UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA YmcA EN LA REGULACIÓN DE LA HEMÓLISIS Y FORMACIÓN DE BIOFILM EN *Staphylococcus aureus*

Paula Camila Trujillo Morales

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Química
Bogotá, Colombia
2022

DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA YmcA EN LA REGULACIÓN DE LA HEMÓLISIS Y FORMACIÓN DE BIOFILM EN *Staphylococcus aureus*

Paula Camila Trujillo Morales

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director:

Jaime Eduardo Castellanos Parra *MSc, PhD*

Línea de Investigación:

Estudio de factores de virulencia y elementos genéticos móviles bacterianos.

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) – Universidad El Bosque

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2022

A Dios y a mis padres

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

_____

Nombre: Paula Camila Trujillo Morales

Fecha 04/05/2022

Agradecimientos

Primeramente, debo agradecer a Dios por haberme permitido realizar esta tesis de maestría y guiarme en la culminación de esta, por tantas veces que pensé en renunciar y él me mostró el camino para seguir adelante, también debo agradecer a mis padres, a mis abuelos, hermana y a la señora Rocio por todo el apoyo emocional y espitirual que me otorgaron a lo largo de estos años por comprender siempre, mi mal humor y mis frustraciones. A mi padre en especial por financiar toda mi maestría.

También debo de agradecer a Javier Escobar por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio y siempre tenderme la mano, a mis tutores por siempre guiarme en cada experimento y enseñarme tanto, a Zayda Corredor por toda su guía en cada experimento, a Javier Escobar, Jaime Castellanos y Carlos Nieto. Sin ellos esta tesis no hubiera sido posible.

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria gram positiva, patógeno oportunista con capacidad de generar infecciones potencialmente mortales en humanos por la producción de varios factores de virulencia, del mismo modo muchos procesos biológicos de esta bacteria no son completamente entendidos, como por ejemplo el procesamiento de su ARN. Recientemente, en nuestro laboratorio, se identificó la proteína Qrp/YheA la cual posee el dominio Com_YlbF, la deleción del gen *qrp* produce un aumento en la hemólisis de eritrocitos y disminución en la formación de biofilm, posiblemente asociada a la desregulación en la transcripción de algunos factores de virulencia de la bacteria. Otra proteína con dominio Com_YlbF es YmcA, cuya ausencia en *Bacillus subtilis* inhibe la formación de biofilm, a través de la alteración de la actividad de la RNasa Y, con quien también interactúa. En *S. aureus* no se conoce el rol de YmcA. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar la interacción de la proteína YmcA con RNasa Y y determinar su participación en la regulación de la hemólisis y formación de biofilm en *Staphylococcus aureus.* Para ello se realizó la mutación delecional del gen *ymcA,* que causó un descenso en la capacidad hemolítica de la bacteria y un incremento en la capacidad de formación de biofilm de esta. Por otro lado, con el ensayo de Far Western Blot se demostró la interacción de la proteína YmcA con la ribonucleasa RNasa Y. Concluyendo así que la proteína YmcA participa en la hemólisis y biofilm de *S. aureus* probablemente debido a la interacción de YmcA con la RNasa Y

Palabras clave: Com_YlbF, YmcA, biofilm, hemólisis, RNasa Y.

Abstract

DETERMINATION OF THE PARTICIPATION OF THE YmcA PROTEIN IN THE REGULATION OF HEMOLYSIS AND BIOFILM FORMATION IN *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus is a gram-positive bacterium, an opportunistic pathogen with the capacity to generate life-threatening infections in humans due to the production of various virulence factors. Currently, many biological processes of this bacterium are not fully understood, such as the processing of its RNA. Recently, in our laboratory, the Qrp/YheA protein was identified, which has the Com_YlbF domain. The deletion of the qrp gene produces an increase in erythrocyte hemolysis and a decrease in biofilm formation, possibly associated with transcription deregulation. some bacterial virulence factors. Another protein with a Com_YlbF domain is YmcA, whose absence in Bacillus subtilis inhibits biofilm formation by altering the activity of RNase Y, with which it also interacts. In S. aureus the role of YmcA is not known. Therefore, the objective of this work is to determine the interaction of the YmcA protein with RNase Y and to determine its participation in the regulation of hemolysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. For this, the deletional mutation of the ymcA gene was carried out, obtaining a decrease in the hemolytic capacity of the bacteria and an increase in its biofilm formation capacity. The Far Western Blot assay also demonstrated the interaction of the YmcA protein with ribonuclease RNase Y. Concluding that the YmcA protein participates in the hemolysis and biofilm of S. aureus and this is possibly due to the interaction of YmcA with RNase Y
Keywords: Com_YlbF, YmcA, biofilm, hemolysis, RNase Y.

Keywords: Com_YlbF, YmcA, biofilm, hemolysis, RNase Y.

Contenido

Pág.

1. Marco teórico 5

1.1 Generalidades de *Staphylococcus aureus* 5

1.2 Procesos básicos importantes en la colonización de *S. aureus* 5

2. Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la capacidad de formar biofilm y lisar eritrocitos de *Staphylococcus aureus.* 15

2.1 Materiales y métodos 15

2.1.1 Cepas bacterianas 15

2.1.2 Obtención de la cepa mutante, complementada y sobre-expresada 17

2.1.3 Ensayo de formación de biofilm de *S. aureus* 24

2.1.4 Ensayo de la capacidad hemolítica de *S. aureus* 26

2.2 Resultados 28

2.2.1 Deleción del gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4 28

2.2.2 Cepa complementada y sobre-expresada 32

2.2.3 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la hemólisis de eritrocitos de *Staphylococcus aureus.* 35

2.2.4 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la formación de biofilm de *Staphylococcus aureus.* 37

3. Efecto de la deleción del motivo putativo QKQAVN de la proteína YmcA en la capacidad de formar biofilm y lisar eritrocitos de *Staphylococcus aureus* 39

3.1 Materiales y métodos 39

3.2 Resultados 43

3.2.1 Modelamiento de la proteína YmcA y la proteína YmcA con la sustitución del motivo putativo QKQAVN 43

3.2.2 Cepa con la modificación del motivo putativo QKQAVN 45

4. Interacción de la proteína rYmcA con la ribonucleasa rRNasa Y en *Staphylococcus aureus.* 48

4.1 Materiales y métodos 48

4.1.1 Cepas bacterianas 48

4.1.2 Obtención de las proteínas recombinantes rYmcA y rRNasa Y 49

4.1.3 Purificación de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasaY-His ... 51

4.1.4 Obtención del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY 52

4.1.5 Aclarado del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY 53

4.1.6 Ensayo de reconocimiento del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY con la proteína rYmcA 54

4.1.7 Ensayo de Far Western Blot 56

4.2 Resultados 58

4.2.1 Inducción de las proteínas recombinantes rYmca-His y rRNasaY-His 58

4.2.2 Purificación de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasaY-His para los ensayos de interacción 60

4.2.3 Evaluación de especificidad del anticuerpo policlonal Anti-RNasa Y con las proteínas recombinantes 62

4.2.4 Ensayo de interacción Far Western Blot 63

5. Discusión 65

6. Conclusiones y perspectivas 69

Anexo 71

Bibliografía 72

Lista de figuras

Figura 1-1 Esquema de la formación de biofilm en Staphylococcus spp. 6

Figura 1-2 Alineamiento múltiple de la proteína YmcA en bacterias gram positivas 11

Figura 1-3 Estructura tridimensional de la proteína YmcA de *Bacillus subtilis*..... 13

Figura 2-1. Diagrama de flujo para el proceso de deleción del gen *ymcA* en *Staphyloccoccus aureus*. 21

Figura 2-2. Diagrama de Flujo para el proceso de obtención de la cepa complementadas y sobreexpresada. 24

Figura 2-3 Diagrama de los pasos más importantes en el ensayo de formación de biofilm. 26

Figura 2-4 Diagrama de los pasos más importantes en el ensayo cualitativo de hemólisis..... 27

Figura 2-5 Diagrama de los pasos más importantes en el ensayo cuantitativo de hemólisis..... 28

Figura 2-6 Análisis bioinformático. 29

Figura 2-7 Representación esquemática del procedimiento de dos pasos utilizado para obtener la recombinación de reemplazo del gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus*. 30

Figura 2-8 Confirmación molecular de la deleción del gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus*. 31

Figura 2-9. Análisis bioinformático de la construcción de la cepa complementada y sobreexpresada..... 32

Figura 2-10 Confirmación molecular del plásmido pJET- *ymcA* y ligación de pCN51-*ymcA*. 34

Figura 2-11 Ensayo de transformación en las cepas *E. coli* Top 10 y *S. aureus* RN4220 35

Figura 2-12 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la cepa 8325-4 en la hemólisis cuantitativa de eritrocitos por *Staphylococcus aureus*..... 36

Figura 2-13 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la cepa 8325-4 en la hemólisis cualitativa de eritrocitos por *Staphylococcus aureus*. 37

Figura 2-14 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la formación de biofilm de *Staphylococcus aureus* 38

Figura 3-1. Diagrama de Flujo para el proceso de obtención de la cepa con la sustitución del motivo putativo QKQAVN 42

Figura 3-2 Estructura tridimensional de las proteínas YmcA y YmcA con la modificación en el motivo QKQAVN *Staphylococcus aureus* NCTC8325-4. 44

Figura 3-3 Confirmación molecular del plásmido pJET- *ymcA-A* y ligación de pCN51-*ymcA-A*..... 45

Figura 3-4 Ensayo de transformación en las cepas *E. coli* Top 10 y *S. aureus* RN4220 47

Figura 4-1. Producción de proteínas recombinantes rYmcA y rRNasa Y..... 50

Figura 4-2. Purificación de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasaY-His 52

Figura 4-3. Purificación de anticuerpos policlonales Anti-YmcA y Anti-RNasa Y. .. 53

Figura 4-4. Aclarado del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY.. 54

Figura 4-5. Ensayo de reconocimiento del anticuerpo policlonal Anti-RnasaY..... 55

Figura 4-6. Diagrama del ensayo de Far Western Blot**. 56**

Figura 4-7 Estandarización del ensayo de Far Western Blot**.. ..... 57**

Figura 4-8 Ensayo de Far Western Blot **estandarizado 58**

Figura 4-9 . Confirmación de los genes *ymcA* y *rny* 59

Figura 4-10. SDS-PAGE de la expresión de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasa Y 60

Figura 4-11. Purificación y reconocimiento de las proteínas recombinantes rRNasaY-His y rYmcA-His 61

Figura 4-12. Evaluación del reconocimiento del anticuerpo anti-RNasa Y 62

Figura 4-13 Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-RNasa Y 63

Figura 4-14 Estandarización del ensayo de Far Western Blot **..... 64**

Figura 4-15 Ensayo de Far Western Blot **Membrana incubada con el anticuerpo aclarado Anti-RNasa Y. 64**

Figura 5-1 Esquema de la regulación molecular de la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* por el operón ica y el regulador agr 68

Figura 5-2 Esquema de la regulación de la hemólisis de eritrocitos en *Staphylococcus aureus* por la RNasa Y 68

Lista de tablas

Tabla 2-1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en la generación de la cepa mutante y las cepas complementada y sobre-expresada 15

Tabla 2-2. Oligonucleótidos usados para la producción de la cepa mutante y la cepas complementadas y sobre-expresada..... 22

Tabla 3-1 Cepas bacterianas y plásmidos usados para la obtención de la cepa con la variación del motivo QKQAVN. 39

Tabla 3-2. Oligonucleótidos usados para la producción de la cepa con la modificación del motivo putativo QKQAVN 41

Tabla 3-3. Valores de los parámetros de calidad de los modelos generados y evaluados con los programas PROCHECK, ERRAT y PROVE..... 44

Tabla 4-1 Cepas bacterianas, plásmidos y anticuerpos usados para la interacción de la proteína YmcA y RNasa Y. 48

Tabla 4-2. Oligonucleótidos usados para la confirmación de cepas usadas en la producción de las proteínas recombinantes rYmcA y rRNasa Y. 50

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

IPTG Isopropyl β-D1_thiogalactopyranoside

OD Densidad óptica

pb Pares de bases

BSA Albumina de suero bovino

TSB Triptona Soya

PIA Polisacárido intercelular de adhesión

PBS Buffer fosfato salino

LB Luria Bertani

Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria gram positiva, colonizador de algunas áreas de la piel y mucosas, causando diversas infecciones como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, síndrome de choque tóxico, entre otras [2,3,4].

La tasa de portadores de *S. aureus* en adultos sanos varía entre el 20-30 % de la población mundial, mientras que un 29% es colonizado por cepas de *S. aureus* que podrían causar alguna enfermedad grave y así presentar mayor riesgo de tener alguna infección invasiva y fallecer[48,49].

Una de las afecciones más relevantes causadas por *S. aureus* es la bacteriemia (presencia de bacterias en la sangre) la cual se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad, en comparación con la bacteriemia causada por otros patógenos, con una tasa de incidencia anual de 20 a 50 casos / 100.000 habitantes, y una tasa de mortalidad del 10 y 30%[50]. Las tasas de mortalidad más altas se producen en pacientes con infecciones pulmonares bacterémicas primarias y endocarditis infecciosa, mientras que las tasas más bajas se producen en pacientes con infecciones relacionadas con el catéter venoso central o periférico[50]. Debido a un crecimiento en el uso de dispositivos médicos, biomateriales e implantes en los últimos años, el número de casos de infecciones causadas por esta bacteria va en aumento, principalmente por la capacidad de formar biofilm y de sobrevivir por largos periodos de tiempo sobre implantes, ventiladores, catéteres intravenosos, entre muchos más, haciendo que esta bacteria sea considerada de gran importancia en la salud pública[6,51,52].

A pesar de la relevancia que tienen los genes implicados en los diferentes procesos básicos como la formación de biofilm y la expresión de factores de virulencia responsables de la actividad hemolítica de *S. aureus*, aún no se conocen de forma clara los múltiples mecanismos moleculares involucrados en su regulación[6,51,52]. Se cree que las proteínas con dominio Com_YlbF pueden estar implicadas en estos procesos según lo visto en otros

gram positivos como *Bacillus subtilis*, evidenciando no solo que la proteína YmcA presenta dicho dominio junto con la proteína YlbF, sino que estas dos proteínas interactúan con una tercera denominada YaaT formando el Complejo Y el cual se ha relacionado en procesos de competencia, esporulación y formación de biofilm de *B. subtilis*[28,29,30].

A pesar de esto la información del papel que cumplen las proteínas con dominio Com_YlbF en *S. aureus* es muy escasa. Sin embargo, Escobar y colaboradores identificaron y caracterizaron la proteína Qrp/YheA[35,53] la cual presenta un dominio Com_YlbF, cuya deleción cromosomal tiene efectos negativos en la generación de biofilm y variación en la capacidad hemolítica[35,53]. La proteína YmcA de *S. aureus* con su dominio Com_YlbF, se caracteriza por presentar un tamaño molecular de aproximadamente 13 kDa (121 aminoácidos). Escobar y colaboradores mediante arreglos bioinformáticos predijeron la estructura terciaria de esta proteína, encontrándose una estructura similar a la reportada para *B. subtilis* mediante alineamientos múltiples con otras proteínas YmcA de gram positivos, estableciendo que posee regiones altamente conservadas como el motivo putativo QKQAVN el cual puede ser importante para su función[35,53,33,54].

En *B. subtilis* el Complejo Y interactúa con una endoribonucleasa denominada RNasa Y, principal RNasa para la degradación del ARNm de *B. subtilis*[33] y así mismo, se ha demostrado que el homólogo de la ribonucleasa RNasa Y (*rny*/*cvfA*) en *S. aureus* juega un papel importante en la mediación de la estabilidad de ARNs mensajeros y afectando su virulencia [54,39,40,41]. Algunos estudios reportan que cuando se deleciona el gen *rny* (que codifica para la RNasa Y) del genoma de la bacteria, las mutantes presentan disminución en su virulencia, especialmente en su capacidad hemolítica[38], sin embargo, hasta el día de hoy no es claro si en *S. aureus* la RNasa Y pueda tener alguna interacción con las proteínas del Complejo Y, regulando algunos de los procesos en los que se ha visto implicado. En el 2018 Deloughery y colaboradores, demostraron que la ausencia de la proteína con dominio Com_YlbF (YlbF) en *S. aureus* puede ocasionar una alteración en la actividad de la ribonucleasa Y, específicamente afectando el reconocimiento del corte nucleotídico en el transcrito del operón *cggR-gapA*, el cual codifica para una proteína implicada en la glucólisis[33].

Debido a la importancia que tiene la proteína YmcA con dominio Com_YlbF y su posible participación con la actividad de RNasa Y en *B. subtilis,* se cree que esta proteína podría tener una función similar en *S. aureus* por lo cual se plantea la siguiente hipótesis de estudio:
La proteína YmcA está relacionada con la regulación de la hemólisis de eritrocitos y la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus y* tiene la capacidad de interactuar con la Ribonucleasa Y (RNasa Y).

A partir de esta hipótesis se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Está la proteína YmcA involucrada en la regulación de la formación de biofilm y en la capacidad hemolítica de *S. aureus*? ¿La proteína YmcA de *S. aureus* interactúa con la Ribonucleasa Y?

Para responder estas preguntas se realizó la deleción del gen *ymcA* de la cepa NCTC8325-4 de *S. aureus*, para su posterior uso en ensayos de hemólisis y biofilm, y adicionalmente se realizaron ensayos de Far-Western Blot con proteínas recombinantes de YmcA y RNasa Y para determinar la interacción de las mismas. El documento presenta 4 capítulos, el primero contiene los conceptos fundamentales del modelo de estudio *S. aureus,* los aspectos importantes en la formación de biofilm y actividad hemolítica. En el segundo, se presenta evidencia de la deleción el gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4 de *S. aureus* asimismo su participación en la formación de biofilm y hemólisis. El tercer capítulo muestra la modificación del motivo putativo QKQAVN y el impacto de este en la formación de biofilm y hemólisis ,el cuarto muestra la interacción de la proteína YmcA con la ribonucleasa RNasa Y y finalmente el capitulo 5 es la discusión de todos los resultados .

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la interacción de la proteína YmcA con RNasa Y y determinar su participación en la regulación de la hemólisis y formación de biofilm en *Staphylococcus aureus.*

Objetivos específicos

-Establecer el efecto de la deleción del gen *ymcA* en la capacidad de formar biofilm y lisar eritrocitos de la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus.*

- Evaluar el efecto de la deleción del motivo putativo QKQAVN de la proteína YmcA en la capacidad de formar biofilm y lisar eritrocitos de *Staphylococcus aureus.*

- Determinar la interacción de la proteína YmcA con la ribonucleasa RNasa Y en *Staphylococcus aureus.*

1. Marco teórico

1.1 Generalidades de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, oportunista, sésil y no formadora de esporas[1]. Crece en medios de cultivo tradicionales después de incubarse a 37°C por alrededor de 18 a 24 horas, formando colonias que oscilan entre los 0.5 mm a 1.5 mm de diámetro, las colonias se observan lisas, brillantes y de bordes enteros además presentan una consistencia cremosa, su coloración va del amarillo a dorado[1]. Además, el genoma de este organismo presenta un tamaño promedio de 2.800 Kb, formado por un único cromosoma circular y plásmidos de tamaño variable. Esta bacteria generalmente coloniza determinadas áreas de la piel y mucosas, cuando el hospedero se encuentra inmunosuprimido puede causar diversas infecciones como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, síndrome de choque tóxico, entre otras[2,3,4].

1.2 Procesos básicos importantes en la colonización de *S. aureus*

Existen dos procesos importantes para la colonización bacteriana por *S. aureus*, el primero es la formación de biofilm, el cual es regulado por complejas interacciones de factores genéticos que controlan la agregación bacteriana dentro de una matriz de polisacáridos extracelulares, ADN extracelular y proteínas; y el segundo es el proceso de hemólisis el cual se encuentra regulado principalmente por las hemolisinas[5].

1.2.1 Biofilm

El biofilm o biopelícula puede ser definida como una comunidad microbiana la cual se encuentra altamente estructurada, y presenta la capacidad de adherirse a superficies o a un sustrato, por medio de la auto-secreción de sustancias poliméricas extracelulares, que

conforman una matriz de biopolímeros, proporcionando la capacidad de evadir los múltiples mecanismos de eliminación producidos por el huésped (Figura 1-1)[6,7]. El desarrollo del biofilm por organismos como *Staphylococcus spp*. es un proceso de dos pasos que implica una unión inicial y una posterior fase de maduración (Figura 1-1). La unión inicial se da generalmente a una superficie sólida, como lo son los dispositivos médicos[7,8], seguido a esto se da la etapa de maduración que consiste en la agregación intercelular para luego terminar en la fase de liberación y se inicia un nuevo ciclo de formación de biofilm. Las moléculas que conectan las células en el biofilm son en su mayoría el exopolisacárido PIA (polisacárido intercelular de adhesión), además de ácidos teicoicos y otras proteínas[8,9].

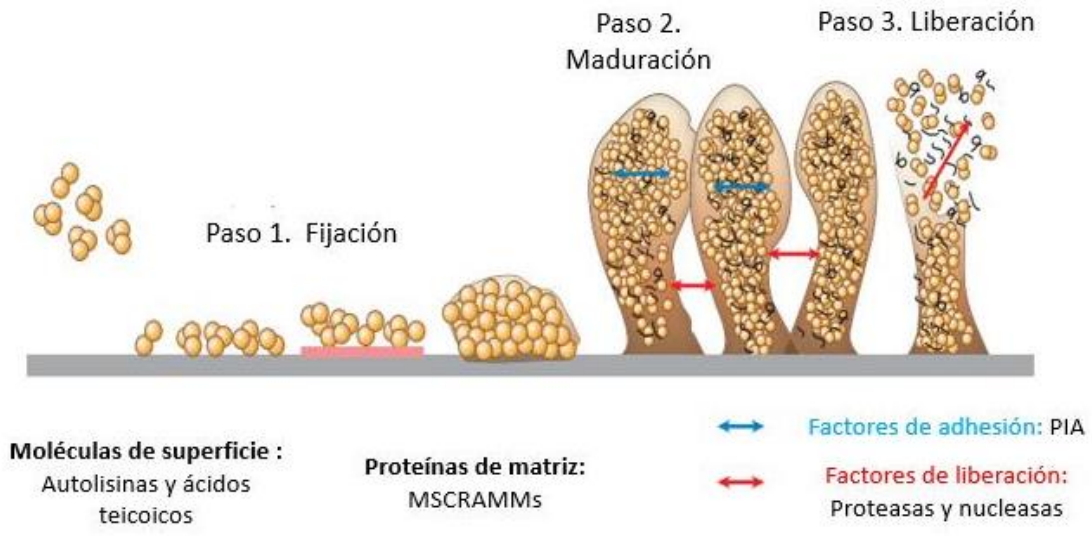


Figura 1-1 Esquema de la formación de biofilm en *Staphylococcus spp*. Figura adaptada de Otto 2013[10].

La formación de biofilm en *S. aureus* se da gracias a diversas moléculas, que participan en dos rutas, una asociada a moléculas de superficie bacteriana como la enzima autolisina o los ácidos teicoicos que permiten la fijación a una superficie abiótica, y proteínas ancladas a superficie las cuales se unen a las proteínas de la matriz del huésped que permiten la fijación a superficies bióticas denominadas colectivamente MSCRAMM (componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas adhesivas de la

matriz celular)[10]. La segunda vía es mediante la producción de la molécula más relevante para la formación de biofilm, el polisacárido intercelular de adhesión (PIA) secretado y sintetizado por el operón *ica*. PIA es un glicano de residuos de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosilo unidos a β-1,6 con una carga positiva neta que promueve la agregación intercelular y la unión de las células a las superficies inertes[9]. La formación del biofilm de *Staphylococcus aureus* está controlado por una red de vías regulatorias como icaR, el cual es el principal componente genético en regular su expresión, ya que la biosíntesis de PIA se realiza mediante los productos del locus del gen *ica*, que comprende una N-acetilglucosamina transferasa (icaA y icaD), una desacetilasa PIA (icaB), un exportador putativo de PIA (icaC) [8,9,11]. La formación del biofilm de *S. aureus* se ve afectada por las condiciones de crecimiento y también está controlada por otros múltiples reguladores globales como sarA ya que se ha evidenciado un aumento en el número de transcritos de este, cuando *S. aureus* está en condiciones de formación de biofilm en comparación con cultivos planctónicos, además los mutantes del gen *sarA* muestran una reducción en su capacidad de formación de biofilm[12,13,6.] Se ha planteado que sarA induce a la unión y formación temprana de biofilm probablemente al reprimir las enzimas extracelulares nucleolíticas y proteolíticas, y una vez que el biofilm ha alcanzado una población significativa, la expresión de otro regulador *agr* conduce a la regulación positiva de una serie de factores de virulencia que atacan al sistema inmune del huésped[6]. Además de esto, se ha demostrado que el locus *agr* regula a la baja los genes implicados en los factores de adherencia asociados a la pared celular[14] lo que conduce a una menor adherencia y a una disminución de la formación inicial de biofilm[6]. Igualmente, se ha evidenciado que *agr* regula positivamente la expresión de péptidos y nucleasas de tipo detergente que parecen aumentar el desprendimiento del biofilm [15,16,17]. Otro regulador global implicado en la formación de biofilm de *S. aureus* es el operón *sigB* ya que algunos de los factores necesarios para las primeras etapas de la formación de biofilm, son regulados por este, además que los mutantes de *sigB* no puede formar biofilm[17,18,19].

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* son capaces de generar biofilm dependiente del estímulo externo al que se encuentren sometidas, el primero dado por concentraciones moderadas de glucosa en el medio dando como resultado condiciones de acidez lo cual genera un biofilm compuesto principalmente por proteínas de unión a fibronectina A, B y

proteínas de adhesión, estas permiten la formación de agregados bacterianos densos. El segundo inducido por estrés osmótico el cual se puede dar por altas concentraciones de sales en el medio lo cual genera una matriz densa de polisacáridos este proceso es dependiente de la expresión del operón *ica* y el represor icaR, los cuales son los principales componentes en la regulación de la formación biofilm[8,55,56].

1.2.2 Hemólisis

Una de las particularidades importantes de *S. aureus* es su capacidad para secretar diversas toxinas que lisan las membranas celulares del hospedero, como lo son las toxinas citolíticas entre las cuales se encuentran las hemolisinas capaces de lisar los glóbulos rojos del huésped. Este tipo de proteínas forman una estructura de β-barril en las membranas citoplasmáticas, provocando la liberación del contenido celular y la muerte de la misma[10]. En *S. aureus* se han identificado cuatro hemolisinas diferentes (α, β, γ y δ):

Alfa hemolisina: la α-hemolisina es codificada por el gen *hla*, es un polipéptido con un peso molecular de 33 kDa, el cual presenta actividad citolítica hacia una gran variedad de tipos de células del huésped como lo son los queratinocitos humanos, células epiteliales, endoteliales y linfocitos, entre otras[20]. Esta toxina es secretada como un monómero el cual es soluble en agua y es capaz de unirse y oligomerizarse formando una estructura heptamérica en la membrana de la célula del huésped, formando un poro anfipático que permite el flujo de iones Ca^{2+} y K^{+}, además de ATP y moléculas de bajo peso molecular de hasta 4 kDa a través del poro, llevando a la lisis celular[21,22,23].

Beta hemolisina: La β-hemolisina tiene un peso molecular de 35 kDa y a diferencia de otras hemolisinas no forma un poro en la membrana celular plasmática, es una esfingomielinasa la cual se encarga de hidrolizar la esfingomielina de la membrana plasmática lo cual resulta en un incremento de la permeabilidad con pérdida progresiva de la carga de la superficie celular desestabilizando así la membrana plasmática ocasionando la lisis celular; este mecanismo es esencial en la lisis de los glóbulos rojos[22,23,24].

Delta hemolisina: La δ-hemolisina es un péptido anfipático pequeño de peso molecular de aproximadamente 2,9 kDa, presenta una estructura de hélice α, las cuales se unen a la superficie celular y afectan la curvatura de la membrana, desestabilizando así la membrana plasmática, además de esto se ha visto que, a alta concentración, actúa como detergente solubilizando la membrana y así logrando la lisis celular [23,24,25].

Gamma hemolisina: La γ-hemolisina es una toxina bicomponente que forma parte de una familia de proteínas con leucocidinas y toxina R^5, esta hemolisina afecta neutrófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos y eritrocitos, se cree que tienen el efecto en la inducción de la inflamación1. La γ-hemolisina presenta dos clases, la clase S y clase F, en la clase S se encuentran la subunidad hlgA y la subunidad hlgC y en la clase F se encuentra la subunidad hlgB. Cada componente se une secuencialmente a la superficie celular en forma monomérica antes de oligomerizarse en un preporo el cual está formado por cuatro componentes S dispuestos alternativamente con cuatro componentes F, el hetero-octámero maduro forma un poro de barril β transmembrana a través de la membrana plasmática, lo que conduce a la lisis de las células huésped en su mayoría de los eritrocitos[23,26,27].

Pese a que el proceso de formación de biofilm y de hemólisis de eritrocitos ya han sido descritos anteriormente en *S. aureus*, aún no se conocen de manera detallada los múltiples mecanismos moleculares involucrados en su regulación, no obstante, recientemente se ha evidenciado que las proteínas con el dominio Com_YlbF han sido implicadas en la regulación de procesos básicos bacterianos y podrían estar involucradas en estos procesos[53].

1.3 Proteínas con dominio Com_YlbF

En la actualidad, la mayor fuente de información disponible respecto al papel que cumplen las proteínas con dominio Com_YlbF es en bacterias gram positivas y proviene del estudio

en la bacteria *Bacillus subtilis.* Este dominio Com_YlbF y sus proteínas presentan forma de “pinza”, destacándose la proteína YlbF la cual fue la primera en ser identificada y caracterizada, demostrando que es necesaria para la competencia en *B. subtilis*. Así mismo, se ha determinado que las proteínas con dominio Com_YlbF pueden regular procesos básicos dentro de la bacteria[28,29,30] a través de la formación de un complejo tripartita formado por las proteínas YlbF y YmcA (dominio Com_YlbF) y la proteína YaaT. También se ha podido determinar que mutaciones tanto en las proteínas con dominio Com_YlbF como de YaaT tienen efectos directos en la capacidad de formación de biofilm y en los fenómenos de competencia y esporulación en *B. subtilis*[28,29,30]. La formación de biofilm en esta bacteria se cree que puede ser regulada mediante dos rutas en las cuales se ve involucrado el Complejo Y (YmcA- YlbF-YaaT), la primera ruta sugiere que este complejo estimula la actividad del regulador de respuesta Spo0A, aumentando su fosforilación activando así la transcripción de genes necesarios para formar biofilm[28,29,31]. En la segunda ruta se propone que el Complejo Y participa en la degradación del ARNm de sinR, un represor transcripcional que inhibe la transcripción de algunos genes relacionados con la formación de biofilm, a través de la interacción funcional con la ribonucleasa RNasa Y [32,33]. Adicionalmente, se cuenta con evidencia que este complejo de proteínas interactúa con la ribonucleasa Y ya que la mutación individual del Complejo Y (YlbF-YmcA-YaaT) altera la actividad catalítica de esta proteína, la cual a su vez regula la estabilidad de algunos ARNm a través del clivaje de los transcritos [33,34].

En la actualidad, la información del papel que cumplen las proteínas con dominio Com_YlbF en *S. aureus* es muy escasa. Sin embargo, recientemente en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) de la Universidad El Bosque se identificó y caracterizó la proteína Qrp/YheA [35], la cual presenta un dominio Com_YlbF, cuya deleción cromosomal tiene efectos negativos en la generación de biofilm y aumento en la capacidad hemolítica[35], además pareciera que la proteína YheA/Qrp tiene la capacidad de formar dímeros al igual que las otras proteínas descritas para este complejo (datos no publicados). Cuando se deleciona del genoma se observa un aumento en el número de los transcritos de algunas hemolisinas como lo son la alfa hemolisina, la delta hemolisina y la gamma hemolisina y proteínas que pueden estar implicadas en el proceso de hemólisis como el operón *agr* y el procesamiento del ARNIII, un ARN necesario en la expresión de la delta hemolisina (datos no publicados). Por otro lado, su análisis de interacción proteica mostró

una posible interacción con las proteínas YmcA y YlbF (datos no publicados). Paralelo a estos estudios en el 2018 Deloughery y colaboradores, quienes demostraron que la ausencia de la proteína YlbF (con dominio Com_YlbF) en *S. aureus* puede ocasionar una alteración en la actividad de la ribonucleasa Y, específicamente afectando el reconocimiento del corte nucleotídico en el transcrito del operón *cggR-gapA*, el cual codifica para una proteína implicada en la glucólisis[33].

1.4 Proteína de estudio: YmcA

La proteína YmcA se encuentra muy conservada en bacterias gram positivas[53] incluso Escobar en 2018 encontró para la proteína YmcA una secuencia consecutiva con los aminoácidos QKQAVN (Figura 1-2), la cual está conservada en todas las bacterias y se cree que podría desempeñar un papel fundamental en la proteína[53].

Figura 1-2 Alineamiento múltiple de la proteína YmcA en bacterias gram positivas tomado de Escobar 2018[53]. El recuadro amarillo indica los aminoácidos conservados.

La proteína YmcA de *B.subtilis* (PDB ID: 2PIH) se encuentra involucrada en la formación de biofilm, competencia y esporulación. Para cumplir con estas funciones la proteína participa de un complejo tripartita denominado "Complejo Y"[28]. En cuanto sus características estructurales, la proteína YmcA cristalizada en dos trabajos diferentes (PDB:2PIH; 6PRH) y resuelta mediante rayos X, reveló que está conformada por cinco hélices alfa (Figura 1-3A) y que tienen la capacidad de formación de homodímeros en forma de "pinza" (Figura 1-3B). Recientemente Danso y colaboradores, identificaron que

también tiene la capacidad de formar dímeros con la proteína YlbF (PDB: 6PRK), y en algunos casos dímeros de dímeros[36] (Figura 1-3C). Por otro lado, Reverdy y colaboradores, pudieron observar en *Bacillus subtilis* que la acetilación del residuo de lisina 64 puede ser necesario para su activación, ya que cuando se modifica este residuo, la bacteria disminuye la capacidad de formación de biofilm y posiblemente esta acetilación influya en la interacción de YmcA con las demás proteínas del Complejo Y[37].

En *Staphylococcus aureus* la información disponible para YmcA es escasa, Escobar y colaboradores predijeron mediante programas bioinformáticos, la estructura terciaria de esta proteína, encontrándose una estructura similar a la reportada para *B. subtilis*, por otro lado, se reportaron aminoácidos conservados que en la predicción de estructura terciaria se ubican en la parte del extremo de la pinza, los cuales podrían estar involucrados en la interacción con ácidos nucleicos, según lo reportado para las proteínas con este dominio[35].

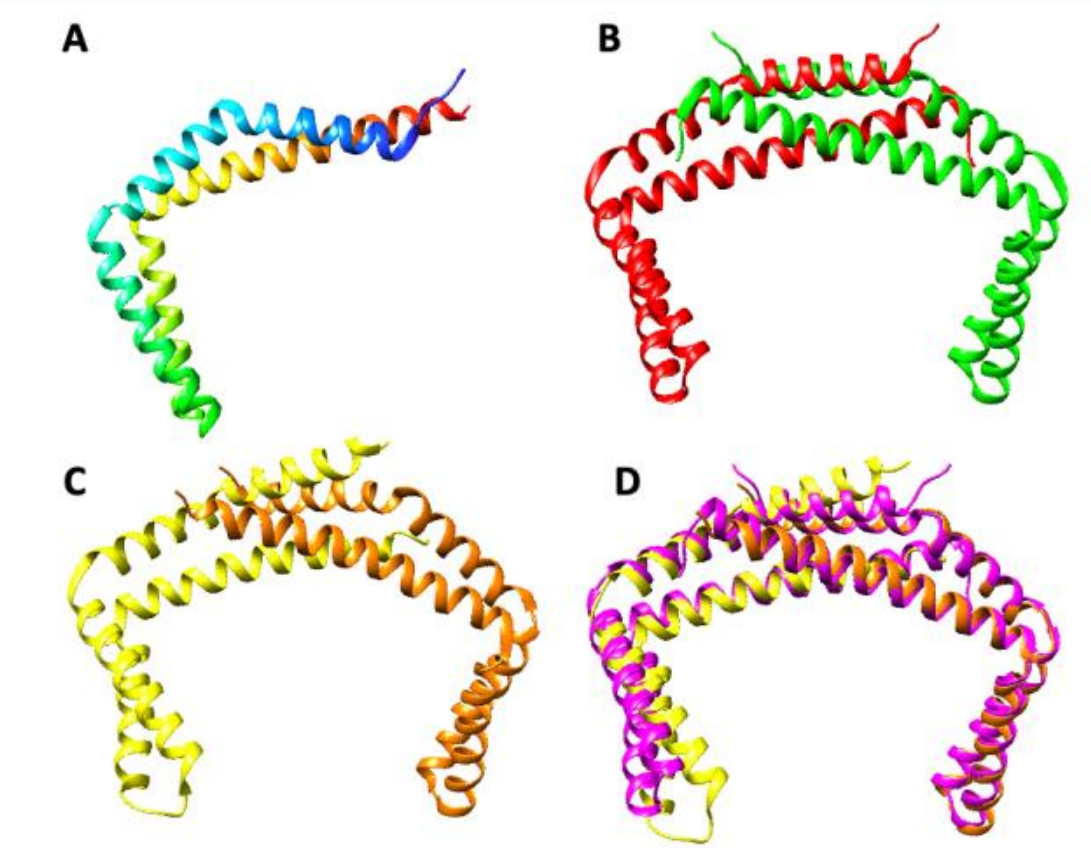


Figura 1-3 Estructura tridimensional de la proteína YmcA de *Bacillus subtilis*. A. Monómero de la proteína, B. Homodímero de la proteína, C. Dímero formado por la proteína YmcA y YlbF, D. Comparación de dímeros formados por la proteína YmcA y YlbF. Todas las estructuras fueron resueltas mediante rayos X (PDB: 6PRK).

Como se mencionó anteriormente se cree que la proteína YmcA junto con las demás proteínas del Complejo Y regulan diversos mecanismos básicos. En *S. aureus* hasta el día de hoy solo se han podido identificar proteínas hipotéticas para las tres proteínas del Complejo Y también para la Ribonucleasa, por el contrario, no se ha logrado identificar ninguna para la ruta de Spo0A, esto hace que nuestro trabajo se direccione hacia una sola ruta, sin desconocer que puedan existir las proteínas hipotéticas para la cascada de fosforilación.

1.5 Ribonucleasa Y y su papel regulador

La RNasa Y es la principal endonucleasa para la degradación del ARNm en *Bacillus subtilis* y como se describió anteriormente, y se ha reportado que el Complejo Y podría estar interaccionando con ella, regulando diversos procesos básicos en la bacteria[33]. Se ha demostrado que el homólogo de la RNasa Y (*rny*/*cvfA*) de *Staphylococcus aureus* juega un papel importante en la mediación de la estabilidad de ARNs mensajeros y afecta la virulencia de *S. aureus* mediando la expresión del gen regulador global (*agr*), el cual controla la expresión de diversos factores de virulencia como lo son las exotoxinas, entre las cuales se encuentran las hemolisinas, toxinas responsables de la hemólisis[38]. Adicionalmente se ha demostrado que la RNasa Y también puede regular negativamente al gen *sarZ*, un gen regulador de la virulencia en *S. aureus*, ya que las mutantes del gen *rny* (gen que codifica para RNasa Y) exhiben una expresión disminuida del locus *agr* y del gen *sarZ*, además de una capacidad hemolítica menor[39,40,41.] Además la RNasa Y juega un papel importante en el procesamiento y la estabilización de la transcripción inmadura del sistema regulador global de virulencia *Sae*PQRS, haciendo que esta sea esencial para la activación coordinada de genes de virulencia[42] , ya que cuando se deleciona el gen *rny* del genoma de la bacteria, las mutantes presentan disminución en su virulencia, especialmente en su capacidad hemolítica[38]. Hasta el día de hoy no se sabe si en *S. aureus* la RNasa Y pueda tener alguna interacción con las proteínas del Complejo Y, regulando algunos de los procesos en los que se ha visto implicada.

2. Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la capacidad de formar biofilm y lisar eritrocitos de *Staphylococcus aureus.*

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas usadas en este capítulo se describen en la Tabla 2-1. El ensayo de mutagénesis se realizó en la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus*, empleando *Escherichia coli* para almacenamiento y propagación de los plásmidos recombinantes.

Tabla 2-1. Cepas bacterianas y plásmidos usados en la generación de la cepa mutante y las cepas complementada y sobre-expresada

Plásmidos y cepas bacterianas	Características principales
Plásmidos	
pMAD	Plásmido termosensible para recombinación homóloga en *Staphylococcus aureus*[43]
pCN51	Plásmido para la sobreexpresión de genes en *Staphylococcus aureus* [44]
pJET	Vector de clonación
pJET-AD	Plásmido pJET con el fragmento A corriente arriba y D corriente abajo del gen *ymcA*

pJET-ymcA	Plásmido pJET con el gen ymcA
pMAD-AD	Plásmido pMAD con el fragmento A corriente arriba y D corriente abajo del gen *ymcA*
pCN51 -ymcA	Plásmido pCN51 con el gen ymcA
Cepas bacterianas	
8325-4	Cepa de referencia NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus* (WT)
RN4220	Cepa de *Staphylococcus aureus* derivada de la 8325-4 pero con una mutación en el sistema de modificación-restricción, apta para experimentos de manipulación genética.
Escherichia coli TOP10	*Escherichia coli* TOP10 cepa de clonación
ΔymcA	*S. aureus* 8325-4 mutante por deleción del gen ymcA
ΔymcA +pCN51	*S. aureus* 8325-4 ΔymcA con el plásmido pCN51 -ymcA
8325-4+pCN51	*S. aureus* 8325-4 con el plásmido pCN51 -ymcA
RN4221 pMAD-AD	*S. aureus* RN4220 con el vector pMAD-AD, usado para hacer deleción del gen ymcA
RN4220 pCN51 -ymcA	*S. aureus* RN4220 con el plásmido pCN51 con el gen ymcA
E. coli XL1 blue pMAD-AD	*E. coli* XL1 blue con el vector pMAD-AD.
E. coli XL1 blue pCN51 -ymcA	*E. coli* XL1 blue con el vector pCN51 -ymcA
USA 300	Cepa de *Staphylococcus aureus* usada como control positivo en la hemólisis de eritrocitos cualitativa de *Staphylococcus aureus*
Klebsiella pneumoniae	Cepa usada como control negativo en la hemólisis cualitativa de eritrocitos

2.1.2 Obtención de la cepa mutante, complementada y sobre-expresada

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos Tabla 2-2 (ymcA_A ymcA_B) para la amplificación de un fragmento corriente arriba (fAB) del gen *MiaB* con un tamaño de amplicón esperado de 500 pb y oligonucleótidos (ymcA_C ymcA_D) para la amplificación de un fragmento corriente abajo (fCD) del gen *ThiW* con un tamaño de amplicón esperado de 532 pb (Figura 2-1), la amplificación de estos fragmentos permitió realizar una PCR overlap, con el fin de obtener un solo fragmento (fAD) con un tamaño de amplicón 1011 pb (Figura 2-1) usando los oligonucleótidos qrp_A y qrp_D con el fin de que este fragmento se clonara en el vector de almacenamiento pJET y posteriormente en el vector de recombinación homóloga. Los oligonucleótidos diseñados fueron evaluados por PCR *in silico* con ayuda del programa SnapGene.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos Tabla 2-2 (ymcA_S y ymcA_AS) para amplificar el marco abierto de lectura completo del gen *ymcA* desde la cepa NCTC8325-4 con un tamaño de amplicón esperado de 383 pb (Figura 2-1). El posicionamiento de los oligonucleótidos y la evaluación de amplificación fue evaluado usando el programa SnapGene.

Análisis de enzimas de restricción

Se realizó un análisis bioinformático con el fin que los oligonucleótidos diseñados *ymcA*_A y *ymcA*_D contuvieran las secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción BamHI (G^GATCC) corriente arriba fAB (gen *MiaB*) y Ncol (C^CATGG) corriente abajo fCD (gen *ThiW*). Esto permitió la digestión del fragmento fAD en el vector de almacenamiento pJET y la clonación en el vector de recombinación homóloga pMAD, evaluado con el programa SnapGene. Así mismo, se realizó un análisis bioinformático para los oligonucleótidos diseñados *ymcA*_S *ymcA*_AS con el fin de identificar en estos las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI (G^GATCC) y EcoRI (G^AATTC). Estos primers permitieron la clonación del gen en el plásmido de

almacenamiento pJET y la posterior clonación en el vector de expresión pCN51, evaluando la digestión enzimática con el programa SnapGene.

Predicción de la amplificación de los genes y fragmentos de interés para PCR overlap, y clonación de los fragmentos en el vector de clonación, recombinación homóloga

Una vez diseñados los oligonucleótidos estos fueron evaluados en el programa SnapGene en una PCR *in silico* amplificando los fragmentos fAB y fCD. De igual manera se realizó *in silico* una PCR overlap con el fin de obtener el fragmento fAD y así evaluar la clonación de este fragmento en el vector de almacenaje pJET y en el vector de recombinación homóloga pMAD. También se evaluaron los oligonucleótidos *ymcA*_S *ymcA*_AS usando el programa SnapGene, los cuales fueron empleados en una PCR *in silico* para la amplificación del gen *ymcA*, con el fin de evaluar la clonación de este gen en el vector de almacenamiento pJET y en el vector de expresión pCN51.

Cepa mutante

La deleción del gen *ymcA* del genoma se realizó en la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus* usando el plásmido pMAD[43]. Los pasos más relevantes de la metodología son mostrados en la Figura 2-1. Para la deleción del gen *ymcA* se amplificaron dos fragmentos corriente arriba y corriente abajo del gen *ymcA*. Para el fragmento corriente arriba (fAB) gen *MiaB* que tiene un producto esperado de 500 pb se emplearon los oligonucleótidos ymcA_A y ymcA_B; y para el fragmento corriente abajo (fCD) gen ThiW que tiene un producto esperado de 530 pb se usaron los oligonucleótidos ymcA_C y ymcA_D. Estos fragmentos fueron obtenidos a partir de ADN genómico obtenido de la cepa NCTC8325-4. Una colonia de la cepa fue crecida en 5 mL de medio LB durante 12 horas, la suspensión bacteriana fue centrifugada y el ADN extraído a partir del precipitado de bacterias utilizando el método fenol-cloroformo como ha sido estandarizado previamente en el laboratorio. El ADN fue cuantificado por su absorbancia a 260 nm usado un nanodrop y entre 50 ng y 100 ng fueron usados para cada PCR.

Los fragmentos fAB y fCD fueron purificados a partir del gel de agarosa usando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific®) y fueron utilizados en una PCR de solapamiento, con el fin de obtener un único fragmento de ADN (fAD) con un tamaño de

1007 pb usando los oligonucleótidos *qrp*_A y *qrp*_D y la ADN polimerasa Phusion (Thermo Scientific®). El fragmento fAD fue purificado a partir del gel y clonado en el plásmido pJET (Thermo Scientific®) usando ADN ligasa y posteriormente transformado en células de *E. coli* XL1 blue por choque térmico (42 °C durante 45 s, 5 min en hielo). La suspensión bacteriana fue crecida en 1 mL de medio LB durante 1 hora a 37°C a 250 rpm y las bacterias transformantes fueron seleccionadas en placas de agar LB suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina. El plásmido recombinante pJET-AD (Tabla 2-1) fue confirmado por medio de PCR usando los oligonucleótidos pJET-S, pJET-AS, ymcA_B y ymcA_C.

El fragmento fAD fue liberado del plásmido pJET-AD por medio de restricción con las enzimas BamHI y EcoRI (FastDigest Thermo Scientific®) de acuerdo a las condiciones sugeridas por el fabricante, usando los sitios de restricción que fueron incorporados previamente en los oligonucleótidos previamente diseñados (Tabla 2-2). Una vez purificado el fragmento fue clonado en el plásmido pMAD, con extremos de reconocimiento a las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. El plásmido recombinante pMAD-AD (Tabla 2-1) fue transformado en células de *E. coli* XL1 blue por electroporación usando las siguientes condiciones: 1250 v, 25uF, 200Ω y un tiempo de exposición entre 3.9 y 4 ms. Las bacterias transformantes fueron seleccionadas en placas de agar LB suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina y X-Gal (80 µg/mL). El plásmido recombinante pMAD-AD (Tabla 2-1) fue confirmado por medio de PCR usando los oligonucleótidos ymcA_A y ymcA_B y secuenciación convencional (Sanger). Luego el plásmido recombinante pMAD-AD fue purificado desde las células de *E. coli* y transformado en la cepa RN4220 de *S. aureus* por electroporación usando las condiciones anteriormente descritas. Las células transformantes fueron crecidas en 1 mL de medio LB por 3 horas, incubadas a 28°C (temperatura a la cual el plásmido pMAD puede replicarse) a 200 rpm y luego seleccionadas en cajas de TSB (agar tripticasa soya) suplementadas con eritromicina (1,5 µg/mL) y X-Gal (80 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 2 o 3 días. El plásmido recombinante es primero transformado en la cepa RN4220, la cual es deficiente en el sistema de modificación-restricción y permite la adquisición de ADN foráneo, esto favorece la aceptación y permanencia del plásmido en otras cepas de *S. aureus*.

El plásmido pMAD-AD, previamente confirmado por PCR, fue purificado desde la cepa RN4220 y transformado en la cepa NCTC8325-4 por electroporación usando las condiciones anteriormente descritas. La cepa NCTC8325-4 con el plásmido recombinante

pMAD-AD creció en 1 mL de medio SMMP por 3 horas a 28°C y 200 rpm, luego se plaquearon en cajas de TSB (agar tripticasa soya) suplementadas con eritromicina (1,5 µg/ml) y X-Gal (80 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 2 o 3 días. Posteriormente, las colonias azules fueron resembradas en 5 mL de medio TSB suplementado con eritromicina (1,5 µg/ml) a 28°C a 250 rpm durante 24 horas.

Después de confirmar que la cepa NCTC8325-4 había adquirido y conservado el plásmido pMAD-AD se procedió a inducir la deleción del gen *ymcA*, para esto se sembraron 5 colonias en 5 mL de medio TSB suplementado con eritromicina (1,5 µg/mL) a 44°C a 250 rpm durante 24 horas. Luego se realizó una dilución seriada 1:10 por tres veces (dilución final 1:1000) y 60 µL de cada suspensión bacteriana fueron sembrados en placas de agar TSB suplementado con eritromicina (1,5 µg/mL) y X-Gal (80 µg/mL) a 44°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, las colonias de color azul claro (celeste) fueron resembradas en placas de agar TSB suplementado con eritromicina (1,5 µg/mL) y X-Gal (80 µg/mL) a 44°C durante 24 horas. De cada caja se seleccionaron entre 2 y 5 colonias y fueron sembradas en 5 mL de caldo TSB sin antibiótico a 28°C a 200 rpm durante toda la noche (16 horas). A partir de este crecimiento bacteriano se realizó una dilución seriada 1:10 por 6 veces (dilución final $1:10^{-6}$) y 60 µL de cada suspensión bacteriana fue sembrada en placas de agar TSB suplementado X-Gal (80 µg/mL) (sin antibiótico) a 37°C durante 48 horas o hasta que se distinguieron bien las colonias blancas. En estas colonias blancas existe un 50% de probabilidad que correspondan a cepas mutantes, por lo cual es necesario confirmar la mutación por PCR en el mayor número de colonias. Para esto cada colonia fue aislada por duplicado en placas de agar suplementadas con o sin eritromicina (1,5 µg/mL) y X-Gal (80 µg/mL) e incubadas a 28°C durante 24 horas. A las colonias blancas que crecieron en el agar TSB y que no crecieron en el agar suplementado con eritromicina se les extrajo el ADN y la deleción del gen *ymcA* fue confirmada por medio de PCR utilizando los oligonucleótidos ymcA_F y ymcA_E (Tabla 2-1). Las cepas mutantes fueron almacenadas a -80°C en medio TSB con glicerol al 35% hasta su uso.

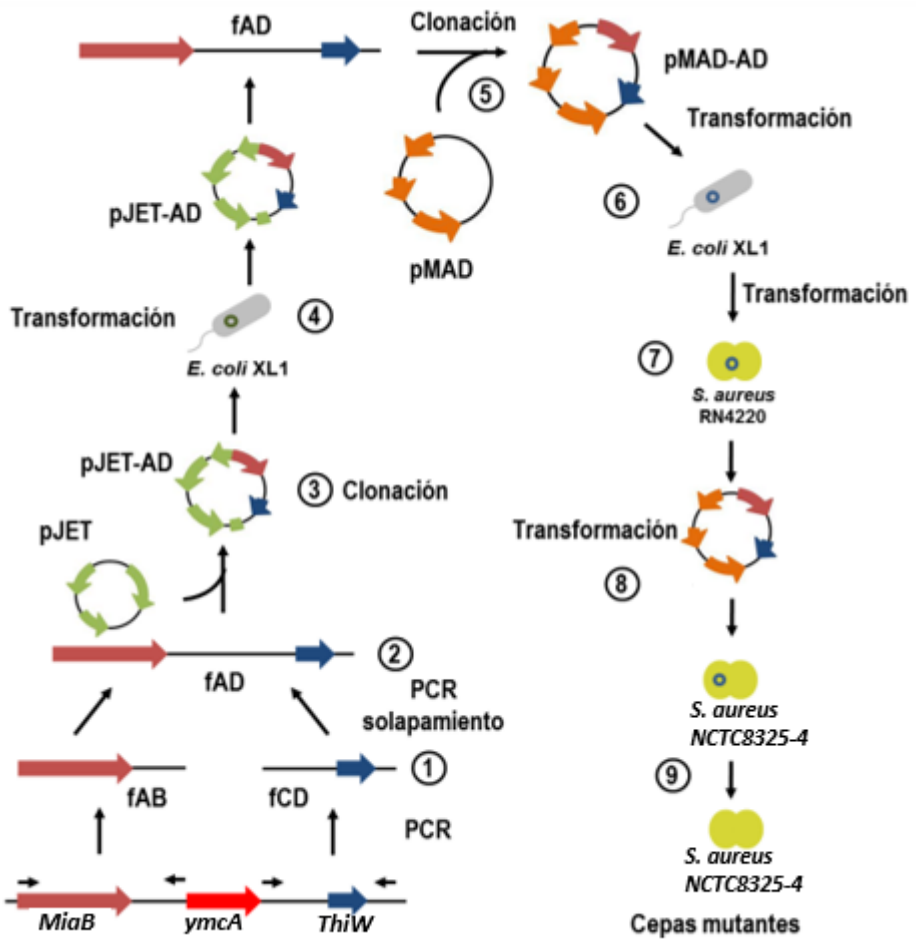


Figura 2-1. Diagrama de flujo para el proceso de deleción del gen *ymcA* en *Staphyloccoccus aureus*. Adaptado de Escobar-Pérez J. 2019: 1. Amplificación por PCR de los fragmentos fAB y fCD localizados corriente arriba y abajo del gen *ymcA* 2. Generación de un fragmento de ADN que contiene los dos fragmentos anteriores por medio de PCR de solapamiento, (fAD), 3. Clonación del fragmento de ADN (fAD) en el plásmido pJET, 4. Transformación de pJET-AD en *Escherichia coli* XL1 blue, 5. Liberación y clonación del fragmento de ADN (fAD) en el plásmido pMAD, 6. Transformación de pMAD-AD en *Escherichia coli* XL1 blue, 7. Purificación y transformación del plásmido pMAD-AD en la cepa RN4220 de *Staphylococcus aureus*, 8. Purificación y transformación del plásmido pMAD-AD en la cepas NCTC8325-4 9. Deleción del gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4 y confirmación por PCR.

Cepa complementada y sobre-expresada

En la Figura 2-2 se muestran los pasos más importantes realizados para la obtención de la cepa complementada y sobreexpresada, para lo cual se utilizó el plásmido pCN51 [44]. Se

diseñaron oligonucleótidos ymcA_S, ymcA_AS para amplificar el marco abierto de lectura completo del gen *ymcA* desde la cepa NCTC8325-4 (Tabla 2-2). Los oligonucleótidos utilizados tenían incorporados sitios de reconocimiento para las enzimas BamHI y EcoRI. El gen completo amplificado (383 pb) fue purificado a partir del gel de agarosa y clonado en el plásmido pJET® usando ADN ligasa y posteriormente transformado en células de *E. coli* XL1 blue por electroporación usando las siguientes condiciones: 1250 v, 25uF, 200Ω y un tiempo de exposición de 4 ms.

La suspensión bacteriana creció en 1 mL de medio LB durante 1 hora a 37°C a 250 rpm y las bacterias transformantes fueron plaqueadas en placas de agar LB suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina. El plásmido recombinante pJET-ymcA fue confirmado por medio de PCR usando los oligonucleótidos pJET-S, pJET-AS, ymcA_S y ymcA_AS (Tabla 2-2). El gen *ymcA* fue liberado del plásmido pJET-ymcA por medio de restricción enzimática con las enzimas BamHI y EcoRI (FastDigest Thermo Scientific®), purificado y clonado en el plásmido pCN51. El plásmido pCN51-*ymcA* se transformó en diferentes cepas de *E. coli* como lo fueron TOP 10, XL1 blue, además de las cepas de *S. aureus* NCTC8325-4 y RN4220. Los ensayos de transformación incluyeron a la cepa de alta eficiencia C3040 de *E. coli*

Tabla 2-2. Oligonucleótidos usados para la producción de la cepa mutante y la cepas complementadas y sobre-expresada

Código LGMB	Secuencia	Uso
ymcA_A	**GATCC**GGATTTAGTAAAACGAATC AAAGATAGA	Amplificación gen *MiaB* con reconocimiento de la enzima BamHI
ymcA_B	TATTGAATCACCATTTCCGGC	
ymcA _C	GCCGGAAATGGTGATTCAATAATT ACAAACAAAAAGGAGAACAATCA	Amplificación gen *ThiW* con reconocimiento de la enzima NcoI
ymcA_D	**GTAC**AAGAATACCACGTTTTTTTA GAGTAA	

ymcA _E	CGTTATAATAGAGATTTCCAAATTG	Confirmación de la deleción del gen *ymcA*
ymcA _F	AAACCTAATAAAATGTGTCAATAG	
pJET-S	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Primer corriente arriba del sitio de clonación del plásmido pJET
pJET-AS	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Primer corriente abajo del sitio de clonación del plásmido pJET
ymcA_S	C**GGGATC**CATGTATAATAAAGATGACG	Amplificación completa del gen *ymcA* en *S. aureus* para clonar en pCN51.
ymcA_AS	CCG**GAATTC**ATCACTATGCTTGGCTTTA	
GP553	GCACAGATTCATCAGAACCAA	Amplificación de un fragmento interno del gen *ymcA*
GP554	AACGTGTTTCCATTGTTGATAC	
GP555	CTAGCTTTATATTCTTTAGGTG	Confirmación del plásmido pCN51
GP556	CAGTATTTATTATGCATTTAGAATA	

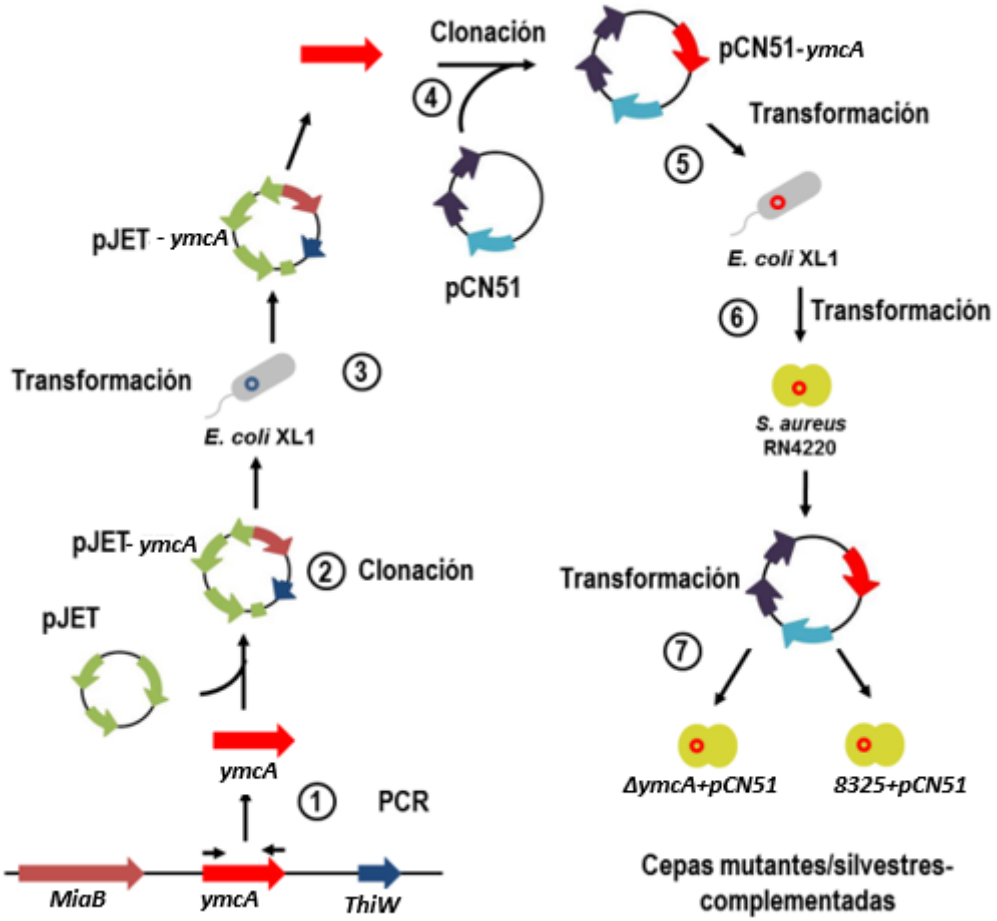


Figura 2-2. Diagrama de Flujo para el proceso de obtención de la cepa complementada y sobreexpresada. Adaptado de Escobar-Pérez J. 2019. 1. Amplificación por PCR del ORF completo del gen *ymcA*, 2. Clonación del gen *ymcA* en el plásmido pJET, 3. Transformación del plásmido recombinante pJET-ymcA en *Escherichia coli* XL1 blue, 4. Liberación y clonación del gen *ymcA* en el plásmido pCN51 , 5. Transformación del plásmido recombinante pCN51 -ymcA en *Escherichia coli* XL1 blue, 6. Purificación y transformación del plásmido pCN51 -ymcA en la cepa RN4220 de *Staphylococcus aureus*, 7. Purificación y transformación del plásmido pCN51 -ymcA en las cepas ΔymcA (mutante) y 8325-4 (silvestre) y confirmación por PCR.

2.1.3 Ensayo de formación de biofilm de *S. aureus*

En la Figura 2-3 se muestran los pasos más importantes realizados en el ensayo de formación de biofilm. Con el fin de evaluar el posible efecto de la deleción del gen *ymcA* en la formación de biofilm, se determinó *in vitro* en la cepa ΔymcA (mutante delecional),

mediante el ensayo de microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano tratadas para cultivo celular, empleando como control formador de biofilm la cepa NCTC8325-4. Los ensayos se realizaron de acuerdo al protocolo de Christensen y colaboradores[45], con modificaciones previamente estandarizadas en el laboratorio LGMB. Se partió de un inóculo de 5 mL de cada una de las cepas obtenidas en caldo TSB (Tripticasa Soya) suplementado con glucosa 0.25% con el fin de evaluar condiciones de acidez y suplementado con NaCl 3% para evaluar en condiciones de estrés osmótico, y se incubaron a 37°C a 200 rpm por 18 horas. Posteriormente se determinó la densidad óptica (DO) de cada uno de las suspensiones bacterianas a una longitud de onda de 600 nm, y se ajustó la OD de las mismas a 0.1 unidades de absorbancia. De cada una de las suspensiones bacterianas ajustadas, se tomaron 5 µL los cuales se sembraron en los pozos de la microplaca junto con 195 µL TSB (caldo Tripticasa Soya) suplementado con glucosa o NaCl. Luego de ser incubadas las placas a 37°C durante 24 horas sin agitación, se retiró el sobrenadante inactivándolo en una solución de agua - hipoclorito y se lavaron las placas tres veces por inmersión en agua-destilada, para retirar las bacterias en condición planctónica o no adheridas. Posteriormente se secó la placa por inversión y se adicionaron 200 µL de solución de cristal violeta en cada uno de los pozos. Pasados dos minutos, se descartó el colorante y la microplaca se sumergió nuevamente por inmersión en agua destilada tres veces más para retirar el exceso de colorante. Posteriormente el colorante adherido a cada pozo se solubilizó adicionando 200 µL de una solución de Etanol 80% - Acetona 20% y se dejó la placa en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de decoloración de cada pozo fue transferida a otra microplaca de fondo plano limpia y se cuantificó a 570 nm en el lector de Elisa. Los experimentos fueron realizados por triplicados independientes cada uno con lecturas por duplicado.

Figura 2-3 Diagrama de los pasos más importantes en el ensayo de formación de biofilm. 1. Las cepas bacterianas fueron cultivadas en medios suplementados con glucosa 0.25% y NaCl al 3% y ajustadas a 0,1 unidades de absorbancia a 600nm 2. Se agregaron 5 µL de las cepas previamente cultivadas junto con 195 µL de caldo TSB suplementado con NaCl al 3% y glucosa al 0.25% en placas de cultivo celular 3. Las placas fueron incubadas a 37°c por 24 horas 4. Las placas fueron teñidas con el colorante cristal violeta 5. Las placas fueron cuantificadas a 570 nm.

2.1.4 Ensayo de la capacidad hemolítica de *S. aureus*

Con el fin de evaluar la capacidad hemolítica de la cepa mutante delecional del gen *ymcA* de *S. aureus* se realizaron ensayos de tipo cualitativo y cuantitativo.

Ensayo cualitativo

En la Figura 2-4 se muestran los pasos más importantes realizados en el ensayo de hemólisis cualitativo. Para realizar el análisis cualitativo de la capacidad hemolítica de las diferentes cepas de trabajo (8325-4 y ΔymcA) estas crecieron inicialmente en 3 mL de medio BHI (Infusión cerebro corazón) a 37°C por 16 horas, luego las células se colectaron por centrifugación (900xg por 10 minutos) el sobrenadante fue descartado y el precipitado obtenido se lavó con PBS estéril al 0,89% y se colectaron nuevamente por centrifugación. Posteriormente 2 µL de bacterias se colocaron directamente en cajas de agar TSB enriquecidos con sangre de cordero al 3% y se incubaron a 37°C por 24 y 48 horas pasado este tiempo fueron medidos y comparados los halos de crecimiento, como control de hemólisis se usó la cepa con alta capacidad hemolítica USA300 y como control negativo de hemólisis la cepa de referencia ATCC *Klebsiella pneumoniae* 70060, los ensayos fueron realizados por triplicado.

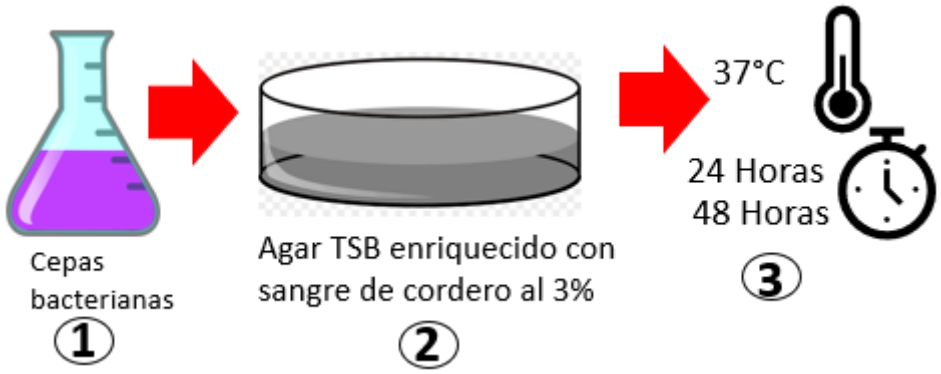


Figura 2-4 Diagrama de los pasos más importantes en el ensayo cualitativo de hemólisis. 1. Se cultivaron las cepas de interés 2. Se sembraron 2 µL de cada una de las cepas de interés en cajas de agar TSB suplementado con sangre de cordero al 3% 3. Las cajas fueron incubadas durante 24 y 48 horas a 37°C, pasado este tiempo se midieron y compararon los halos de hemólisis.

Ensayo cuantitativo

En la Figura 2-5 se muestran los pasos más importantes realizados en el ensayo de hemólisis cuantitativa. Para realizar el análisis cuantitativo se emplearon placas de cultivo celular en las cuales se empleó el mismo pellet bacteriano mencionado anteriormente para preparar una suspensión bacteriana equivalente a un MacFarlan de 2 (0,4 UA). Luego se sembraron 30 µL de esta suspensión en la microplaca junto con 270 µL de una suspensión de eritrocitos de cordero al 3%, obtenidos luego de ser lavados con PBS hasta obtener un sobrenadante translúcido. Como control de hidrólisis total se emplearán 270 µl de suspensión de eritrocitos, los cuales serán lisados con 20 µl de SDS al 1% (100% de hidrólisis). La microplaca se incubó a 37°C por 24 horas y se centrifugó a 500 xg, luego 100 µL del sobrenadante fueron transferidos a una nueva placa limpia de fondo redondo y se evaluó su absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA. El porcentaje de hemólisis se calculó teniendo como referencia el valor de la absorbancia de los eritrocitos control tratados con SDS (100% de hidrólisis). La significancia estadística entre las diferentes cepas (silvestre, mutante) empleadas para los ensayos de formación de biopelícula y hemólisis, se calculó por medio de una prueba t-Student , con tres réplicas.

Figura 2-5 Diagrama de los pasos más importantes en el ensayo cuantitativo de hemólisis. 1. Se cultivaron las cepas de interés y se ajustaron a 0.4 unidades de absorbancia 2. Se sembraron 30 µL de cada una de las cepas de interés en placas de cultivo celular con 270 µL de eritrocitos agar de cordero al 3% 3. Las placas fueron incubadas durante 24 y 48 horas a 37°C, pasado este tiempo se midieron las placas a 540 nm.

2.2 Resultados

2.2.1 Deleción del gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4

Análisis bioinformático

Con el fin de evaluar los oligonucleótidos diseñados, se realizó una PCR *in silico* (Figura 2-6), obteniéndose tres fragmentos: el fragmento AB correspondiente al gen *MiaB* con un tamaño de 500 pares de bases, el fragmento CD correspondiente al gen *ThiW* con un tamaño de 532 pares de bases y el fragmento AD con un tamaño de 1011 pb obtenido de la PCR overlap *in silico*. Además, se realizó la digestión enzimática del fragmento en el vector de almacenamiento pJET (Figura 2-6B) y la clonación *in silico* del fragmento AD en el vector de almacenamiento pJET y en el vector de recombinación homóloga pMAD (Figura 2-6C).

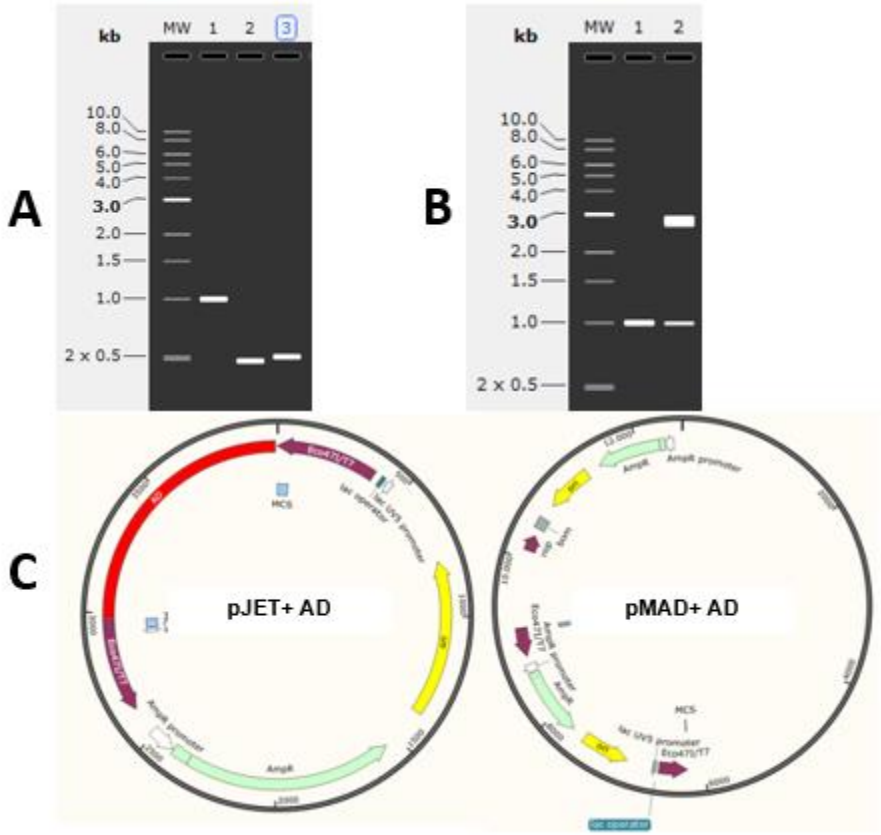


Figura 2-6 Análisis bioinformático. A. Gel de agarosa al 1% 1. Fragmento AD 2. Fragmento AB 532pb 3. Fragmento CD 1011 pb. Marcador de peso de 1Kb. B. Gel de agarosa al 1% 1 Fragmento AD. 2.Restricción enzimática del vector pJET con el fragmento AD con las enzimas BamHI+NcoI C. Clonación del fragmento AD en el vector de clonación pJET y en el vector de recombinación homóloga pMAD.

Para obtener la mutante delecional del gen *ymcA* se empleó la metodología de recombinación homóloga con el sistema pMAD[43] la cual se basa en el reemplazo alélico por recombinación en dos pasos, el primero es la integración del plásmido recombinante pMAD en el genoma de la bacteria y el segundo es la resolución del plásmido (Figura 2-7), este proceso se puede evidenciar visualmente por la acción que ejerce la β-galactosidasa sobre X-gal, inicialmente se realizó la construcción del plásmido recombinante pMAD con las secuencias que rodean el gen *ymcA*, con el fin de hacer la recombinación alélica. Este plásmido fue transformado en *E. coli*, para almacenarlo, posterior a esto fue transformado en la cepa RN4220 de *S. aureus*, con el fin de obtener las modificaciones adecuadas (metilación del ADN plasmídico) y que este pudiera ser

adquirido y mantenido eficientemente por la cepa NCTC8325-4 de *S. aureus* donde se realizó la deleción, esta fue confirmada por medio de dos PCR, usando diferentes oligonucleótidos Figura 2-8, en donde se evidencia la deleción correcta del gen *ymcA*

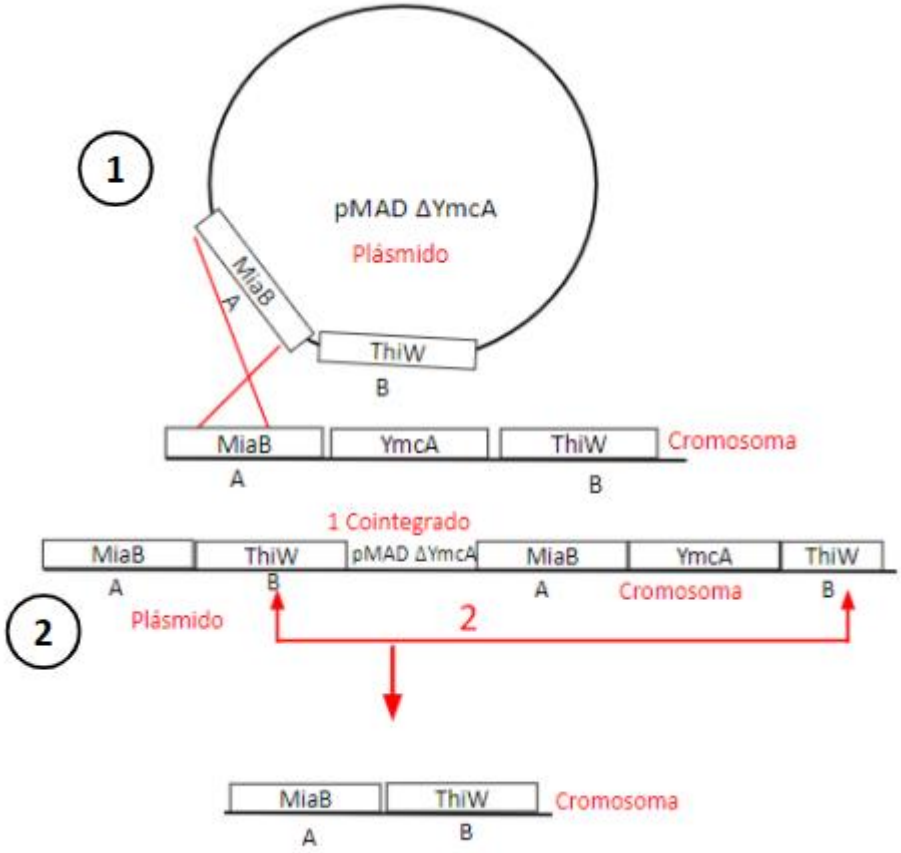


Figura 2-7 Representación esquemática del procedimiento de dos pasos utilizado para obtener la recombinación de reemplazo del gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus*. Las áreas etiquetadas como A y B representan secuencias de ADN ubicadas aguas arriba y aguas abajo del gen *ymcA*. Las líneas cruzadas indican eventos cruzados. La integración de pMAD a través de secuencias homólogas puede tener lugar en el área A o B. El cointegrado sufre un segundo evento de recombinación, regenerando el plásmido pMAD. El reemplazo del gen ocurre solo si el segundo evento de recombinación ocurre en el área B.

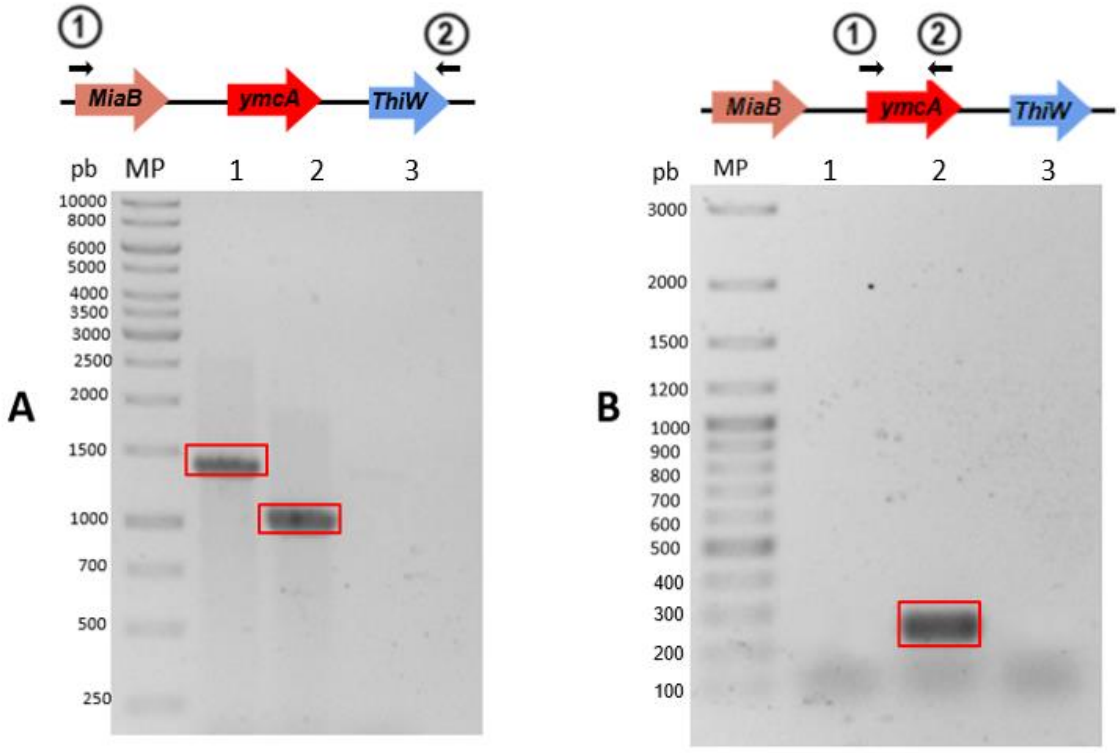


Figura 2-8 Confirmación molecular de la deleción del gen *ymcA* en la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus*. A. 1. Amplificación de la cepa NCTC8325-4 2. Amplificación de la cepa ΔymcA. Usando los oligonucleótidos ymcA_E y 2. ymcA_F. **B**. Amplificación de la cepa NCTC8325 usando los oligonucleótidos 1. GP553 y 2. GP554 MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp plus ADN Ladder. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con tinción de bromuro de etidio, las flechas indican la posición de los oligonucleótidos.

El tamaño esperado para la mutante del gen *ymcA* (ΔymcA) cuando se amplifica el gen corriente arriba del gen *ymcA* el gen *MiaB* y corriente abajo del gen *ymcA* el gen *Thiw* es de 1011 pb y para la silvestre (WT) es de 1370 pb Figura 2-8. Por el contrario, cuando se amplifica el gen *ymcA* de la cepa NCTC8325 usando los oligonucleótidos 1. GP553 y 2. GP554 (Tabla 2-1), no se espera amplificación para la mutante del gen *ymcA* (ΔymcA) el tamaño esperado para la cepa silvestre (WT) es de 238 pb.

2.2.2 Cepa complementada y sobre-expresada

Análisis bioinformático

Con el fin de evaluar los oligonucleótidos diseñados se realizó una PCR *in silico* (Figura 2-9A) obteniéndose la amplificación del gen *ymcA* con un tamaño de 383. Además, se realizó la digestión enzimática del gen *ymcA* en el vector de expresión pCN51 y en el vector de almacenamiento pJET Figura 2-9B y la clonación *in silico* de el gen *ymcA* en el vector de almacenamiento pJET y en el vector de expresión pCN51 (Figura 2-9B).

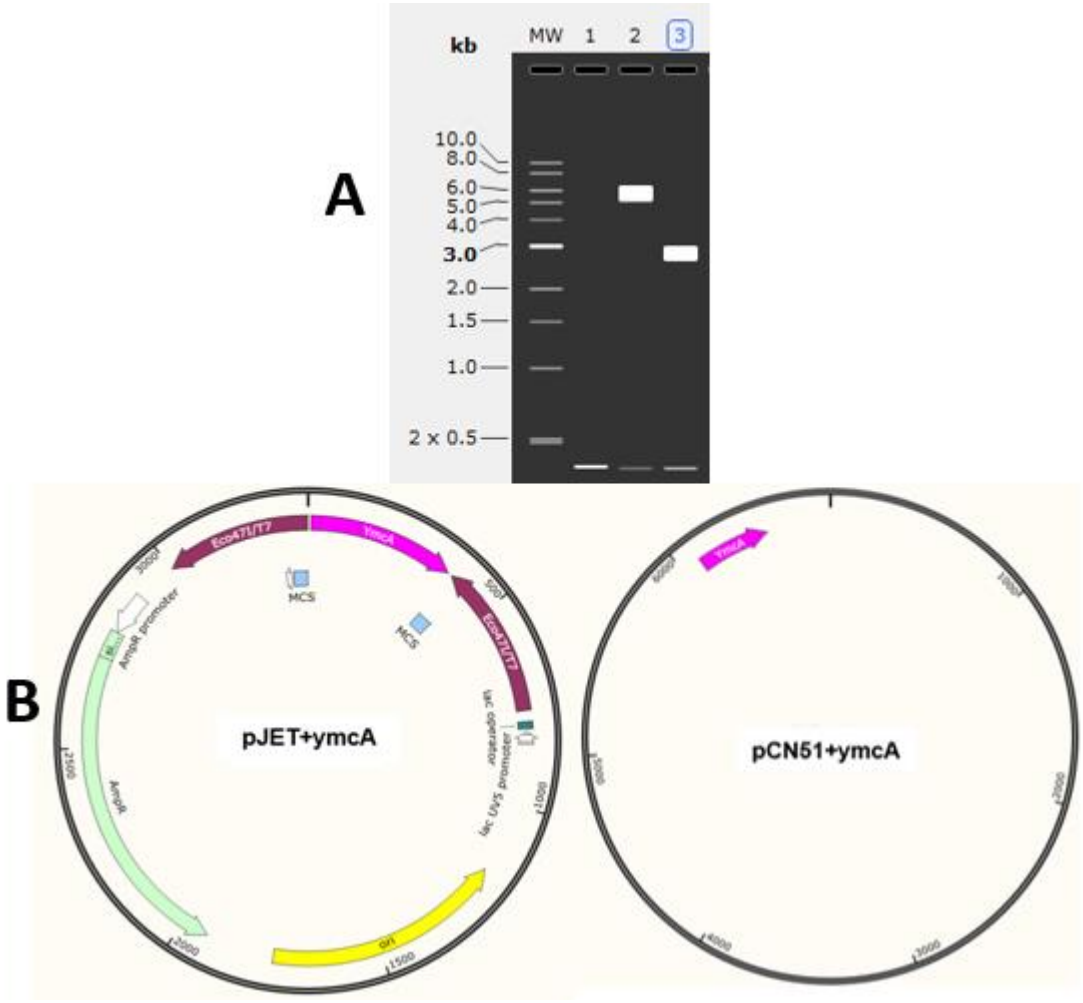


Figura 2-9. Análisis bioinformático de la construcción de la cepa complementada y sobreexpresada A. Gel de agarosa al 1% 1. Gen *ymcA* 383 pb 2. Restricción enzimática del vector pCN51 con el gen *ymcA* usando las enzimas BamHI+EcoRI **B.** Clonación del gen *ymcA* en el vector de clonación pJET y en el vector de expresión pCN51.

Para obtener la cepa complementada y sobre-expresada se empleó el plásmido pCN51 [44] el cual tiene origen de replicación para gram positivos, e inicialmente se amplificó el gen *ymcA* desde ADN de la cepa NCTC8325-4 de *S. aureus* y se clonó en el plásmido de almacenamiento pJET (Figura 2-10A). Lastimosamente el plásmido de expresión pCN51 no fue transformado en la *E. coli*. Sin embargo, con el fin de identificar las posibles razones por la cuales la transformación en *E. coli* no tuvo éxito, se realizó por PCR la confirmación de la ligación del gen *ymcA* al vector de expresión pCN51 observándose señal de la ligación (Figura 2-10B). con el fin de evaluar si la deficiencia en la transformación por electroporación por la no adquisición del plásmido en las cepas electrocompetentes de interés, se realizó un ensayo de transformación empleando y preparando electrocompetentes de las cepas TOP 10 de *E. coli* y RN4220 de *S. aureus* sensibles a los antibióticos ampicilina (Figura 2-11A) y eritromicina respectivamente (Figura 2-11B). El ensayo permitió identificar que las cepas no eran resistentes a los antibióticos de interés, y se realizó la transformación por electroporación de la ligación del gen *ymcA* a el vector de expresión pCN51 al cual se le realizó previamente su confirmación por PCR. Asimismo, se emplearon como controles del ensayo de transformación el plásmido pCN51 vacío y del plásmido pMAD (Figura 2-11). Evidenciándose que las cepas tanto de *E. coli* TOP 10 y de *S. aureus* RN4220 son viables y electrocompetentes, ya que al realizar la transformación con el plásmido pMAD esta tuvo éxito al igual que ocurrió cuando se realizó la transformación con el plásmido pCN51 vacío. A pesar que las cepas se encontraban en buen estado al igual que el plásmido pCN51, la transformación con la ligación del plásmido pCN51 con el gen *ymcA* fue deficiente imposibilitando la obtención de las cepas complementada y sobre-expresada (Figura 2-11).

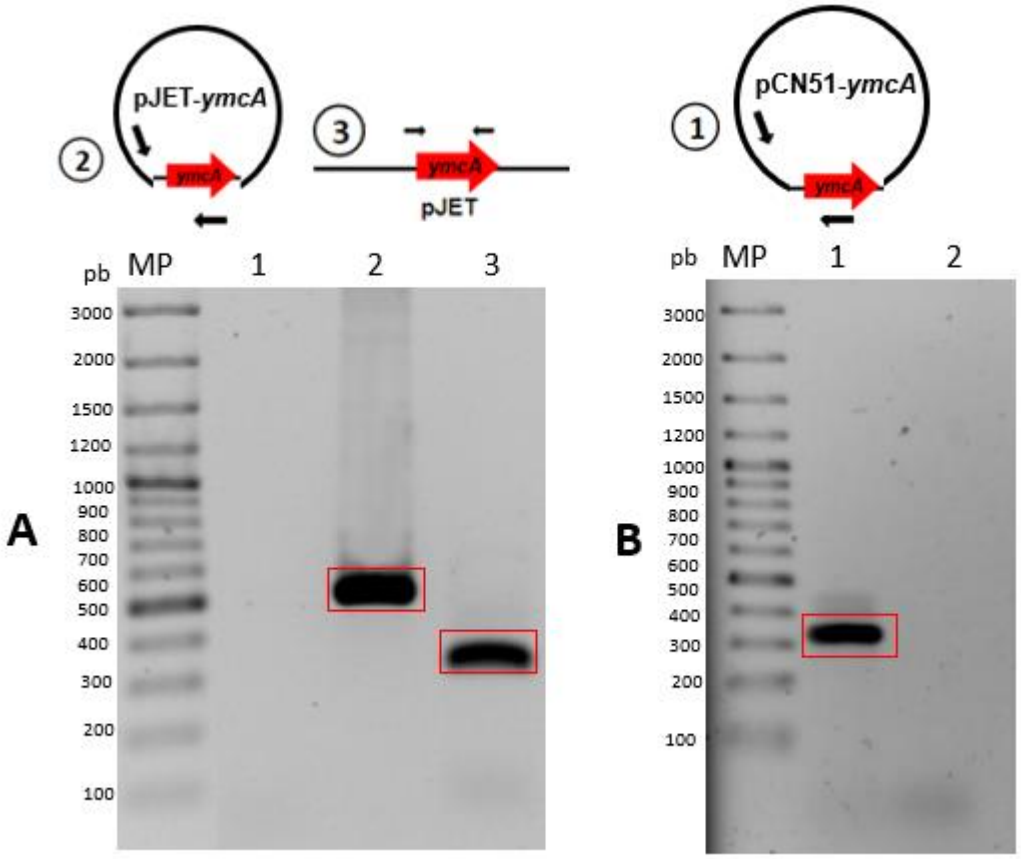


Figura 2-10 Confirmación molecular del plásmido pJET- *ymcA* y ligación de pCN51-*ymcA*. A. PCR de la colonia de la cepa *E. coli* TOP 10 con el plásmido pJET-*ymcA* 1. Control de reactivos 2. Amplificación usando los oligonucleótidos pJET-S y ymcA_AS 3. Amplificación usando los oligonucleótidos ymcA_S y ymcA_AS. Gel de agarosa 1%, MP marcador de peso de 100pb B PCR de la ligación pCN51-*ymcA* usando los oligonucleótidos GP553 y GP555. MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp plus ADN Ladder. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con tinción de bromuro de etidio, las flechas indican los oligonucleótidos.

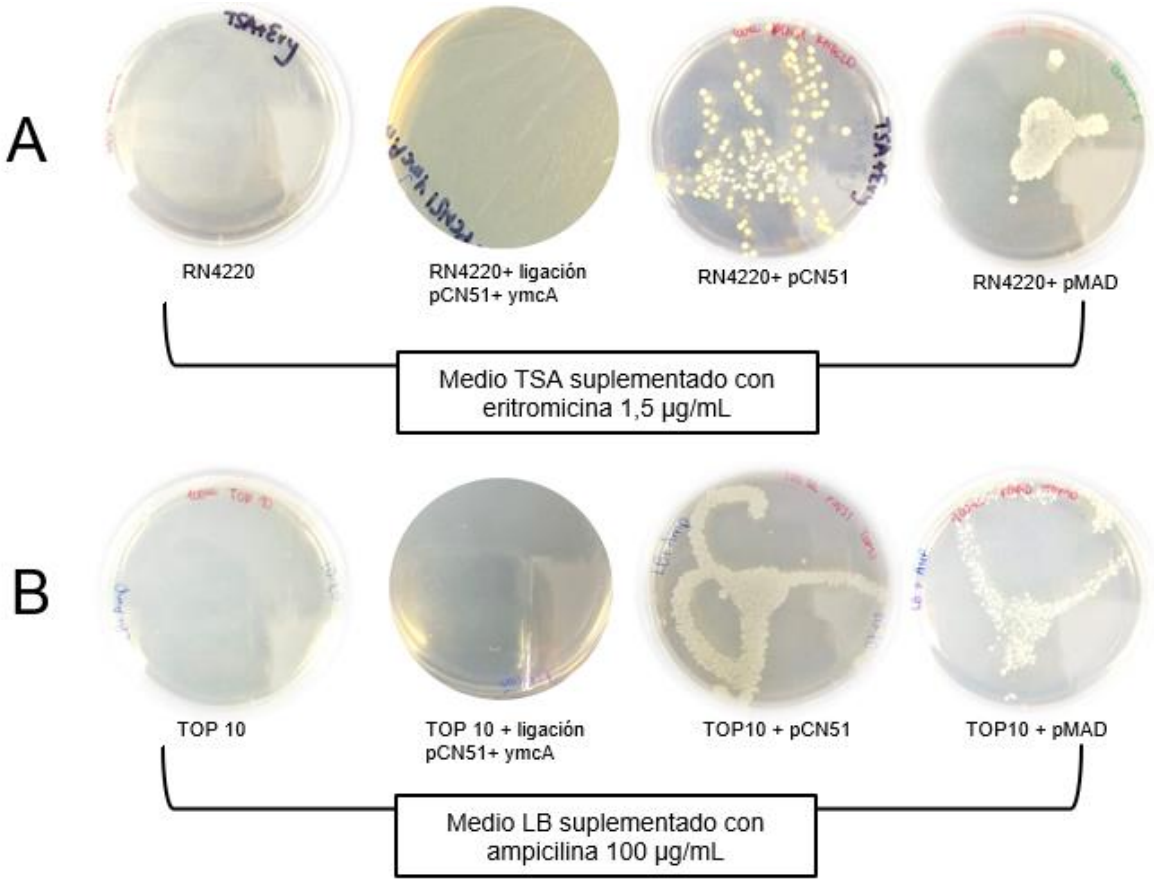


Figura 2-11 Ensayo de transformación en las cepas *E. coli* Top 10 y *S. aureus* RN4220. A. Ensayo de transformación en la cepa RN4220 en medio TSB suplementado con eritromicina 1,5 µg/mL. B. Ensayo de transformación en la cepa TOP 10 en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL.

2.2.3 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la hemólisis de eritrocitos de *Staphylococcus aureus.*

Una vez confirmada la deleción cromosomal del gen *ymcA* se evaluó su capacidad hemolítica mediante el ensayo de hemólisis de eritrocitos de manera cuantitativa (Figura 2-12) y cualitativa (Figura 2-13), observándose a las 24 horas una disminución en la capacidad hemolítica de aproximadamente el 70% en la cepa *ΔymcA* comparado con la cepa WT, con una diferencia estadísticamente significativa según la prueba t-Student a un intervalo de confianza del 95%. Y para el tiempo 48 horas también se evidenció una disminución en capacidad hemolítica aproximadamente del 40% para la cepa *ΔymcA* con

respecto a la cepa WT, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa según la prueba t-Student a un intervalo de confianza del 95% (Figura 2-12).

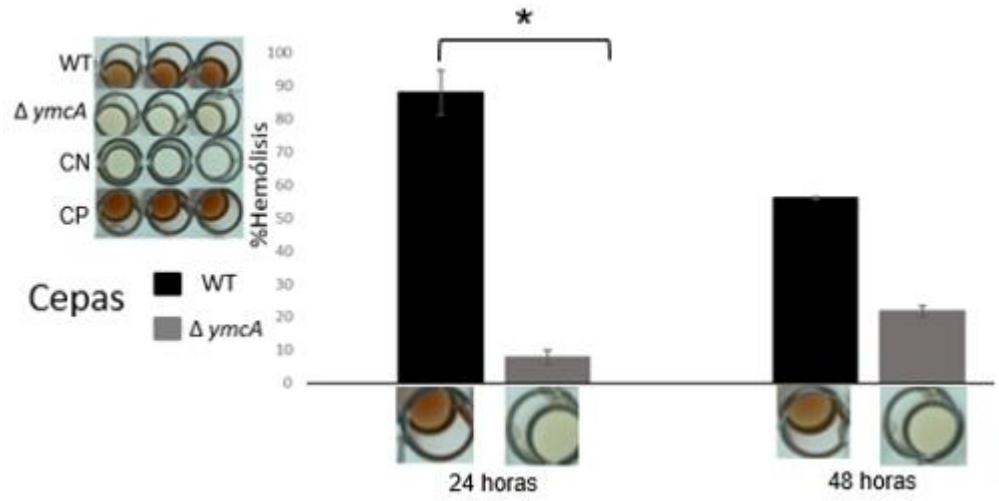


Figura 2-12 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la cepa 8325-4 en la hemólisis cuantitativa de eritrocitos por *Staphylococcus aureus*. Evaluación de la capacidad de hemólisis de la WT (8325-4), y la *ΔymcA* (cepa mutante). CP: Control positivo (SDS), CN: Control negativo (PBS). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre los valores de las medias de los dos grupos de datos usando la prueba t-Student, a un intervalo de confianza del 95%. Ensayo de microplaca.

En cuanto al ensayo cualitativo, para el tiempo de 24 horas se observó disminución del 3% de la capacidad hemolítica (asociado al área del halo) en la cepa *ΔymcA* con respecto a la cepa WT, esta diferencia no fue estadísticamente significativa según la prueba t-Student a un intervalo de confianza del 95%. Y para el tiempo de 48 horas se observó disminución del 50% de la capacidad hemolítica (asociado al área del halo) en la cepa *ΔymcA* con respecto a la cepa WT, esta diferencia fue estadísticamente significativa según la prueba t-Student a un intervalo de confianza del 95% (Figura 2-13).

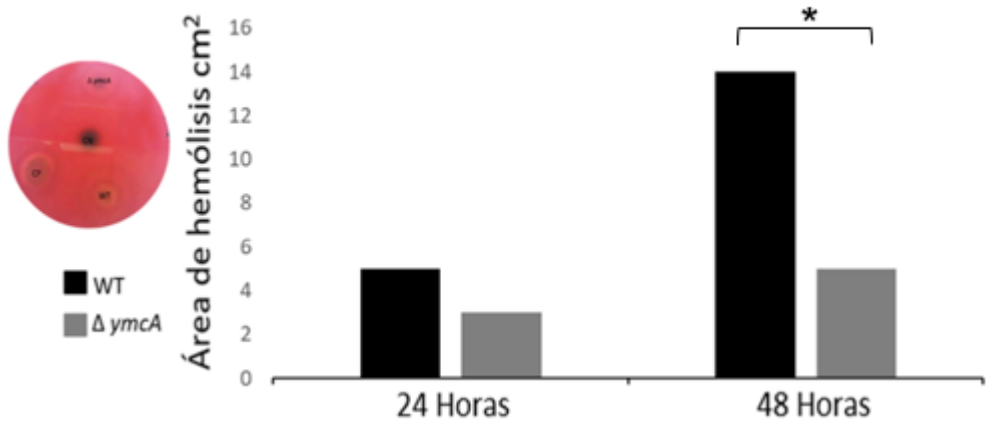


Figura 2-13 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la cepa 8325-4 en la hemólisis cualitativa de eritrocitos por *Staphylococcus aureus*. Evaluación de la capacidad de hemólisis de la WT (8325-4), y la *ΔymcA* (cepa mutante). CP: Control positivo (Cepa de *Staphylococcus aureus* USA300), CN: Control negativo (Cepa *Klebsiella pneumoniae*). Letras diferentes representan diferencias estadísticas entre los valores de las medias de los dos grupos de datos usando la prueba t-Student, a un intervalo de confianza del 95%. Ensayo de microplaca.

2.2.4 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la formación de biofilm de *Staphylococcus aureus.*

Una vez obtenida la cepa mutante delecional del gen *ymcA* se evaluó la capacidad de formación del biofilm, suplementando el medio TSB con glucosa o NaCl como inductores del biofilm en cepas de *Staphylococcus aureus* (Figura 2-14).

Se observó que al delecionar el gen *ymcA* del genoma de *Staphylococcus aureus* un aumento en la formación del biofilm con el medio TSB de aproximadamente 40% con respecto a la cepa WT, sin diferencias estadísticas significativas según la prueba t-Student, a un intervalo de confianza del 95% (Figura 2-14). Pero con el medio suplementado con NaCl al 3%, se evidenció una disminución de aproximadamente 70% en la capacidad de formación de biofilm en la cepa *ΔymcA* con respecto a la cepa WT, diferencias estadísticamente significativas según la prueba t-Student, a un intervalo de confianza del 95%. Y para el medio suplementado con glucosa al 0.25% se observó un leve aumento en

la capacidad de formación de biofilm en la cepa *ΔymcA* con respecto a la cepa WT, sin diferencias estadísticamente significativas según la prueba t-Student (Figura 2-14).

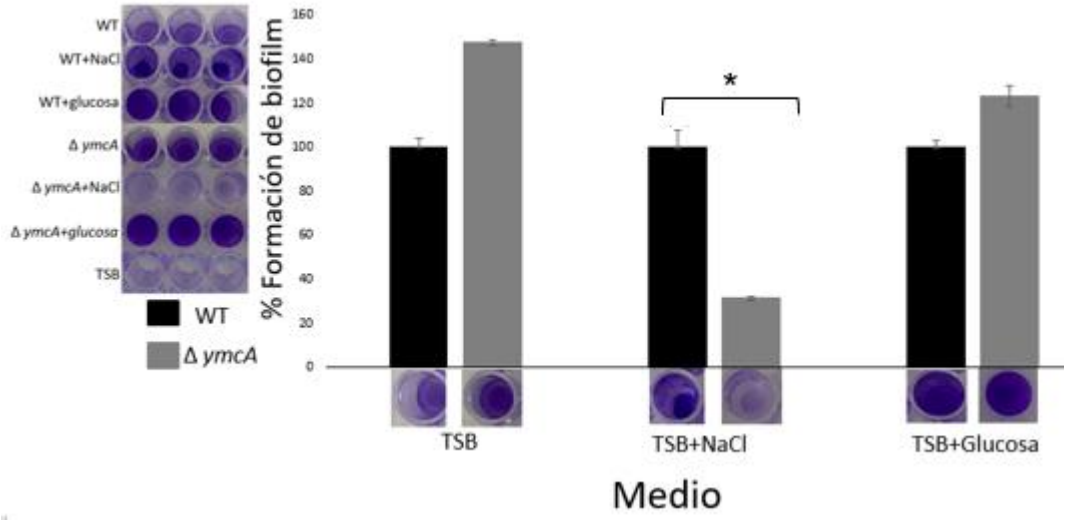


Figura 2-14 Efecto de la deleción del gen *ymcA* en la formación de biofilm de *Staphylococcus aureus*. Evaluación del efecto de la formación de biofilm suplementado con NaCl o Glucosa de la cepa WT (8325-4) y *ΔymcA*. Medio TSB suplementado con NaCl al 3% (TSB+NaCl), medio TSB suplementado con glucosa al 0,25% (TSB+Glucosa). Las letras diferentes representan diferencias estadísticas entre los valores de las medias de los dos grupos de datos usando la prueba t-Student, a un intervalo de confianza del 95%.

3. Efecto de la deleción del motivo putativo QKQAVN de la proteína YmcA en la capacidad de formar biofilm y lisar eritrocitos de *Staphylococcus aureus*.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas usadas en este capítulo se describen en la Tabla 3-1. El ensayo de mutagénesis se realizó en la cepa NCTC8325-4 de *S. aureus*, empleando *Escherichia coli* para almacenamiento y propagación de los plásmidos recombinantes.

Tabla 3-1 Cepas bacterianas y plásmidos usados para la obtención de la cepa con la variación del motivo QKQAVN.

Plásmidos y cepas bacterianas	Características principales
Plásmidos	
pMG-ymcA-A	Plásmido con la variación del motivo QKQAVN
pCN51	Plásmido para la sobreexpresión de genes en *Staphylococcus aureus* [44]
pJET	Vector de clonación
pJET-ymcA-A	Plásmido pJET con el gen *ymcA* con la modificación del motivo QKQAVN
pCN51 -ymcA-A	Plásmido pCN51 con el gen *ymcA* con la modificación del motivo QKQAVN

Cepas bacterianas	
RN4220	Cepa de *Staphylococcus aureus* derivada de la 8325-4 pero con una mutación en el sistema de modificación-restricción, apta para experimentos de manipulación genética.
Escherichia coli TOP10	*Escherichia coli* TOP10
ΔymcA	*S. aureus* 8325-4 mutante por deleción del gen *ymcA*

3.1.2 Análisis bioinformático

Inicialmente se realizó una predicción bioinformática mediante el programa AlphaFold para el modelamiento de la estructura tridimensional de la proteína YmcA y la predicción de la estructura tridimensional de la proteína YmcA con la sustitución del motivo putativo QKQAVN por alaninas. Con el fin de evitar un cambio en la conformación de la proteína por la variación del motivo putativo, los modelos fueron validados usando los programas PROCHECK (http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/),ERRAT (http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/) ProSA-web (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php). Las gráficas de Ramachandran fueron construidas usando PROCHECK. La visualización de los modelos y comparación de las estructuras por superposición se realizó por medio del programa PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, 1.8 Schrodinger, LLC).

3.1.3 Sustitución del motivo putativo QKQAVN

Los pasos más importantes para la sustitución del motivo putativo QKQAVN se describen en la Figura 3-1. Para evaluar el efecto del motivo putativo QKQAVN se clonó en el plásmido pMG por Macrogen el gen *ymcA* sustituyendo el motivo putativo QKQAVN por 6 alaninas (ver anexos), el cual se usó como plantilla para la obtención del amplificado *ymcA-A* usando los oligonucleótidos ymcA_S y ymcA_AS con sitios de reconocimiento para las enzimas BamHI y EcoRI (Tabla 3-1). Este fragmento *ymcA-A* fue clonado en el plásmido pJET, (pJET-ymcA-A) y fue transformado en *E. coli* con el fin de almacenar el plásmido.

pJET-ymcA-A fue digerido con las enzimas BamHI y EcoRI (FastDigest Thermo Scientific®) según las indicaciones del fabricante, y el fragmento fue purificado y clonado en el plásmido pCN51 con reconocimiento a las enzimas BamHI y EcoRI. El plásmido pCN51-ymcA-A fue transformado en células de *E. coli* TOP10 por electroporación usando las condiciones previamente descritas (capitulo 2). A pesar que se obtuvo la ligación del vector pCN51 con ymcA-A, no se obtuvo la cepa transformada TOP10pCN51-ymcA-A portando la modificación del motivo putativo QKQAVN. El plásmido pCN51-*ymcA-A* se transformó en diferentes cepas de *E. coli* como lo fueron TOP 10, XL1 blue, además de las cepas de *S. aureus* NCTC8325-4 y RN4220. Los ensayos de transformación incluyeron a la cepa de alta eficiencia C3040 de *E. coli*.

Tabla 3-2. Oligonucleótidos usados para la producción de la cepa con la modificación del motivo putativo QKQAVN

Código LGMB	**Secuencia**	**Uso**
pJET-S	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Primer corriente arriba del sitio de clonación del plásmido pJET.
pJET-AS	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Primer corriente abajo del sitio de clonación del plásmido pJET.
ymcA_S	C**GGGATC**CATGTATAATAAAGATGACG	Amplificación completa del gen *ymcA*-A en el plásmido pMG para clonar en pCN51.
ymcA_AS	CCG**GAATTC**ATCACTATGCTTGGCTTTA	
GP553	GCACAGATTCATCAGAACCAA	Amplificación de un fragmento interno del gen *ymcA.*
GP554	AACGTGTTTCCATTGTTGATAC	
GP555	CTAGCTTTATATTCTTTAGGTG	Confirmación del plásmido pCN51.
GP556	CAGTATTTATTATGCATTTAGAATA	

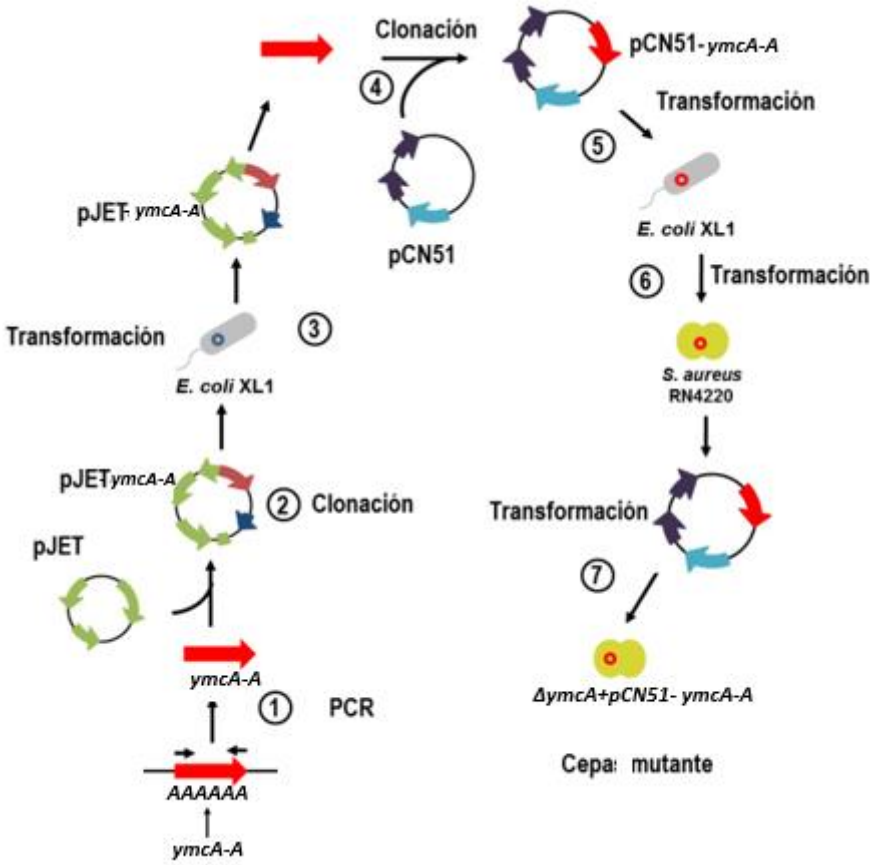


Figura 3-1. Diagrama de Flujo para el proceso de obtención de la cepa con la sustitución del motivo putativo QKQAVN. Adaptado de Escobar-Pérez J. 2019. 1. Amplificación por PCR del ORF completo del gen *ymcA*, desde el plásmido pMG que contiene la sustitución del motivo putativo QKQAN 2. Clonación del gen *ymcA*-A en el plásmido pJET, 3. Transformación del plásmido recombinante pJET-ymcA-A en *Escherichia coli* XL1 blue, 4. Liberación y clonación del gen *ymcA*-A en el plásmido pCN51, 5. Transformación del plásmido recombinante pCN51 -ymcA-A en *Escherichia coli* XL1 blue, 6. Purificación y transformación del plásmido pCN51 -ymcA-A en la cepa RN4220 de *Staphylococcus aureus*, 7. Purificación y transformación del plásmido pCN51 -ymcA-A en la cepa ∆ymcA (mutante) y confirmación por PCR.

3.2 Resultados

3.2.1 Modelamiento de la proteína YmcA y la proteína YmcA con la sustitución del motivo putativo QKQAVN

Con el fin de evaluar el motivo putativo QKQAVN el cual se cree que es necesario para el buen funcionamiento de la proteína YmcA, se realizó el modelamiento de la estructura tridimensional de las proteínas YmcA y YmcA con la sustitución en el motivo putativo (QKQAVN por 6 alaninas) utilizando el programa AlphaFold. Para la proteína YmcA se encontró una estructura tipo pinza compuesta por 5 hélices alfa similar a la reportada por Escobar y colaboradores[53] y de igual manera para la proteína que presenta la variación en el motivo putativo se observa una estructura tipo pinza con 6 hélices alfa similar a la de la proteína silvestre (Figura 3-2A,B). También se realizó la superposición de las dos estructuras modeladas para visualizar la diferencia entre las dos proteínas, encontrándose que las dos presentan una gran similitud en la estructura terciaria global (Figura 3-2C). Adicionalmente, en la Tabla 3-3 se muestran los valores obtenidos en la validación de los modelos generados y teniendo en cuenta este análisis bioinformático se realizaron ensayos de mutagénesis y ligación con el fin de remplazar el motivo putativo QKQAVN por las 6 alaninas y evaluar así el efecto del motivo en procesos básicos de *Staphylococcus aureus* como en la formación de biofilm y en la hemólisis de eritrocitos.

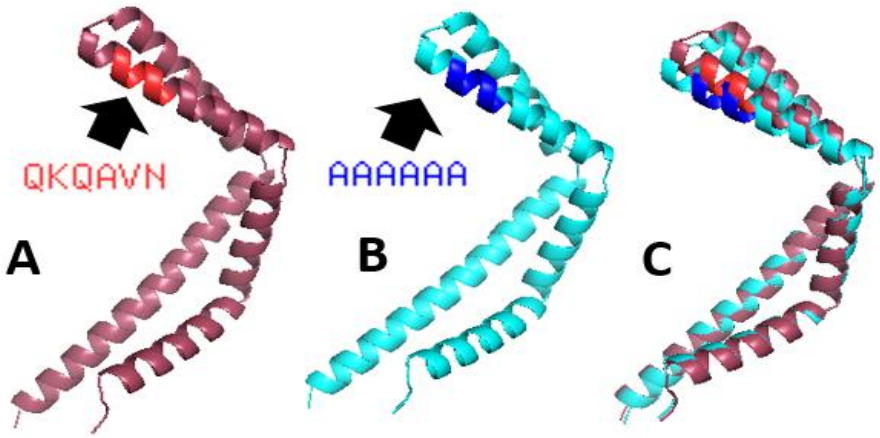


Figura 3-2 Estructura tridimensional de las proteínas YmcA y YmcA con la modificación en el motivo QKQAVN *Staphylococcus aureus* NCTC8325-4. A. Estructura tridimensional de la proteína YmcA (rosada), la flecha señala el motivo putativo QKQAVN. B. Estructura terciaria de la proteína YmcA que tiene el motivo putativo sustituido por alaninas (Azul), la flecha señala la variación del motivo putativo. C. Superposición de las dos estructuras tridimensionales anteriormente mencionadas. Las estructuras presentadas se modelaron usando el programa AlphaFold y fueron graficadas usando el programa PyMOL.

	Staphylococcus aureus	
	YmcA	YmcA mutante
Graficas de Ramachandran		
Residuos en regiones favorecidas	99.1%	**98.3%**
Residuos en regiones adicionales permitidas	0.9%	**1.7%**
Residuos en otras regiones permitidas	0.0 %	**0.0%**
Residuos en regiones rechazadas	0.0%	**0.0%**
Overall G-factor	0.69	**0.68**
Z-score	-0.069	-0.033
C-score	0.93	**0.92**
TM-score	0.84	**0.84**
RMSD	2.6	**2.6**
ERRAT	100	**100**

Tabla 3-3. Valores de los parámetros de calidad de los modelos generados y evaluados con los programas PROCHECK, ERRAT y PROVE.

3.2.2 Cepa con la modificación del motivo putativo QKQAVN

Para obtener la cepa con la modificación del motivo putativo QKQAVN se empleó el plásmido pCN51 [44] el cual tiene origen de replicación para gram positivos. Para ello, inicialmente se amplificó el gen *ymcA*-A desde del plásmido pMG-*ymcA*-A (MACROGEN) (Anexo) y se clonó en el plásmido de almacenamiento pJET (Figura 3-3A).

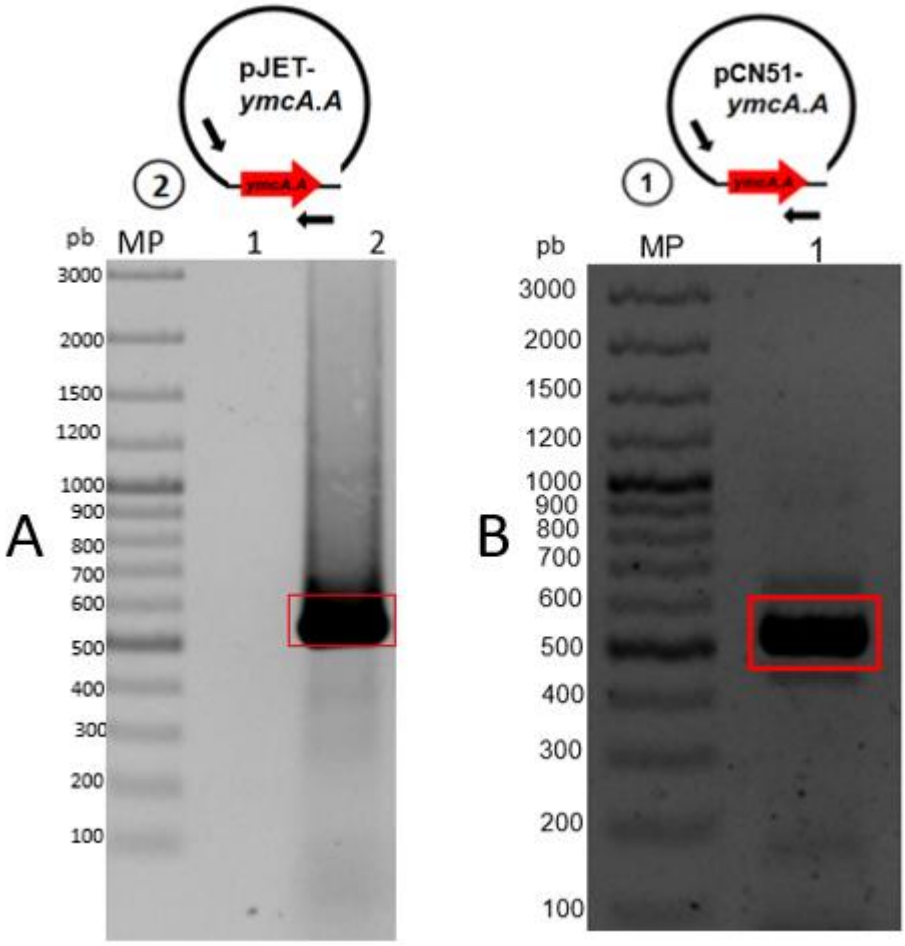


Figura 3-3 Confirmación molecular del plásmido pJET- *ymcA-A* y ligación de pCN51-*ymcA-A*. A. PCR de la colonia de la cepa *E. coli* TOP 10 con el plásmido pJET-*ymcA-A* 1. Control de reactivos 2. Amplificación usando los oligonucleótidos pJET-S y ymcA_AS gel de agarosa 1%, MP marcador de peso de 100pb B PCR de la ligación pCN51-*ymcA-A* usando los oligonucleótidos GP553 y GP555. MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp plus ADN Ladder. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con tinción de bromuro de etidio, las flechas indican los oligonucleótidos.

Posteriormente se intentó transformar el plásmido de expresión pCN51 en *E. coli*, sin embargo, con el fin de identificar las posibles razones por la cuales la transformación en *E. coli* no tuvo éxito, se realizó un confirmación por PCR de la ligación del gen *ymcA-A* al vector de expresión pCN51 obteniéndose el amplicón asociado a la señal de la ligación (Figura 3-3B). Adicionalmente, con el fin de evaluar la capacidad competente de las cepas se realizó un ensayo de transformación utilizando las cepas electrocompetentes TOP 10 de *E. coli* y RN4220 de *S. aureus*, confirmando su sensibilidad a los antibióticos ampicilina y eritromicina respectivamente. Así mismo, en este ensayo se utilizó la reacción de ligación del gen *ymcA-A* ligado al vector de expresión pCN51 (previamente confirmado por PCR), empleando como controles de transformación los plásmidos pCN51 y del plásmido pMAD (Figura 3-4). Se observó que las cepas tanto de *E. coli* TOP 10 y de *S. aureus* RN4220 son electrocompetentes al crecer cepas resistentes a ampicilina asociado a la presencia del plásmido control pMAD y resistentes a eritromicina asociado a la presencia del plásmido control pCN51 vacío. Sin embrago, a pesar de confirmar la competencia de las cepas, no se obtuvieron cepas transformadas con la reacción de ligación del plásmido pCN51*ymcA*-A portador de la modificación del motivo putativo QKQAVN (Figura 3-4).

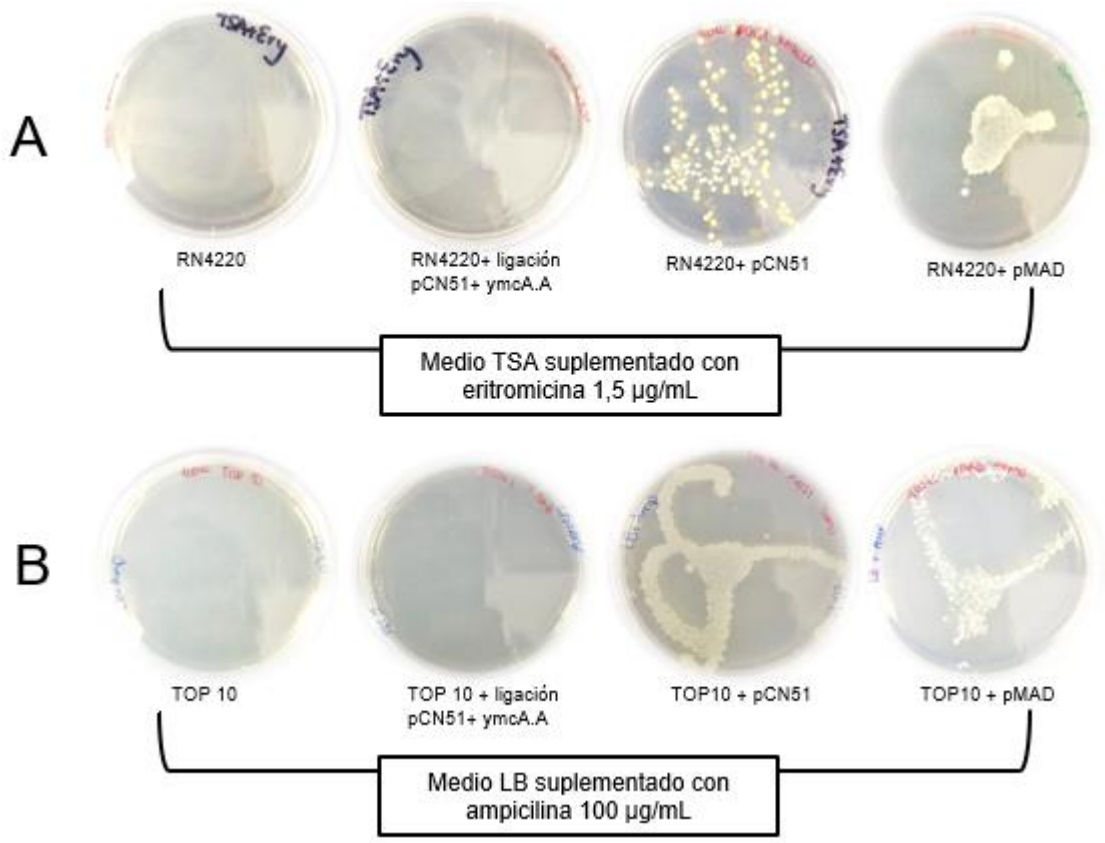


Figura 3-4 Ensayo de transformación en las cepas *E. coli* Top 10 y *S. aureus* RN4220. A. Ensayo de transformación en la cepa RN4220 en medio TSB suplementado con eritromicina 1,5 µg/mL. B. Ensayo de transformación en la cepa TOP 10 en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL.

4. Interacción de la proteína rYmcA con la ribonucleasa rRNasa Y en *Staphylococcus aureus.*

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas usadas en este capítulo son descritas en la tabla 4-1. El laboratorio cuenta con una cepa de *E. coli* BL21 que contiene el plásmido pET 303/CtHis+RNasaY para la producción de la proteína recombinante rRNasaY (RNasaY- His) y otra cepa de *E. coli* BL21 que contiene el plásmido pET 303/CtHis+YmcA para la producción de la proteína recombinante rYmcA (YmcA-His). Adicionalmente se usó la cepa NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus* para producir el extracto total de proteínas.

Tabla 4-1 Cepas bacterianas, plásmidos y anticuerpos usados para la interacción de la proteína YmcA y RNasa Y.

	Características principales
Plásmidos	
pET303/CT-His + RnY	Plásmido para la expresión de la proteína RNasa Y (Cepario LGMB).
pET303/CT-His + YmcA	Plásmido para la expresión de la proteína YmcA (Cepario LGMB).
Cepas bacterianas	
8325-4	Cepa de referencia NCTC8325-4 de *Staphylococcus aureus*

E. coli BL21 pET303/CT-His + RnY	Cepa de *E. coli* con el plásmido pET303/CT-His + RnY usada en la producción de la proteína recombinante rRNasa Y. (Cepario LGMB).
E. coli BL21 pET303/CT-His + YmcA	Cepa de *E. coli* con el plásmido pET303/CT-His + YmcA usada en la producción de la proteína recombinante rYmcA. (Cepario LGMB).
Anticuerpos	
Anti-RNasa Y	Anticuerpo policlonal dirigido la proteína RNasa Y. (Material LGMB).
Anti-Histidinas	Anticuerpo monoclonal dirigido contra etiquetas de histidinas. (Thermo Scientific®)
Anti mouse IgG-HRP	Anticuerpo policlonal secundario dirigido contra las IgG de rata. (Thermo Scientific®)

4.1.2 Obtención de las proteínas recombinantes rYmcA y rRNasa Y

Los pasos más importantes en la producción de las proteínas recombinantes rYmcA Y RNasa Y se describen en la Figura 4-1. Las cepas *E.coli* BL21 con los plásmidos pET 303/CtHis+RNasaY y pET 303/CtHis+YmcA se sembraron por agotamiento en cajas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) a 37 °C durante 24 horas. Se tomó una colonia y se le realizó PCR para confirmar la presencia del plásmido y el gen de interés usando los oligonucleótidos ymcA_S ymcA_AS para amplificar el gen *ymcA* y los oligonucleótidos rny _F y rny_R para amplificar el gen *rny* (Tabla 4-2). Una vez confirmado el plásmido se tomó una colonia y se inoculó en 5 mL de caldo LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) a 37°C con agitación a 150 rpm durante toda la noche. Se indujo la producción de las proteínas recombinantes con el inductor IPTG-Isopropyl β-D1_thiogalactopyranoside a 0.5 mM, a una temperatura de 37 °C y un tiempo de inducción de 6 horas. Finalizada la inducción se colectaron las bacterias por centrifugación a 4000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante y se procedió a realizar la lisis celular para la obtención de las fracciones solubles (sobrenadante) y fracción insoluble o cuerpos de

inclusión (pellet o botón). De acuerdo a lo visto previamente en el laboratorio las proteínas recombinantes se encuentran en los cuerpos de inclusión (Fracción insoluble), para confirmar la inducción de las proteínas recombinantes se sometió la fracción insoluble a separación por electroforesis vertical (SDS-PAGE) con un gel separador al 15% y el concentrador al 5% de poliacrilamida. El corrido electroforético se realizó en Buffer Tris-Glicina y SDS a 100V por 100 min y la tinción del gel se realizó con azul de Coomassie al 0,25%, se utilizó el marcador de peso Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

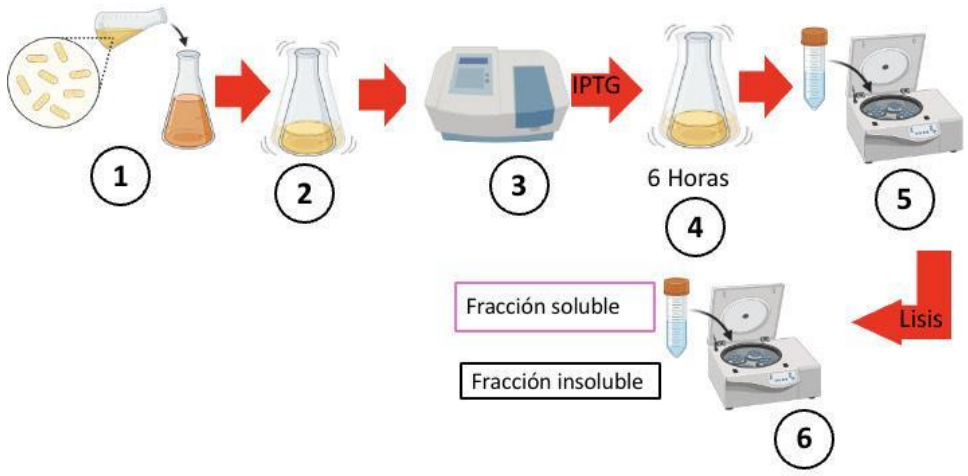


Figura 4-1. Producción de proteínas recombinantes rYmcA y rRNasa Y 1. Las cepas *E.coli* BL21 con los plásmidos pET 303/CtHis+RNasaY y pET 303/CtHis+YmcA fueron inoculadas en caldo LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) 2. Se incubaron a 37°c con agitación 150 rpm 3. Crecieron hasta alcanzar una OD de 0,6 4. Las cepas fueron suplementadas con el inductor IPTG 0.5 mM durante 6 horas 5. Los cultivos bacterianos fueron lisados 6. El lisado celular se separó en fracción soluble e insoluble.

Tabla 4-2. Oligonucleótidos usados para la confirmación de cepas usadas en la producción de las proteínas recombinantes rYmcA y rRNasa Y.

Código LGMB	**Secuencia**	**Uso**
ymcA_S	C**GGGATC**CATGTATAATAAAGATG ACG	

ymcA_AS	CCG**GAATTC**ATCACTATGCTTGGC TTTA	Amplificación completa del gen *ymcA.*
rny _F	GCTCTAGAATGAATTTATTAAGCC TCCTAC	
rny_R	CCGCTCGAGTTTCGCATATTCTAC TGCTCTA	Amplificación de la región codificante de la RNasa Y.

4.1.3 Purificación de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasaY-His

Los pasos más importantes en la purificación de las proteínas recombinantes rYmcA Y RNasa Y se describen en la Figura 4-2. Debido a que las proteínas recombinantes no se pudieron obtener de manera soluble su purificación se realizó por medio de electroelución, de la siguiente manera: se usaron 135 µL del extracto proteico insoluble y se sometieron a separación por electroforesis vertical (SDS-PAGE) con un gel separador al 15% y el concentrador al 5% de poliacrilamida. El corrido electroforético se realizó en Buffer Tris-Glicina y SDS a 100V por 100 min y la tinción del gel se realizó con azul de Coomassie al 0,25%, para identificar la posición de la proteína recombinante se cortaron 2 carriles de los dos extremos laterales del gel y adicionalmente se tomó como referencia el marcador de peso Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, se tiñeron con azul de Coomassie por 2 horas, se decoloraron y se pusieron junto al gel como indicadores. Se separó la banda correspondiente a la proteína recombinante, se cortó en trozos y se transfirió a una bolsa de diálisis SnakeSkin™ Dialysis 10K (Thermo Scientific), en 1mL de buffer TBE 0,5X y se puso en una cámara de electroforesis horizontal con Buffer TBE 0,5X a 100V por 4 horas. La solución purificada en la bolsa de diálisis se transfirió a un nuevo tubo, se cuantificó y se confirmó por SDS-PAGE.

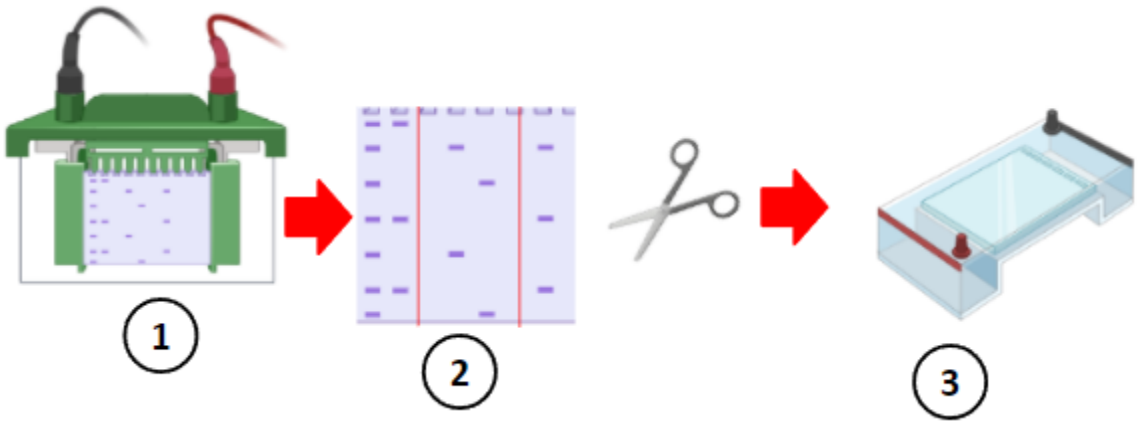


Figura 4-2. Purificación de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasaY-His 1. El extracto insoluble de proteínas fue sometido a SDS-PAGE 2. Se cortaron los laterales del gel y se tiñeron con azul de coomassie 0,25%, posteriormente se destiñeron y se tomaron como guía para cortar las bandas donde deberían de estar las proteínas recombinantes rYmcA y rRNasa Y 3. Las bandas de gel cortadas fueron sometidas a electroforesis horizontal.

4.1.4 Obtención del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY

Para la obtención del anticuerpo policlonal en rata para RNasa Y se usó el suero de ratas inoculadas con la proteína rRNasaY-His, (Suero obtenido previamente en el laboratorio). Para ello se empleó la metodología propuesta por Moreno y colaboradores en 2013[46] y estandarizada en el laboratorio LGMB. Se partió de la purificación de la proteína recombinante RNasa Y (rRNasaY) por medio de electroelución debido a su insolubilidad. Una vez confirmada su purificación por Western blot, rRNasaY fue usada para producir anticuerpos murinos policlonales por inoculación intraperitoneal (i.p) Protocolo de manejo de animales[73,74]. La purificación del anticuerpo se realizó con 1mg de la proteína rRNasaY-His en un SDS-PAGE al 15%, este se transfirió a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) 0,2µm (Thermo Scientific) a 200 mA por 2 horas, la membrana se tiño con rojo Ponceau y se cortaron los pedazos de la membrana correspondientes a la señal de la proteína recombinante. Posteriormente, se inició el proceso de bloqueo de la membrana con leche descremada al 5% en buffer TBST (tris-HCl pH 7,5 10mM, NaCl 150mM, tween-20 0,1%) con agitación suave por 12 horas, se retiró la solución de bloqueo y se lavaron los pedazos de membrana con TBS tres veces. Seguido de ello, los pedazos de la membrana fueron sumergidos en una alícuota de 100 µL del anticuerpo total Anti-RNasaY (previamente obtenido en el

laboratorio), durante 18 horas a 4°C con agitación. Los pedazos de la membrana fueron incubados con 100 µL de solución de Glicina 100 mM pH 2,5 durante dos minutos, luego el anticuerpo eludido se neutralizó adicionando una solución de 10 µl de Tris HCl 2M pH 8,5 y la elución se repitió 3 veces. El anticuerpo fue cuantificado mediante el ensayo de Bradford y evaluado mediante Western Blot y Dot-Blot (Figura 4-3).

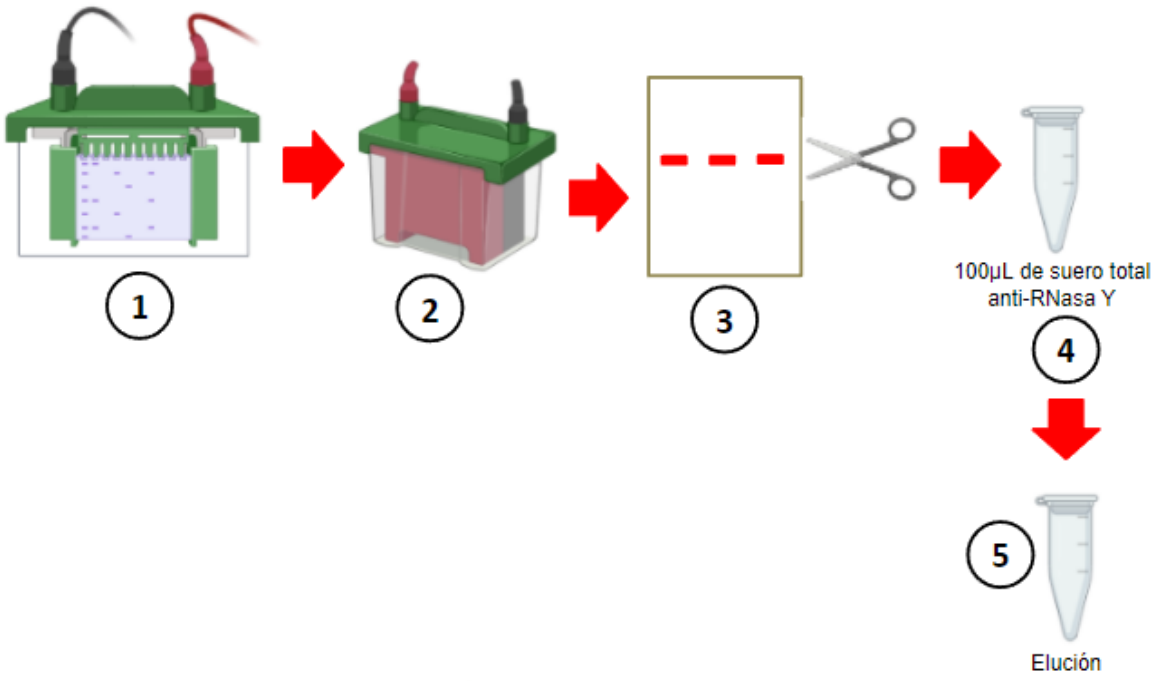


Figura 4-3. Purificación del anticuerpo policlonal Anti-RNasa Y. 1. Se sometió 1mg de la proteína rRNasaY previamente purificada a SDS-PAGE 2. Se realizó la electrotransferencia del gel obtenido del SDS-PAGE 3. La membrana fue teñida con rojo ponceau y esta se cortó donde había señal del colorante 4. Los trozos de membrana fueron incubados en 100 µL de suero total de las ratas previamente inoculadas con la proteína rRNasa Y 5. Los trozos de membrana fueron eluidos con Glicina 100 mM pH 2,5.

4.1.5 Aclarado del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY

Los pasos más importantes en el aclarado del anticuerpo policlonal anti-RNasa Y se describe en la Figura 4-4. Con el fin de evitar la detección de la etiqueta de histidinas por parte del anticuerpo previamente purificado se realizó un aclarado del mismo de la siguiente manera:

Se sembró en una membrana PDVF 1 mg de una proteína no relacionada que contenía una etiqueta de histidinas, esta fue bloqueada durante 12 horas con solución de bloqueo (leche descremada al 5% en buffer TBST), posterior a esto fue lavada 3 veces durante 10 min con TBST. La membrana fue incubada con 1 mg/mL del anticuerpo previamente purificado (Anti-RNasaY) durante 18 horas en agitación constante a 4°c.

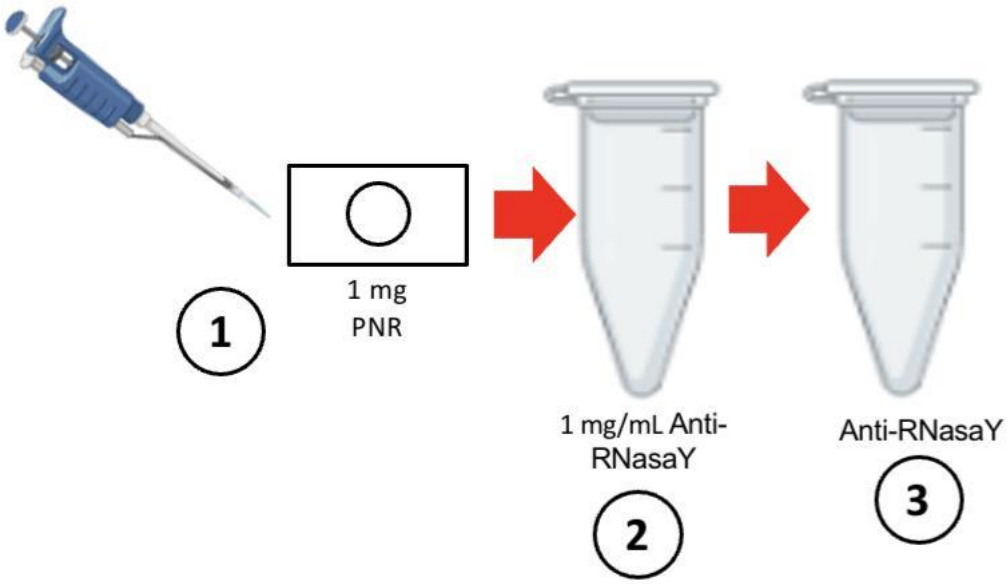


Figura 4-4. Aclarado del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY. 1. Se sembró 1 mg de una proteína no relacionada que contenía una etiqueta de histidina en una membrana de PVDF. 2. La membrana fue incubada en 1mg/mL del anticuerpo anti-RNasa Y previamente purificado durante 18 horas a 4°c con agitación constante 3. La membrana fue retirada del anticuerpo quedando anticuerpos no unidos a la etiqueta de histidinas.

4.1.6 Ensayo de reconocimiento del anticuerpo policlonal Anti-RNasaY con la proteína rYmcA

Los pasos más importantes en el ensayo de reconocimiento del anticuerpo policlonal anti-RNasa Y se describen en la Figura 4-5. Con el fin de evaluar la especificidad del anticuerpo purificado y aclarado, se sembró en una membrana de PVDF, 500 ng/µL de la proteína rRNasaY-His, 500 ng/µL de la proteína rYmcA, 500 ng/µL de la proteína no relacionada con etiqueta de histidinas (PNR) y 500 ng/µL de Albumina Sérica Bovina (BSA). La membrana fue bloqueada durante 12 horas con

solución de bloqueo (leche descremada al 5% en buffer TBST), posterior a esto fue lavada tres veces durante 10 min con TBST e incubada con el anticuerpo anti-Rnasa Y 1:200 durante 2 horas. Pasado este tiempo la membrana fue lavada 3 veces con TBST e incubada con el anticuerpo Anti mouse IgG-HRP 1:6000 (Amersham®) acoplado a peroxidasa por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Después de este tiempo, la membrana fue transferida a otro recipiente y se realizaron 3 lavados de 10 min con buffer TBST en agitación suave. El revelado se hizo mediante el kit de revelado Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate con una relación 1:1 de peróxido de hidrógeno y luminol.

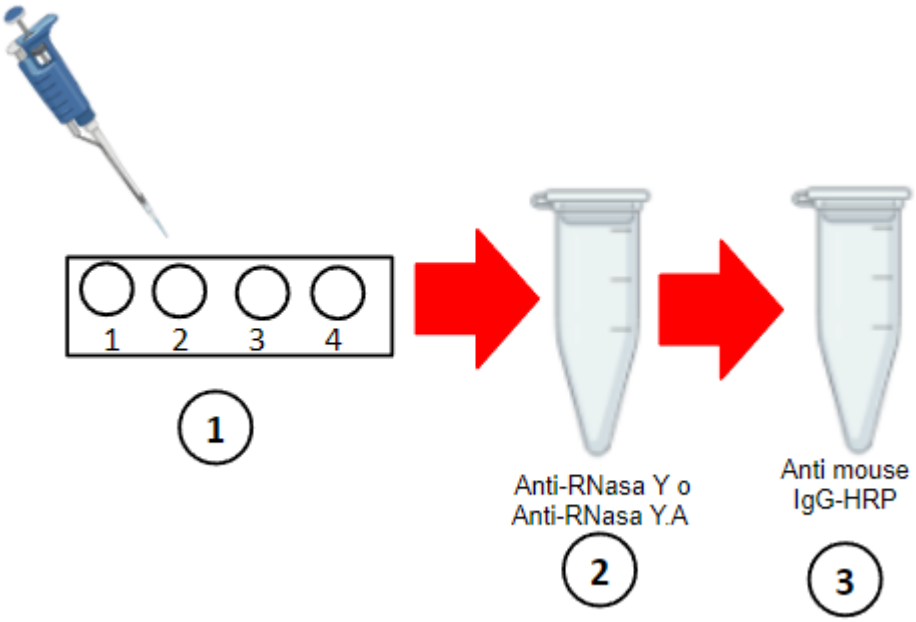


Figura 4-5. Ensayo de reconocimiento del anticuerpo policlonal Anti-RnasaY. 1. Se sembraron 500 ng de la proteína no relacionada (con etiqueta de histidinas), 500 ng de BSA, 500 ng de la proteína rYmcA y 500ng de la proteína rRNasa Y en membrana de PVDF 2. Se incubo con el anticuerpo anti-Rnasa Y . 3. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti mouse igG-HRP y posteriormente revelada.

4.1.7 Ensayo de Far Western Blot

El ensayo de Far-Western Blot (FWB) consiste en la detección de interacción proteína – proteína mediante ensayos de inmunodetección (Western Blot) en el cual la proteína 1 es una proteína (nativa o recombinante purificada) que es llamada presa; la proteína 2 (a la cual se le quiere probar la interacción) relacionada con un extracto total soluble de proteínas o una proteína purificada[47] (Figura 4-6). Para el ensayo, la proteína 1 o presa fue rYmcA-His y la proteína 2 o carnada la ribonucleasa RNasa Y presente en un extracto total soluble de proteínas de *S. aureus*. El revelado de la interacción proteína-proteína se realizó con el anticuerpo policlonal Anti-RnasaY previamente purificado dirigido a la proteína 2 o carnada.

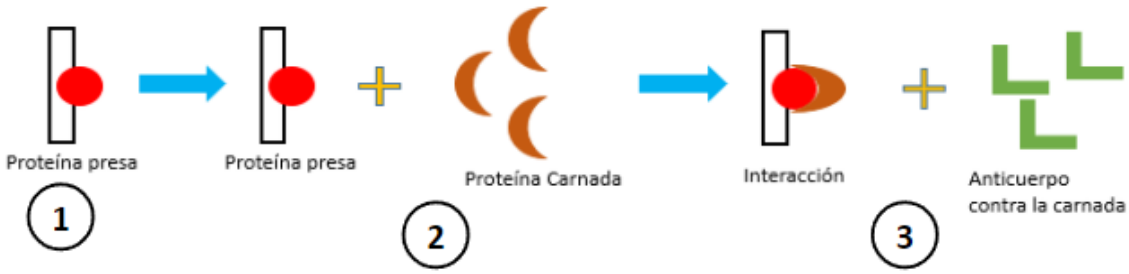


Figura 4-6. Diagrama del ensayo de Far Western Blot**.** 1. Se ancla a una membrana una proteína denominada 2 o presa. 2. La membrana se incuba con la proteína denominada 2 o carnada. 3. Se evalúa la interacción usando el anticuerpo contra la proteína 2 o carnada.

Con el fin de determinar la concentración mínima de proteína de interés para la detección en el ensayo de Far Western Blot, se usaron 700 ng, 600 ng y 500 ng de la proteína presa rYmcA-His (purificada), 500 ng de una proteína no relacionada que contenía una etiqueta de histidinas y 500 ng de Albumina Sérica Bovina (BSA). Las proteínas fueron ancladas a la membrana de PVDF, previamente equilibrada con metanol y buffer TBST también empleado como buffer de anclaje (Figura 4-7).

El protocolo realizado fue el siguiente: La membrana fue bloqueada en buffer TBST- L (leche 5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% V/V) por aproximadamente 12 horas, luego se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con buffer TBST. La membrana se dejó a 4 ºC

durante toda la noche en incubación con el extracto total soluble de proteínas de *S. aureus* en agitación suave. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con TBST durante 10 minutos, y se inició el protocolo de inmunodetección de la siguiente manera: se incubó la membrana por dos horas con el anticuerpo primario policlonal obtenido en rata Anti-RNasa Y previamente purificado y aclarado, se realizaron tres lavados durante 10 minutos con TBST y se adicionó el anticuerpo secundario Anti-IgG de Rata acoplado a HRP (peroxidasa de rábano). Se realizaron de nuevo tres lavados con TBST durante diez minutos cada uno, y la interacción fue revelada mediante quimioluminiscencia (Luminol/Enhancer solution: Peroxidase solution) empleando el kit Gel Doc XR+ Gel documentation system (Biorad). Como controles se emplearon: una proteína con etiqueta de histidinas no relacionada, BSA y buffer TBST.

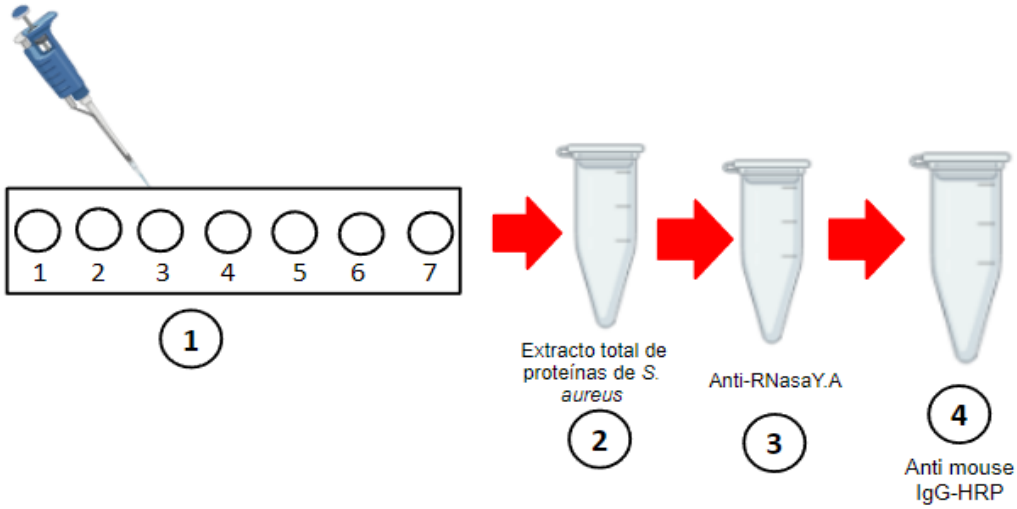


Figura 4-7 Estandarización del ensayo de Far Western Blot**.** Paso 1. Se sembraron en la membrana 1. 700 ng la proteína rYmcA-His, 2. 600 ng de la proteína rYmcA-His. 3. 500 ng de la proteína rYmcA-His. 4. 500 ng de la proteína rRNasa Y-His. 5. 500ng de la proteína no relacionada. 6. 500 ng de BSA. 7. Buffer TBS. Paso 2. La membrana fue incubada con el extracto total de proteínas de *S. aureus* durante toda la noche a 4°C. Paso 3. La membrana fue incubada con el anticuerpo 1:2000 anti RNasa Y durante dos horas. Paso 4. Se incubó la membrana con el anticuerpo anti mouse igG-HRP 1:6000 durante una hora y revelada por quimioluminiscencia.

A partir del ensayo anterior, se determinó utilizar para el ensayo de Far Western Blot, 500 ng de cada una de las proteínas siguiendo las mismas condiciones previamente estandarizadas (Figura 4-8).

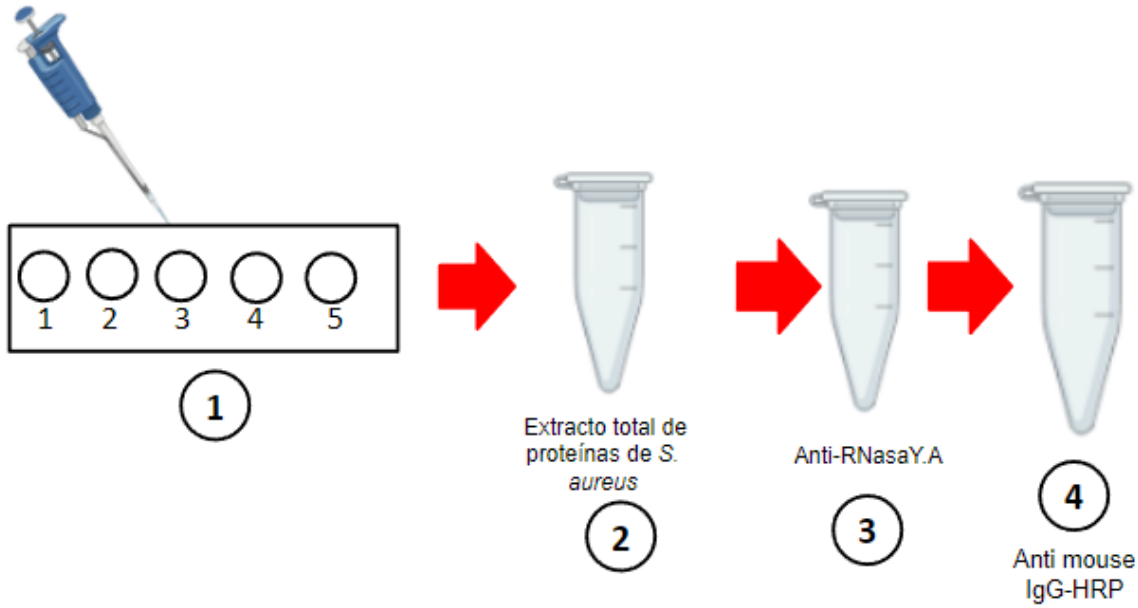


Figura 4-8 Ensayo de Far Western Blot **estandarizado.** Paso 1. Se sembraron 500 ng de la proteína rYmcA-His. 2. 500 ng de la proteína rRNasa Y. 3. 500ng de la proteína no relacionada. 4. 500 ng de BSA. 5. Buffer TBS. Paso 2**.** La membrana fue incubada con el extracto total de proteínas de *S. aureus* durante toda la noche a 4°C. Paso 3. La membrana fue incubada con el anticuerpo 1:2000 anti RNasa Y durante dos horas. Paso 4. Se incubó la membrana con el anticuerpo anti mouse igG-HRP 1:6000 durante una hora y revelada por quimioluminiscencia.

4.2 Resultados

4.2.1 Inducción de las proteínas recombinantes rYmca-His y rRNasaY-His

Con el fin de obtener las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasaY-His para el ensayo de Far Western Blot, se realizó la extracción del ADN plasmídico de cada una de las cepas portadoras de las proteínas recombinantes, y con el fin de mejorar la expresión de estas proteínas, los extractos plasmídicos fueron transformados de nuevo en la cepa *E. coli* BL21(DE3) por choque térmico. La transformación fue confirmada por PCR usando oligonucleótidos para la amplificación del gen *ymcA* con un tamaño esperado de 383 pb y de 1574 pb (Figura 4-9).

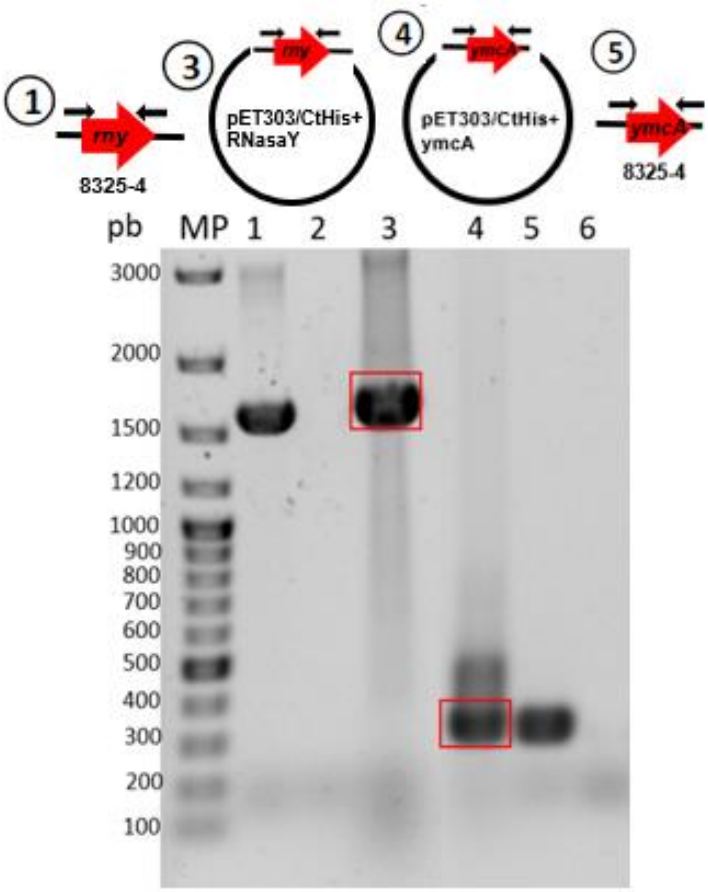


Figura 4-9. Confirmación de los genes *ymcA* y *rny*. 1. Amplificación del gen rny con ADN genómico de la cepa 8325-4 usando los oligonucleótidos *rny*_F y *rny*_R. 2. Control de reactivos de la reacción. 3 amplificación del gen rny desde el extracto plasmídico pET303/CT-His + RNasaY Usando los oligonucleótidos rny_F y rny_R. 4. Amplificación del gen *ymcA* con ADN genómico de la cepa NCTC8325-4 usando los oligonucleótidos GP553 y GP555. 5. Amplificación del gen *ymcA* desde el extracto plasmídico pET303/CT-His + YmcA usando los oligonucleótidos *ymcA*_S y *ymcA*_AS. 6 control de reactivos de la reacción MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp plus ADN Ladder. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con tinción de bromuro de etidio, las flechas indican la ubicación de los oligonucleótidos.

Una vez confirmadas mediante PCR las cepas transformadas BL21 pET303/CT-His+YmcA y BL21 pET303/CT-His+rny, se indujeron con 0,5 mM de IPTG a una densidad óptica de 0,6 y a una longitud de onda de 600 nm. Previo a la inducción se extrajeron alícuotas de 1 mL y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min. Se obtuvieron las recombinantes rYmcA-His de aproximadamente 13 kDa y rRNasaY-His de aproximadamente 60 kDa (Figura 4-10).

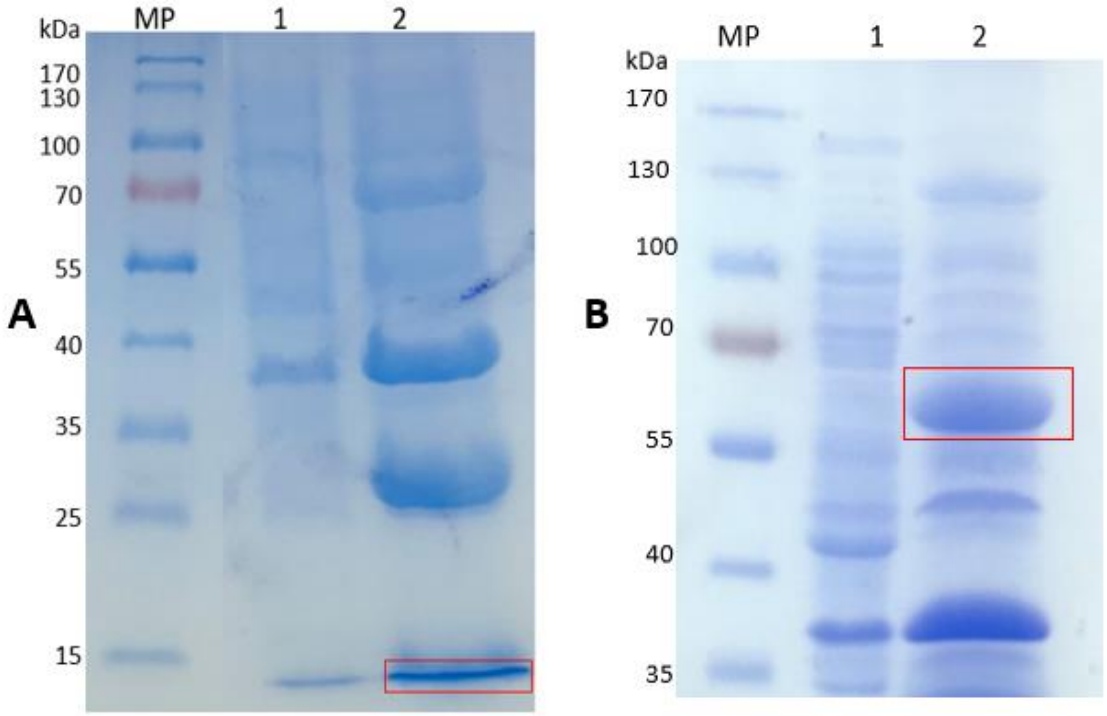


Figura 4-10. SDS-PAGE de la expresión de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasa Y. A. 1 Proteínas totales de *E. coli* BL21(DE3) con plásmido pET303/CT-His + YmcA no Inducido. 2 fracción insoluble de proteínas de *E. coli* BL21 con el plásmido pET303/CT-His+ YmcA inducido con 0.5 Mm de IPTG. **B.** 1 Proteínas totales de *E.coli* BL21(DE3) con plásmido pET303/CT-His + RnY no Inducido. 2 fracción insoluble de proteínas de *E.coli* BL21 con el plásmido pET303/CT-His+ RnY inducido con 0.5 Mm de IPTG. MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder SDS-PAGE 15% de acrilamida.

4.2.2 Purificación de las proteínas recombinantes rYmcA-His y rRNasaY-His para los ensayos de interacción

Con el fin de obtener las proteínas recombinantes para la realización de los ensayos de interacción proteína-proteína, las proteínas recombinantes fueron purificadas por electroelución y cuantificadas por el método de Bradford obteniéndose así una concentración para la proteína rYmcA de 1.23 mg/mL y para la proteína rRNasa Y de 0.52 mg/mL, posterior a esto la purificación fue evaluada por electroforesis vertical (SDS-PAGE) con un gel separador al 15% y el concentrador al 5% de poliacrilamida. El corrido electroforético se realizó en Buffer Tris-Glicina y SDS a 100V por 100 min y la tinción del gel se realizó con azul de Coomassie al 0,25%, obteniéndose bandas únicas tanto

para la proteína recombinante rRNasaY-His con un tamaño aproximadamente de 60 kDa como para la proteína rYmcA-His con un tamaño aproximado de 13 kDa (Figura 4-11A). Una vez evaluada la purificación de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE, éstas fueron evaluadas por Western blot usando anticuerpos anti-histidinas obteniéndose una señal clara para cada una de las proteínas recombinantes rRNasaY-His con un tamaño aproximado de 60kDa y rYmcA-His con un tamaño aproximado de 13 kDa Figura 4-11B

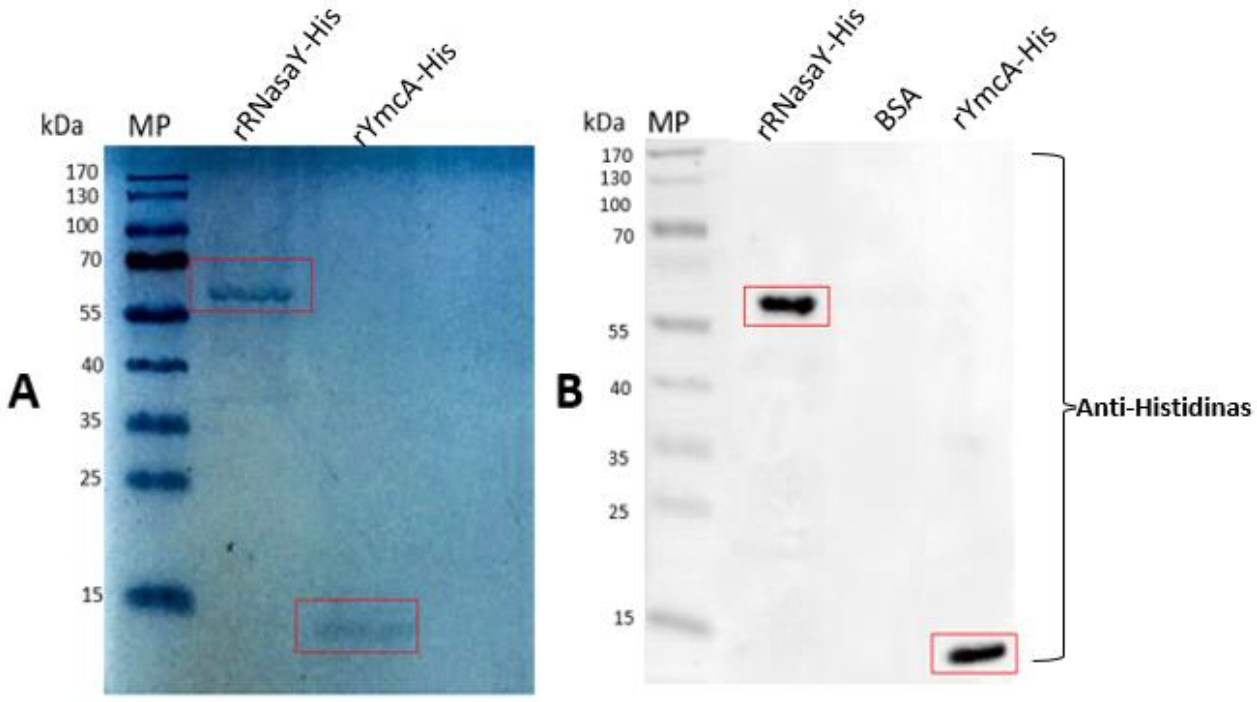


Figura 4-11. Purificación y reconocimiento de las proteínas recombinantes rRNasaY-His y rYmcA-His A. SDS-PAGE de la proteína recombinante purificada rRNasaY-His (60 kDa). Proteína recombinante purificada rYmcA-His (13 kDa) MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. SDS-PAGE gel de acrilamida 15% **B** Western Blot de la proteína recombinante purificada RnY (60 kDa). BSA. Proteína recombinante purificada YmcA (13kDa) MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Western Blot incubado con el anticuerpo anti-histidinas.

4.2.3 Evaluación de especificidad del anticuerpo policlonal Anti-RNasa Y con las proteínas recombinantes

Se evaluó por Western blot la especificidad del anticuerpo policlonal anti-RNasa Y, siguiendo las indicaciones mencionadas previamente (Figura 4-12). Se observó una señal de reconocimiento a la proteína rRNasa Y con el anticuerpo anti-RNasa Y previamente purificado .

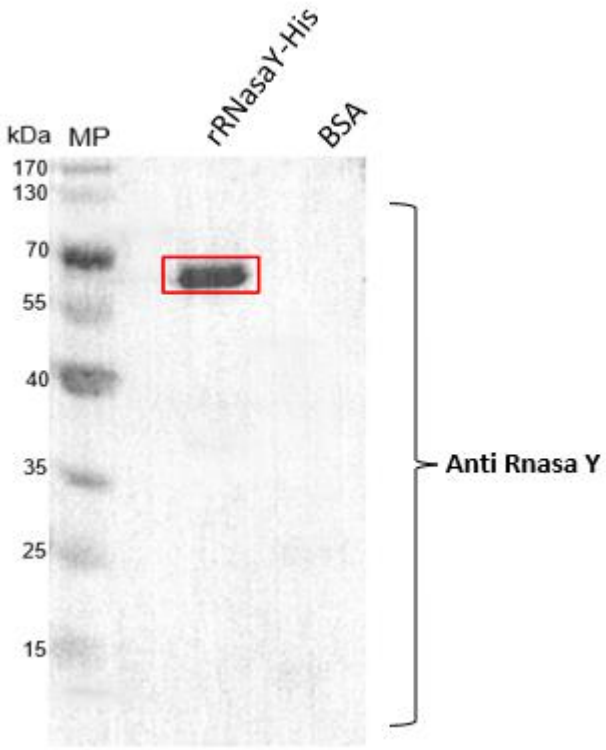


Figura 4-12. Evaluación del reconocimiento del anticuerpo anti-RNasa Y a la proteína recombinante purificada rRNasaY (60 kDa). BSA MP, Marcador de peso Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Western Blot incubado con el anticuerpo policlonal purificado anti-RNasa Y.

Con el fin de evitar interacción cruzada del anticuerpo policlonal purificado anti-RNasa Y, se evaluó el posible reconocimiento del anticuerpo hacia la etiqueta de histidinas. Lo anterior debido que, para la producción del anticuerpo policlonal las ratas fueron inoculadas con la proteína recombinante rRNasa Y con etiqueta de histidinas. Para esto, se sembró en una membrana de PVDF 500 ng de la proteína rYmcA-His purificada, 500 ng de la proteína rRNasaY-His purificada,

500 ng de una proteína no relacionada con etiqueta de histidinas y 500 ng de BSA, obteniéndose una señal para las proteínas con etiquetas de histidinas (Figura 4-13A). Al identificar la capacidad de reacción cruzada del anticuerpo policlonal, se realizó un segundo aclarado al anticuerpo previamente purificado, observándose en una nueva membrana de PVDF con 500 ng de la proteína rYmcA-His purificada, 500 ng de la proteína rRNasaY-His purificada, 500 ng de una proteína no relacionada con etiqueta de histidinas y 500 ng de BSA, una única señal para la detección de la proteína rRNasaY-His, sin señal alguna para las demás proteínas con etiquetas de histidinas (Figura 4-13B). Confirmada la especificidad del anti-RNasa Y se realizó el ensayo de Far-Western Blot.

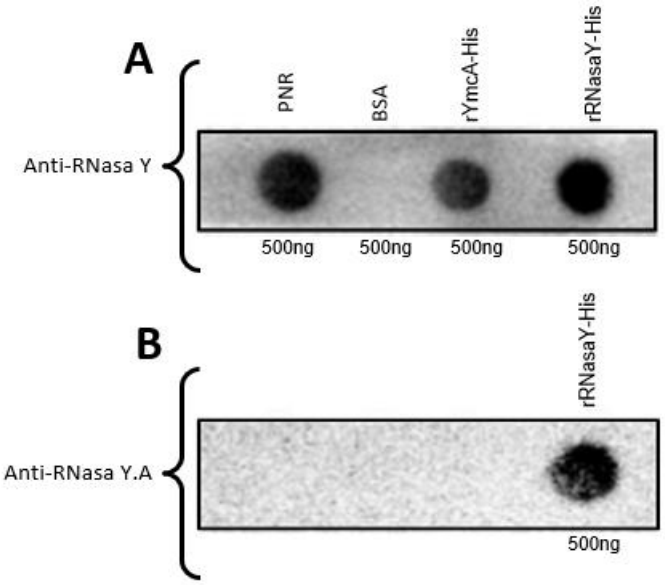


Figura 4-13 Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-RNasa Y. A. Membrana incubada con el anticuerpo Anti-RNasa Y **B.** Membrana incubada con el anticuerpo aclarado Anti-RNasa Y.A

4.2.4 Ensayo de interacción Far Western Blot.

Con el fin de estandarizar el ensayo de Far Western Blot y determinar la concentración mínima necesaria para la interacción entre la proteína rYmcA con la proteína rRNasa Y se sembraron diferentes cantidades de la proteína recombinante rYmcA 700 ng, 600 ng y 500 ng (Figura 4-14). Se observó que la concentración no afectaba el reconocimiento ni la intensidad de la señal, por lo

cual se determinó usar la concentración de 500 ng de la proteína recombinante rYmcA (Figura 4-14).

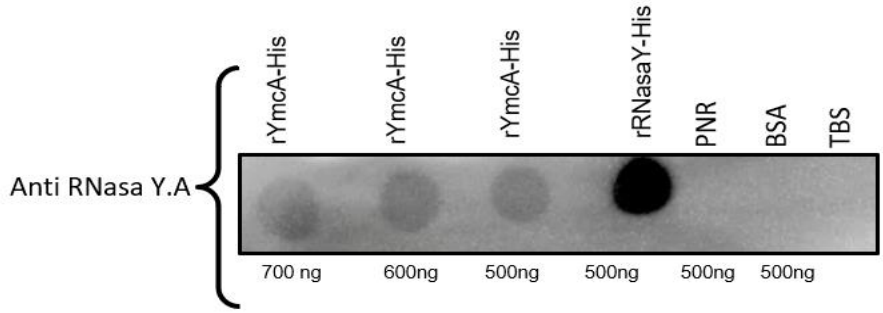


Figura 4-14 Estandarización del ensayo de Far Western Blot**.** Evaluación de las diferentes concentraciones de la proteína recombinante rYmcA-His (700ng, 600ng y 500ng) membrana incubada con el anticuerpo aclarado Anti-RNasa Y.

Una vez confirmada la especificidad del anticuerpo Anti RNasa Y y la cantidad necesaria para obtener una señal, se realizó el ensayo de Far Western blot con el extracto total soluble de proteínas de *S. aureus*, como se detalla en la metodología (Figura 4-6). Se observó una señal de interacción de la proteína rYmcA-His con proteínas nativas de *S. aureus* y el reconocimiento por parte del anticuerpo Anti-RNasa Y, sugiriendo que la proteína RNasa Y nativa de *Staphylococcus aureus* puede interactuar con la proteína rYmcA-His (Figura 4-15).

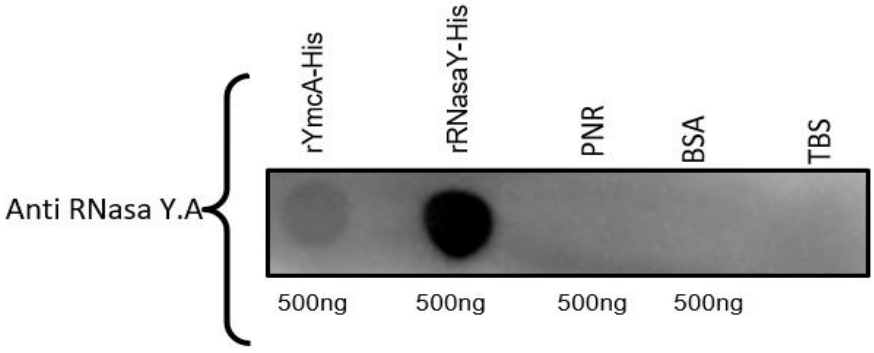


Figura 4-15 Ensayo de Far Western blot Membrana incubada con el anticuerpo aclarado Anti-RNasa Y.

5. Discusión

Conocer los mecanismos moleculares implicados en la virulencia y patogenicidad de *Staphylococcus aureus*, ha sido uno de los principales enfoques en recientes estudios[53,35,64] Por ello, identificar en este microorganismo la proteína Qrp (YheA) con dominio Com-YlbF (la cual está involucrada en la regulación de la formación de biofilm), permitió mediante análisis *in silico* reconocer genes ortólogos que codifican para las proteínas con dominio Com_ylbF como YmcA, previamente reportada y caracterizada en *Bacillus subtilis*[35,75] Algunos estudios han demostrado dos vías por las cuales las proteínas con dominio Com_YlbF (YlbF y YmcA) en interacción con YaaT (formando el Complejo Y), pueden estar regulando la formación de biofilm en *B. subtilis*[76,77,78] la primera, acelerando una cascada de fosforilación desencadenada en la activación del gen regulador Spo0A[29.31,32] y la segunda, en el procesamiento de la degradación de transcritos a través de una posible interacción con la endoribonucleasa RNasa Y (Rny) y/o regulando la estabilidad de algunos ARNs como los represores SinR y AbrB en la síntesis del biofilm[32,79,80,81] A la fecha en *S. aureus* solo se han podido identificar proteínas hipotéticas relacionadas con el Complejo Y, y un homólogo de la ribonucleasa RNasa Y (*rny*/*cvfA*)[39,41]. Así mismo, en *S. aureus* aún no se ha logrado identificar alguna ruta asociada a Spo0A, direccionando la participación de las proteínas con dominio Com_YlbF como YmcA, hacia la ruta de regulación transcripcional para la maduración del RNA de factores de virulencia y patogenicidad[82,83].

La formación del biofilm de *Staphylococcus aureus* está controlado por diversos reguladores genéticos dentro de los cuales podemos resaltar dos, el operón *ica* y el gen regulador global (*agr*) (Figura 5-1). El operón *ica* es el componente genético en regular su expresión, ya que la biosíntesis de PIA se realiza mediante los productos del locus del gen *ica*, (icaA, icaD, icaB, icaC e icaR) [8, ,9,11]. El factor más importante involucrado en la regulación de icaADBC es IcaR, un miembro de la familia TetR de proteínas reguladoras, que reprime la expresión del operón *ica* al unirse a la región promotora icaA[58,71]. Se ha demostrado que la inactivación de icaR aumenta significativamente la expresión de *ica*ADBC y la producción de PIA dando como resultado un aumento en la formación de biofilm[58.71]. Nuestros resultados en *S. aureus* revelaron que la ausencia de la proteína YmcA, a

pesar de no afectar la supervivencia del microorganismo, tiene participación en la formación del biofilm dependiente de ica. Se observó de forma directa o indirecta una disminución estadísticamente significativa (70%) de la capacidad de formación de biofilm bajo condiciones de estrés osmótico (NaCl 3%); una condición asociada a la ruta de la formación biofilm dependiente de la expresión del operón *ica* y el represor icaR[8,55,56]. Por otra parte, el gen regulador global *agr* afecta la regulación de los genes implicados en los factores de adherencia asociados a la pared celular como las modulinas solubles en fenol PMS[14] (Figura 5-2), lo que conduce a una menor adherencia y a una disminución de la formación inicial de biofilm[63,64]. Ello también podría sugerir que la ausencia de la proteína YmcA pudo regular al operón *agr,* estimulando la disgregación del biofilm afectando los factores de adherencia asociados a la pared celular.

Curiosamente se observó que en *S. aureus* la ausencia de YmcA genera un aumento no significativo de la capacidad de formación de biofilm bajo condiciones de acidez (Glucosa 0,25%); un resultado que puede ser atribuible a la presencia de glucosa en el medio, de alguna manera la ausencia de la proteína YmcA pueda reprimir el sistema de detección *agr* . Ya que se ha visto que la ausencia de agr es necesaria para la formación de biofilm. Este resultado es todo lo contrario a lo reportado en la literatura[90, 91], ya que se ha documentado que la adición de glucosa en el medio aumenta la expresión de agr dando como resultado una disminución de la formación de biofilm, esto nos sugiere que la proteína YmcA sea necesaria para la regulación del sistema de detección agr y que esta regulación sea mediada por la RNasa Y[90].

Staphylococcus aureus posee un ortólogo de la RNasa Y (*rny/cvfA*)[39,41] pero su caracterización es muy limitada, sin embargo, varios estudios han mostrado que la enzima participa tanto en la degradación de algunos RNAs como en la estabilización[80,82,84] Se han identificado por lo menos 99 genes con sitios de corte para la RNasa Y entre ellos RNAs mensajeros, de transferencia y no codificantes[33,79] resaltando en *S. aureus* su participación en la estabilización del transcrito del operón *SaeRS*[42,85,86] el cual es un sistema de dos componentes que actúa como regulador global de factores de virulencia[87,88,89] El proceso de hemólisis también puede ser regulado por el sistema *sae*RS[68,69], el cual cuando se produce una pérdida total de *Sae*RS da lugar a una disminución de algunos factores de virulencia importantes como la hemolisina gamma A (HlgA), hemolisina gamma B (HlgB), hemolisina gamma C (HlgC) y la leucocidina de PantonValentine (lukF/lukM) afectando a nivel transcripcional la expresión de estos genes o activando la expresión de la alfa-hemolisina Hla y la beta-hemolisina Hlb[70]. DeLoughery y colaboradores propusieron que el Complejo Y en *B.*

subtilis interactúa con la ribonucleasa RNAsa Y acorde con lo reportado en ensayos de doble hibrido (B2H) e inmunoprecipitación[32,57]. Nuestros resultados revelaron que la deleción del gen *ymcA* conlleva a una disminución de la hemólisis de eritrocitos tanto en el ensayo cualitativo como cuantitativo. Trabajos previos han podido demostrar que la deleción de la ribonucleasa RNasa Y puede causar efectos en la hemólisis[42] lo que sugiere que la proteína YmcA del Complejo Y, puede mediar la actividad de la ribonucleasa RNasa Y[33]. Es posible sugerir que en *S. aureus,* la ausencia de las proteínas Com_YlbF como YmcA podría estar regulando la actividad de la RNasa Y, como se logró observar con el ensayo de interacción proteína-proteína (Far Western blot) de YmcA con la ribonucleasa RNasa Y, dado que las proteínas con dominio Com_YlbF pueden participar en la actividad de la RNasa Y variando la vida media de otros transcritos para la maduración eficiente de los ARNm de algunos operones[32]. Adicionalmente, Hamouche y colaboradores encontraron que el Complejo Y de tres proteínas de *B. subtilis* podría estar regulando el tamaño y el número de los ensamblajes de la RNasa Y afectado la especificidad de la misma[34] demostrando que existe una relación directa entre las proteínas del Complejo Y y la ribonucleasa. Por lo anterior, se sugiere que es probable que la proteína YmcA con dominio Com_YlbF del Complejo Y en *S. aureus* pueda actuar de forma similar a las proteínas del Complejo Y de B. subtilis, participando en la regulación de la formación de biofilm y en la capacidad hemolítica, regulando (directa o indirectamente) la actividad de la Ribonucleasa RNasaY.

A pesar de que la ligación de el gen *ymcA* y *YmcA-A* en el plásmido pCN51fue exitosa, la transformación del mismo no fue posible, esto tal vez se deba a que el plásmido pCN51 es un vector diseñado para la expresión de genes en bacterias gram positivas como *S. aureus* el cual fue donado a nuestro laboratorio por el doctor Iñigo lassa al ser un vector donado no tenemos la certeza de que el vector se encuentre en buenas condiciones dificultando la clonación de este y así permitiendo obtener el vector de expresión recombinante, por lo cual se realizaron diversos abordajes y múltiples ensayos (con las herramientas disponibles en el laboratorio), lo que nosotros sugerimos a futuro es obtener el plásmido de forma comercial, mandar a secuenciar el plásmido con el fin de confirma su integridad o sintetizar un plásmido que pueda cumplir las mismas funciones.

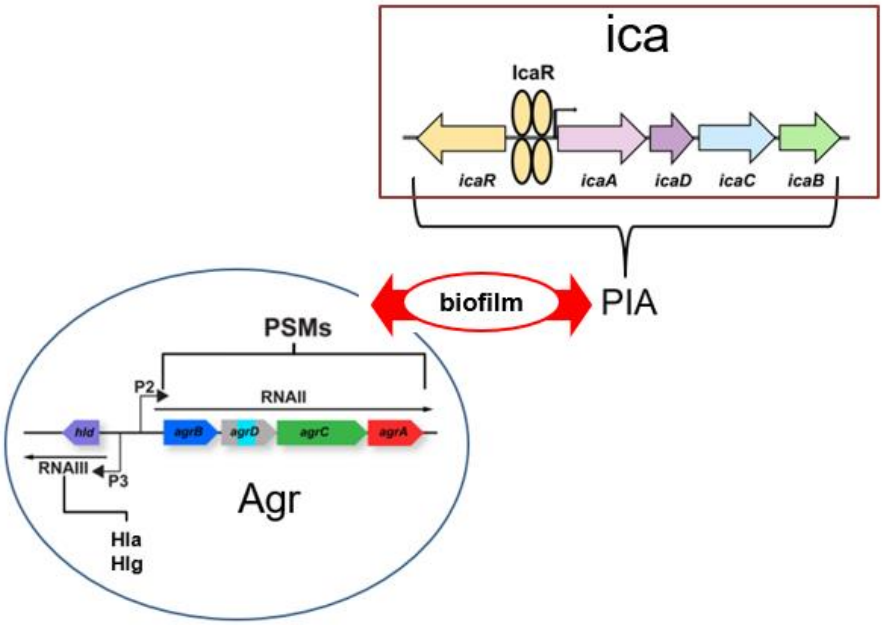


Figura 5-1 Esquema de la regulación molecular de la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* por el operón ica y el regulador agr. Imágenes adaptadas de Jenul, C y colaboradores 2019[72]. Y Nguyen y colaboradores 2020[71].

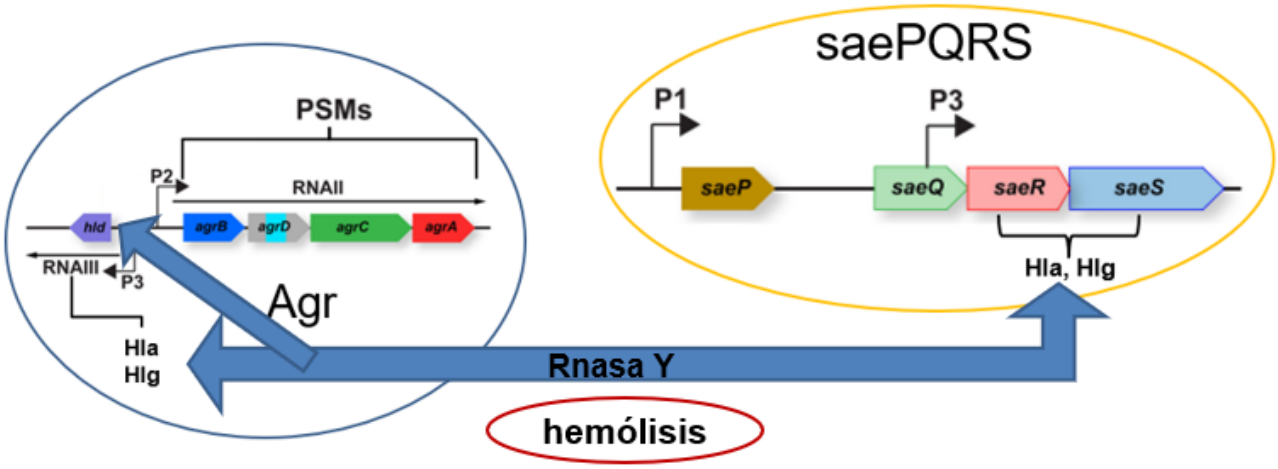


Figura 5-2 Esquema de la regulación de la hemólisis de eritrocitos en *Staphylococcus aureus* por la RNasa Y. Imágenes adaptadas de Jenul, C y colaboradores 2019[72].

6. Conclusiones y perspectivas

Conclusión general

Existe interacción entre las proteínas RNasa Y y YmcA de *Staphylococcus aureus,* lo cual sugiere una posible participación por parte de la proteína YmcA en los procesos de virulencia regulados por la RNasa Y como la hemólisis de eritrocitos y la formación de biofilm

Conclusiones especificas

-La deleción del gen *ymcA* afecta positivamente la formación de biofilm de *Staphylococcus aureus* en condiciones de acidez y negativamente en condiciones de estrés osmótico

- La deleción del gen *ymcA* afecta negativamente la hemólisis de eritrocitos de *Staphylococcus aureus*, probablemente este fenómeno sea mediado o relacionado con la ribonucleasa Y.

- A pesar de los múltiples ensayos realizados para obtener la cepa con la mutación del motivo putativo QKQAVN con el fin de evaluarlo en ensayos de biofilm y hemolisis no fue posible la construcción del plásmido.

- Existe interacción entre las proteínas RNasa Y y YmcA de *Staphylococcus aureus*, lo cual sugiere una posible participación por parte de la proteína YmcA en los procesos de virulencia regulados por la RNasa Y como la hemólisis de eritrocitos.

Perspectivas

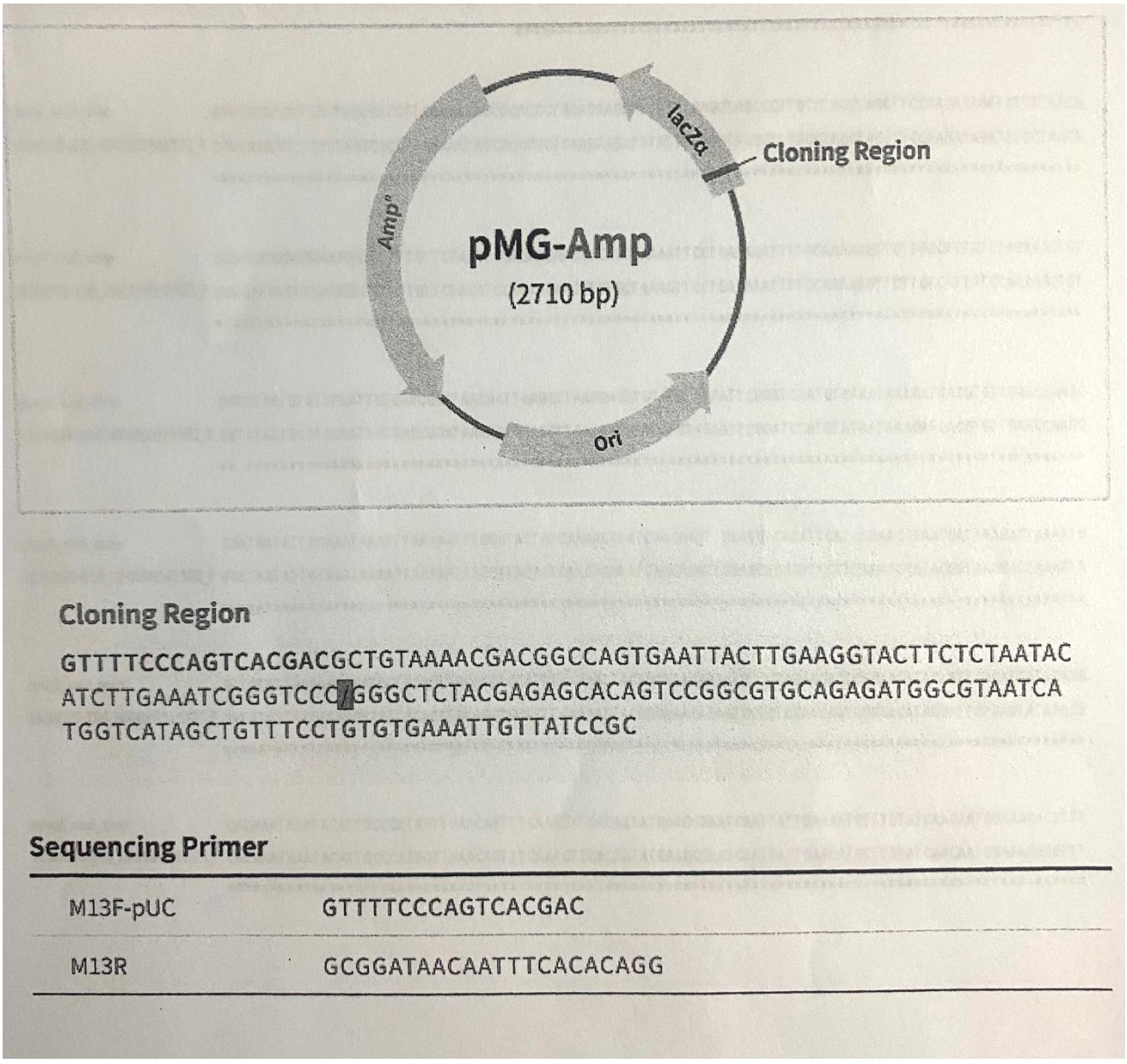
Nuestros resultados además de generar nuevos conocimientos acerca del rol de la proteína YmcA en la virulencia de *S. aureus* crean preguntas de investigación que pueden guiar futuros estudios

¿Puede la proteína YmcA interactuar con la proteína YaaT al igual que ocurre en su ortólogo *B. subtilis* ?

¿Es necesaria la proteína YlbF en la actividad de la proteína YmcA?

¿La deleción del gen ymcA puede afectar el nivel de transcriptos de agr ,el operón sae o del operón ica?

Anexo



Secuenciación del plásmido pMG. Plásmido diseñado con la mutación del gen *ymcA* (cambio del motivo putativo QKQAVN por AAAAAA).

Bibliografía

1. Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). General characteristics of *Staphylococcus aureus*. Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio, 61(1), 28-40

2. Velázquez-Meza, Maria Elena. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. Salud Pública de México, 47(5), 381- 387.

3. Paganini, Hugo R., Della Latta, Paula, Soto, Adriana, Casimir, Lidia, Mónaco, Andrea, Verdaguer, Virginia, Berberian, Griselda, Rosanova, María T., González, Fernando, & Sarkis, Claudia. (2010). Bacteriemias por *Staphylococcus aureus* adquiridas en la comunidad: 17 años de experiencia en niños de la Argentina. Archivos argentinos de pediatría, 108(4), 311-317

4. Calderini, M., Sanabria, B. G., Taboada, A., Samaniego, S., Irala, B. J., & Estigarribia, G. B. (2015). Colonización nasal de *Staphylococcus aureus* y su relación con afectación sistémica en pacientes adultos intearndos en el Instituto de Medicina Tropical. de Medicina Tropical, 13.

5. Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., ... & Prévost, G. (2005). *Staphylococcus aureus* bicomponent γ-hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. Jouarnl of chemical information and modeling, 45(6), 1539-1545.

6. Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence, 2(5), 445-459.

7. Beenken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., ... & Smeltzer, M. S. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. Jouarnl of bacteriology, 186(14), 4665-4684.

8.Otto, M. Staphylococcal biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322, 207–228 (2008).

9. Gauliard, E., Ouellette, S. P., Rueden, K. J., & Ladant, D. (2015). Characterization of interactions between inclusion membrane proteins from *Chlamydia trachomatis*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 5, 13.

10. Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annual review of medicine, 64, 175- 188.

11. Abee T, Kovács ÁT, Kuipers OP, van der Veen S. (2011) Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. Current Opinion in Biotechnology.

12. Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J. M., Amorena, B., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2003). SarA and not σB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. Molecular microbiology, 48(4), 1075-1087.

13.Beenken, K. E., Blevins, J. S., & Smeltzer, M. S. (2003). Mutation of sarA in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. Infection and immunity, 71(7), 4206-4211.

14. Chan, W. C., Coyle, B. J., & Williams, P. (2004). Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive AgrC antagonists as quorum sensing inhibitors. Jouarnl of medicinal chemistry, 47(19), 4633-4641.

15.Beenken, K. E., Mrak, L. N., Griffin, L. M., Zielinska, A. K., Shaw, L. N., Rice, K. C., ... & Smeltzer, M. S. (2010). Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. PloS one, 5(5).

16. Kong, K. F., Vuong, C., & Otto, M. (2006). Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. Intearntional Jouarnl of Medical Microbiology, 296(2-3), 133-139.

17. Liu, Q., Yeo, W. S., & Bae, T. (2016). The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. Genes, 7(10), 81.

18. Nicholas, R. O., Li, T., McDevitt, D., Marra, A., Sucoloski, S., Demarsh, P. L., & Gentry, D. R. (1999). Isolation and Characterization of a sigBDeletion Mutant of *Staphylococcus aureus*. Infection and immunity, 67(7), 3667-3669.

19.Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., & Ziebuhr, W. (2000). Altearntive Transcription Factor ςB Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate. Jouarnl of bacteriology, 182(23), 6824-6826.

20. Kennedy, A. D., Wardenburg, J. B., Gardner, D. J., Long, D., Whitney, A. R., Braughton, K. R., ... & DeLeo, F. R. (2010). Targeting of alpha-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. The Jouarnl of infectious diseases, 202(7), 1050-1058.

21. Berube, B. J., & Wardenburg, J. B. (2013). *Staphylococcus aureus* α-toxin: nearly a century of intrigue. Toxins, 5(6), 1140-1166.

22. Camussone, C. M., & Calvinho, L. F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevanciay rol como agentes inmunógenos. 11.Revista Argentina de Microbiología, 45(2), 119–130. https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7

23. Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bicomponent Leukocidins, and Cytolytic Peptides: ¿A Redundant Arsenal of MembraneDamaging Virulence Factors? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2, 12. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012

24. Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. Current Opinion in Microbiology, 17, 32– 37. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004.

25. Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J. M., & Héchard, Y. (2009). δHemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. Peptides, 30(4), 817-823.

26. Spaan, A. N., Vrieling, M., Wallet, P., Badiou, C., Reyes-Robles, T., Ohneck, E. A., ... & Lina, G. (2014). The staphylococcal toxins γ-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. Nature communications, 5(1), 1- 11

27 Kessel, C. (2017). molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from the u.p. community for the presence of toxin-encoding genes. All NMU Master's Theses. Retrieved from https://commons.nmu.edu/theses/133

28. Carabetta, V. J., Tanner, A. W., Greco, T. M., Defrancesco, M., Cristea, I. M., & Dubnau, D. (2013). A complex of YlbF, YmcA and YaaT regulates sporulation, competence and biofilm formation by accelerating the phosphorylation of Spo0A. Molecular microbiology, 88(2), 283-300.

29. Tanner, A. W., Carabetta, V. J., Martinie, R. J., Mashruwala, A. A., Boyd, J. M., Krebs, C., & Dubnau, D. (2017). The RicAFT (YmcA-YlbF-YaaT) complex carries two [4Fe-4S] 2+ clusters and may respond to redox changes. Molecular Microbiology, 104(5), 837– 850.

30. Kearns, D. B., Chu, F., Branda, S. S., Kolter, R., & Losick, R. (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. Molecular microbiology, 55(3), 739-749.

31.Dubnau EJ, Carabetta VJ, Tanner AW, Miras M, Diethmaier C, Dubnau D. A protein complex supports the production of Spo0A-P and plays additional roles for biofilms and the K-state in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2016;101(4):606–24. Epub 2016/08/09. pmid:27501195; PubMed Central PMCID: PMCPMC4978174.

32. DeLoughery A, Dengler V, Chai Y, Losick R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis* requires an endoribonuclease-containing multisubunit complex that controls mARN levels for the matrix gene repressor SinR. Mol Microbiol 2016; 99(2): 425- 37.[http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13240] [PMID: 26434553]

33. DeLoughery, A., Lalanne, J. B., Losick, R., & Li, G. W. (2018). Maturation of polycistronic mARNs by the endoribonuclease ARNse Y and its associated Y- complex in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(24), E5585-E5594.

34. Hamouche, L., Billaudeau, C., Rocca, A., Chastanet, A., Ngo, S., Laalami, S. y Putzer, H. (2020). Localización dinámica de membrana de RNasa Y en *Bacillus subtilis*. mBio , 11 (1).

35. Escobar-Perez, J., Ospina-Garcia, K., Rozo, Z. L. C., Marquez-Ortiz, R. A., Castellanos, J. E., & Gomez, N. V. (2019). Identification and "in silico" Structural Analysis of the Glutamine-rich Protein Qrp (YheA) in *Staphylococcus aureus*. The Open Bioinformatics Jouarnl, 12(1).

36. Adusei-Danso, F., Khaja, F. T., DeSantis, M., Jeffrey, P. D., Dubnau, E., Demeler, B., ... & Dubnau, D. (2019). Structure-Function Studies of the *Bacillus subtilis* RicProteins Identify the Fe-S Cluster-Ligating Residues and Their Roles in Development and ARN Processing. mBio, 10(5), e01841-19.

37. Reverdy, A., Chen, Y., Hunter, E., Gozzi, K., & Chai, Y. (2018). Protein lysine acetylation plays a regulatory role in *Bacillus subtilis* multicellularity. PloS one, 13(9), e0204687.

38. Kaito, C., Kurokawa, K., Matsumoto, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Hamada, S., & Sekimizu, K. (2005). Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. Molecular microbiology, 56(4), 934-944.

39. Numata, S., Nagata, M., Mao, H., Sekimizu, K., & Kaito, C. (2014). CvfA protein and polynucleotide phosphorylase act in an opposing manner to regulate *Staphylococcus aureus* virulence. Jouarnl of Biological Chemistry, 289(12), 8420- 8431.

40. Kaito, C., Morishita, D., Matsumoto, Y., Kurokawa, K., & Sekimizu, K. (2006). Novel ADN binding protein SarZ contributes to virulence in *Staphylococcus aureus*. Molecular microbiology, 62(6), 1601-1617.

41. Nagata, M., Kaito, C., & Sekimizu, K. (2008). Phosphodiesterase activity of CvfA is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. Jouarnl of Biological Chemistry, 283(4), 2176-2184.

42. Marincola, G., Schäfer, T., Behler, J., Bernhardt, J., Ohlsen, K., Goerke, C., & Wolz, C. (2012). ARNse Y of *Staphylococcus aureus* and its role in the activation of virulence genes. Molecular microbiology, 85(5), 817-832

43. AARNud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6887-91.

44. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6076-85.

45. Christensen, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. Clin. Microbiol. 22, 996–1006 (1985).

46. Moreno-González, P. A., Diaz, G. J., & Ramírez-Hernández, M. H. (2013). Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD+.Revista colombiana de quimica, 42(2), 12-20.

47. Walsh, B. W., Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., & Simmons, L. A. (2012). Far Western Blotting as a rapid and efficient method for detecting interactions between ADN replication and ADN repair proteins. In Single-Stranded ADN Binding Proteins (pp. 161-168). Humana Press, Totowa, NJ.

48.Rodríguez Tamayo, E. A., & Jiménez Quiceno, J. N. (2015). Factors related with colonization by *Staphylococcus aureus*. Iatreia, 28(1), 66-77.

49.Deinhardt-Emmer, S., Sachse, S., Geraci, J., Fischer, C., Kwetkat, A., Dawczynski, K., ... & Löffler, B. (2018). Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization. Jouarnl of Hospital Infection, 100(3), 309-315.

50. Van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., & Gosbell, I. B. (2012). Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clinical microbiology reviews, 25(2), 362-386.

51. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun. 1999; 67:5427-33.

52. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:1955- 8.

53. Escobar Pérez, J. (2018). Identificación y caracterización de una proteína de unión al gen icaA y evaluación de su potencial participación en la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus.*

54. Ohniwa, R. L., Ushijima, Y., Saito, S. & Morikawa, K. Proteomic Analyses of Nucleoid-Associated Proteins in *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. PLoS One 6, e19172 (2011).

55. Vergara-Irigaray, M. et al. Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Foreign-Body Infections †.Infect. Immun. 77, 3978–3991 (2009).

56.O'Neill, E. et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. J. Bacteriol. 190, 3835–3850 (2008).

57 Carabetta, V. J., Tanner, A. W., Greco, T. M., Defrancesco, M., Cristea, I. M., & Dubnau, D. (2013). A complex of YlbF, YmcA and YaaT regulates sporulation, competence and biofilm formation by accelerating the phosphorylation of Spo0A. *Molecular microbiology*, *88*(2), 283-300.

58 Ramos, J.L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., Tobes, R., 2005. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69, 326–356.

59 Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bachi, B., Bischoff, M., 2008. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. Infect. Immun. 76, 2044–2050.

60 O'Neill, E.; Pozzi, C.; Houston, P.; Smyth, D.; Humphreys, H.; Robinson, D.A.; O'Gara, J.P. Association between Methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 1379–1388.

61 Regassa, L.B.; Novick, R.P.; Betley, M.J. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 3381–3388

62 Boles, B.R.; Horswill, A.R. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 449–455.

63 Foulston, L.; Elsholz, A.K.W.; DeFrancesco, A.S.; Losick, R. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. *MBio* **2014**, *5*, e01667-14.

64Dengler, V.; Foulston, L.; DeFrancesco, A.S.; Losick, R. An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2015**, *197*, 3779–3787.

65 Wang, B., & Muir, T. W. (2016). Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. Cell Chemical Biology, 23(2), 214– 224. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.004

66 Li, T., He, L., Song, Y., Villaruz, A. E., Joo, H.-S., Liu, Q., … Li, M. (2015). AraC-Type Regulator Rsp Adapts *Staphylococcus aureus* Gene Expression to Acute Infection. Infection and Immunity, 84(3), 723–734. https://doi.org/10.1128/IAI.01088-15

67 Tsompanidou, E., Sibbald, M. J. J. B., Chlebowicz, M. A., Dreisbach, A., Back, J. W., van Dijl, J. M., … Denham, E. L. (2011). Requirement of the agr Locus for Colony 54 Spreading of *Staphylococcus aureus*. JouARNl of Bacteriology, 193(5), 1267–1272. https://doi.org/10.1128/JB.01276-10

68 Hanada, Y., Sekimizu, K., & Kaito, C. (2011). Silkworm apolipophorin protein inhibits *Staphylococcus aureus* virulence. The JouARNl of Biological Chemistry, 286(45), 39360–39369. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278416

69 Omae, Y., Hanada, Y., Sekimizu, K., & Kaito, C. (2013). Silkworm apolipophorin protein inhibits hemolysin gene expression of *Staphylococcus aureus* via binding to cell surface lipoteichoic acids. The JouARNl of Biological Chemistry, 288(35), 25542–25550. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495051

70 Rogasch, K., Ruhmling, V., Pane-Farre, J., Hoper, D., Weinberg, C., Fuchs, S., … Engelmann, S. (2006). Influence of the Two-Component System SaeRS on Global Gene Expression in Two Different *Staphylococcus aureus* Strains. Journal of Bacteriology, 188(22), 7742–7758. https://doi.org/10.1128/JB.00555-06

71. Nguyen, H. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA–Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 3324-3334.

71. Lee, S., Kim, S., Lee, H., Ha, J., Lee, J., Choi, Y., ... & Choi, K. H. (2018). icaA gene of *Staphylococcus aureus* responds to NaCl, leading to increased biofilm formation. *Journal of food protection*, *81*(3), 412-416.

72. Jenul, C., & Horswill, A. R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology spectrum*, *7*(2), 7-2.

73. Morales L, Velandia M, Calderón M. Anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NS3 del virus del dengue. Biomédica [Internet]. 2017;37:131–40. Available from: http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v37n1/0120-4157-bio-37-01-00131.pdf

74. Cossio-Bolaños M, Campos RG, Vitoria RV, Hochmuller Fogaça RT, de Arruda M. Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats. Nutr Hosp. 2013;28:2151–6.

75. Tortosa P, Albano M, Dubnau D. Characterization of ylbF, a new gene involved in competence development and sporulation in Bacillus subtilis. Mol Microbiol. 2000;35(5).

76. Berka RM, Hahn J, Albano M, Draskovic I, Persuh M, Cui X, et al. Microarray analysis of the Bacillus subtilis K-state: Genome-wide expression changes dependent on ComK. Mol Microbiol. 2002;43(5).

77. Hamoen LW, Smits WK, de Jong A, Holsappel S, Kuipers OP. Improving the predictive value of the competence transcription factor (ComK) binding site in Bacillus subtilis using a genomic approach. Vol. 30, Nucleic Acids Research. 2002.

78. Ogura M, Yamaguchi H, Kobayashi K, Ogasawara N, Fujita Y, Tanaka T. Whole-genome analysis of genes regulated by the Bacillus subtilis competence transcription factor ComK. J Bacteriol. 2002;184(9).

79. Khemici V, Prados J, Linder P, Redder P. Decay-Initiating Endoribonucleolytic Cleavage by RNase Y Is Kept under Tight Control via Sequence Preference and Sub-cellular Localisation. PLoS Genet. 2015;11(10).

80. Cho KH. The structure and function of the gram-positive bacterial RNA degradosome. Vol. 8, Frontiers in Microbiology. 2017.

81.Tucker AT, Bobay BG, Banse A V., Olson AL, Soderblom EJ, Moseley MA, et al. A DNA mimic: The structure and mechanism of action for the anti-repressor protein AbbA. J Mol Biol. 2014;426(9).

82. Deutscher MP. The metabolic role of RNases. Trends Biochem Sci. 1988;13(4).

83. Durand S, Gilet L, Bessières P, Nicolas P, Condon C. Three essential ribonucleases-RNase Y, J1, and III-control the abundance of a majority of bacillus subtilis mRNAs. PLoS Genet. 2012;8(3).

84. Richards J, Liu Q, Pellegrini O, Celesnik H, Yao S, Bechhofer DH, et al. An RNA

85. Bonnin RA, Bouloc P. RNA degradation in *Staphylococcus aureus*: Diversity of ribonucleases and their impact. Vol.2015, International Journal of Genomics. 2015

86. Marincola G, Wolz C. Downstream element determines RNase y cleavage of the saePQRS operon in *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res. 2017;45(10).

87.Geiger T, Goerke C, Mainiero M, Kraus D, Wolz C. The virulence regulator sae of *Staphylococcus aureus*: Promoter activities and response to phagocytosis-related signals. J Bacteriol. 2008;190(10).

88.Adhikari RP, Novick RP. Regulatory organization of the staphylococcal sae locus. Microbiology. 2008;154(3).

89.Steinhuber A, Goerke C, Bayer MG, Döring G, Wolz C. Molecular Architecture of the Regulatory Locus sae of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Expression of Virulence Factors. J Bacteriol. 2003;185(21).

90. Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS pathogens*, *4*(4), e1000052.

91. O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D. A., & O'Gara, J. P. (2007). Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of clinical microbiology*, *45*(5), 1379-1388.