo de purificación (tratamiento con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel e intercambio aniónico). El perfil de separación de proteínas fue muy similar al obtenido con el extracto total sin precipitar. Los extractos proteicos de bacterias planctónicas y formando biofilm fueron corridos a un flujo de 0,5 y 0,3 ml/min respectivamente, por fallas en la columna de filtración, razón por la que los tiempos del corrido fueron diferentes. No obstante el perfil de separación de proteínas para ambos ensayos fue muy similar, observándose los mismos picos (A-F) (Figura 4-8 A y C). En el pico B marcado en rojo con las fracciones 14, 15 y 16, hubo retardamiento formando un único complejo (C1), comparado con los controles positivos para plantónico y biofilm (PL+ y BF+) que muestran dos complejos de retardo (Figura 4-8 B y D). Por otra parte, la escala de absorbancia en los dos perfiles de separación analizados fue de 0 a 1 UA para planctónico y 0 a 2 para biofilm, esta diferencia se observa principalmente en el pico A que tuvo 1,89 UA en biofilm y 0,74 UA en planctónico, ésta diferencia puede ser debido a la expresión de diferentes tipos de proteínas en cada estado de la bacteria, como se reporta en la literatura (84). Sin embargo la diferencia de

absorbancias en el pico B que contiene las fracciones positivas en los dos estados no mostró grandes diferencias, en planctónico fue de 0,11 UA y en biofilm de 0,16 UA.

Figura 4-7 Separación de un extracto total de proteínas de USA300 por cromatografía de intercambio aniónico. A. Cromatograma con el perfil de separación de proteínas obtenido. Las líneas discontinuas señalan el porcentaje del gradiente en que son eluidas las proteínas de los picos D y E en rojo. **B.** EMSA, de las fracciones 19 a 26 (70% a 85% del gradiente). Se utilizó como control positivo (+PL) un extracto de proteínas totales planctónico.



Para obtener una cantidad de proteína observable en siguiente paso de purificación, se realizaron 9 corridos cada uno con inyecciones de 500 µl y se colectaron 40 fracciones de 1 ml cada una en los extractos planctónicos y 5 corridos cada uno de 500ul con 40 fracciones por corrido en los extractos del ensayo de biofilm. Adicionalmente, en estos corridos se pudo observar la reproducibilidad del ensayo mediante la técnica de FPLC, por la superposición de cada uno de los perfiles de separación mostrado en el anexo D.

En el siguiente paso de purificación por intercambio aniónico, se utilizó en el corrido de las fracciones planctónicas una columna Mono Q HR 5/5 de farmacia. Para los ensayos con biofilm se obtuvo en el laboratorio una nueva columna de intercambio, UNO Q1 BIORAD, que fue utilizada en los demás experimentos con biofilm; se realizaron pruebas con esta columna también para extractos totales y verificar las condiciones del corrido (anexo C). La figura 4-9 muestra el seguimiento de la proteína después del tercer paso de purificación por intercambio aniónico, donde se obtuvo señal positiva en fracciones con un alto porcentaje de buffer B (88%) correspondiente con el pico B (Figura 4-9 A). Como se muestra en la figura 4-9 B, el ensayo de EMSA muestra una señal de unión claramente positiva en las fracciones 51 y 52, sin embargo fue más clara la detección de la 52 por lo cual su perfil fue analizado en un gel de poliacrilamida, a partir del cual se seleccionaron las bandas para secuenciar.

Con las fracciones obtenidas a partir de filtración en gel del ensayo en biofilm, se realizó el mismo proceso, teniendo en cuenta que se utilizó una nueva columna de intercambio, como se describió anteriormente. La figura 4-10 muestra el perfil de separación y el porcentaje de buffer B al cual es eluida la proteína de interés. Teniendo en cuenta ensayos previos donde se obtuvo señal en fracciones de 38% del gradiente de B (anexo C). Para este caso se obtuvo también señal positiva en fracciones encontradas en este %B, correspondiente al pico C (48 y 49). Cabe resaltar que con esta columna se disminuye la concentración del buffer B al que es eluida la proteína, lo que mejora notablemente el corrido en los ensayos de seguimiento, como muestra la figura 4-10. Según el perfil de separación se seleccionó una proteína de la fracción 49 que fue muy similar con el perfil obtenido en el ensayo planctónico. Para este caso la banda BP1 fue secuenciada por espectrometría de masas.

Figura 4-8 Separación de la proteína de interés en cromatografía de filtración en gel a partir de extractos planctónico y biofilm A. Cromatograma con el perfil de separación del extracto de proteínas planctónicas, 6 picos (A-F), el pico B en rojo señal las fracciones positivas (14,15 y 16). Escala en unidades de absorbancia (0-1,00 UA), **B.** seguimiento de la proteína en fracciones del pico B, PL+ (control positivo, extracto total plantónico), con la señal de los dos complejos (C1 y C2), **C.** perfil de separación del extracto de proteínas en biofilm, con 6 picos (A-F), el pico B en rojo señal las fracciones positivas (14,15 y 16) Escala en unidades de absorbancia (0-2,00 UA). **D** seguimiento de la proteína en las fracciones obtenidas a partir de un extracto de biofilm. Fracciones del pico B. BF (control positivo, extracto total de bacterias en biofilm).

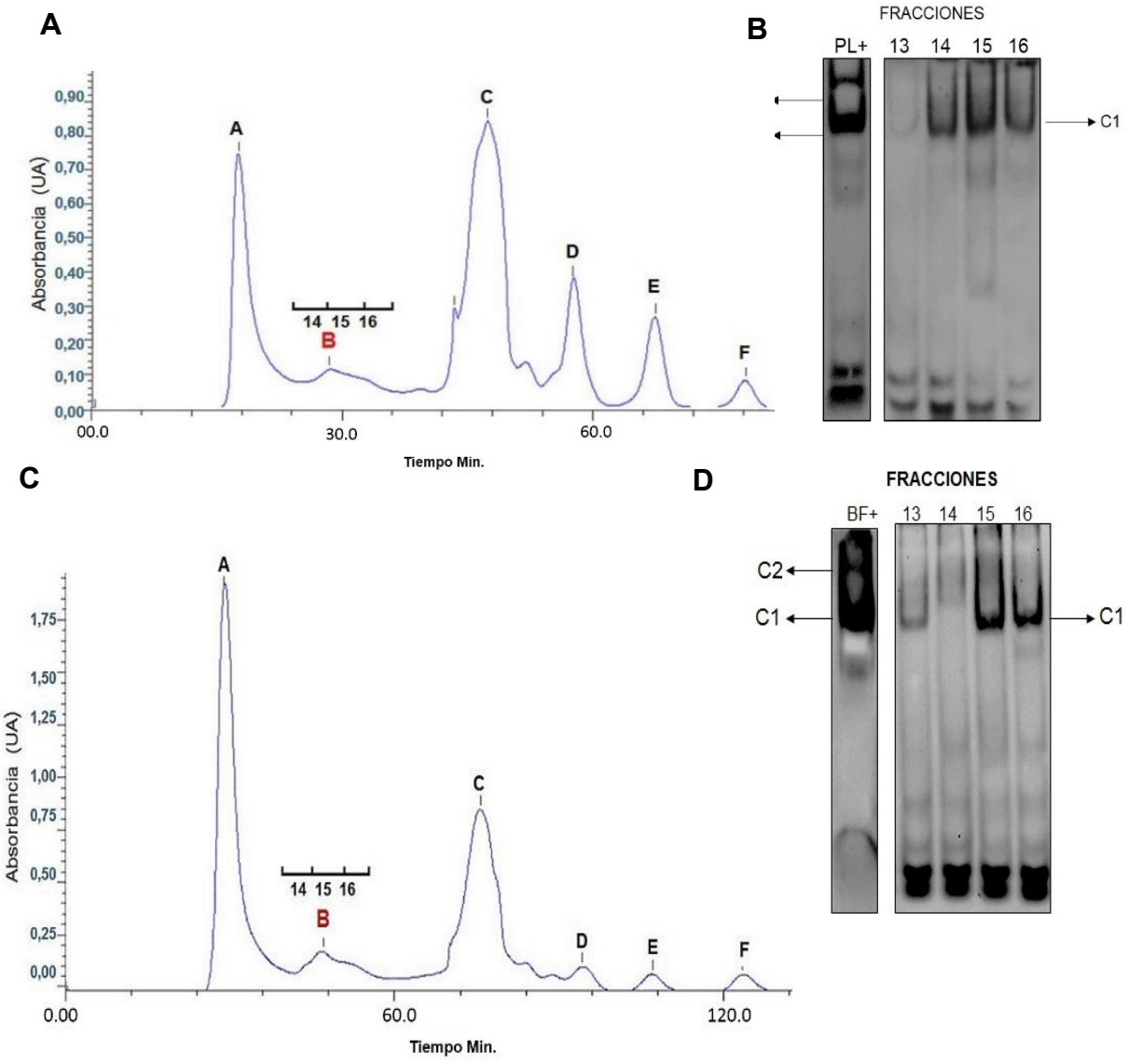


Figura 4-9 Separación de proteínas de las fracciones positivas en filtración en gel (planctónicas) por intercambio aniónico y seguimiento de la proteína de interés. A. perfil de separación de las fracciones positivas en filtración en gel, las líneas discontinuas marcan el gradiente de B (88%) que coincide con el pico B en rojo con las fracciones analizadas (51 a 53). **B.** Seguimiento de las fracciones después de un corrido en la columna de intercambio aniónico, fracciones 51 y 52 positivas (C1). **C.** perfil de separación de las fracciones positivas en el EMSA, la flecha en rojo muestras las bandas representativas del corrido y a las cuales se realizó el proceso de secuenciación.

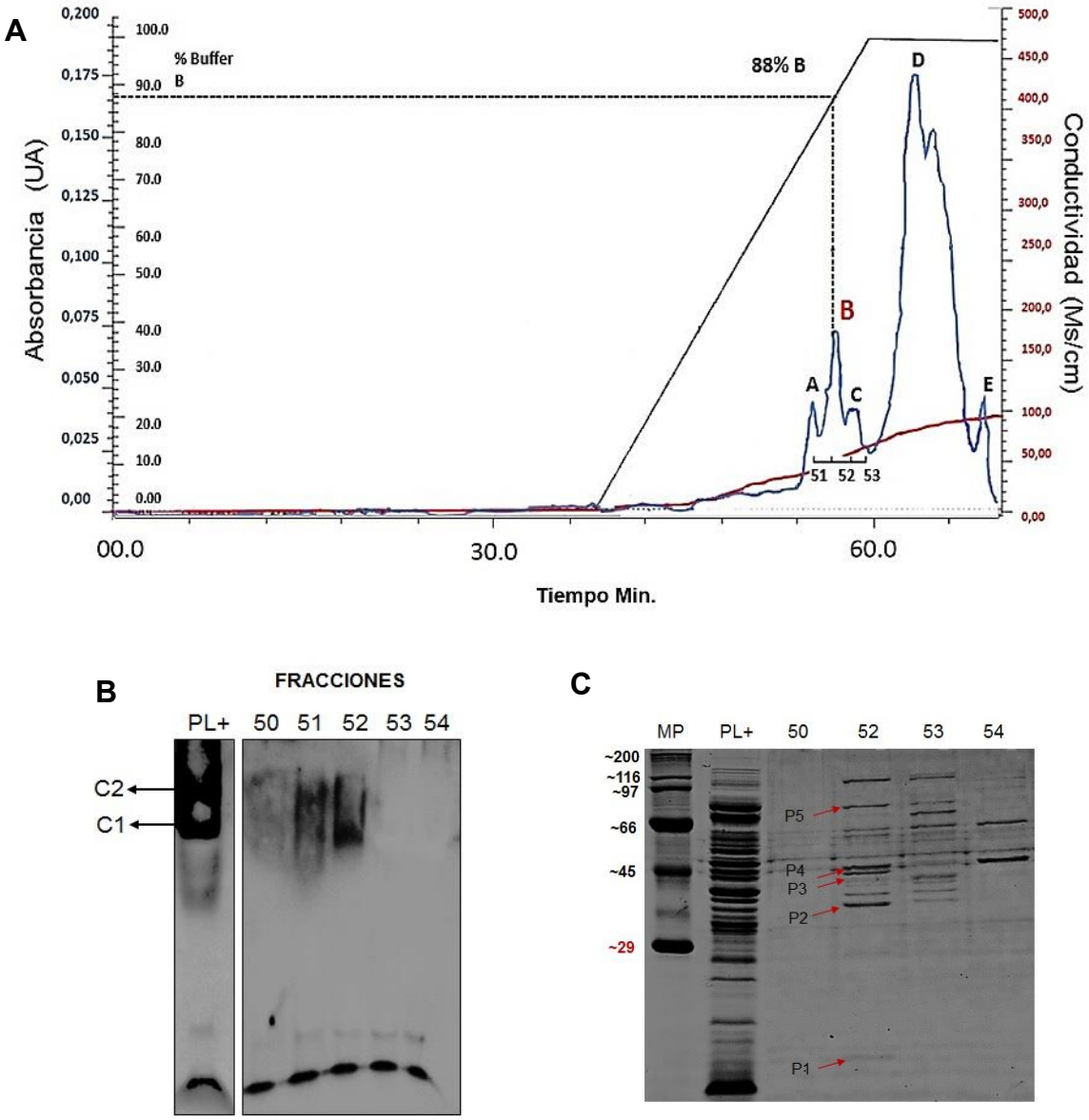
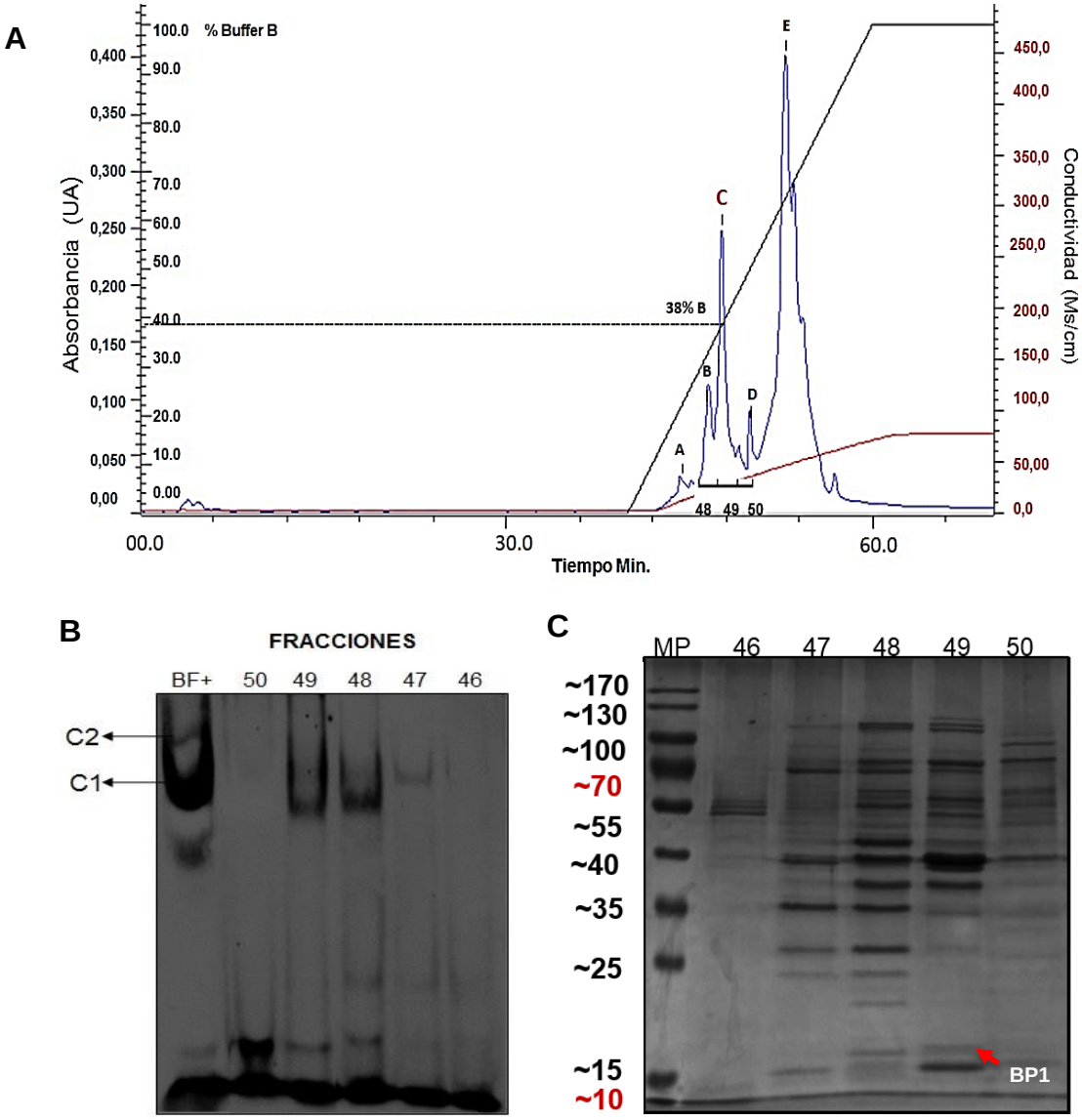


Figura 4-10 Separación por cromatografía de intercambio aniónico y seguimiento de la proteína de interés, a partir de fracciones de filtración en gel (biofilm). A. Cromatograma de intercambio aniónico de las fracciones positivas en filtración por gel de extractos en biofilm. Las líneas discontinuas señalan el porcentaje de buffer B (38%) del pico C en rojo, de las fracciones analizadas. **B.** Seguimiento por EMSA de las fracciones después de un corrido de intercambio. **C.** perfil de separación de las fracciones positivas en el EMSA, por SDS-PAGE, la flecha en rojo muestra la banda seleccionada para secuenciación por MALDI-TOF.



4.4 Identificación de proteínas de las fracciones positivas en ensayos plantónicos y biofilm

Las fracciones 52 y 49 (de los ensayos planctónico y biofilm, respectivamente), fueron seleccionadas teniendo en cuenta los resultados en los ensayos de EMSA con la sonda palindrómica. A partir de su perfil de separación por SDS-PAGE teñido con Coomassie se seleccionaron 6 bandas para ser identificadas por espectrometría de masas, MALDI TOF. 5 bandas del ensayo plantónico y 1 banda del ensayo de biofilm (figuras 4-9 C y 4-10 C respectivamente).

4.4.1 Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF

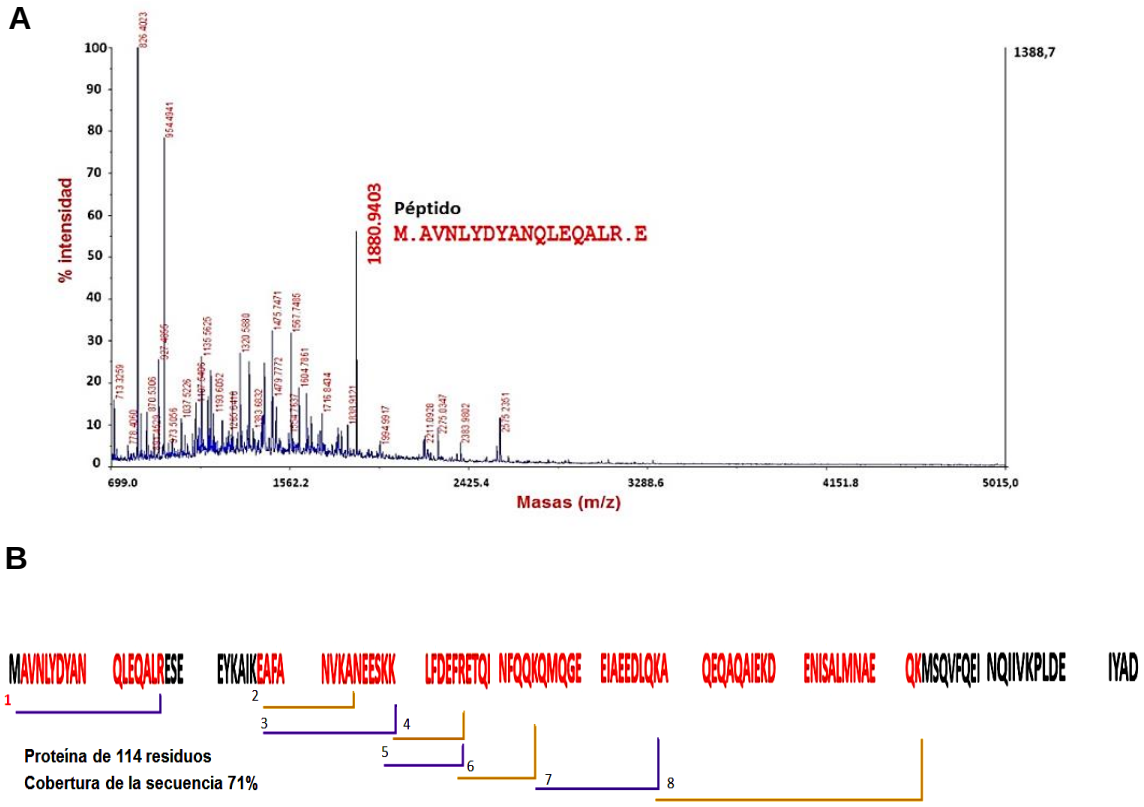
Las proteínas identificadas por medio de espectrometría de masas (ms y ms/ms) son descritas en la tabla 4-1.De las 5 proteína analizadas 4 fueron proteínas ya descritas en *Staphylococcus aureus* y relacionadas con procesos metabólicos. Sin embargo, también

Tabla 4-1 Proteínas identificadas en las fracciones con retardamiento de la sonda. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (P1-P5). La función de cada una de las proteínas se obtuvo a partir de la consulta de cada una de estas proteínas en la base de datos de Swiss-pro y NCBI.

Proteína	Proteína identificada por EM	Masa mol. Teórica (KDa)	Número de residuos	Función
P1	**"hypothetical protein"de *Staphylococcus*.**	**13.3**	**114**	Desconocida
P2	"L-lactate dehydrogenase"de *Staphylococcus aureus.*	**34.6**	**317**	Enzima metabólica Glicolisis anaeróbica
P3	"alanine dehydrogenase"de *Staphylococcus aureus.*	**40.1**	**372**	Enzima metabólica Proteína de unión a NAD
P4	"phosphogluconate dehydrogenase (NADP(+)-dependent, decarboxylating)"de *Staphylococcus aureus*	**51.7**	**468**	Enzima metabólica Transporte de carbohidratos
P5	"methionyl-tRNA synthetase"de *Staphylococcus aureus*.	**71.8**	**630**	Biosíntesis de proteínas

se identificó una proteína hipotética de 13,3kDa (P1) de la que no existen reportes de función en *S. aureus*. Esta proteína está conformada por 114 aminoácidos y el tratamiento con tripsina genera 8 péptidos, que representan una cobertura de 71% del total de la secuencia. Todos los péptidos obtenidos fueron identificados por los ensayos de espectrometría de masas, siendo el más frecuente y relevante el péptido **M.AVNLYDYANQLEQALR**. (Figura 4-11). Análisis independientes de cada uno de los espectros obtenidos de los 8 péptidos, permitieron identificar la proteína P1 por medio del software MASCOT**.**

Figura 4-11 Identificación de la proteína P1. A. Espectro de masas del péptido M.AVNLYDYANQLEQALR.E, uno de los péptidos usados para la identificación de la proteína P1. **B.** Secuencia completa de la proteína P1 identificada. Los aminoácidos en rojo muestran los péptidos obtenidos en masas, las líneas moradas y amarillas indican los cortes con tripsina y el tamaño de cada péptido, con una cobertura de 71% de los 114 aminoácidos que la componen.



4.5 Análisis "*in silico*" de la proteína hipotética de *Staphylococcus aureus* USA300

4.5.1 Búsqueda de homólogos en otras bacterias

Una vez obtenida la secuencia se realizó un seguimiento "*in silico"* de la proteína de interés. La primera búsqueda por BLAST-P en toda la base de datos del NCBI mostró que la proteína P1 identificada poseía un dominio YlbF, el cual fue inicialmente identificado y caracterizado en el regulador transcripcional YlbF en *Bacillus subtilis* (85). Actualmente se han identificado otras tres proteínas con este dominio en esta bacteria YheA. YmcA y DUF963 (figura 4-12 A). Interesantemente, se ha demostrado experimentalmente que las proteínas YlbF and YmcA son reguladores de la formación de biofilm en *B. subtilis* (86, 87). Se evaluó la posibilidad de que la proteína hipotética de *S. aureus* USA300 correspondiera de manera muy cercana a una de las encontradas en *B. subtilis*, teniendo en cuenta que las funciones del dominio YlbF de este microorganismo son de regulación transcripcional y se han relacionado con la correcta formación de biofilm, acercándose a los resultados esperados para *S. aureus*.

Los alineamientos de la proteína P1 de *S. aureus* con las proteínas YlbF, YheA y YmcA de *B. subtilis* mostraron porcentajes de identidad y similitud de 18% y 49% (para YlbF), 49% y 79% (para YheA), y 20% y 40% (para YmcA); respectivamente (Figura 4-12 B). Adicionalmente, en la tabla 4-2 se comparan algunos parámetros fisicoquímicos importantes de la proteína P1 y las tres proteínas de *B. subtilis*. De acuerdo a estos resultados la proteína P1 identificada en *Staphylococcus aureus* corresponde a la proteína YheA de *B. subtilis*.

4.5.2 Función de las proteínas con el dominio YlbF en *Bacillus subtilis*

De la proteína YheA no existen estudios detallados, por tanto es poca la información que se puede encontrar de esta proteína incluyendo la búsqueda en bases de datos, donde se reporta como una proteína de función desconocida, sin embargo, comparte el dominio YlbF característico de un grupo de proteínas reguladoras en *B. subtilis*.

Figura 4-12 Búsqueda de homólogos para la proteína P1. A. Resultado de la búsqueda en la base de datos del GenBank usando BLAST-P, se destaca las proteínas con dominio YlbF descritas en *B. subtilis*. **B.** Alineamientos pareados de la secuencia P1 con cada una de las proteínas de *B. subtilis* que tienen el dominio YlbF,proteína YlbF (NP_389382.1), YheA (AFQ56895.1) y YmcA (AEP90854.1). Bs (*B. subtilis*), Sa (*S. aureus*). Encima de cada alineamiento se muestran los % de identidad y similitud, respectivamente. (*) Residuos completamente conservados, (:) residuos con propiedades fuertemente similares, (.) residuos con propiedades levemente similares.

A

List of domain hits

	Name	Accession	Description	E-value
[+]	PRK13676	PRK13676	hypothetical protein; Provisional	2.86e-39
[-]	YlbF	COG3679	Cell fate regulator YlbF, YheA/YmcA/DUF963 family (controls sporulation, competence, biofilm	1.78e-28
	Cell fate regulator YlbF, YheA/YmcA/DUF963 family (controls sporulation, competence, biofilm development) [Signal transduction mechanisms]			
[+]	Com_YlbF	pfam06133	Control of competence regulator ComK, YlbF/YmcA; YlbF is a family of short Gram-positive and ...	1.72e-17

B

```
        Identidad  18%                                similitud 49%
P1SaUSA300      -----MAVNLYDYANQLEQALRESEEYKAIKEAFANVKANEESKKLFDEFRETQINFQQK
YlbFBs          MYATMESVRLQSEAQQLAEMILQSETAENYRNCYKRLQEDEEAGRIIRSFIKIKEQYEDV
                      :*.* . *:** : : :**  :  ::.: .:: :**: ::: .* : : ::::

P1SaUSA300      QMQGEEIAE--EDLQKAQEQAQAIEKDENISALMNAEQKMSQVFQEINQ--------IIV
YlbFBs          QRFGKYHPDYREISRKMREIKRELDLNDKVADFKRAENELQSILDEVSVEIGTAVSEHVK
                *  *:   :  *  :* :*  : :: ::::: : .**:::..:::*:.          :

P1SaUSA300      KPLDEIYAD--------------------
YlbFBs          VPTGNPYFDGLSSCGGGCGSGGSCGCKVS
                 * .: * *

      Identidad 49%                                Similitud 71%

P1SaUSA300      MAVNLYDYANQLEQALRESEEYKAIKEAFANVKANEESKKLFDEFRETQINFQQKQMQGE
YheABs          MAVNFYDVAYDLENALRGSEEFTRLKNLYDEVNADESAKRMFENFRDVQLRLQQKQMAGE
                ****:** * :**:*** ***:. :*: : :*:*:*.:*::*::**:.*:.:***** **

P1SaUSA300      EIAEEDLQKAQEQAQAIEKDENISALMNAEQKMSQVFQEINQIIVKPLDEIYAD---
YheABs          EITQEEVTQAQKTVALVQQHEKISQLMEAEQRMSMLIGELNKIIMKPLEELYGSVEG
                **::*:: :**: .  :::.*:** **:***:** :: *:*:**:***:*:*..

    Identidad 20%                                  Similitud 40%

P1SaUSA300      MAVNLYDYANQ------LEQALRESEEYKAIKEAFANVKANEESKKLFDEFRET---QIN
YmcABs          --MTLYSKKDIVQQARNLAKMISETEEVDFFKRAEAQINENDKVSTIVNQIKALQKQAVN
                  :.**.  :       * : : *:** . :*.* *::: *:: ..:.::::      :*

P1SaUSA300      FQQKQMQGEEIAEEDLQKAQEQAQAIEK-DENI---SALMNAEQKMSQVFQEI-------
YmcABs          LKHY--EK----HEALKQVEAKIDALQEELEEIPVIQEFRDSQMEVNDLLQLVAHTISNQ
                :::   :     .* *::.: : :*:::  *:*   . : ::: ::.:::* :

P1SaUSA300      --NQIIVKPLDEIYAD---------------
YmcABs          VTNEIITSTGGDLLKGETGSKVKHSNNSCSL
                  *:**..  .::  .
```

Tabla 4-2 Parámetros fisicoquímicos "*in silico*" de la proteína P1 de *S. aureus* y de las proteínas YlbF, YheA y YmcA de *B. subtilis.* Estos parámetros fueron obtenidos a partir de un análisis en el programa ProtParam disponible en (http://web.expasy.org/protparam).

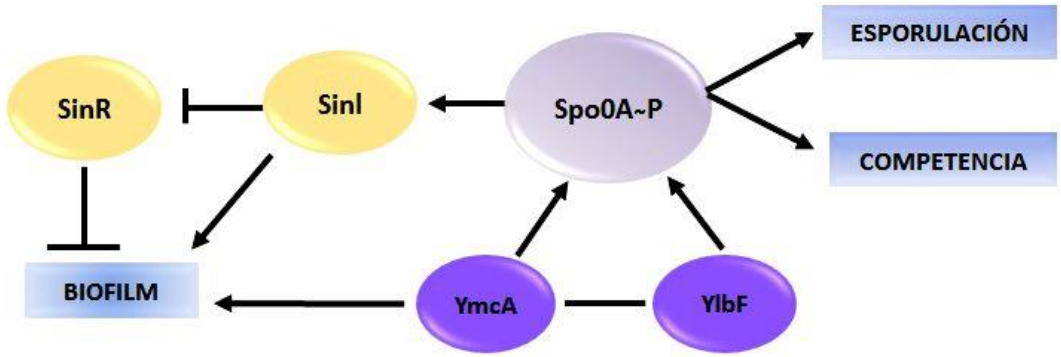
Parámetros	P1 *S.aureus*	Yhea *B. subtilis*	YlbF *B.subtilis*	YmcA *B. subtilis*
Número de aminoácidos	114	117	149	143
Peso molecular	13295.75	13611.39	16913.96	16166.27
Punto isoeléctrico	4.31	4.60	5.20	5.25
Residuos positivos	21%	20%	17%	16%
Residuos negativos	12	14	21	17
índice de hidrofobicidad	-0.85	-0.671	0.705	-0.546

Según un estudio realizado por Carabetta *et al* (86)**,** las proteínas YlbF y YmcA actúan de forma sinérgica aumentando la formación de biofilm por medio de la fosforilación del regulador maestro Spo0A (Figura 4-13), esta proteína en su forma activa fosforilada, Spo0A~P, estaría activando a la proteína Sinl, la cual a su vez activa el operon *eps* a través de la inhibición de su represor, la proteína SinR. El operón *eps* codifica las proteínas encargadas de producir el exopolisacárido (EPS), el principal componente del biofilm en *B. subtilis* y molécula análoga a PIA (polisacárido de adhesión intercelular) en *S. aureus* (figura 4-13 A)**.** Actualmente, no hay evidencia experimental de la función de YheA. Un análisis de la ubicación de los genes *ylbf*, *ymcA* y *yheA* muestra que estos están localizados en regiones distantes del genoma, sugiriendo que no conforman un operón, y están siendo regulados de forma independiente, sin embargo se conoce qué YlbF y YmcA actúan juntas en una función reguladora del biofilm. Interesantemente, en la base de datos del "Protein DataBank" se encuentra reportada la estructura terciaria de las proteínas YmcA y YheA de *B. subtilis* (2PIH y 2OOE, respectivamente)*,* sin embargo, no se encuentra reportada para la proteína YlbF. Finalmente, un análisis del entorno del gen *yheA* en la cepa NCIB 3610 de *B. subtilis* permitió la identificación de un gen corriente abajo y sin espacio intergénico, el cual codifica una proteína que contiene un dominio DUF445 de función desconocida y reportada como yheB, una proteína características de unión a la membrana celular. Este resultado sugiere que yheB podría estar conformando

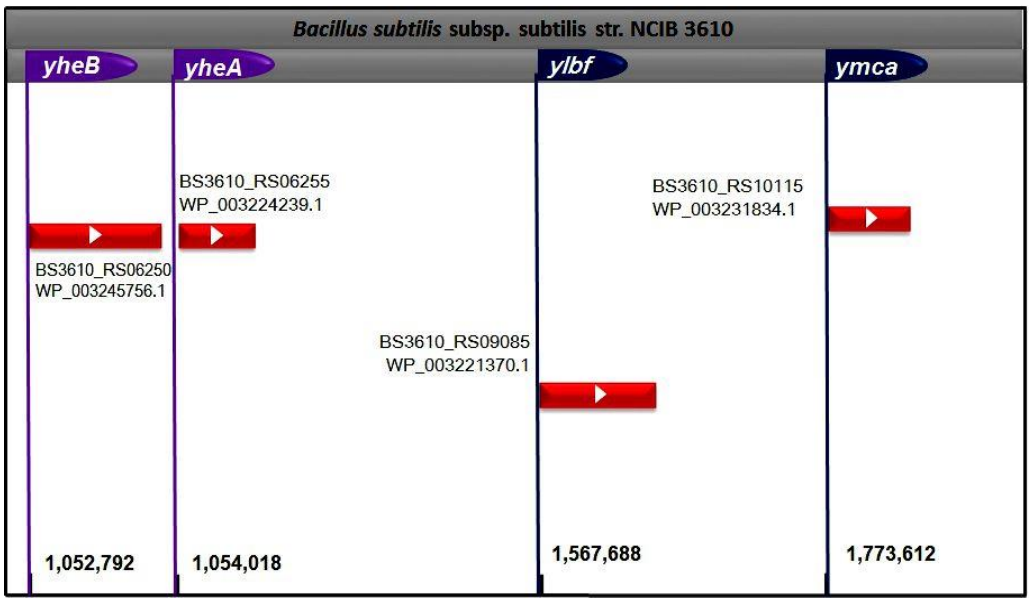
un operón con *yheA.* En la figura 4-13 C se muestra un resumen de las características de cada una de las proteínas con dominio YlbF.

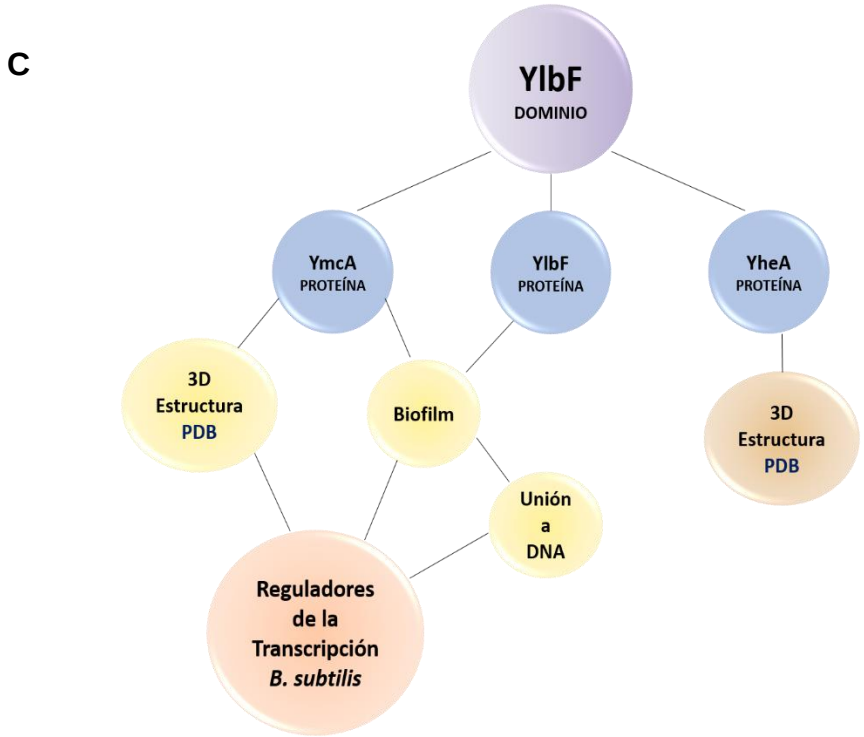
Figura 4-13 Información de proteínas del dominio YlbF y análisis de YheA en *B. subtilis*. A. posible ruta de acción de YlbF y YmcA en la formación de biofilm de *B. subtilis*. Las líneas truncadas representan represión y las flechas activación. **B.** genes cercanos a la región del gen que codifica para la proteína YheA en el genoma de *B. subtilis* cepa NCIB 3610 (NZ_CM000488.1). En morado se observa la ubicación de YheA y YheB. En azul se señalan ylbF y ymcA. La figura muestra los números de acceso para los genes y proteínas en el NCBI. **C**. resumen de la información encontrada para las proteínas del dominio YlbF.

A



B





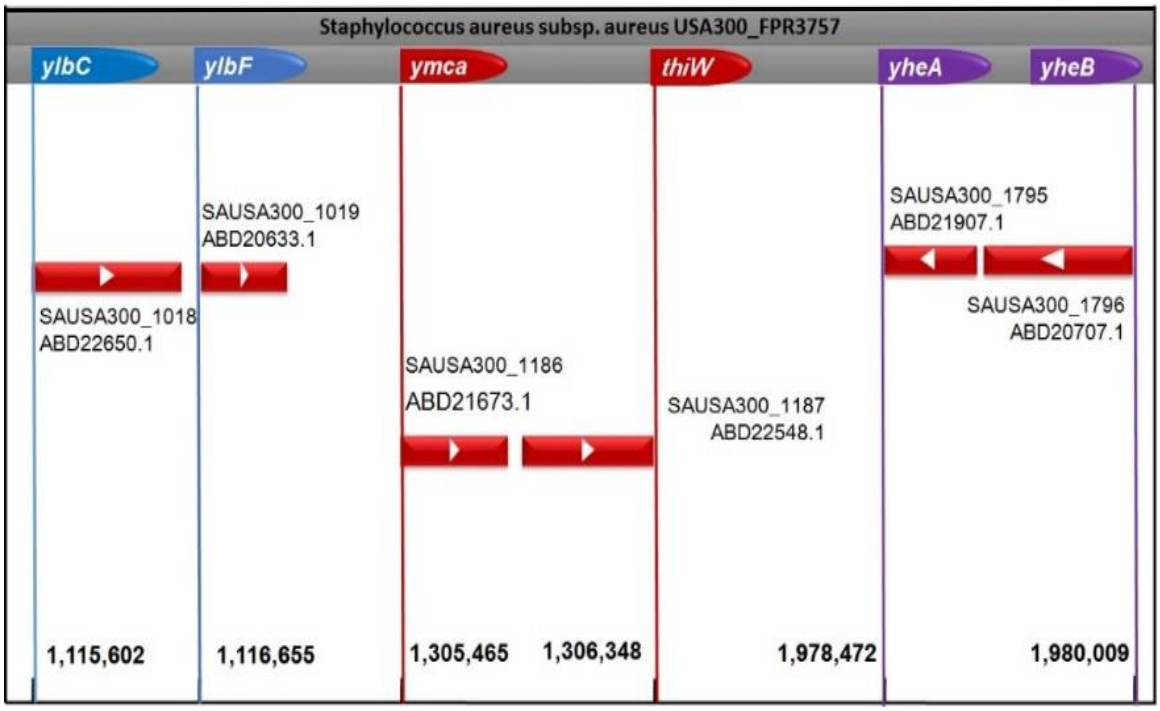
4.5.3 Proteínas asociadas el dominio YlbF en el genoma de *Staphylococcus aureus* USA300

La identificación de la proteína YheA en *Staphylococcus aureus* a través de nuestro estudio generó el interés en determinar si las proteínas YlbF y YmcA también están presentes en *S. aureus.* Por medio de la herramienta BLAST los genes *ylbF* y *ymcA* fueron ubicados dentro del genoma de la cepa USA300_FPR3757 (CP000255.1) de *Staphylococcus aureus* y como ocurre en *B. subtilis*, están en posiciones distantes uno del otro y a *yheA* (Figura 4-14). Estas proteínas también son reportadas como proteínas hipotéticas en *S. aureus* y no se encontró información adicional de sus posibles funciones.

Teniendo en cuenta la fuerte evidencia de la participación de estas proteínas en la formación de biofilm en *B. subtilis,* estos resultados sugieren que muy probablemente estas proteínas también pueden estar relacionadas con la formación de biofilm en *S. aureus*, y abren una valiosa puerta hacia el estudio de nuevos factores genéticos que podrían estar contribuyendo a la formación de biofilm en esta bacteria. Finalmente, también se logró

establecer la presencia del gen *yheB* en *S. aureus,* el cual se encuentra en el mismo sentido y corriente abajo junto al gen *yheA.*

Figura 4-14 Localización de los genes *yheA, ylbf y ymcA* dentro del genoma de la cepa USA300 de *Staphylococcus aureus*. Ubicación de los genes dentro del genoma de USA300, para cada gen se muestra el "*locus_tag*" y el "*Id*" de las proteínas en el GeneBank. El nombre de los genes se encuentra en la parte superior, en azul. Rojo y morado. Las flechas blancas indican la dirección de la transcripción. Y en la parte inferior se encuentra el número de ubicación de cada gen dentro del genoma.



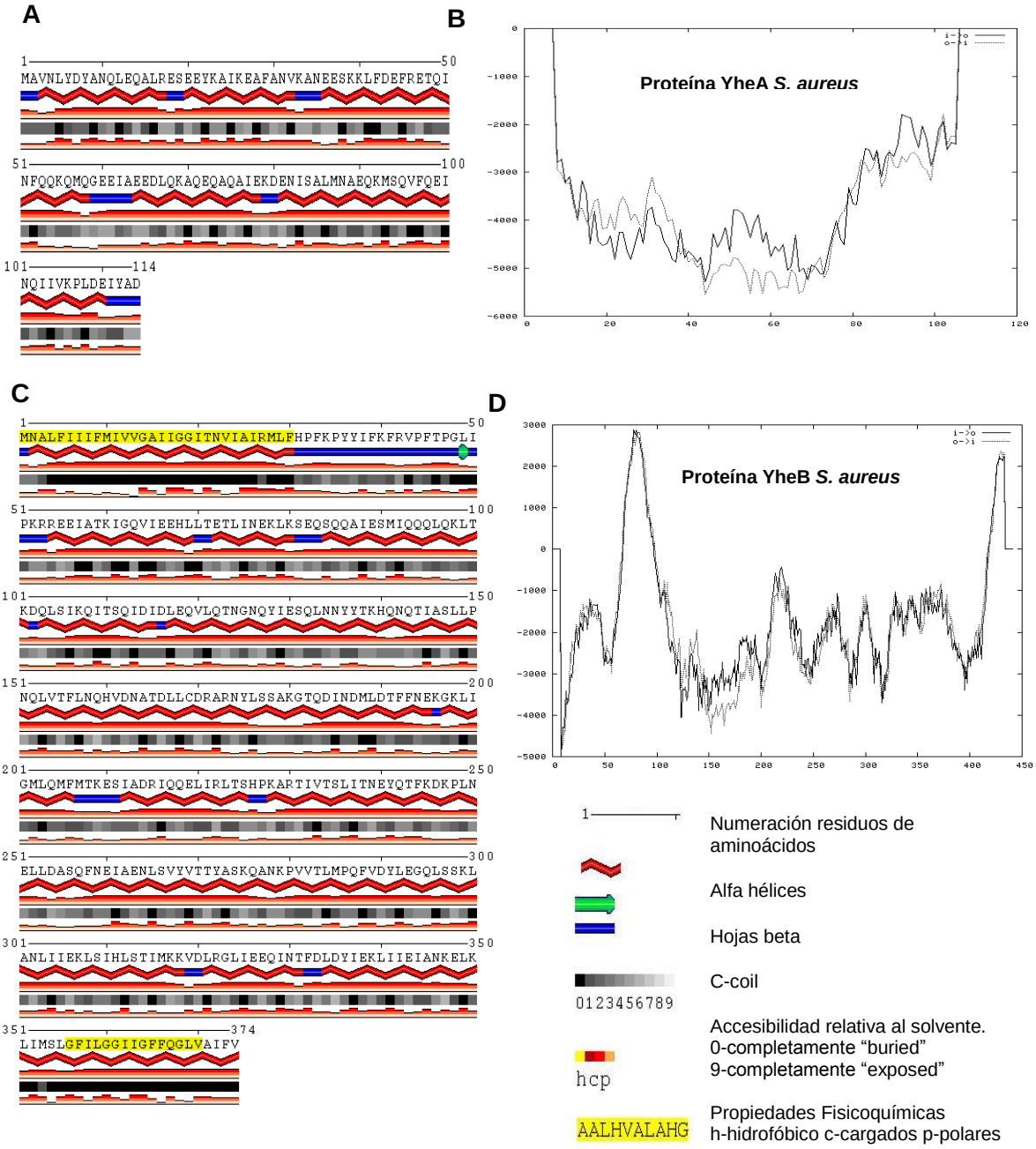
4.5.4 Predicción de la estructura secundaria, dominios transmembrana y relación YheA y YheB de USA3000

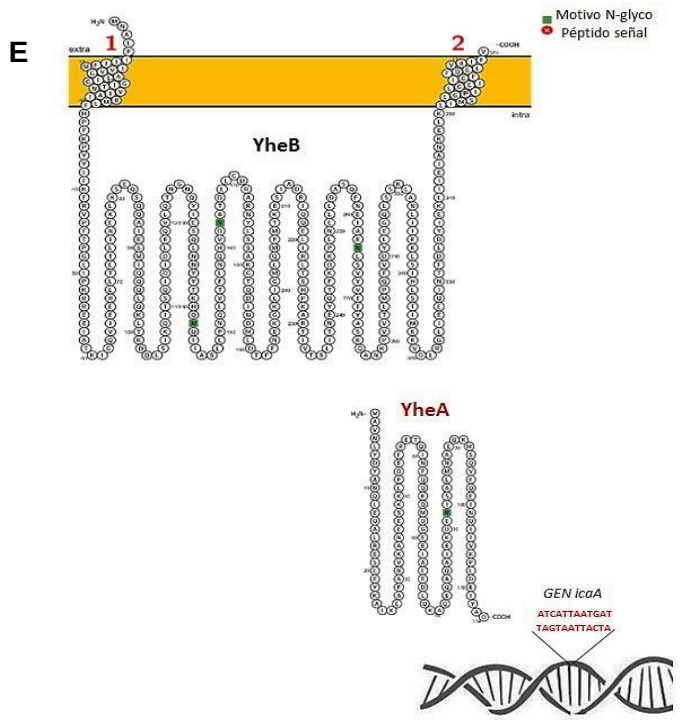
La estructura secundaria se obtuvo por medio de la herramienta MINNOU (**M**embrane protein **I**de**N**tificatio**N** with**OU**t explicit use of hydropathy profiles and alignments) (82)

que permite predecir, alfa-hélices, hojas beta y dominios transmembranales. Para la secuencia de yheA de USA300 no se obtuvieron dominios transmembranales y la estructura secundaria esta principalmente representada por alfa hélices, con la mayor parte de regiones conformadas por aminoácidos polares y con regiones poco hidrofóbicas, según lo indica en la gráfica en escala de grises con la accesibilidad al solvente (figura 4-15 A). De la misma manera fue analizada la estructura de la proteína cercana a YheA, YheB.

Los análisis realizados para esta proteína en la figura 4-15 B, Muestran la presencia de dos dominios transmembranales en los extremos de la secuencia de aminoácidos, mostradas como regiones muy hidrofóbicas embebidas en la membrana como lo indica la accesibilidad al solvente y los dominios transmembrana señalados en amarillo (figura 4-15 C). Estos resultados contrastan con lo obtenido a través de la herramienta TMpred para la predicción de segmentos transmembrana (figura 4-15 B y D) desarrollada para ambas proteínas; para YheA no se encontraron regiones transmebranales y si se encontraron en YheB. Debido a la poca información que se tiene a cerca de la proteína de interés, los datos de los análisis estructurales de las dos proteínas permiten realizar una visualización de lo que se tiene y establecer hipótesis acerca de posibles funciones e interacciones con el uso de herramientas como Protter. En la figura 4-15 E se obtuvo una aproximación visual de la forma de la proteína de interés y su acompañante YheB, que es una proteína de membrana sin función definida, pero que podría estar relacionada con la función de YheA, haciendo parte posiblemente de un sistema de transducción de señal, teniendo en cuenta que esta última presentó características de una proteína citoplasmática por sus propiedades de solubilidad y por ende la ausencia de sitios de unión a membrana. En la figura se muestra también la posibilidad de que la función de la proteína YheA esté relacionada con la unión al ADN, específicamente a la secuencia palindrómica del gen *icaA,* sin embargo esta predicción requiere un análisis que permita un análisis estructural adicional y posible función.

Figura 4-15 Predicción de la estructura secundaria y posibles dominios transmembranales de la proteína YheA y YheB de S. aureus. A. Predicción de la estructura secundaria de YheA. **B.** Predicción de regiones transmembranales para YheA de *S. aureus*. **C.** estructura secundaria de la proteína YheB **D.** predicción de sitios transmembranales de YheB de *S. aureus*. **E.** posible relación de la proteína de interés YheA con YheB. Visualización de la forma de las proteínas con respecto a sus propiedades fueron obtenidas por medio de la herramienta bioinformática Protter.





4.5.5 Predicción de la estructura terciaria de YheA de *Staphylococcus aureus*

Debido a la falta de información respecto a la función de YheA, se realizó un modelamiento de su estructura terciaria para tratar de intuir su posible potencial de unión a DNA. Como una primera aproximación a la estructura y función de la proteína identificada en este estudio, se realizó una predicción de la estructura 3D por medio de la herramienta I.TASSER, con la secuencia de la proteína YheA de *S. aureus*, se obtuvo el modelamiento de la estructura para esta proteína destacando dos modelos principales (figura 4-16 A), la estructura fue obtenida como un monómero de alfa-hélices, los ángulos de unión entre las hélices fueron diferentes para los dos modelos, esto se puede apreciar en la superposición.

Adicionalmente, se realizó el modelamiento de los dímeros para cada uno de los modelos, teniendo en cuenta que las estructuras reportadas son homodímeros. El dímero más estable parece ser el del modelo 1 (Figura 4-16 B y C). La figura 4-17 A y D muestra la estructura tridimensional de la proteína YheA y ymcA de *Bacillus subtilis,* reportadas en la base de datos del PDB. Las dos estructuras son homodímeros muy similares y se reportan como proteínas de función desconocida. De la proteína YlbF no se encontraron reportes

de estructura tridimensional. El modelamiento del homodímero de las proteína YheA mostro una particular similitud con el obtenido para la proteína YmcA, la figura 4-18 muestra a superposición de estas tres proteínas con apenas pocas diferencias principalmente con el ángulo de las hélices de YheA que parece estar más cerrado comparado con las otras dos proteínas supuerpuestas.

Figura 4-16 Modelamiento de la estructura teciaria de la proteína yhea de *s. aureus*. A. estructura terciaria obtenida en I-tasser a partir de la secuencia de aminoacidos de YheA. modelo 1. (rojo) C-score= 0.46. Modelo 2 (naranja) C-score = -5. C-score, predice la calidad del modelo el valor mas alto representa el nivel mas alto de confianza (rango -5,2). Superposición de los dos modelos. **B.** Modelamiento de la estructura, conformacion de homodímeros de las alfa-hélices, a partir de los modelos 1 y 2. **C**. Rotación de los homodímeros de los modelos de YheA de *S. aureus*.

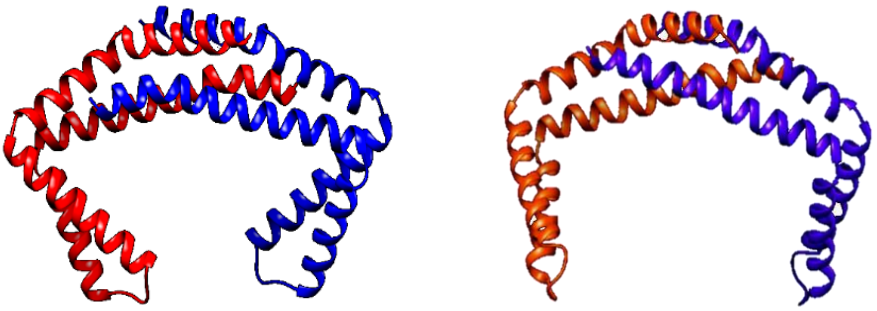
A

Monómero YheA de *Staphylococcus aureus*

Modelo 1 **Modelo 2** **Superposición**

Homodímero YheA de *Staphylococcus aureus*

B



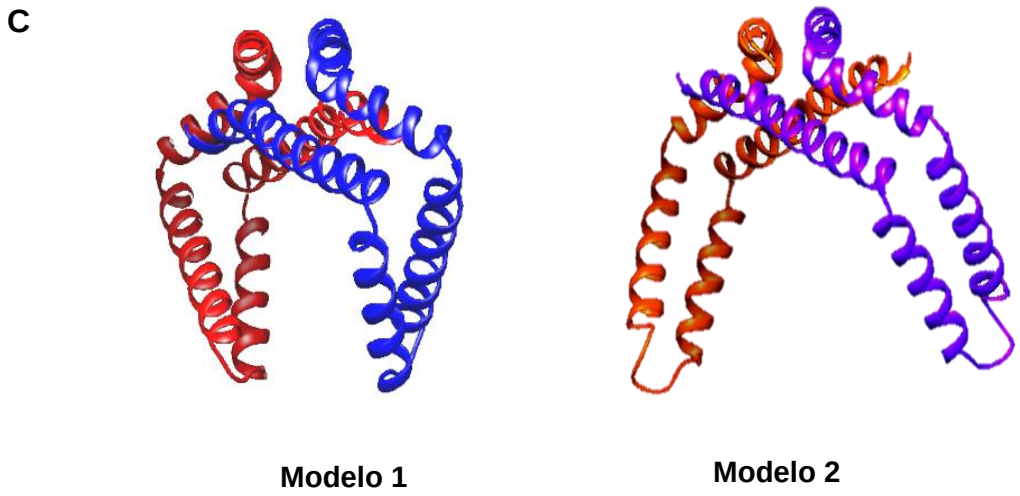


Figura 4-17 Estructura teciaria de las proteínas del dominio YIbF de *Bacillus subtilis* reportadas en el PDB. A Homodímero de la estructura terciaria reportada en PDB para Yhea, por cristalografia de rayos X. **B.** Estrucura tridimensional de YmcA reportada en PDB por cristalografia de rayos X, se reporta de igual forma como un homodímero.

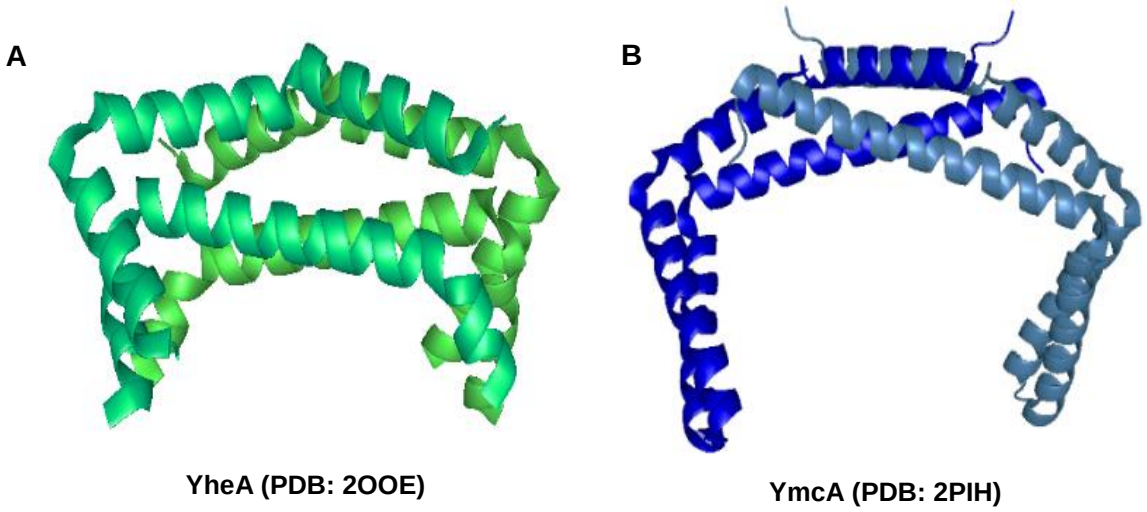
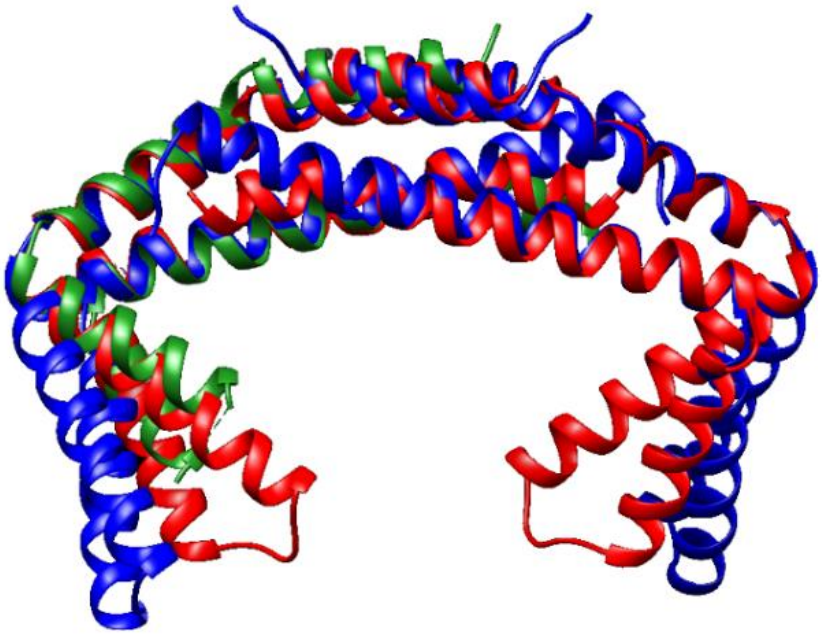


Figura 4-18 Superposición de las estructuras homodiméricas de las proteínas del dominio Ylbf de *B. subtilis* y *S. aureus.* Modelamiento de tres estructuras superpuestas que incluyen: la proteína YmcA con estructura reportada, el modelo 1 de YheA en rojo y la proteína YheA con estructura reportada *B. subtilis* (verde).



YheA *S. aureus* (modelo 1) rojo
YheA *B. subtilis* (PDB 2OOE) verde
YmcA *B. subtilis* (PDB 2PHI) Azul

5. Discusión

La capacidad de formar biofilm en *S. aureus* es proporcionada por una amplia red multifactorial de genes, dentro de los cuales está el operón *ica*, considerado como el principal mecanismo genético relacionado con la formación de biofilm por la producción de PIA (88, 89). Debido a su importancia, muchos estudios se han enfocado en descubrir nuevos mecanismos de regulación de los genes que conforman este operón (*icaA, icaD, icaB* e *icaC*) (56, 57, 90-93). Estudios realizados en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana permitieron identificar una secuencia palindrómica ubicada 240 nucleótidos dentro del gen *icaA*, que se encuentra altamente conservada en diferentes especies de *Staphylococcus* spp. Estas secuencias palindrómicas sirven como puntos para el reconocimiento de proteínas y se ha asociado con la expresión diferencial de genes dentro de operones policistrónicos (62, 94). Con el desarrollo de este estudio se avanzó en la identificación de una proteína que podría estar interactuando con esta secuencia palindrómica. Los ensayos de retardamiento en gel permitieron observar la formación de por lo menos dos complejos, cuya señal aumenta a medida que se aumenta la cantidad de proteína, lo que puede sugerir que muy probablemente la aparición de esa señal corresponde a la interacción de la sonda con alguna proteína del extracto (Figura 4-3). Durante el proceso de purificación, la cromatografía de exclusión por tamaño muestra que la proteína de interés eluye en las primeras fracciones (tamaño mediano), lo cual no corresponde al tamaño de la proteína YheA identificada, indicando que esta proteína podría estar formando algún complejo de mayor tamaño con otras proteínas.

Dentro del proceso de identificación por espectrometría de masas, se lograron identificar cinco proteínas, de las cuales 4 fueron enzimas metabólicas ya reportadas en *S. aureus*, con funciones y estructuras descritas en procesos relacionados con la formación de lactato en la glicolisis del metabolismo anaerobio (P2, L- lactato deshidrogenasa), síntesis de alanina a partir de piruvato dependiente de NAD (P3, alanina deshidrogenasa), transporte de carbohidratos (P4, fosfogluconato deshidrogenasa) y biosíntesis de proteínas (P5, metionil-tRNA sintetasa) (95, 96). Al parecer estás proteínas están siendo co-purificadas

con la proteína YheA. Interesantemente, esta misma proteína YheA fue identificada en las bacterias formando biolfim. Sin embargo, no existe en la literatura reportes que describan características o función de esta proteína para *S. aureus,* siendo nuestro estudio el primer reporte. Varios estudios de genómica y proteómica comparativa en esta especie, han analizado la expresión diferencial de genes con distintas funciones para bacterias en crecimiento planctónico y formando biofilm; Rech y colaboradores en el 2004, reportaron más de 200 genes que se sobre expresan en alguna de las dos formas de crecimiento y que codifican proteínas hipotéticas de función desconocida (84, 97, 98). Aunque ninguna de estas proteínas hipotéticas reportadas en estos estudios corresponde a la proteína YheA, identificada en nuestro estudio, si sugiere también que aún son muchas las proteínas para las que se desconoce su función, por lo que, aquí se considera la importancia de estudiar las posibles funciones de proteínas como YheA, como posible regulador de la formación de biofilm.

Aunque es indispensable confirmar la unión de YheA con la secuencia palindrómica (a través de la producción de la proteína recombinante), se emprendió un completo análisis "*in silico*" de la proteína, el cual permitió determinar que es una proteína pequeña y posee un dominio YlbF, que hace parte de una familia de reguladores transcripcionales, que en *B. subtilis* están asociados con la formación de biofilm, y otros procesos como esporulación y competencia (87). Además de YheA, existen dos proteínas en este microorganismo que tienen este dominio (YlbF y YmcA) y se ha demostrado experimentalmente que favorecen la formación de biofilm, via SinR/SinI, represor y activador de la transcripción de los genes del operón *eps* (Figura 4-13 A), encargado de la producción del exopolisacarido *en B. subtilis.* Ensayos de mutagénesis dirigida, eliminando los genes *ylbF y ymcA* mostraron una disminución en la expresión *eps*, en cepas con una fusión de la región promotora de *eps* con el gen reportero *lacZ* lo que podría sugerir una interacción de estas proteínas con la región promotora del operón (86, 87, 99). Adicionalmente, estas dos proteínas forman un complejo con la proteína Yaat que regula la fosforilación del regulador maestro Spo0A, cuya forma activa Spo0A~P favorece la formación de biofilm, la esporulación y la competencia en *B. subtilis* (85, 86). Estas evidencias abren la posibilidad de que probablemente la proteína YheA encontrada en *S. aureus,* por tener el dominio YlbF, sea una proteína de unión a DNA, actuando como regulador transcripcional y que adicionalmente pueda estar relacionada con procesos de formación de biofilm.

Por la reducida cantidad de información que se tiene de la proteína de interés, realizamos otros tipos de análisis, teniendo en cuenta estudios que destacan la importancia y las implicaciones que tiene la distribución de los genes dentro del genoma y sus implicaciones en la dinámica celular (100, 101). Los genes que codifican para las proteínas del dominio YlbF, fueron ubicados en regiones distantes dentro de los genomas de *B. subtilis* y *S. aureus* USA300. Sin embargo un análisis de los genes cercanos a YheA, ubicó en ambos genomas un gen que codifica para una proteína hipotética de función desconocida, pero cuyo producto se reconoce como una proteína de membrana (YheB). Ésta proteína podría tener alguna relación con la función de YheA en estos microorganismos. Estas dos proteínas podrían estar formando parte de un operón. En algunos sistemas de regulación como en los de dos componentes la proteína de membrana es codificada en el mismo operón con su regulador afín (100). Estos datos contrastaron con la predicción de la estructura secundaria, conformada por alfa-hélices con algunas regiones de residuos que no tienen ninguna conformación "*coil*". Todos estos estudios se basan en los análisis de las características de los residuos, que incluyen accesibilidad al solvente e hidrofobicidad, que fueron analizados en la proteína de interés, con la mayor parte de residuos expuestos y de baja hidrofobicidad, características que coinciden con las descritas en la literatura para las proteínas de unión al DNA (102). Adicionalmente, es una proteína de alta solubilidad y no se encontraron dominios transmebranales, lo que puede sugerir que se trata de una proteína reguladora encontrada en el citoplasma. Este análisis se realizó también para la proteína YheB, para la cual si se obtuvieron dominios transmembrana en los extremos de la secuencia donde los residuos de aminoácidos de alta hidrofobicidad muestran un nivel bajo de accesibilidad al solvente, indicando que se encuentran embebidos posiblemente en la membrana (Figura 4-15). Así, con estos resultados se podría sugerir que estas dos proteínas YheA y YheB están conformando un sistema de dos componentes de transducción de señal donde la proteína de membrana (YheB) comunica la señal al regulador (YheA) que posiblemente ejerce su función uniéndose al DNA. Sin embargo, son necesarias más evidencias experimentales para confirmarlo.

Adicionalmente, nosotros realizamos la predicción de la estructura terciaria de la proteína YheA de *S. aureus*, por medio de un múltiple "threading" que utiliza estructuras ya reportadas como modelo y alineamientos de estas con la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, para finalmente escoger la plantilla que mejor se ajuste, por medio del programa I-TASSER (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) (83). El

monómero conformado por alfa-hélices, fue comparado con lo reportado para YheA y YmcA de *B. subtilis,* las dos proteínas son homodímeros con función estructural desconocida y principalmente formadas por dos cadenas alfa-hélices (103, 104). A pesar de estas coincidencias con estructuras reportadas, la información sigue siendo escasa, no obstante, se conoce que muchas proteínas que regulan la expresión de genes reconocen el DNA como homodímeros, estos se han descrito como una forma sencilla que permite una unión fuerte y especifica (105). Diferentes formas de homodímeros de unión a DNA se han descrito, siendo las más comunes los motivos, "*helix-turn-helix*" (HTH), "*coiled coil* y *leucine zipper*" (106); este último es un motivo que se une al DNA por medio de dímeros de alfa-hélices, esto contrasta con la anotación funcional de nuestra proteína que por ontología de genes (GO) identificó una función molecular involucrada con un factor de transcripción con estructura terciaria reportada en PDB (2OQQ), que corresponde a un homodímero de dos cadenas en *Arabidopsis thaliana,* una especie de planta herbácea para la cual se ha reportado la proteína (HY5) que contiene el motivo "*leucine zipper*" o cremallera de leucinas que es característico de proteínas de unión a DNA (107) (108). Esta relación sugiere que posiblemente la proteína YheA, presenta una conformación estructural como este motivo para la interacción con la secuencia palindrómica. Estos acercamientos permiten proponer a YheA como la proteína que tienen diferentes características, de secuencia, fisicoquímicas y estructurales para unirse a DNA, junto con la coincidencia experimental de hallar esta proteína en las fracciones que mostraron señales de retardamiento de la sonda con la región palindrómica. Estos resultados son muy interesantes e importantes, ya que son el insumo fundamental para el direccionamiento de nuevos proyectos de investigación orientados a confirmar si YheA se une al gen *icaA* a través del reconocimiento y unión a la secuencia palindrómica y si está asociado con la formación de biofilm en *S. aureus*. Adicionalmente, el identificar la proteína YheA nos ha permitido identificar las proteínas YlbF y YmcA, y teniendo en cuenta el importante papel que cumplen estás en la formación de biofilm en *Bacillus subtilis*, de forma paralela se iniciará con la determinación de la posible relación de estas proteínas en la formación del biofilm en *Staphylococcus aureus* y otras especies de *Staphylococcus* spp.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Los análisis realizados en este estudio para la proteína identificada YheA de *S. aureus* parecen indicar que se trata de un regulador transcripcional, teniendo en cuenta la presencia del dominio YlbF relacionado con formación de biofilm en *B. subtilis.* Adicionalmente las características fisicoquímicas y estructurales también parecen mostrar que esta proteína tiene las condiciones adecuadas para favorecer la unión con moléculas de DNA. No obstante, es importante considerar la importancia de continuar con los estudios para confirmar dicha unión y su función posiblemente relacionada con formación de biofilm.

El hallazgo de la proteína identificada en este estudio es importante porque independientemente de que yheA interactúe o no con la secuencia palindrómica del gen *icaA*, es claro que este estudio nos permitió identificar una nueva familia de proteínas desconocidas en *S aureus* y con un alto potencial de estar jugando un papel fundamental en la regulación de la formación del biofilm.

Con este estudio se tiene un primer acercamiento al descubrimiento de nuevas rutas de regulación, direcciona nuevos estudios para confirmar y esclarecer de manera experimental la funcionalidad de este grupo de proteínas que incluye a YlbF y YmcA de *S. aureus* y si estas se encuentran también en otras especies de *Staphylococcus* spp, que tanto se conservan y si al igual que en *B. subtilis* estas proteínas pueden relacionarse con procesos fundamentales para la supervivencia de estos microorganismos, como lo es en este caso la formación de biofilm.

6.2 Recomendaciones

Confirmar la unión de la proteína YheA a la sonda a partir de ensayos "*in vitro*" con la proteína recombinante. La identificación de esta proteína abre paso a continuar con investigaciones que ayuden a esclarecer las funciones de la misma, como se demostró en este trabajo en el genoma de *S. aureus,* se encuentran todos los genes relacionados con el dominio YlbF de reguladores transcripcionales, por lo que podrían tener una importancia funcional para este microorganismo, teniendo en cuenta la falta de información acerca de estas proteínas.

A futuro se podría pensar en la obtención de cepas mutantes de la proteína YheA de *S. aureus*, para evaluar si afecta y de qué forma lo haría la expresión del biofilm en esta bacteria.

A nivel de bioinformática sería interesante obtener más detalles de la estructura tridimensional y así poder realizar ensayos de "*Molecular Docking*", y comprobar que efectivamente y de acuerdo con las evidencias obtenidas hasta ahora, la proteína YheA tiene dominios de unión a DNA.

A. Anexo: condiciones del corrido de FPLC en la columna de filtración en gel

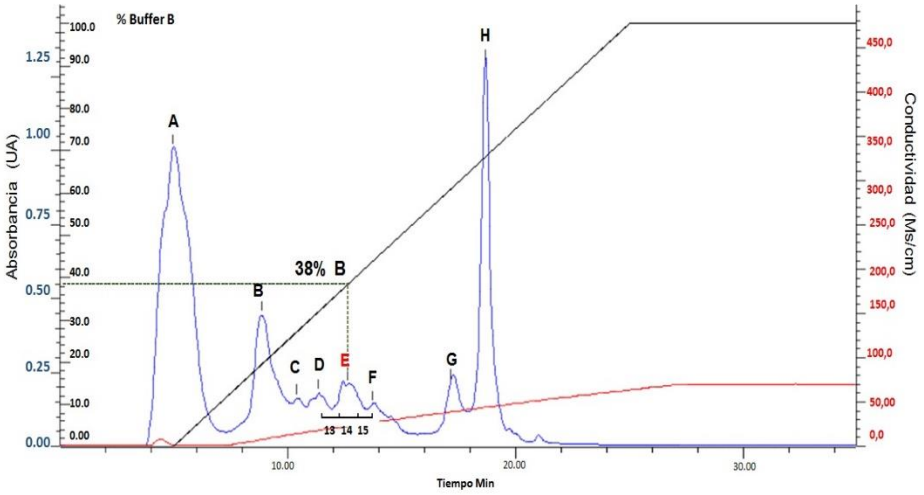
volumen		descripción			Parámetros
1	0.00	Colectar fracciones de 1ml durante todo el corrido			
2	0.00	Lámpara (detector UV)			
3	0.00	Flujo isocrático	A: TRIS HCl 20 Mm pH 7,5 B: NO	100% 0%	Vol: 2.00ml Flujo: 0.20%
4	2.00	Carga/inyección muestra	Muestra Loop estático	 Auto-inyección	Vol: 2.00ml Flujo: 0.20%
5	4.00	Cambio de válvula	Válvula AV 7-3		
6	4.00	Flujo isocrático	A: TRIS HCl 20 Mm pH 7,5 B: NO	100% 0%	Vol: 36ml Flujo: 0.20ml
	40.00	Fin del protocolo			

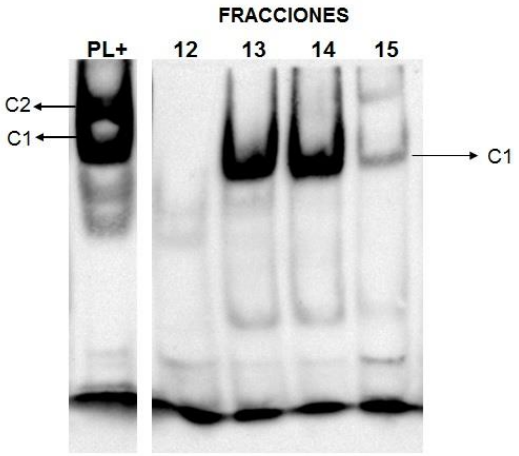
B. Anexo: condiciones del corrido de FPLC columna de intercambio aniónico

El protocolo puede variar dependiendo de la cantidad de inyecciones para concentrar la muestra.

volumen		descripción			Parámetros
1	0.00	Colectar fracciones de 1ml durante todo el corrido			
2	0.00	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	100% 0%	Vol: 3.00ml Flujo: 1.00ml/min
3	3.00	Carga/inyección muestra	Muestra Loop estático	Auto-inyección	Vol: 0,70ml Flujo: 1.00ml/min
4	3.70	Cambio de válvula		Válvula AV 7-3	
5	3.70	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	100% 0%	Vol: 0,50ml Flujo: 1.00ml/min
6	4.20	Carga/inyección muestra	Muestra Loop estático	Auto-inyección	Vol: 0,70ml Flujo: 1.00ml/min
7	4,.90	Cambio de válvula	Válvula AV 7-3		
8	4.90	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	100% 0%	Vol: 0,50ml Flujo: 1.00ml/min
9	5.40	Carga/inyección muestra	Muestra Loop estático	Auto-inyección	Vol: 0,70ml Flujo: 1.00ml/min
10	6.10	Cambio de válvula	Válvula AV 7-3		
11	6.10	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	100% 0%	Vol: 0,50ml Flujo: 1.00ml/min
12	6.60	Carga/inyección muestra	Muestra Loop estático	Auto-inyección	Vol: 0,70ml Flujo: 1.00ml/min
13	7.30	Cambio de válvula	Válvula AV 7-3		
14	7.30	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	100% 0%	Vol: 0,50ml Flujo: 1.00ml/min
15	7.80	Carga/inyección muestra	Muestra Loop estático	Auto-inyección	Vol: 0,70ml Flujo: 1.00ml/min
16	8,50	Cambio de válvula	Válvula AV 7-3		
17	8.50	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	100 0%	Vol: 0,50ml Flujo: 1.00ml/min
18	9.00	Carga/inyección muestra	Muestra Loop estático	Auto-inyección	Vol: 0,70ml Flujo: 1.00ml/min
19	9.70	Cambio de válvula	Válvula AV 7-3		
20	9.70	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	100% 0%	Vol: 1.00ml Flujo: 1.00ml/min
21	10.70	Gradiente lineal	A:A1: ácido B:B1: sal	100%---0% 0%-----100%	Vol: 20ml Flujo: 1ml/min
22	30.70	Flujo isocrático	A:A1: ácido B:B1: sal	0% 100%	Vol: 10.00ml
	40.70	Fin del protocolo			

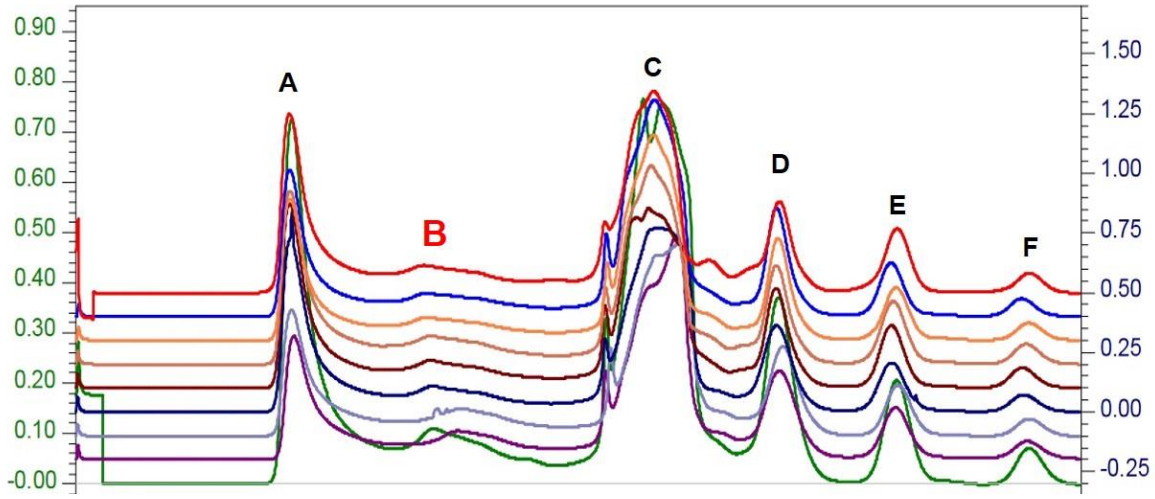
C. Anexo: cromatografía de intercambio aniónico de un extracto total de proteínas con la columna UNOQ de BioRad.





Bajo el mismo protocolo usado con la columna anterior, se realizó la prueba para la columna de BioRad. Las fracciones fueron evaluadas mediante el seguimiento por EMSA y en el pico E en rojo, con un 38% de buffer B se obtuvo señal positiva.

D. Anexo: reproducibilidad de la técnica FPLC por filtración en gel para extractos totales de *Staphylococcus aureus* USA300



Línea del detector	base	Max	unidad
UV CFG 131216-2* Method CFG	0.00	0.95	AU
UV CFG 121216 Method CFG	-0.10	1.90	AU
UV CFG 121216-1* Method CFG	-0.20	1.80	AU
UV CFG 121216-2 Method CFG	-0.30	1.70	AU
UV CFG 131216-3 Method CFG	-0.40	1.60	AU

Línea del detector	base	Max	unidad
UV CFG 131216-3* Method CFG	-0.50	1.50	AU
UV CFG 131216-4 Method CFG	-0.60	1.40	AU
UV CFG 131216-4* Method CFG	-0.70	1.30	AU
UV CFG 141216-5 Method CFG	-0.80	1.20	AU

Bibliografía

1. Bui LM, Turnidge JD, Kidd SP. The induction of Staphylococcus aureus biofilm formation or Small Colony Variants is a strain-specific response to host-generated chemical stresses. Microbes Infect. 2015;17(1):77-82.
2. Grinholc M, Nakonieczna J, Negri A, Rapacka-Zdonczyk A, Motyka A, Fila G, et al. The agr function and polymorphism: impact on Staphylococcus aureus susceptibility to photoinactivation. J Photochem Photobiol B. 2013;129:100-7.
3. Abraham NM, Jefferson KK. A low molecular weight component of serum inhibits biofilm formation in Staphylococcus aureus. Microb Pathog. 2010;49(6):388-91.
4. Dancer SJ. Importance of the environment in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. The Lancet Infectious Diseases. 2008;8(2):101-13.
5. Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. Frontiers in Immunology. 2013;4:507.
6. Pourakbari B, Khodabandeh M, Mahmoudi S, Sabouni F, Aziz-Ahari A, Bahador A, et al. Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus nasal colonization among patients and their parents /guardian in an Iranian referral hospital. Microb Pathog. 2017;107:75-80.
7. Jenney A, Holt D, Ritika R, Southwell P, Pravin S, Buadromo E, et al. The clinical and molecular epidemiology of Staphylococcus aureus infections in Fiji. BMC Infectious Diseases. 2014;14:160-.
8. Chuang Y-Y, Huang Y-C. Molecular epidemiology of community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus in Asia. The Lancet Infectious Diseases. 2013;13(8):698-708.
9. Wu D, Wang Q, Yang Y, Geng W, Wang Q, Yu S, et al. Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67(1):1-8.
10. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature. 2010;465(7296):346-9.
11. GREBO BI. Boletín Informativo GREBO Número 7 Infecciones micóticas en nuestros hospitales Bogotá, Colombia GREBO; 2015 [cited 2015 12-Noviembre]. Available from: www.grebo.org.

12. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. The Lancet. 2006;368(9538):874-85.
13. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. International Journal of Medical Microbiology. 2002;292(2):67-74.
14. Zendejas-Manzo GS. Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica. 2014;25(3).
15. Abee T, Kovács ÁT, Kuipers OP, van der Veen S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. Current Opinion in Biotechnology. 2011;22(2):172-9.
16. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence. 2011;2(5):445-59.
17. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus. The Lancet. 2006;367(9512):731-9.
18. Nimmo GR. USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. 2012;18(8):725-34.
19. Pahissa A. Infecciones producidas por Staphylococcus aureus 1ed. Books BMM, editor. Barcelona2009.
20. Sejvar JJ. *Staphylococcus* [staff"ə-lo kok'əs] etymologia. Emerging Infectious Diseases. 2013:1553.
21. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2014; 61 28-40.
22. Foster TJ, Geoghegan JA. Chapter 37 - *Staphylococcus aureus*. In: Schwartzman Y-WTSLP, editor. Molecular Medical Microbiology (Second Edition). Boston: Academic Press; 2015. p. 655-74.
23. Thwaites GE, Gant V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? Nat Rev Micro. 2011;9(3):215-22.
24. Salgado-Pabon W, Schlievert PM. Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine. Nat Rev Micro. 2014;12(8):585-91.
25. Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. *Staphylococcus aureus:* la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed 2006;17:287-305.
26. Patel H, Vaghasiya Y, Vyas BRM, Chanda S. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: A Challenge to Researchers and Clinicians. Bacteriology Journal. 2012; 2

23-45.
27. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. New England Journal of Medicine. 1998;339(8):520-32.

28. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. Nature reviews Microbiology. 2009;7(9):629-41.
29. Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación Revista Biomedica. 2014;25:129-43.
30. Bassetti M, Nicco E, Mikulska M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? International Journal of Antimicrobial Agents. 2009;34:S15-S9.
31. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department. New England Journal of Medicine. 2006;355(7):666-74.
32. Alvarez-Uria G, Reddy R. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Rural Area of India: Is MRSA Replacing Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the Community? ISRN Dermatology. 2012;2012:5.
33. Otto M. MRSA virulence and spread. Cellular Microbiology. 2012;14(10):1513-21.
34. Nimmo GR. USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection. 2012;18(8):725-34.
35. Vanhommerig E, Moons P, Pirici D, Lammens C, Hernalsteens J-P, De Greve H, et al. Comparison of Biofilm Formation between Major Clonal Lineages of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE. 2014;9(8):e104561.
36. Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR. Interconnections between Sigma B, agr, and Proteolytic Activity in *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. Infection and Immunity. 2009;77(4):1623-35.
37. Nazar C J. Biofilms bacterianos. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello [online]. 2007;67:161-72.
38. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial Biofilms: A Common Cause Of Persistent Infections. Science 1999; 284 1318-22.
39. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus biofilms*. Virulence. 2011;2(5):445-59.
40. Rieu A, Lemaître J-P, Guzzo J, Piveteau P. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology. 2008;126(1–2):76-82.
41. Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Generation of multiple cell types in Bacillus subtilis. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(1):152-63.
42. Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the Bacillus subtilis way. Nat Rev Microbiol. 2013;11(3):157-68.
43. Lasa I, Pozo JLd, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2005;28:163-75.

44. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, Nicoletti G, et al. agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2007;51(1):220-7.
45. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials. 2012;33(26):5967-82.
46. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology. 1998;6(12):484-8.
47. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu Rev Med. 2013;64:175-88.
48. Michu E, Cervinkova D, Babak V, Kyrova K, Jaglic Z. Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of ica-mediated biofilms. International Dairy Journal. 2011;21(3):179-84.
49. O'Gara JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters. 2007;270(2):179-88.
50. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* [mdash] the 'accidental' pathogen. Nat Rev Micro. 2009;7(8):555-67.
51. Abraham NM, Jefferson KK. A low molecular weight component of serum inhibits biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Microbial Pathogenesis. 2010;49(6):388-91.
52. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. Journal of Bacteriology. 1996;178(1):175-83.
53. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. Journal of Biological Chemistry. 1998;273(29):18586-93.
54. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. The Teicoplanin-Associated Locus Regulator (TcaR) and the Intercellular Adhesin Locus Regulator (IcaR) Are Transcriptional Inhibitors of the ica Locus in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 2004;186(8):2449-56.
55. Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of sarA in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation. Infection and Immunity. 2003;71(7):4206-11.
56. Cue D, Lei MG, Lee CY. Activation of sarX by Rbf is required for biofilm formation and icaADBC expression in Staphylococcus aureus. J Bacteriol. 2013;195(7):1515-24.
57. Cue D, Lei MG, Luong TT, Kuechenmeister L, Dunman PM, O'Donnell S, et al. Rbf promotes biofilm formation by Staphylococcus aureus via

repression of icaR, a negative regulator of icaADBC. J Bacteriol. 2009;191(20):6363-73.
58. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa Í, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. Journal of Bacteriology. 2001;183(9):2888-96.
59. Suyama M, Lathe WC, III, Bork P. Palindromic repetitive DNA elements with coding potential in *Methanocaldococcus jannaschii*. FEBS Letters. 2005;579(24):5281-6.
60. Tobes R, Pareja E. Repetitive extragenic palindromic sequences in the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 genome: extragenic signals for genome reannotation. Research in Microbiology. 2005;156(3):424-33.
61. Aranda-Olmedo I, Tobes R, Manzanera M, Ramos JL, Marqués S. Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. Nucleic Acids Research. 2002;30(8):1826-33.
62. Tobes R, Pareja E. Repetitive extragenic palindromic sequences in the Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 genome: extragenic signals for genome reannotation. Res Microbiol. 2005;156(3):424-33.
63. Suyama M, Lathe WC, 3rd, Bork P. Palindromic repetitive DNA elements with coding potential in Methanocaldococcus jannaschii. FEBS Lett. 2005;579(24):5281-6.
64. Si J, Zhao R, Wu R. An overview of the prediction of protein DNA-binding sites. Int J Mol Sci. 2015;16(3):5194-215.
65. Gaines AS. Detección y Purificación de Proteínas de Unión al Gen *icaA* en *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) Cepa USA300. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia 2010.
66. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, et al. A Novel *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotype Mediated by the Fibronectin-Binding Proteins, FnBPA and FnBPB. Journal of Bacteriology. 2008;190(11):3835-50.
67. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions. Applied and Environmental Microbiology. 2005;71(5):2663-76.
68. Gaudreault M, Gingras M-E, Lessard M, Leclerc S, Guérin S. Electrophoretic Mobility Shift Assays for the Analysis of DNA-Protein Interactions. In: Leblanc B, Moss T, editors. DNA-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology™. 543: Humana Press; 2009. p. 15-35.
69. Thermo-Scientific F. Overview of Protein-Protein Interaction Analysis 2015. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1601945-Protein-Interactions-Handbook.pdf.
70. Franco Mesa ML. Características, ventajas y desventajas de la hibridización in situ para la identificación de agentes patógenos. Revista Medicina Veterinaria; Núm 25 (2013). 2013.

71. Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T, Miura T. Hypoxic Induction of Prolyl 4-Hydroxylase α(I) in Cultured Cells. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(19):14139-46.
72. Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. Nat Protocols. 2007;2(8):1849-61.
73. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. Nat Protocols. 2006;1(1):16-22.
74. Campos D, Rikir R, Thonart P. Diferentes tecnicas de purificación de la inulinasa extracelular de un muntante de *Kluyveromices marxianus*. Biotecnología aplicada. 1992;9:246-58.
75. Englard S, Seifter S. Precipitation techniques. Methods in enzymology. 1990;182:285-300.
76. Wood EJ. Data for biochemical research (third edition) by R M C Dawson, D C Elliott, W H Elliott and K M Jones, pp 580. Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1986. ISBN 0-19-855358-7. Biochemical Education. 1987;15(2):616.
77. www.gelifesciences.com/sizeexclusion. Size Exclusion Chromatography Principles and Methods: © 2015 General Electric Company doing business as GE Healthcare; 2000 [cited 2015 12 Noviembre].
78. http://www.bio-rad.com/en-ch/sku/7801650-enrich-sec-650-10-x-300-column. ENrich™ SEC 650 10 x 300 Column: Copyright © 2015 Bio-Rad Laboratories; 2015 [cited 2015 12- Noviembre].
79. http://www.bio-rad.com/en-us/product/enrich-high-resolution-ion-exchange-columns. ENrich™ High-Resolution Ion Exchange Columns: Copyright © 2015 Bio-Rad Laboratories, Inc; 2015 [cited 2015 12 Noviembre].
80. Yergey A, Coorssen J, Backlund P, Blank P, Humphrey G, Zimmerberg J, et al. De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. J Am Soc Mass Spectrom. 2002;13(7):784-91.
81. Torres Cabra E, Hernández-Fernández J. Caracterización in silico de las proteínas del choque térmico Hsp70 y Hsp90 de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) y su posible actividad adaptativa. Mutis; Vol 4, Núm 1 (2014). 2014.
82. Cao B, Porollo A, Adamczak R, Jarrell M, Meller J. Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles. Bioinformatics. 2006;22(3):303-9.
83. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nat Methods. 2015;12(1):7-8.
84. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Gotz F. Differential gene expression profiling of Staphylococcus aureus cultivated under biofilm and planktonic conditions. Appl Environ Microbiol. 2005;71(5):2663-76.
85. Tortosa P, Albano M, Dubnau D. Characterization of ylbF, a new gene involved in competence development and sporulation in Bacillus subtilis. Molecular Microbiology. 2000;35:1110 -9.
86. Carabetta VJ, Tanner AW, Greco TM, Defrancesco M, Cristea IM, Dubnau D. A complex of YlbF, YmcA and YaaT regulates sporulation, competence and biofilm formation by accelerating the phosphorylation of Spo0A. Mol Microbiol. 2013;88(2):283-300.

87. Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Dervyn E, Ehrlich SD, Losick R, Kolter R. Genes involved in formation of structured multicellular communities by Bacillus subtilis. J Bacteriol. 2004;186(12):3970-9.
88. O'Gara JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett. 2007;270(2):179-88.
89. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials. 2012;33(26):5967-82.
90. Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR. Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in Staphylococcus aureus biofilm maturation. Infect Immun. 2009;77(4):1623-35.
91. Cerca N, Brooks JL, Jefferson KK. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (icaR) by SarA, sigmaB, and IcaR in Staphylococcus aureus. J Bacteriol. 2008;190(19):6530-3.
92. Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:38.
93. Yu D, Zhao L, Xue T, Sun B. Staphylococcus aureus autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an icaR-dependent manner. BMC Microbiology. 2012;12:288-.
94. Ogata H, Suhre K, Claverie JM. Discovery of protein-coding palindromic repeats in Wolbachia. Trends Microbiol. 2005;13(6):253-5.
95. Yeswanth S, Nanda Kumar Y, Venkateswara Prasad U, Swarupa V, Koteswara rao V, Venkata Gurunadha Krishna Sarma P. Cloning and characterization of l-lactate dehydrogenase gene of Staphylococcus aureus. Anaerobe. 2013;24:43-8.
96. Patrick J. Baker YS, Hitoshi Shibata, Svetlana E. Sedelnikova, David W. Rice. Analysis of the structure and substrate binding of Phormidium lapideum alanine dehydrogenase. nature structural biology. 1998;5:561-7.
97. Resch A, Leicht S, Saric M, Pasztor L, Jakob A, Gotz F, et al. Comparative proteome analysis of Staphylococcus aureus biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. Proteomics. 2006;6(6):1867-77.
98. Heckera M, Engelmanna S, Cordwell S. Proteomics of Staphylococcus aureus current state and future challenges. Journal of Chromatography B. 2003;787:179–95.
99. Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R. A master regulator for biofilm formation by Bacillus subtilis. Mol Microbiol. 2005;55(3):739-49.
100. Capra EJ, Laub MT. Evolution of two-component signal transduction systems. Annu Rev Microbiol. 2012;66:325-47.
101. Rocha EPC, Guerdoux-Jamet P, Moszer I, Viari A, Danchin A. Implication of gene distribution in the bacterial chromosome for the bacterial cell factory. Journal of Biotechnology. 2000;78(3):209-19.

102. Jones S, Shanahan H, Berman H, Thornton J. Using electrostatic potentials to predict DNA-binding sites on DNA-binding proteins. Nucleic Acids Research. 2003;31:7189-98.
103. Binkowski TA, Borovilos M, Abdullah J, A. J. yheA from Bacillus subtilis: http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2OEE; 2007.
104. Seetharaman J, Abashidze M, Forouhar F, Wang D, Fang Y, Cunningham K, et al. Crystal structure of Protein ymcA from Bacillus subtilis. http://www rcsb org/pdb/explore/explore do?structureId=2PIH. 2007.
105. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York2002. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26806/.
106. Brown T. Genomes. Oxford2002. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21115/table/A7039/.
107. Yoon MK, Kim HM, Choi G, Lee J-O, Choi B-S. Structural basis for the conformational integrity of the Arabidopsis thaliana HY5 leucine zipper homodimer. To be published. 2007.
108. Srivastava AK, Senapati D, Srivastava A, Chakraborty M, Gangappa SN, Chattopadhyay S. Short Hypocotyl in White Light1 Interacts with Elongated Hypocotyl5 (HY5) and Constitutive Photomorphogenic1 (COP1) and Promotes COP1-Mediated Degradation of HY5 during Arabidopsis Seedling Development. Plant Physiol. 2015;169(4):2922-34.