

T-378

WILL, I.F.
Estudio de la Regula

2004

60658



CREER... CREAR... CRECER



60658

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

**Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y
Naturales**

**Trabajo de Tesis
para optar al grado de
Magister en Biotecnología**

**Título: "Estudio de la regulación de la
expresión del gen regulatorio sae en
Staphylococcus aureus"**

**Autora: Mic. Ileana F. Will
Directora: Dra. Rosa Nagel
Co-Directora: Dra. Claudia Raspanti**

-3 de agosto de 2004-

80822

60658

MFN:
Class: T. 378

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un agente causante de infecciones, tanto en el hombre como en los animales. La patogenicidad de *S. aureus* está dada por un gran número de proteínas extracelulares y unidas a la superficie bacteriana, las cuales se expresan coordinadamente, evidenciando la existencia de sistemas regulatorios globales. Estos sistemas regulan la expresión de genes de virulencia en respuesta a la densidad celular y a distintas condiciones ambientales y pueden ser divididos en: sistemas regulatorios de dos componentes, tales como *agrCA*, *saeRS*, *lytRS*, *arlRS*, *srrAB* e *yycFG*; sistemas regulatorios mediados por proteínas homólogas a SarA y un factor sigma alternativo.

El sistema regulatorio *sae* consiste en dos genes, *saeR* y *saeS*, los cuales regulan a nivel transcripcional la expresión de varios factores de virulencia. Análisis transcripcionales revelaron la síntesis de un co-transcripto, de 2.4 kb, durante las fases de crecimiento post-exponencial tardía y estacionaria temprana, cuya expresión se encuentra disminuída en la mutante *agr*, indicando que *agr* es un regulador positivo de *sae*. Estudios previos habrían descrito dos promotores del locus *sae*, uno localizado 626 nt río arriba *saeRS*, y otro, 83 nt río arriba.

El objetivo del presente trabajo fue avanzar en el estudio del sistema regulatorio *saeRS*, en cuanto a su organización molecular y a su expresión bajo diferentes condiciones ambientales. Con este propósito, se obtuvieron construcciones plasmídicas y se llevaron a cabo estudios de complementación y de expresión del locus *sae*.

Los ensayos de complementación efectuados en la mutante *sae* permitieron demostrar que el plásmido portador de los genes *saeRS* más 406 pb río arriba restablece el fenotipo salvaje, indicando la presencia de un tercer promotor.

Los estudios de fusiones transcripcionales con distintos fragmentos de la región promotora del locus *sae* mostraron niveles diferentes de expresión, corroborando la existencia de varios promotores.

La expresión del locus *sae* se vió modificada por cambios en el medioambiente, incluso bajo condiciones que no afectan al gen regulatorio *agr*, lo que permitiría inferir el efecto de algunos factores ambientales directamente sobre *sae*, independientemente de *agr*.

ÍNDICE

I- INTRODUCCIÓN

I.1- <i>Staphylococcus aureus</i> : características fisiológicas.....	1
I.2- Regulación global de los factores de virulencia en <i>S. aureus</i>	2
I.2.1- Sistemas regulatorios globales de dos componentes.....	2
I.2.1.1- Sistema regulatorio <i>agr</i>	3
I.2.1.2- Sistema regulatorio <i>sae</i>	5
I.2.1.3- Otros loci regulatorios	8
I.2.2- Familia de proteínas homólogas a <i>sarA</i>	8
I.2.3- Factor sigma alternativo.....	9
I.3- Sistemas regulatorios globales y patogenicidad de <i>S. aureus</i>	10

II- HIPÓTESIS.....	12
--------------------	----

III- OBJETIVOS	13
----------------------	----

IV- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1- Cepas bacterianas, plásmidos y fagos	14
IV.2- Buffers y soluciones	15
IV.3- Medios de cultivo.....	16
IV.4- Conservación de las cepas.....	17
IV.5- Condiciones de cultivo.....	17
IV.6- Diseño de cebadores.....	18
IV.7- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
IV.8- Mezcla de Reacción.....	19
IV.9- Programas de PCR.....	19
IV.10- Clonado de productos de PCR.....	20
IV.10.1- Reacción de Ligación.....	21
IV.11- Subclonado de productos de PCR.....	22
IV.11.1- Subclonado en el vector pMK4.....	22
IV.11.2- Subclonado en el vector pLC4.....	23
IV.12- Transferencia de los productos de ligación a <i>E. coli</i> DH5 α	24
IV.12.1- Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α con CaCl ₂	24
IV.12.2- Transformación de células competentes con CaCl ₂	25

IV.13- Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i> y elución de fragmentos de restricción.....	25
IV.14-Transferencia de plásmidos a <i>S. aureus</i>	26
IV.14.1- Preparación de células electrocompetentes.....	26
IV.14.2-Transformación de células electrocompetentes.....	26
IV.15- Extracción de plásmidos de <i>S. aureus</i>	26
IV.16- Experimentos de transducción.....	27
IV.17- Detección de actividad de exoproteínas: α -hemolisina, β -hemolisina, coagulasa y DNasa.....	27
IV.17.1- Hemolisinas.....	27
IV.17.2- Coagulasa.....	28
IV.17.3- DNasa.....	28
IV.18- Ensayo de actividad catecol 2,3-dioxigenasa.....	29
IV.19- Análisis estadístico.....	29
V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
V.1- Diseño de cebadores.....	30
V.2- Amplificación de fragmentos de la región <i>sae</i>	30
V.3- Eficiencia de transformación de las células de <i>E. coli</i> DH5 α	32
V.4- Clonado de los fragmentos amplificados por PCR en el vector pGEM [®] -T-Easy.....	32
V.5- Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i>	32
V.6- Subclonado de los fragmentos del sitio <i>sae</i> en un vector bifuncional.....	33
V.7- Transferencia a <i>S. aureus</i> de los plásmidos pFU7 y pRC35.....	35
V.8- Análisis de complementación.....	36
V.8.1- Hemolisinas.....	36
V.8.2- Coagulasa.....	37
V.8.3- DNasa.....	37
V.9- Análisis de la expresión del locus <i>sae</i>	38
V.9.1- Determinación de la expresión del locus <i>sae</i> bajo diferentes entornos genéticos.....	39
V.9.2- Determinación de la expresión del locus <i>sae</i> bajo diferentes condiciones ambientales.....	40
V.9.2.1- Disponibilidad de oxígeno.....	40
V.9.2.2- Concentración salina.....	42

V.9.2.3- Concentración de sacarosa.....	43
V.9.2.4- Concentración de glucosa.....	44
V.9.2.5- Concentración de fructosa.....	45
VI- CONCLUSIONES.....	47
VII- BIBLIOGRAFIA.....	48

Introducción

I- INTRODUCCIÓN

I.1- *Staphylococcus aureus*: características fisiológicas

Staphylococcus aureus es una especie perteneciente a la familia *Micrococcaceae*. Son cocos Gram positivos, no esporulados, inmóviles, que se desarrollan en forma de racimos irregulares, aerobios facultativos, de metabolismo respiratorio y fermentativo, capaces de tolerar altas concentraciones de cloruro de sodio (hasta un 10%) [8].

S. aureus forma parte de la microflora normal, tanto del hombre como de los animales, y se encuentra en el epitelio mucoso y cutáneo [37]; sin embargo, se conoce una amplia variedad de infecciones causadas por esta especie. El sitio primario de infección es a menudo la piel, provocando afecciones menores tales como forúnculos, dermatitis, síndrome de la piel escaldada, artritis, hasta otras graves cuando el microorganismo se disemina e infecta tejidos más profundos donde causa una variedad de síntomas dependiendo del órgano colonizado, tales como osteomielitis, neumonía, endocarditis, síndrome del shock tóxico, etc. [35]. Es además el principal agente etiológico de la mastitis bovina en nuestro país [10, 11]. La mastitis bovina es la enfermedad infecciosa de mayor importancia del ganado bovino lechero por las grandes pérdidas económicas que ocasiona en la producción lechera, debido a la disminución del valor biológico de la leche, a los serios inconvenientes en su industrialización y a las pérdidas en el valor del animal infectado [55].

Las infecciones producidas por *S. aureus* son difíciles de erradicar a pesar de prolongadas terapias con antibióticos adecuados. Un factor importante en esta persistencia es la habilidad que posee este microorganismo para invadir, vivir y dividirse dentro de ciertos tipos de células huésped, comportándose como un patógeno intracelular. Este mecanismo le permitiría evadir la inmunidad humoral del huésped y la acción de antimicrobianos, contribuyendo a la cronicidad y recurrencia de la infección [4, 7].

La patogenicidad de *S. aureus* es un proceso complejo que involucra un gran número de proteínas extracelulares y unidas a la superficie bacteriana, las cuales se expresan coordinadamente durante las diferentes fases de crecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro* [49]. Éstas incluyen varias toxinas citolíticas (α -, β -, γ - y δ -hemolisinas), enterotoxinas, leucocidina, proteasas, coagulasa, nucleasa, proteína A, proteínas de unión a fibronectina y a colágeno, cápsula, etc. [71]. Generalmente, las proteínas de superficie son expresadas tempranamente permitiendo el establecimiento de la infección y la subsiguiente evasión de las defensas del huésped, mientras que las proteínas extracelulares son

producidas tardíamente facilitando la penetración y diseminación en los tejidos [52, 49].

La expresión coordinada de estos factores de virulencia evidencia la existencia de sistemas regulatorios globales. Estos sistemas regulan la expresión de los diferentes genes en respuesta a la densidad celular y a distintas condiciones ambientales a las que se encuentra sometido el microorganismo.

I.2- Regulación global de los factores de virulencia en *S. aureus*

Los estudios genómicos han revelado la existencia de reguladores globales de la síntesis de los factores de virulencia en *S. aureus*: sistemas regulatorios de dos componentes [25, 2, 17, 49], sistemas regulatorios mediados por proteínas homólogas [17] y un factor sigma alternativo [39]. Muchos de estos elementos regulatorios fueron descubiertos a través del estudio de mutantes obtenidas por transposición, las cuales mostraron un efecto pleiotrópico sobre la producción de varias proteínas extracelulares y proteínas unidas a la pared celular.

I.2.1- Sistemas regulatorios globales de dos componentes

La patogénesis bacteriana es un proceso en el cual el agente infeccioso debe reconocer y responder de manera apropiada a ciertas señales específicas provenientes del medio ambiente, tales como temperatura, pH, presencia o ausencia de fuentes de carbono y energía, etc. [46]. La capacidad de adaptarse a estos cambios es una característica crucial para la supervivencia y desarrollo del microorganismo en el nuevo ambiente [3, 21].

La mayoría de las respuestas adaptativas a estímulos ambientales son mediadas por sistemas de transducción de señales que involucran dos componentes enzimáticos [65]. Un típico sistema de dos componentes está formado, como su nombre lo indica, por dos proteínas, una histidina-proteína-quinasa (HPK) y su regulador de respuesta asociado (RR). El primer componente de este sistema es una proteína sensora, localizada generalmente en la membrana citoplasmática, que monitorea el entorno fisiológico y modula las funciones del RR o proteína efectora. La comunicación molecular entre las proteínas sensora y efectora sólo involucra reacciones de fosfotransferencia (fosforilación y defosforilación) [31, 47]. Cuando la HPK detecta una señal, ésta se autofosforila y por transferencia del grupo fosfato, fosforila al RR. Esta segunda proteína es un regulador transcripcional, el cual

al ser fosforilado sufre un cambio conformacional que le permite unirse a la región promotora de determinados genes. En la mayor parte de los sistemas, cuando la proteína efectora se fosforila, se convierte en un activador de la transcripción de los genes necesarios para generar una respuesta al estímulo inicial [21].

Aunque estas dos proteínas, HPK y RR, juegan un rol central en el sistema de transducción de señales, a menudo hay más proteínas involucradas en el sistema, sobre todo a nivel de la membrana citoplasmática [66].

Se han identificado hasta el momento varios loci regulatorios, entre ellos, *agrCA*, *saeRS*, *lytRS*, *arlRS*, *srrAB* e *yycFG* [58, 29, 25, 9, 22, 74, 43].

Debido a que estos sistemas juegan un rol clave en el control de la expresión de genes involucrados en la patogénesis y en la supervivencia del microorganismo, se presentan como un blanco atractivo para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas [43, 41].

I.2.1.1- Sistema regulatorio *agr*

Uno de los primeros y mejor caracterizado es el sistema regulatorio *agr* (accessory gene regulator). El locus *agr* consiste en dos transcriptos divergentes: RNAII y RNA III. El primero es transcripto a partir de su promotor P2 y codifica para los genes *agrDBC* y *A* [52, 53, 38]. La función principal de estos genes es activar la transcripción de su propio promotor, así también como la del promotor P3, del cual se transcribe RNAIII [38] (Figura 1).

Los genes *agrA* y *agrC* codifican para un sistema de señales de dos componentes. La proteína AgrA corresponde al regulador de respuesta y AgrC a la histidina-proteína-quinasa [52, 41]. El producto de *agrD* es un propéptido, el cual es procesado y secretado por AgrB, dando como resultado un octapéptido autoinducible (AIP) señal de densidad celular que interacciona con la proteína sensora AgrC para transmitir a través de AgrA una señal que activa, la expresión de RNAII y RNAIII a partir de los promotores P2 y P3, respectivamente.

El segundo transcripto, RNAIII, es el verdadero efector de la respuesta *agr*. RNAIII actúa en la regulación de los genes blanco por un mecanismo que probablemente involucra proteínas codificadas por operones distintos al *agr*; a la vez, RNAIII codifica para la δ -hemolisina, la cual no está involucrada en la regulación [53].

El sistema *agr* se activa en la fase post-exponencial de crecimiento, vía AIP, cuando la densidad celular alcanza un nivel crítico, y actúa como un regulador positivo sobre la síntesis de la mayoría de las exoproteínas: α -, β -, y δ - hemolisinas, proteasas, DNasa, estafiloquinasa y toxina-1 del síndrome del shock tóxico, y ejerce un control negativo sobre la transcripción de los genes de proteína A, coagulasa y de otras proteínas asociadas a la pared celular [38, 58].

El locus *agr* presenta polimorfismos en la región de los genes B, D y C, dando lugar a, por lo menos, cuatro grupos de especificidad diferentes [36, 34, 19]. La comparación de las secuencias de distintas cepas de *S. aureus* indica que AgrB, AgrD y AgrC, involucrados en la generación de la señal específica, son notablemente variables dentro de los cuatro grupos; mientras que AgrA, el cual codifica para el regulador de respuesta es mucho más conservado. La variación de la secuencia está particularmente marcada en el precursor de AIP, AgrD y en una porción de AgrC, donde estaría localizado el sitio extracelular que interactúa con el AIP. Esta variabilidad origina una competencia a nivel de la expresión de *agr*, ocasionando una inhibición cruzada entre los cuatro grupos genéticos, dando origen a un novedoso mecanismo de interferencia bacteriana, el cual debe tener un rol importante durante la colonización y/o infección [36, 41]. Esta acción inhibitoria de los AIPs podría servir para el desarrollo de potenciales agentes terapéuticos contra *S. aureus* [56].

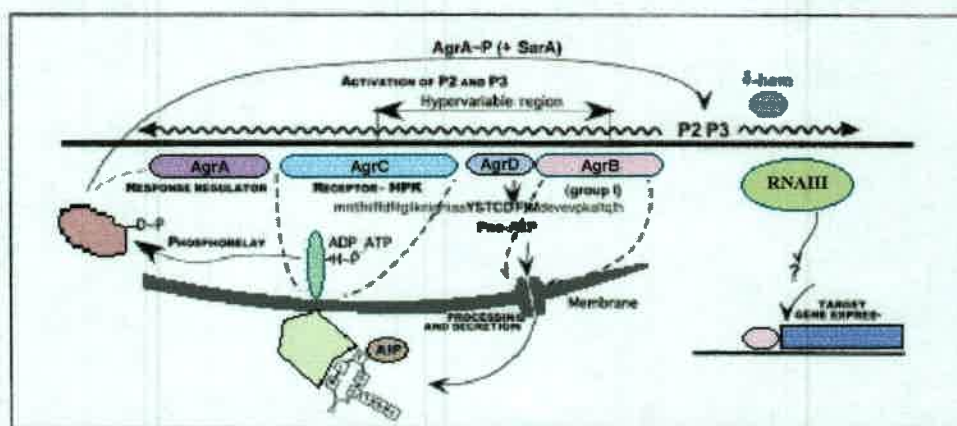


Figura 1. Sistema *agr* (accessory gene regulator) en *Staphylococcus aureus*.

I.2.1.2- Sistema regulatorio *sae*

En el laboratorio de Genética Microbiana de la UNRC se aisló y caracterizó una mutante obtenida por transposición insercional de Tn551 designada *sae* (*Staphylococcus aureus exoprotein expression*) que exhibe alteraciones en la producción de varias exoproteínas. La mutante *sae::Tn551* es deficiente en la producción de α - y β -hemolisinas, coagulasa, DNasa y proteína A [29]. Estudios de Northern blot mostraron que *sae* regula positivamente la expresión de los genes que codifican para estas proteínas a nivel transcripcional [26].

El locus *sae* fue clonado y secuenciado en este laboratorio [25]. La estrategia para ello consistió en usar como sonda la secuencia de ADN adyacente a la inserción del transposón en la cepa mutante *sae::Tn551* para localizar el gen entero en una genoteca de la cepa salvaje. Se seleccionó y clonó en el vector pBlueScript II KS un fragmento *EcoR I/Cla I* de 3.4 kb (pRC9) que contiene secuencias que flanquean ambos lados del transposón. El secuenciamiento de dicho fragmento reveló que el transposón Tn551 se insertó en un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una proteína que presenta una alta homología con los reguladores de respuesta de los sistemas regulatorios de dos componentes bacterianos. Este gen, de 687 pb, fue designado *saeR*. Se llamó *saeS* a un segundo ORF, de 1062 pb, localizado río abajo (*downstream*) de *saeR* que se transcribe en la misma dirección y que codifica para un producto que posee homología con las histidín-proteín-quinasas sensoras [25] (Figura 2).

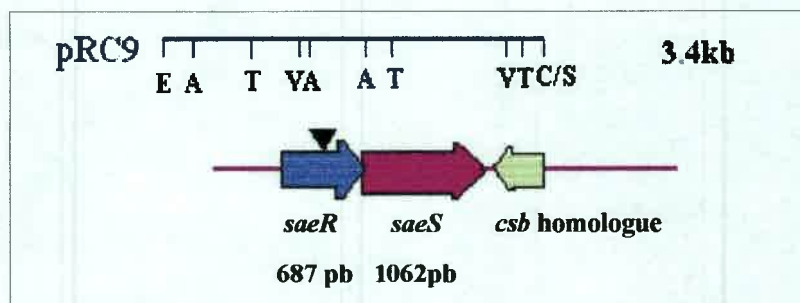


Figura 2. Mapa físico del plásmido pRC9 que contiene el locus *sae* clonado en el vector pBlueScriptII KS. El esquema indica la localización y orientación del operón *saeRS* y de parte de un marco de lectura abierto incompleto con homología al gen *csbB* de *B. subtilis*, (▼) indica el sitio de inserción del transposón Tn551. Sitios de restricción: A, *Acc I*; C, *Cla I*; E, *EcoR I*; S, *Sal I*, T, *Tfi I*; V, *EcoR V*.

Análisis transcripcionales por Northern blot revelaron la presencia de un co-transcripto, de aproximadamente 2.4 kb y de otras dos bandas, de 1.5 y 0.9 kb aproximadamente, las cuales podrían originarse a partir de otro/s promotores o del procesamiento del co-transcripto [27]. Los tres transcritos se expresan durante las fases post-exponencial tardía y estacionaria temprana, indicando que la activación de los promotores depende de la fase de crecimiento.

La expresión de estos transcritos se encuentra disminuída en la mutante *agr*, lo cual indica que *agr* es un regulador positivo de *sae* [27]. Estudios previos de Northern blot habían mostrado que *sae* no ejerce efecto sobre la transcripción de *agr* [26].

Análisis de *primer extension* indicaron que el locus *sae* tendría al menos dos promotores, uno (designado P1) localizado 626 nt río arriba (*upstream*=UP) del marco de lectura abierto de *saeRS*, que corresponde al sitio de iniciación del transcripto de mayor tamaño, y otro más débil, (designado P2) localizado 83 nt UP [27].

Análisis de secuencia revelaron un ORF adicional UP *saeRS*, el cual codificaría para una hipotética proteína hidrofóbica (Figura 3), [27].

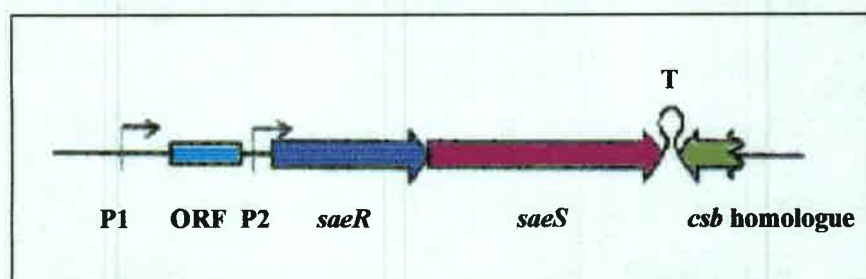


Figura 3. Organización del locus *sae* conteniendo los genes *saeRS*. Los promotores P1 y P2 están localizados a 626 y 83 nt UP de *saeRS*, respectivamente. ORF, marco de lectura abierto de 327 nt localizado UP de *saeRS* el cual codifica para una hipotética proteína hidrofóbica. T, posible *loop* de terminación.

Estudios de expresión del locus *sae* con fusiones transcripcionales de pLC4, vector portador del gen reportero *xylE* sin su propio promotor [57], y fragmentos de diferente tamaño (181 y 1150 pb) de la región UP de *saeRS*, designados pFU5 y pFU9, respectivamente, revelaron una débil expresión con el fragmento UP de menor tamaño y una muy buena expresión con pFU9 tanto en la mutante *sae* RC106 como en su cepa parental salvaje ISP479. El débil inicio de transcripción (P2) concuerda con el bajo nivel de expresión del gen *xylE* observado con el plásmido pFU5, tanto en la cepa salvaje como

en la mutante. El fuerte inicio de transcripción a los 626 nt UP de *saeR* (P1) explicaría los elevados niveles de expresión detectados con el plásmido pFU9. La expresión de *xylE* con la fusión pFU9 en una mutante *agr* se vio disminuída, confirmando el efecto regulatorio positivo de *agr* sobre la expresión de *sae* ya observado en análisis de Northern blot [27].

Estudios de complementación efectuados en la mutante *sae* RC106 con el plásmido pRC91, portando los genes *saeRS* más 1150 pb UP en el vector bifuncional pMK4, mostraron que este plásmido restablece el fenotipo salvaje, determinado por la producción de α - y β -hemolisinas, DNasa y coagulasa [25].

Una segunda construcción, denominada pRC31, portadora de los genes *saeRS* más 181 pb UP en el vector pMK4, restauró parcialmente la producción de α - y β -hemolisinas y DNasa, mientras que no se detectó producción de la enzima coagulasa. Estos resultados se correlacionaron con los datos obtenidos en los experimentos de expresión de fusiones transcripcionales y *primer extension* [27], que indicaron la presencia de al menos dos promotores con diferente fuerza.

Recientemente, un análisis transcripcional del operón *sae* ha sido realizado por otros dos grupos de investigadores. Se localizaron tres promotores UP *saeRS*, uno de los cuales (P2, Figura 4) correspondería al promotor P1 (Figura 3) descrito por nuestro grupo. El análisis de las secuencias reveló la presencia de dos ORFs UP *saeRS* (Figura 4), uno de los cuales, ORF3, codificaría para una proteína hidrofóbica probablemente asociada a la membrana [64, 51], que podría corresponder al ORF identificado en nuestro laboratorio (Figura 3) [27]. Las diferencias observadas pueden deberse a variaciones en las cepas utilizadas para tales experimentos.

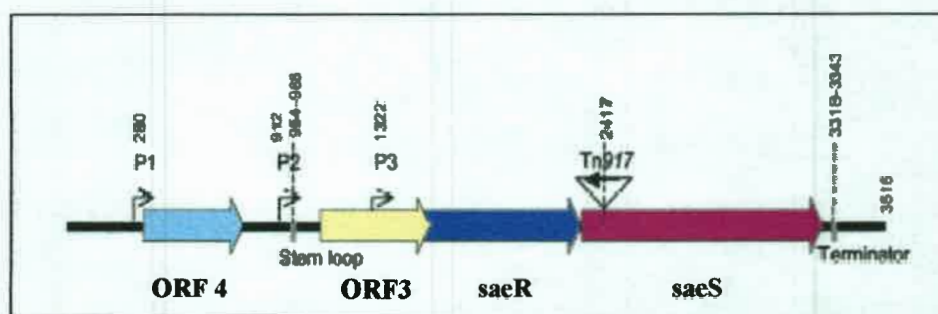


Figura 4. Esquema del operón *sae* basado en la secuencia de pCWSAE7 (GenBank accession number AJ556795).

I.2.1.3- Otros loci regulatorios

Otros sistemas regulatorios de dos componentes han sido identificados en *S. aureus*, entre ellos el de los genes *lytS* y *lytR*, los cuales controlan la tasa de autólisis por su efecto sobre la expresión de la mureína-hidrolasa asociada con la célula. [9].

Fournier y col. identificaron otros genes, *arlS-arlR*, involucrados en la regulación de factores de virulencia de *S. aureus*. El locus *arl* regula, principalmente, la síntesis de proteína A, y de algunas exoproteínas, tales como α - y β -hemolisinas, coagulasa y lipasa, vía *agr* y/o *sarA* [22].

Investigando el mecanismo por el cual el oxígeno podría regular la producción de la toxina del síndrome del shock tóxico en *S. aureus*, se identificaron genes que estarían implicados en la regulación del metabolismo respiratorio, designados *srrA* y *srrB* (*staphylococcal respiratory response*). Las proteínas SrrA y SrrB regulan la producción de exoproteínas y de proteínas asociadas a la pared en respuesta a los niveles de oxígeno. *srrAB* reprime la expresión de RNAlII e induce la expresión de TSST-1 (toxina del síndrome del shock tóxico) [74].

Otro sistema regulatorio, esencial para el crecimiento, es el constituido por los genes *yycFG*, que actuaría en la regulación de la composición de la pared y/o membrana celular, causando un importante efecto sobre la permeabilidad celular. Así, las mutantes *yycFG* muestran hipersensibilidad a antibióticos del tipo macrólidos, indicando un incremento en la permeabilidad celular o una disminución en el eflujo del antibiótico [43, 23].

I.2.2- Familia de proteínas homólogas a *sarA*

El locus *sar* (*staphylococcal accessory regulator*) codifica para la proteína SarA, la cual se transcribe a partir de tres promotores distintos, superpuestos en parte (P1, P3 y P2), (Figura 5) [32]. Se ha demostrado que la proteína SarA interacciona en forma directa con los promotores de varios genes blanco, incluyendo *agr*, *hla* (α -hemolisina), *spa* (proteína A) y *fnbA* (proteínas de unión a fibronectina), activando la transcripción de los mismos; ésto implica que SarA puede modular la expresión de los genes blanco vía *agr* o en forma independiente [18, 72]. Se han descrito elementos regulatorios adicionales con alta homología con *sarA*. Uno de ellos, *sarHI* (*Sar homologue 1*) o *sarS* reprime la transcripción de *hla* y activa la transcripción de *spa*, y su expresión es reprimida por *sarA* y *agr* [69, 16]. Otro gen homólogo de *sarA*, *sarT*, al igual que *sarHI* (o *sarS*), es reprimido

por *sarA* y *agr* y a su vez reprime la expresión de *hla* [63]. Así, *sarA* y *agr* modularían la expresión de *hla* a través de sus efectos sobre *sarH1* y *sarT*. Igualmente, la represión de *spa* por *agr* sería mediada por SarH1. Sin embargo, *sarA* y *agr* ejercerían además un efecto directo sobre la síntesis de α -hemolisina. Un tercer gen de la familia de homólogos de SarA, *sarR*, reprime la expresión de *sarA* durante la fase post-exponencial [42]. *rot* (*repressor of toxins*) es otro sitio regulatorio perteneciente a esta familia, el cual tiene la función de regulador negativo de la transcripción de factores de virulencia, tales como la α -hemolisina y proteasas y cuyo efecto es alterado en forma directa o indirecta por el gen *agr* [45, 59].

Se ha demostrado recientemente por ensayos en *microarrays* que los genes *sarA* y *agr* regulan la transcripción de otros genes además de los hasta ahora identificados, muchos de ellos no vinculados con caracteres de patogenicidad [20].

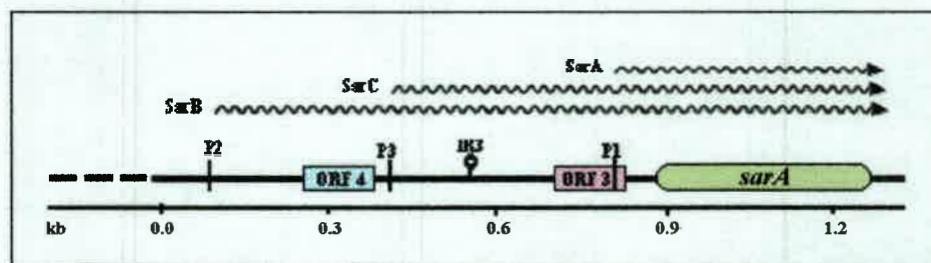


Figura 5. Sistema *sar* (*staphylococcal accesory regulator*) en *Staphylococcus aureus*.

I.2.3- Factor sigma alternativo

En algunas bacterias, el núcleo de la enzima ARN polimerasa está compuesta por cuatro subunidades, $\alpha_2\beta\beta'$. La asociación del núcleo enzimático con el factor sigma (σ) forma una holoenzima capaz de reconocer sitios promotores específicos, permitiendo el inicio de la transcripción. Un grupo de factores σ se requiere para la expresión de genes de supervivencia esenciales para el crecimiento celular. El segundo grupo contiene factores σ alternativos (σ^B) que están involucrados en la regulación de la expresión de genes que responden a cambios en el medioambiente (privación de nutrientes, temperaturas extremas, cambios de osmolaridad, etc.).

Wu y col. [73] describieron y secuenciaron un conjunto de cuatro genes en *S. aureus* (*rsbU*, *rsbV*, *rsbW* y *sigB*), cuyos productos muestran un alto nivel de identidad con el operón *sigB* de *B. subtilis*.

La actividad de σ^B es regulada por los productos de los genes *rsbU*, *-V* y *-W*. RsbW actúa como un factor anti-sigma, uniéndose a σ^B y formando un complejo RsbW- σ^B . RsbV es un factor anti-anti- σ^B , el cual compete con σ^B por RsbW. RsbV es modulado por la fosfatasa RsbU y la fosforilasa RsbW [62].

En condiciones normales, RsbV, está inactivo debido a su fosforilación por RsbW. En condiciones adversas, tales como presencia de etanol, acidez, salinidad o alta temperatura, RsbU defosforila a RsbV, el cual se une a RsbW, permitiendo la activación de σ^B .

σ^B incrementa la expresión de *sar*, y simultáneamente reduce los niveles de RNAIII y de *sae*, por lo que se propone que dicho factor está involucrado directa o indirectamente en la regulación de la expresión de genes de virulencia [6, 51].

I.3- Sistemas regulatorios globales y patogenicidad de *S. aureus*

Se ha observado que la expresión de algunos genes de virulencia es el resultado del control por varios genes regulatorios que actúan en forma simultánea. Así, estudios realizados sobre la producción de α -hemolisina indicaron que la regulación de *hla* depende de *agr*, *sar* y *sae*, ya que una mutación en cualquiera de los tres loci resulta en la disminución o falta de transcripción de dicho gen [26, 53, 30].

Los estudios de las mutantes *agr*, *sar* y *sae* en distintos modelos animales mostraron una disminuida virulencia de las mismas con respecto a sus respectivas cepas parentales isogénicas [28, 15, 1]. Más aún, la virulencia de mutantes dobles *sae/agr* y *sar/agr* fue significativamente menor que la de las mutantes simples parentales [15, 28]. Además, el estudio de la expresión de distintas exoproteínas en las mutantes dobles *sae agr* evidenció la existencia de una compleja interacción entre estos dos genes regulatorios [28]. Así se observó que las mutantes dobles *sae/agr* presentan efectos aditivos o sinérgicos con referencia a la disminución de la virulencia y a la síntesis de β -hemolisina, DNAsa y proteasas respecto de las mutantes parentales simples, que la producción de α - y δ -hemolisinas, lipasa y proteína A corresponde al fenotipo de la mutante *agr* y que la producción de proteína A está disminuida, como en la mutante *sae*.

Existen evidencias que indican que *in vivo* los circuitos regulatorios actúan en forma diferente a *in vitro*. Así, no se encontró en un sistema *in vivo* disminución de la síntesis de α -hemolisina con mutantes *agr* o *sar*, mientras que la mutante *sae* mostró significativa disminución de la producción de esta hemolisina, sugiriendo que al menos bajo ciertas condiciones *in vivo*, es el locus *sae*, y no los loci *agr* o *sarA*, el responsable de la patogenicidad [30].

Todas estas observaciones revelan que en *S. aureus* los diferentes loci regulatorios no sólo modulan la expresión de los factores de virulencia sino que además interaccionan entre sí y con el medio ambiente para modificar su expresión, lo cual muestra la existencia de una compleja red regulatoria.

Hipótesis

II- HIPÓTESIS

→ Algunas de las hipótesis planteadas en este trabajo son:

a) que el locus regulatorio *sae*, que corresponde a un sistema regulatorio de dos componentes, es un locus complejo, que se transcribe a partir de varios promotores, y que por ende podría responder a una regulación compleja,

b) y que su expresión depende del estado del crecimiento celular y de señales aún no identificadas del medio ambiente.

Objetivos

III- OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue ^{continuar con} ~~la continuación de~~ los estudios del sistema regulatorio de dos componentes *saeRS* para avanzar en el conocimiento de su organización molecular y de su expresión bajo diferentes condiciones ambientales.

Los objetivos parciales planteados fueron los siguientes:

- 1) Obtención de una nueva construcción plasmídica portadora de la región codificante *saeRS* (1.8 kb) fusionada a una región UP de tamaño intermedio a las ya analizadas, aproximadamente 400 pb, en un vector de copia múltiple.
- 2) Análisis de la complementación de la nueva construcción plasmídica en una mutante *sae* por la expresión de la síntesis de α - y β -hemolisinas, coagulasa y DNasa.
- 3) Construcción de una fusión transcripcional del fragmento de 400 pb de la región UP con el gen reportero *xylE*, en un plásmido multicopia, para llevar a cabo el estudio de la expresión del gen reportero en mutantes *sae* por la determinación de la catecol 2, 3- dioxigenasa.
- 4) Estudio de la expresión del locus *sae* en distintos entornos genéticos y bajo diferentes condiciones ambientales por la determinación de la expresión del gen reportero *xylE* en vectores portadores de fusiones de expresión.

Materiales y Métodos

IV- MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

IV.1- Cepas bacterianas, plásmidos y fagos

Las cepas bacterianas, plásmidos y fagos utilizados están descriptos en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas, plásmidos y fagos.

Cepas	Características	Ref.
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa restricción ⁻ , recombinación ⁻ , endonucleasa I ⁻ , Lac ⁻ , capaz de realizar α -complementación, utilizada para experimentos de transformación.	[33]
<i>S. aureus</i> RN4220	Mutante de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 restricción ⁻ , modificación ⁻ , receptora de ADN foráneo.	[48]
<i>S. aureus</i> ISP479C	Cepa derivada de <i>S. aureus</i> NCTC 8325-4 productora de exoproteínas (exo ⁺) curada del plásmido pI258::Tn551.	[50]
<i>S. aureus</i> RC106	Mutante isogénica de <i>S. aureus</i> ISP479C con una mutación <i>sae</i> ::Tn551	[29]
<i>S. aureus</i> Newman	<i>S. aureus</i> ATCC 25904, cepa de un aislamiento clínico productora de altos niveles de coagulasa y <i>clumping factor</i> .	[44]
<i>S. aureus</i> RN6390	<i>S. aureus</i> NCTC 8325 curada de tres profagos.	[38]
<i>S. aureus</i> RC300	Mutante isogénica de <i>S. aureus</i> Newman con una mutación <i>sae</i> ::Tn551	[26]
<i>S. aureus</i> RC185	Mutante isogénica de <i>S. aureus</i> ISP479C con una mutación <i>agr</i> :: <i>tetM</i>	[28]
<i>S. aureus</i> ISP8	Cepa propagadora de los fagos del grupo lítico III (80 α , 53 y 42E).	[54]
<i>S. aureus</i> RN4220 (pFU5)	<i>S. aureus</i> RN4220 portadora del plásmido pFU5.	[27]
<i>S. aureus</i> RN4220 (pFU9)	<i>S. aureus</i> RN4220 portadora del plásmido pFU9.	[27]
<i>S. aureus</i> ISP479C (pFU5)	<i>S. aureus</i> ISP479C portadora del plásmido pFU5.	[27]
<i>S. aureus</i> ISP479C (pFU9)	<i>S. aureus</i> ISP479C portadora del plásmido pFU9.	[27]

Plásmidos	Características	Ref.
pRC91	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Cla</i> I de la región <i>sae</i> de 3.4 kb clonado en el vector bifuncional pMK4 (Ap ^r , Cm ^r). Peso molecular: 9 kb.	[25]
pGEM [®] -T- Easy	Sistema Vector para el clonado de productos de PCR (Ap ^r). Peso molecular: 3 kb.	Promega
pBlueScript II SK	Plásmido derivado del pUC19 (Ap ^r , Lac ⁺). Peso molecular: 2.96 kb.	Stratagene
pLC4	Vector de clonado bifuncional (Ap ^r , Cm ^r) portador del gen <i>xyIE</i> sin su promotor. Peso molecular: 9 kb.	[57]
pMK4	Vector de clonado bifuncional derivado del pUC9 (Ap ^r , Cm ^r , Lac ⁺) Peso molecular: 5.6 kb.	[67]
pFU5	Fragmento amplificado por PCR de 181 pb UP del ORF de <i>saeRS</i> clonado en el vector bifuncional pLC4. Peso molecular: 9.2 kb.	[27]
pFU7	Fragmento amplificado por PCR de 406 pb UP del ORF de <i>saeRS</i> clonado en el vector bifuncional pLC4 . Peso molecular: 9.4 kb.	Este trabajo
pFU9	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>EcoR</i> V de 1150 pb UP del ORF de <i>saeRS</i> clonado en el vector bifuncional pLC4. Peso molecular: 10.1 kb.	[27]
pRC35	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>EcoR</i> I de la región <i>sae</i> de 2278 pb clonado en el vector bifuncional pMK4. Peso molecular: 7.8 kb.	Este trabajo
Fagos	Características	Ref.
Fago 80α	Fago transductor del Grupo lítico III.	[24]

IV.2- Buffers y soluciones

Todas las drogas empleadas fueron del grado analítico de las marcas Difco, Gibco, Merck, Mallinckrodt o Sigma.

- ❖ GYT: glicerol 10%, extracto de levadura 0.125%, triptona 0.25%.
- ❖ SOB: bacto triptona 20 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0.5 g, KCl 250 mM 10 ml, agua destilada c.s.p. 100 ml.
- ❖ SOC: Adicionar al SOB glucosa 20 mM.
- ❖ Solución alcalina : NaOH 0.2 N, SDS 1%.
- ❖ Solución de lisis para bacterias Gram (-): glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM (pH 8), EDTA 10 mM (pH 8).
- ❖ Solución de lisis para bacterias Gram (+): SDS 4%, Tris base 100 mM, NaOH 4N.

- ❖ Solución de neutralización: 60 ml KAc 5 M, 11.5 ml ácido acético glacial, agua destilada c.s.p. 100 ml.
- ❖ STE: NaCl 0.1 M, Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8).
- ❖ TAE: Tris base 242 g, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0,5 M (pH 8), agua destilada c.s.p. 1000 ml.
- ❖ TB (buffer de transformación): PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM. Esterilizar por filtración. Llevar a pH 6.7 con KOH 5 M.
- ❖ TE: Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8).
- ❖ SMMP: partes iguales de 2X SMM y 2X TY (esterilizados separadamente).
- ❖ 2X SMM: ácido maleico 0.93 g en 20 ml de agua destilada (pH 6.5), sacarosa 68.6 g, MgCl₂.2 H₂O 0.16 g, agua destilada c.s.p. 200 ml.
- ❖ 2X TY: extracto de levadura 0.125%, triptona 0.25%.
- ❖ PBP (buffer fosfato de potasio) 0.1 M (pH 7.4): 38 ml Solución A, 162 ml Solución B, agua destilada c.s.p. 1000 ml. Solución A: KH₂PO₄ 0.5 M. Solución B: K₂HPO₄ 0.5 M.
- ❖ PBPA (buffer fosfato de potasio) 0.02 M: NaCl 0.15 M, albúmina sérica bovina 1 mg/ml.
- ❖ PBS (buffer fosfato de sodio): NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml.

IV.3- Medios de cultivo

❖ Caldo Luria-Bertani (LB):

Triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml, pH 7.4. Cuando fue necesario preparar medio sólido, se agregó agar en una concentración de 15 g/l.

❖ Caldo Cerebro-Corazón (BHI) y Tripticasa-soya (TSB) (Difco y Britania)

Se prepararon según las recomendaciones del fabricante. Se agregó agar a razón de 15 g/l a los caldos BHI y TSB cuando fue necesario obtener medios sólidos, (BHIA y TSA, respectivamente). Los antibióticos se adicionaron a los medios de cultivo en las siguientes concentraciones: ampicilina (Ap) 50 µg/ml, cloramfenicol (Cm) 10 µg/ml y eritromicina (Em) 10 µg/ml .

Medios suplementados

❖ LB/Ap suplementado con X-Gal e IPTG:

Se realizaron placas con LB/Ap (50 µg/ml). Cada placa fue suplementada con 40 µl de X-Gal (20 mg/ml en dimetilformamida), 15 µl de IPTG (200 mg/ml) y 45 µl de agua destilada. Para ello, se colocó la mezcla en la superficie del medio y se distribuyó homogéneamente con espátula de Drigalski; finalmente se dejó secar a 37°C por un período de 2 hs.

❖ Medio de agar sangre:

Se preparó mediante la adición de sangre defibrinada de carnero o conejo a TSA mantenido a 45°C hasta una concentración final del 5%.

❖ Medio de TB-DNA-agar (TDA):

Composición para 1000 ml: ADN de timo de ternero (Sigma) 0.3 g, agar 10 g, 1ml CaCl₂ 0.01 M, NaCl 10 g, 3 ml azul de O-Toluidina (TB) 0.1 M, Tris-HCl 0.05 M (pH 9), c.s.p. 1000 ml [40].

❖ TSA-calcio: agar tripticasa-soya con el agregado de CaCl₂ 5 mM.

❖ TSA-citrato de sodio: agar tripticasa-soya con el agregado de citrato de sodio 5mM.

Métodos

IV.4- Conservación de las cepas

Un volumen de 0,8 ml de un cultivo en fase exponencial se homogeneizó con 0,2 ml de glicerol estéril y se conservó a -20°C. Para su utilización se suspendió un volumen de 10-40 µl del congelado en 1 ml de caldo BHI.

IV.5- Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* y *S. aureus* fueron cultivadas en caldo LB y BHI, respectivamente, a 37°C con agitación (200 rpm) para condiciones de aerobiosis o en cultivos estancos para ensayos de semianaerobiosis.

IV.6- Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se realizó a partir de la secuencia de la región *sae* utilizando el software Primer3 Output (www.genome.wi.mit.edu).

Para ello, a partir de la secuencia blanco de ADN se fijaron varios parámetros tratando de encontrar un balance entre dos objetivos, especificidad y eficiencia.

El programa permitió delimitar dentro de la secuencia blanco una subregión para seleccionar los cebadores.

Las variables fijadas fueron: el tamaño del producto, en general éste tiene un impacto en la eficiencia de la amplificación; el tamaño de los cebadores, que generalmente se relaciona con la especificidad y la temperatura de hibridación; los oligonucleótidos de 18 a 24 pb tienden a ser muy específicos de la secuencia y la temperatura de hibridación del PCR se fija próxima a la T_m de los cebadores. También se eligió el contenido de G-C y la T_m óptima de los oligonucleótidos. Para un 50% de G-C el valor de T_m generalmente oscila entre 56-62°C, lo que provee un margen suficiente para una hibridación eficiente. El contenido de G-C debe ser parecido entre los cebadores derecho e izquierdo; para ello se fijó en el programa los valores máximo y mínimo de T_m aceptados y la mayor diferencia de T_m aceptable entre los oligonucleótidos, así como también el máximo y mínimo contenido de G-C. La posición terminal 3' de los oligonucleótidos es esencial para controlar los errores de hibridación, por lo que se fijó el número de G y C presentes en este extremo. También se informó la complementariedad máxima permitida entre los cebadores para evitar el fenómeno de formación de dímeros cebador-cebador.

La concentración de sal (KCl generalmente) y la concentración de oligonucleótidos en la mezcla de reacción son valores usados por el programa para calcular la T_m de los cebadores. Finalmente, otros valores que fueron predeterminados son el máximo aceptable de bases desconocidas (N) en cualquier cebador, el máximo de Poli-X o repeticiones de un mismo nucleótido y la estabilidad máxima del extremo 3'.

Una vez especificadas todas estas variables, el programa seleccionó varias opciones de pares de cebadores posibles y los clasificó según el nivel de cumplimiento de los valores fijados. La primera opción fue aquella que cumplió más estrictamente con estos valores.

Para cada par de cebador encontrado, el programa especificó: tamaño, posición, secuencia, T_m , % G-C, secuencia 3', tamaño del producto, complementariedad entre cebador y complementariedad 3'.

Los cebadores fueron sintetizados por Biodynamics y enviados en forma liofilizada. Para su utilización fueron resuspendidos en un volumen adecuado de agua deionizada tridestilada estéril.

IV.7- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación del fragmento de la región promotora de *sae* y del fragmento conteniendo *sae* se llevó a cabo por PCR utilizando como ADN molde al plásmido pRC91. La estimación de la masa de amplificación obtenida se realizó visualmente en geles de agarosa por comparación con patrones de concentración conocida.

IV.8- Mezcla de Reacción

Para las reacciones de PCR se utilizó ADN molde en una concentración de 10 ng; en algunos casos se realizaron diluciones de los productos de la reacción de PCR y se procedió a reamplificar los mismos para aumentar la masa de ADN amplificado. Se preparó una única mezcla de reacción para todos los tubos a amplificar. Dicha mezcla contenía todos los componentes de reacción excepto el ADN molde y la enzima polimerasa de ADN. La concentración final de cada cebador y de cada dNTP fue de 1 μ M y de 0.2 mM, respectivamente. Se utilizó Mg^{+2} en una concentración final de 1.25 mM. La mezcla fue llevada a volumen con agua deionizada tridestilada estéril y fraccionada en los tubos de reacción. Se adicionó a cada tubo el ADN molde y 2 Unidades (U) de la enzima *Taq* ADN polimerasa.

IV.9- Programas de PCR

Los programas de PCR utilizados siguieron las siguientes etapas:

- 1) - 1 ciclo de desnaturalización: 95°C, 5 min.
- 2) - 29 ciclos de:
 - desnaturalización: 95°C, 1 min.
 - hibridación: 62°C, 30 seg.
 - polimerización: 72°C, 1 min.
- 3) - 1 ciclo de polimerización: 72°C, 10 min.

IV.10- Clonado de productos de PCR

Para el clonado de los productos de PCR se utilizó el plásmido pGEM[®]-T-Easy de Promega, (Figura 6). Este vector posee timidinas terminales (T) 3' en ambos extremos. Estas T 3' simples en cada extremo incrementan la eficiencia de ligación de un producto de PCR en un plásmido, ya que previenen la recircularización del vector y proveen un extremo compatible con los productos de PCR, que poseen una desoxiadenosina en el extremo 3' independiente de la secuencia del ADN molde. El plásmido contiene además múltiples sitios de restricción que permiten la liberación del inserto por digestión enzimática. La región de clonado múltiple se encuentra dentro de una región que codifica para el α -péptido de la enzima β -galactosidasa, precedida por los promotores de la ARN polimerasa SP6. La inactivación insercional del α -péptido permite la identificación directa de los clones recombinantes en placas indicadoras. Los clones que contienen productos de PCR generan, en la mayoría de los casos, colonias blancas; pero algunas veces pueden producir colonias azules si el fragmento clonado no altera el marco de lectura del gen *lacZ*.

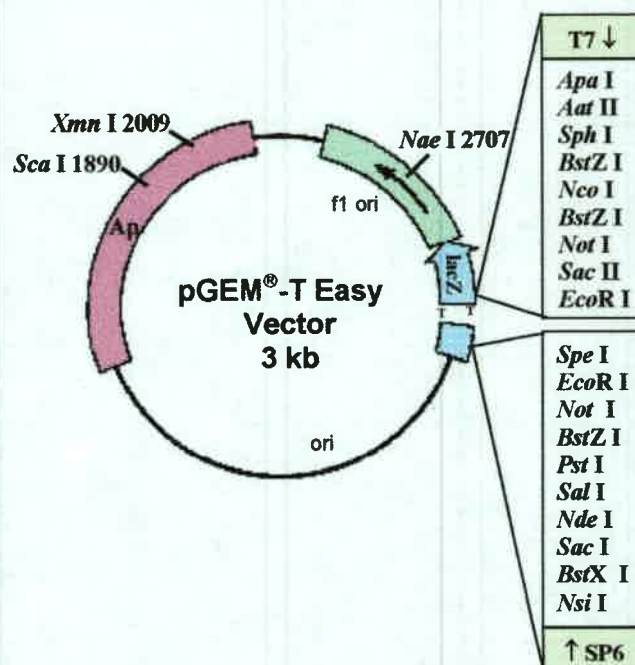


Figura 6. Mapa circular del vector pGEM[®]-T-Easy.

IV.10.1- Reacción de Ligación

Siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Promega), la ligación se realizó utilizando una relación inserto: vector (radio molar) de 1:1.

Para calcular la cantidad apropiada de productos de PCR (inserto) usados en la ligación con 50 ng de vector se aplicó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{tamaño del inserto}}{\text{tamaño del vector}} \times \frac{\text{inserto (1:1)}}{\text{vector}} = \text{ng inserto}$$

Además se realizaron dos controles experimentales. El control positivo se llevó a cabo ligando el vector a un fragmento de ADN (control insert DNA) provisto por el kit. Este control permite determinar si la ligación fue eficiente, en cuyo caso se deberán obtener aproximadamente 100 colonias, un 10 a 30% de ellas azules, cuando se transforma en células con una eficiencia de 1×10^8 UFC/ μg de ADN. Si no se obtienen colonias, la transformación ha fallado y si se obtienen solo colonias azules y ninguna blanca, la ligación ha sido ineficiente.

El segundo control se realizó ligando 50 ng de vector solo. Esta ligación permite determinar el número de colonias azules resultantes de la transformación con vector pGEM[®]-T-Easy sin digerir o que carece de la timidina 3'. Se debe comparar el número de colonias azules generadas por la mezcla de ligación del producto de PCR con las obtenidas en este control. Si el número aumenta significativamente es probable que haya recombinantes entre las colonias azules.

La reacción de ligación se realizó durante toda la noche a 4°C. Cuando se transformaron células por electroporación fue necesario precipitar la mezcla de ligación. El ADN fue precipitado con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y un volumen de isopropanol frío. Se incubó durante 20 min a -20°C y luego se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm. El pellet fue lavado 2 veces con etanol 70% frío. Se dejó evaporar el alcohol a 37°C y se resuspendió en 10 μl de agua destilada estéril.

IV.11- Subclonado de productos de PCR

IV.11.1- Subclonado en el vector pMK4

Para el subclonado del producto de PCR de 2276 pb se utilizó el plásmido bifuncional pMK4 (Figura 7), el cual es capaz de replicar tanto en *E. coli* como en *S. aureus*.

El vector pMK4 contiene varios sitios de restricción dentro del gen *lacZ*. La inserción de ADN foráneo en alguno de estos sitios puede ser detectado fácilmente en forma visual en cepas adecuadas de *E. coli*, permitiendo la identificación de los clones híbridos. Este vector se cortó con la enzima *EcoR* I y se defosforiló con la enzima fosfatasa alcalina intestinal (BioLabs), para ser utilizado posteriormente en el subclonado del fragmento de la región *saeRS* clonado en el vector pGEM[®]-T-Easy. El objetivo de la defosforilación fue impedir la recirculación del vector disminuyendo la frecuencia de aparición de clones portadores del vector sin inserto.

Para la defosforilación se utilizó una concentración de enzima de 1 U/μmol de extremos de ADN. Luego de una incubación de 60 min a 37°C en presencia de la enzima, se realizó la purificación del ADN para eliminar la misma. En un primer paso se agregó EDTA 10 mM y se incubó 1 h a 65°C. A continuación, se realizó una extracción con un volumen de fenol-cloroformo y se precipitó el ADN con el agregado de dos volúmenes de etanol y 0.1 volumen de NaAc 3 M. Luego de una incubación de 20 min a -80°C, la muestra fue resuspendida en 30 a 50 μl de TE. La masa de plásmido purificada se estimó visualmente por electroforesis en geles de agarosa.

Para medir la efectividad de la defosforilación se realizaron ligaciones y transformaciones con el vector cortado con *EcoR* I defosforilado y sin defosforilar y se determinó las UFC/μg de vector para cada caso.

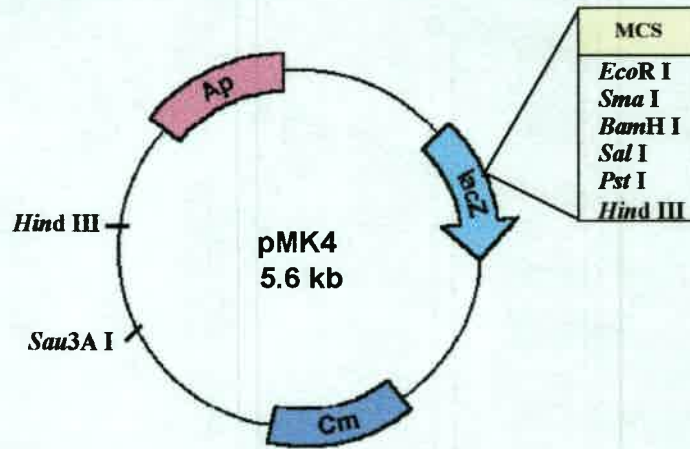


Figura 7. Mapa circular del vector de clonado bifuncional pMK4. MCS: sitio de clonado múltiple (*multiple cloning site*).

IV.11.2- Subclonado en el vector pLC4

Para analizar la regulación del locus *sae* a partir del fragmento de promotor clonado de 406 pb, se subclonó en el vector bifuncional pLC4 (Figura 8), portador del gen reportero *xyIE*, el cual carece de su propio promotor. Este plásmido contiene tres sitios de restricción UP del gen *xyIE*. Para la digestión de este vector se utilizó la enzima *EcoR* I, se defosforiló con la enzima fosfatasa alcalina intestinal en idénticas condiciones que para el vector pMK4 y se ligó al fragmento de la región promotora de *saeRS* clonado en el vector pGEM[®]-T-Easy. Así, se generó una fusión transcripcional donde el gen reportero *xyIE* quedó bajo el control del fragmento de 406 pb UP *saeRS*.

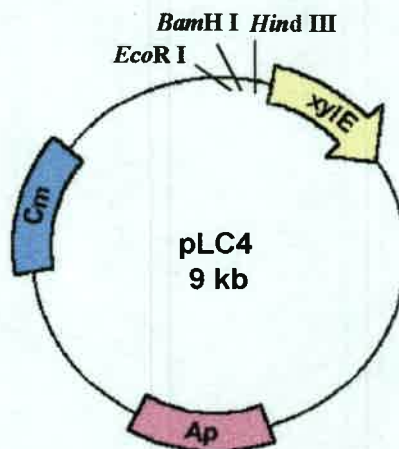


Figura 8. Mapa circular del vector de expresión bifuncional pLC4.

IV.12- Transferencia de los productos de ligación a *E. coli* DH5 α

IV.12.1- Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α con CaCl₂

Se prepararon células competentes por el método del CaCl₂ descrito por Inoue y col. [33]. Para ello se inoculó 50 ml de SOB con 1 ml de células de un cultivo de 20 hs a 37°C de la cepa *E. coli* DH5 α y se incubó a 18°C hasta una DO_{600nm} de 0.6. Luego se centrifugó el cultivo a 3600 rpm a 4°C durante 10 min y el pellet se resuspendió en el buffer de transformación (TB). Se dejó 10 min en hielo y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. Finalmente el pellet fue resuspendido en TB y se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final de 7%. Las células tratadas se alicuotaron y se guardaron en tubos Eppendorf a -80°C.

Para medir la eficiencia de transformación de las células competentes obtenidas por el método del CaCl₂ se transformaron 200 μ l de las mismas con 15 ng de ADN del plásmido pBlueScript II SK (Stratagene). Para ello, la mezcla bacterias/ADN se incubó durante 30 min en hielo, luego se realizó un tratamiento térmico durante 80 seg a 42°C seguido de una incubación en hielo por 2 min. Finalmente se adicionó 0.8 ml de SOC mantenido a 37°C y la mezcla se incubó con agitación durante 1 h a 37°C. Las bacterias portadoras del plásmido pBlueScript II KS fueron identificadas en placas de LB/Ap. El recuento de colonias transformantes se realizó en aquellas placas que mostraron entre 20 y 200 colonias. La eficiencia de transformación se refirió como el número de colonias transformantes obtenidas por microgramos de ADN utilizados en la reacción (UFC/ μ g de ADN).

IV.12.2- Transformación de células competentes con CaCl₂

Las mezclas de ligación, pGEM[®]-T-Easy con los fragmentos amplificados por PCR, fueron transferidas a células competentes de *E. coli* DH5 α , por transformación siguiendo los pasos detallados en IV.12.1. Los clones transformantes con o sin inserto fueron identificados por α -complementación en placas de LB suplementadas con Ap, X-Gal e IPTG [61].

IV.13- Extracción de plásmidos de *E. coli* y elución de fragmentos de restricción

Para la purificación de plásmidos a partir de bacterias Gram (-) se utilizó el método

alcalino de Birnboim y Doly modificado [61].

El pellet de 1.5 ml de cultivo de toda la noche en LB/Ap a 37°C sin agitación, fue lavado con 200 µl de STE, luego se resuspendió en 100 µl de solución de lisis con el agregado de lisozima y se incubó 15 min en hielo. Luego se agregó 200 µl de solución alcalina para desnaturalizar el ADN cromosomal y se mantuvo 3 min a temperatura ambiente. Para restaurar el pH se agregó 150 µl de solución de neutralización, se incubó 10 min en hielo y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C para precipitar ADN cromosomal, proteínas y restos celulares. El sobrenadante enriquecido en ADN plasmídico fue sometido a una extracción con 1 volumen de cloroformo. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se llevó a -80°C durante 20 min o a -20°C por 2 hs para precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó la muestra, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de TE.

El análisis de los plásmidos extraídos se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio.

Para la elución de los fragmentos se utilizó el kit Gelout-PCR (Biodynamics) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. Los fragmentos eluidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

IV.14- Transferencia de plásmidos a *S. aureus*

IV.14.1- Preparación de células electrocompetentes

La preparación de las células se realizó por el método de Tung y Chow [70]. A partir de un cultivo crecido toda la noche a 37°C en LB de la cepa receptora *E. coli* DH5α se inoculó 1 ml en 100 ml de LB y se colocó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una D.O_{600nm} de 0.6. Luego se incubó el cultivo 30 min en hielo, se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min a 4°C y el pellet fue lavado 2 veces con glicerol 10% frío. Las células fueron resuspendidas en 2 ml de medio GYT frío, fraccionadas en alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf y conservadas a -80°C.

IV.14.2- Transformación de células electrocompetentes

La transferencia de plásmidos a *S. aureus* RN4220 se realizó por electroporación de las células tratadas, según Tung y Chow [70].

Las células electrocompetentes receptoras fueron descongeladas en hielo. A un volumen de 40 μ l de células se le agregó 1 μ g de ADN plasmídico y se incubó 1 min en hielo. Se transfirió la mezcla a una cubeta de 1 mm mantenida en hielo y se descargó el pulso fijado en 25 μ F, 2.5 KV, 100 Ω durante 2.5 msec utilizando el BIO-RAD Gene Pulser; inmediatamente después se colocó la cubeta nuevamente en hielo, se agregó 900 μ l de SMMP frío y se homogeneizó suavemente por inversión. Luego se transfirió la mezcla a un tubo, se agregó 4 μ l de Cm (0.05 mg/ml) para inducir la resistencia al antibiótico y se incubó a 37°C en agitación durante 1h para permitir la recuperación de las células. Se plaqueó en BHI/Cm. Las placas suplementadas con el antibiótico inhibieron el crecimiento de las células que no habían incorporado el plásmido.

IV.15- Extracción de plásmidos de *S. aureus*

La extracción de ADN de plásmidos de *S. aureus* según el método propuesto por Takahashi y Nagano [68].

El pellet de 3 ml de cultivo de toda la noche inoculado en caldo BHI/Cm, fue resuspendido en 200 μ l de solución de lisostafina y se incubó 30 min a 37°C. Luego se agregó solución de lisis, se incubó 5 min a temperatura ambiente y para neutralizar el pH se usó solución de neutralización. Se centrifugó 10 min a 10000 rpm a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante y se realizaron dos extracciones con cloroformo y se precipitó con etanol. Se realizó una extracción con 1 volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 18°C. Para precipitar el ADN se agregaron 2 volúmenes de etanol frío, se incubó la muestra a -80°C durante 20 min o a -20°C durante 2 hs y luego se centrifugó a 13500 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet seco fue resuspendido en 20 μ l de TE.

Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE, teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml).

IV.16- Experimentos de transducción

La transferencia de plásmidos de la cepa *S. aureus* RN4220 a distintas cepas de *S. aureus* se realizó por transducción con el fago 80 α . Se obtuvieron lisados transductores por propagación del fago en las cepas correspondientes. Se realizó la titulación del lisado en la cepa *S. aureus* ISP8 por el método del RTD (*Routine Dilution Test*).

Se mezclaron volúmenes iguales del lisado transductor con un cultivo de alta densidad celular de la cepa receptora de *S. aureus*. Luego de 15 min de adsorción a 37°C en presencia de CaCl₂ 5 mM, se sembró la mezcla en placas de BHI/Cm, que contenían citrato de sodio a una concentración final de 5 mM. Se incubó a 37°C durante 24 hs. Los clones transductantes se reaislaron en BHI/Cm.

IV.17- Detección de actividad de exoproteínas: α -hemolisina, β -hemolisina, coagulasa y DNasa

IV.17.1- Hemolisinas

La determinación cualitativa de α - y β - hemolisinas se llevó a cabo usando dos tipos de agar sangre preparados con TSA como medio base y suplementados con sangre de conejo o carnero al 7%, respectivamente. Se sembraron estrias de las cepas a analizar y se incubó a 37°C durante 24 hs. Las α - y β -hemolisinas fueron identificadas de la siguiente manera:

- α -hemolisina: por hemólisis total sobre agar sangre de conejo.
- β -hemolisina: por hemólisis parcial sobre agar sangre de carnero y por su característica de completar la hemólisis luego de incubar las placas a 4°C durante 18 hs.

La cuantificación de la actividad α -hemolítica se llevó a cabo de acuerdo al ensayo del 50% de hemólisis descrito por Bernheimer [5], con algunas modificaciones. Un volumen conveniente de sangre de conejo se lavó dos veces con PBP 20 mM. Los eritrocitos lavados se resuspendieron al 10% en PBPA y a partir de esta suspensión se realizó la solución de trabajo al 1% en PBP. Diluciones al 1/2 en buffer PBP de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos se mezclaron con igual volumen de glóbulos rojos de conejo al 1% en tubos de hemólisis. Éstos se incubaron durante 60 min a 37°C y posteriormente se centrifugaron a 1500-2000 rpm, durante 2 min. Se determinó la cantidad de hemoglobina liberada por lectura de la DO de los sobrenadante a 540 nm. El 100% de hemólisis se determinó por lisis de los glóbulos rojos con SDS 0.1%. El 50% de hemólisis se obtuvo directamente o por interpolación en gráficos de % hemólisis vs. dilución. La inversa de la dilución obtenida multiplicada por 2 se consideró como el número de unidades hemolíticas por ml (UH/ml) de la solución problema.

La cuantificación de la actividad β -hemolítica se determinó de modo similar, excepto que se emplearon glóbulos rojos de carnero y buffer de reacción tanto en la

suspensión de trabajo al 1% de glóbulos rojos como en la preparación de las diluciones. La incubación se realizó durante un período de 30 min a 37°C seguido por otro de 30 min a 4°C.

IV.17.2- Coagulasa

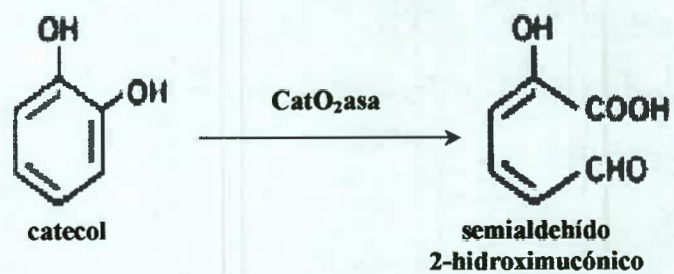
A partir de un cultivo de 15 hs se realizó una dilución 1/80 en BHI/Cm y se incubó durante 3 hs a 37°C en agitación hasta fase exponencial. Diluciones al 1/2 del sobrenadante del cultivo en PBS se incubaron a 37°C con igual volumen de una dilución 1/2 de plasma en PBS. La lectura se realizó a las 4 hs, y el título se definió como la inversa de la última dilución que mostró signos de coagulación visible.

IV.17.3- DNasa

La producción de DNasa se cuantificó según el método descrito por Lachica y col. [40]. Diecisiete ml del medio TDA fundido se volcaron en una placa de Petri. Orificios de 5 mm de diámetro practicados en el TDA se llenaron con diluciones seriadas al 1/2 de sobrenadante de cultivos (20 μ l). Luego de la incubación por 48 hs a 37°C, se observó la hidrólisis del ADN por halos de color rosa alrededor de los orificios. El título se determinó como la inversa de la última dilución que mostró actividad.

IV.18- Ensayo de actividad catecol 2,3-dioxigenasa

Para ensayos enzimáticos de la expresión de *xyIE*, se diluyeron cultivos de 18 hs en caldo BHI/Cm a una $DO_{660\text{ nm}}$ inicial de 0.1-0.2 y se incubaron a 37°C con o sin agitación según la condición de cultivo. Se tomaron muestras en la fase post-exponencial de crecimiento (6 hs de cultivo) y se centrifugaron. Los pellet celulares obtenidos se lavaron, se resuspendieron en buffer fosfato de potasio (pH 7,5) suplementado con 10% de acetona y 25 μ g/ml de lisostafina y se incubaron a 37°C durante 30 min. Las células fueron mantenidas en hielo durante 5 min luego del agregado de Tritón X-100 al 10%. Los extractos fueron centrifugados y la actividad catecol 2,3-dioxigenasa se determinó en los sobrenadantes espectrofotométricamente a 375 nm en buffer fosfato de potasio (pH 8) con 0,2 mM de catecol [60]. Una miliunidad corresponde a la formación a 30°C de 1 nmol de semialdehído 2-hidroximucónico por min. La actividad específica se define como miliunidades por gramo de proteína celular.



IV.19- Análisis estadístico

Los resultados experimentales se analizaron sobre la base de conceptos estadísticos empleando el *software* Statgraphics v. 5.1.

Resultados y Discusión

V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1- Diseño de cebadores

Los cebadores S2 y S4 se diseñaron conforme a la secuencia nucleotídica de la región *sae* informada por Giraudo y col. [25] (*GenBank accession number* 129010), que involucra los genes *saeRS* y 227 nucleótidos (nt) UP. El cebador S7 se diseñó tomando la secuencia UP de -227 nt de la base de datos de Oklahoma University de la cepa *Staphylococcus aureus* NCTC8325 (www.genome.ou.edu).

Características de los cebadores:

- S2: cebador derecho, tamaño 23 pb, contenido de GC 47.8%, Tm 66.6°C.
- S4: cebador derecho, tamaño 20 pb, contenido de GC 45%, Tm 63.1°C.
- S7: cebador, tamaño 20 pb, contenido de GC 45%, Tm 63.1°C.

Los cebadores S2 y S7 se ubican, respectivamente, a 8 pb y 414 pb UP de la secuencia ATG de inicio de la traducción del gen *saeR*. El cebador S4 a 100 pb *downstream* de la secuencia TAA de finalización de la traducción del gen *saeS*.

V.2- Amplificación de fragmentos de la región *sae*

A partir del fragmento *EcoR I/Cla I* de 3.4 kb del plásmido pRC91 secuenciado [25] se amplificaron por PCR dos fragmentos. Uno de ellos corresponde a una porción de la región promotora de 406 pb UP *saeR*, el cual se amplificó utilizando los cebadores S7 y S2. En base a la Tm de los cebadores la temperatura de hibridación se fijó en 62°C. El otro fragmento comprende la misma porción de la región promotora (406 pb UP *saeR*) más la región codificante de *saeRS* (1.8 kb). Para la amplificación de este fragmento se utilizaron los cebadores S7 y S4. Como las condiciones de reacción utilizadas no resultaron adecuadas para la amplificación de este fragmento, se disminuyó la temperatura de hibridación a 55°C y se fijó el tiempo en 1 min para la etapa de hibridación. Además, se duplicaron las concentraciones de dNTPs y Mg^{+2} y se prolongó el tiempo de la etapa de polimerización a 1.5 min.

Con el empleo de los pares de cebadores S2-S7 y S4-S7 se amplificaron fragmentos de 406 pb y 2276 pb, respectivamente (Figura 6). El análisis en geles de agarosa reveló la presencia de los fragmentos amplificados (Figura 7).

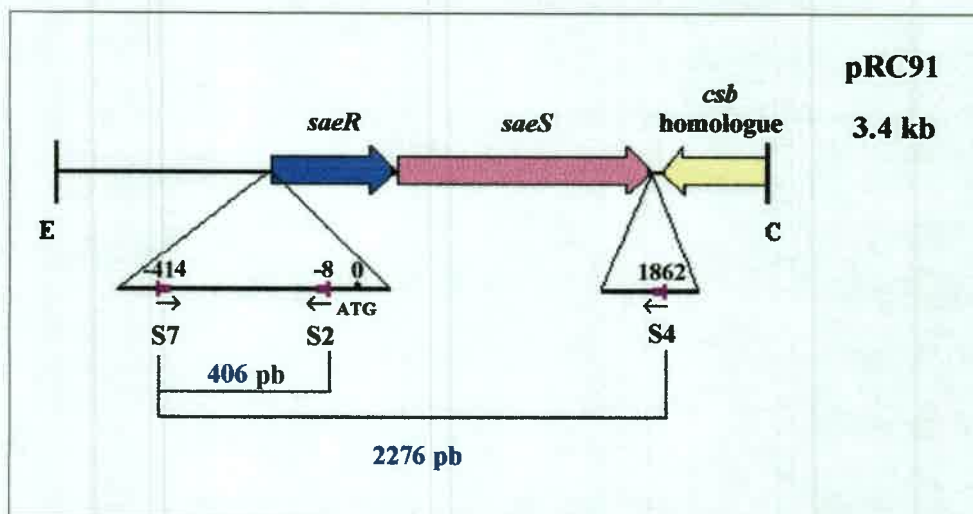


Figura 6. Diagrama esquemático del plásmido pRC91. Se indica la localización y orientación del operón *saeRS*; de los cebadores S2, S4 y S7 y parte de un marco de lectura abierto incompleto con homología a *csbB* de *Bacillus subtilis*. Sitios de Restricción: E, *EcoR* I; C, *Cla* I.

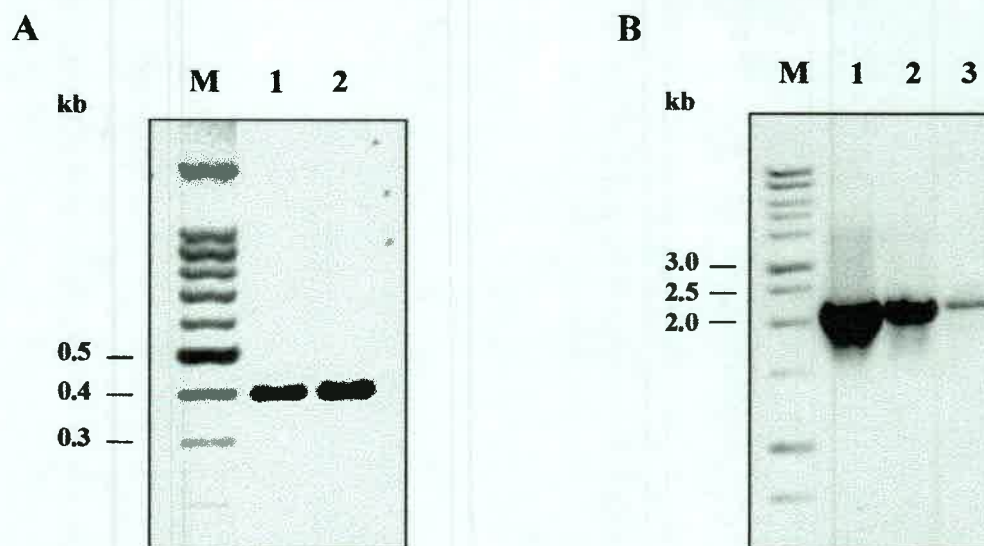


Figura 7. Electroforesis en gels de agarosa de los productos amplificados por PCR de la región *sae*. (A): M: ADN patrón (100 bp DNA Ladder, Promega), calles 1-2: fragmentos de 406 pb amplificados con los cebadores S7 y S2 utilizando distintas concentraciones de ADN molde. (B): M: ADN patrón (1 kb DNA Ladder, Promega), calles 1-3: fragmentos de 2276 pb amplificados con los cebadores S7 y S4 utilizando distintas concentraciones de ADN molde.

La obtención de los productos de amplificación con alta eficiencia y gran especificidad evidenció la efectividad del diseño de cebadores y de las condiciones fijadas para la reacción.

V.3-Eficiencia de transformación de las células de *E. coli* DH5 α

Las células obtenidas por el método de CaCl₂ tuvieron una eficiencia de transformación de 1x10⁸ UFC/ μ g de ADN, la cual es considerada alta para transferir productos de ligación.

V.4- Clonado de los fragmentos amplificados por PCR en el vector pGEM[®]-T-Easy

Los fragmentos de la región *sae* de 406 pb y 2276 pb amplificados por PCR se ligaron al vector pGEM[®]-T-Easy, incluyendo los controles descritos en métodos. Con las mezclas de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α de alta eficiencia de transformación y se obtuvo un alto porcentaje de colonias blancas, las cuales llevaban el inserto de interés.

V.5- Extracción de plásmidos de *E. coli*

Se realizó la extracción de ADN plasmídico de clones recombinantes para cada construcción plasmídica. Las muestras de ADN se cortaron con *EcoR* I y se analizó el tamaño de los fragmentos de restricción liberados en geles de agarosa por comparación con patrones de ADN lineal de tamaño conocido. En la figura 8 se muestran los fragmentos de interés liberados a partir de los plásmidos recombinantes, correspondientes a la región promotora, de 406 pb y a la región promotora y codificante *saeRS*, de 2276 pb.

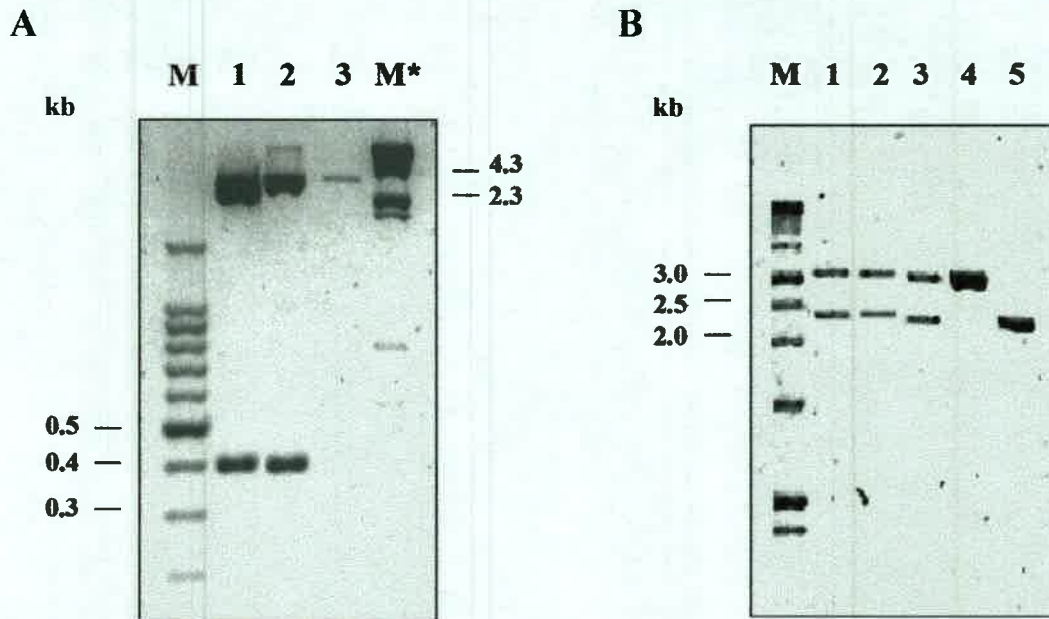


Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa de plásmidos recombinantes cortados con *EcoR* I. (A): M: ADN patrón (100 bp DNA Ladder, Promega), calles 1-2: clones transformantes Ap^r que llevan el plásmido portador del fragmento de 406 pb; 3, pGEM[®]-T-Easy cortado con *EcoR* I; M*:ADN patrón (Lambda DNA/*Hind* III Markers Promega). (B): M: ADN patrón (1 kb DNA Ladder, Promega), calles 1-3: clones transformantes Ap^r que llevan el plásmido portador del fragmento de 2276 pb; 4, pGEM[®]-T-Easy cortado con *EcoR* I; 5, fragmento *saeRS* de 2276 pb.

Se seleccionó un clon portador de cada construcción, designadas pRC32 (con inserto de 406 pb) y pRC34 (con inserto de 2276 pb), para el posterior subclonado en un vector bifuncional.

V.6- Subclonado de los fragmentos del sitio *sae* en un vector bifuncional

Con el objeto de poder introducir los fragmentos del sitio *sae* clonados en las cepas de *S. aureus* de interés, se realizó el subclonado de los mismos en un vector de replicación en bacterias Gram (+).

Primeramente, el vector bifuncional, pMK4, se cortó dentro del sitio múltiple de clonado con la enzima *EcoR* I y se defosforiló para reducir la recircularización del mismo y con esto, reducir el número de colonias transformantes portadoras de plásmido no recombinante.

Para la purificación del inserto se realizó una extracción preparativa de ADN plasmídico a partir de cultivos de 18 hs en LB/Ap de los clones elegidos. Los plásmidos pRC32 y pRC34 extraídos se cortaron con *EcoR* I para liberar los insertos de interés. Los

fragmentos de digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa y los insertos correspondientes a los fragmentos del sitio *sae* se eluyeron utilizando el kit Gelout de Promega, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los fragmentos eluidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

Los fragmentos de 406 pb y 2276 pb purificados se ligaron al vector pLC4 y pMK4, respectivamente, en una relación inserto:vector de 3:1. Con las mezclas de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α y los clones recombinantes se seleccionaron en placas de LB/Ap suplementadas con X-Gal e IPTG. Se confirmó la presencia de los plásmidos recombinantes en clones elegidos mediante extracción plasmídica, corte con *EcoR* I y electroforesis en gel de agarosa (Figura 9).

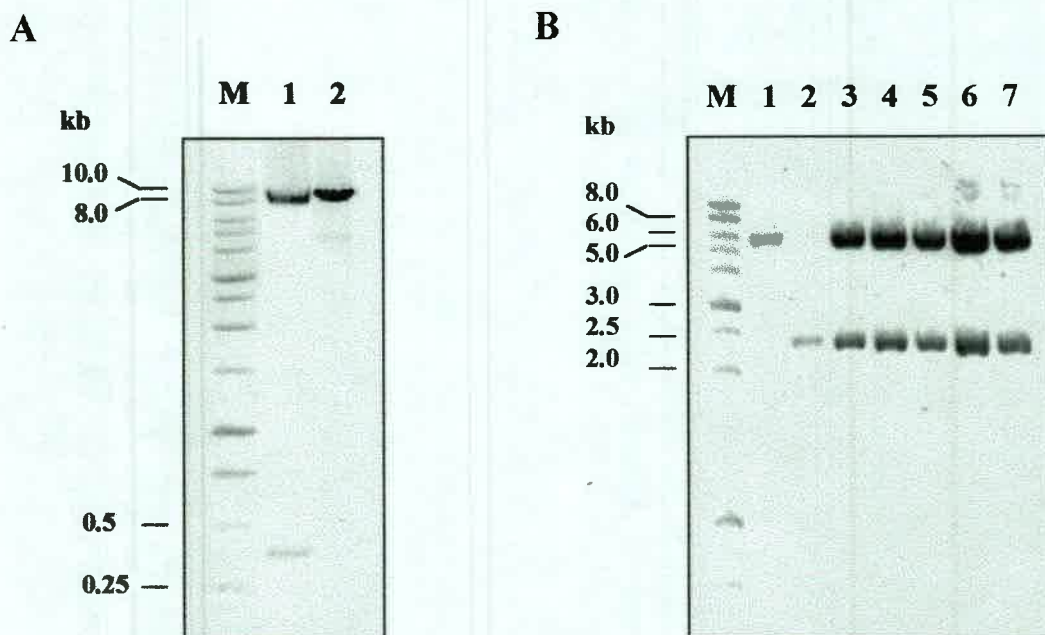


Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa de los plásmidos recombinantes cortados con *EcoR* I. A): M: ADN patrón (1 kb DNA Ladder, Promega), calles 1: clon transformante Ap^r que lleva el plásmido portador del fragmento de 406 pb; 2: pLC4 cortado con *EcoR* I. (B): M: ADN patrón (1 kb DNA Ladder, Promega), calles 1: pMK4 cortado con *EcoR* I; 2: fragmento *saeRS* de 2276 pb; 3-7: clones transformantes Ap^r que llevan el plásmido portador del fragmento de 2276 pb.

Se seleccionó un clon portador de cada plásmido, designados pFU7 (con inserto de 406 pb) y pRC35 (con inserto de 2276 pb). La figura 10 muestra un esquema de las construcciones obtenidas.

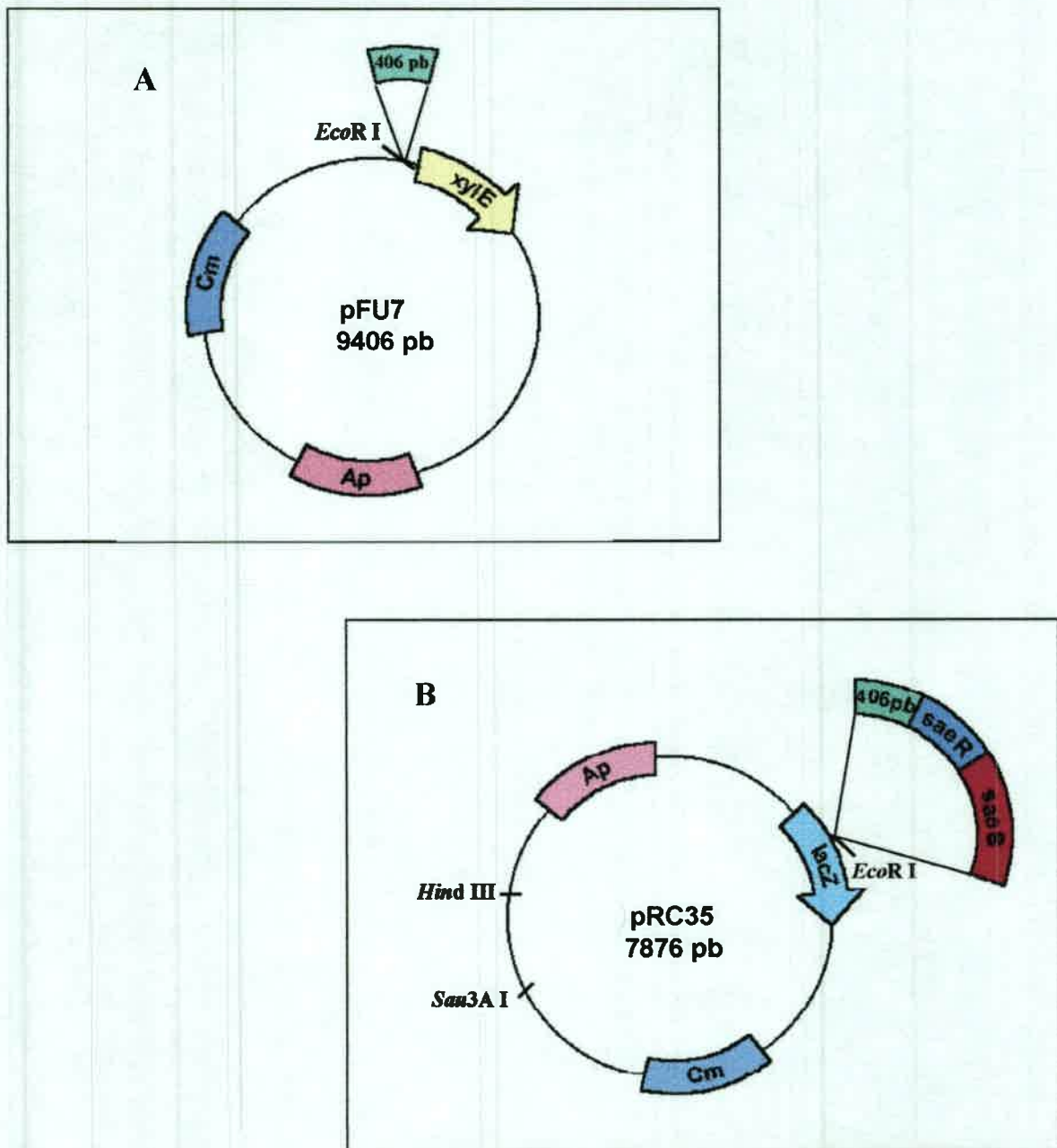


Figura 10. Mapa circular de los plásmidos pRC35 (A) y pFU7 (B) obtenidos por subclonado de los fragmentos de la región *sae* en los vectores pMK4 y pLC4, respectivamente.

V.7- Transferencia a *S. aureus* de los plásmidos pFU7 y pRC35

Los plásmidos pFU7 y pRC35 extraídos a partir de la cepa *E. coli* DH5 α se transfirieron por electroporación a la cepa *S. aureus* RN4220, la cual es capaz de aceptar ADN plasmídico previamente amplificado en bacterias Gram (-).

Los clones portadores de los plásmidos se seleccionaron en placas de BHI/Cm. Se confirmó la presencia de los plásmidos correspondientes por extracción plasmídica, corte con la enzima *EcoRI* y posterior corrida electroforética en gel de agarosa.

Los plásmidos pFU7 y pRC35 se transfirieron por transducción a partir de la cepa *S. aureus* RN4220 a diferentes cepas de interés, para realizar estudios de complementación y de expresión.

V.8- Análisis de complementación

Se llevaron a cabo estudios de complementación con la mutante *sae* RC106 y el plásmido pRC35 portador de los genes *saeRS* más un fragmento UP de 406 pb.

La mutante RC106 muestra una marcada disminución en la producción de varias exoproteínas, tales como α - y β -hemolisinas, coagulasa y DNasa, con respecto a su parental ISP479C [29] (Tabla 2). Para determinar si el fragmento clonado en el plásmido pRC35 restablece la producción de estas exoproteínas a los niveles parentales, se realizaron distintos ensayos de complementación. Este plásmido también se transfirió a la cepa parental ISP479C para un control de efecto de dosaje génico.

V.8.1 - Hemolisinas

El análisis cualitativo de la producción de hemolisinas en placas de agar sangre de carnero y conejo mostró, para las cepas RC106 e ISP479C portadoras del plásmido pRC35, halos de α - y β -hemólisis semejantes a los producidos por la cepa salvaje ISP479C (Figura 11).

Este análisis fue confirmado cuantitativamente realizando la titulación de ambas hemolisinas en los sobrenadantes de cultivo de las cepas mencionadas, por el ensayo del 50% de hemólisis. La hiperproducción observada para la α -hemolisina no fue debido a un efecto de dosaje génico con pRC35, dado los valores obtenidos en la cepa salvaje portadora de dicho plásmido (Tabla 2).

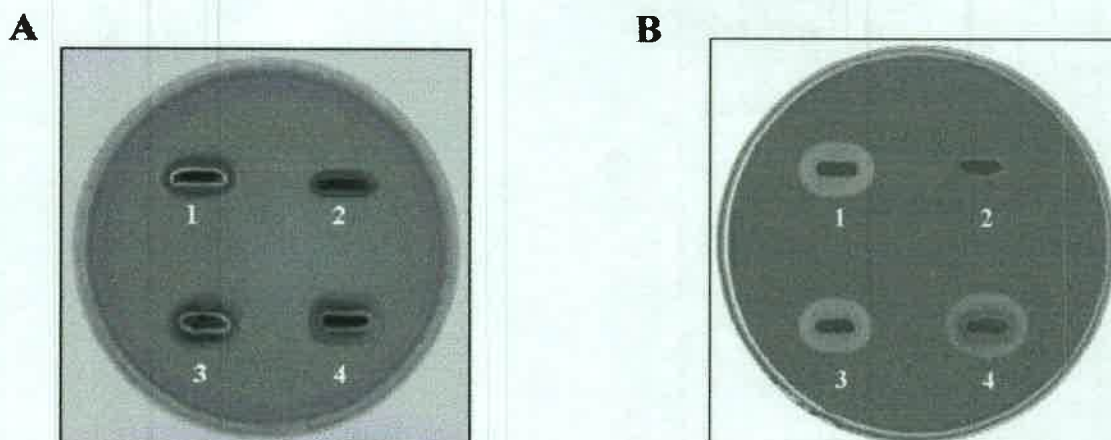


Figura 11. Determinación cualitativa de α - y β -hemolisinas. (A) Agar sangre de conejo. (B) Agar sangre de carnero. Cepas: 1, ISP479C; 2, RC106; 3, ISP479 (pRC35); 4, RC106 (pRC35).

V.8.2- Coagulasa

La mutante *sae* RC106 muestra niveles no detectables de actividad de coagulasa con respecto a su cepa parental ISP479C [29]. Cuando se transfirió el plásmido pRC35 a esta mutante, se observó un incremento en la producción de coagulasa en los sobrenadantes de cultivo hasta valores mayores a los de la cepa ISP479C; este fenómeno ya había sido observado en los ensayos de complementación de la mutante RC106 con el plásmido pRC91 portador de los genes *saeRS* más un fragmento de 1150 kb de la región UP [27] (Tabla 2).

V.8.3- DNasa

La actividad DNasa de la cepa RC106 (pRC35) cuantificada en el sobrenadante de cultivo, reveló un incremento en la producción de esta proteína hasta un valor similar al producido por la cepa ISP479C (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de exoproteínas de las cepas RC106 e ISP479C portadoras del plásmido pRC35.

PRODUCCIÓN (U/ml)	CEPAS			
	ISP479C	RC106	ISP479C(pRC35)	RC106(pRC35)
α -hemolisina	1400	60	1500	4400
β -hemolisina	43600	500	18700	35000
Coagulasa	16	<2	16	256
DNasa	100000	8 00	160000	160000

Experimentos de complementación efectuados previamente con los plásmidos pRC91 y pRC31 en la mutante RC106 habían indicado la presencia de al menos dos promotores del locus *sae*. Los resultados obtenidos con el plásmido pRC35 sugieren la existencia de un tercer promotor, ubicado en la región entre 406 y 181 pb UP de *saeRS*.

V.9- Análisis de la expresión del locus *sae*

Estudios previos de expresión del locus *sae* con las fusiones transcripcionales pFU5 y pFU9, mostraron una débil expresión con la primer fusión y una muy buena expresión con pFU9, tanto en la mutante *sae* RC106 como en su cepa parental salvaje ISP479C [27] (Figura 12).

Se realizaron estudios de expresión del locus *sae* con la nueva fusión transcripcional de pLC4, designada pFU7, portadora del gen reportero *xylE* sin su propio promotor, y el fragmento de 406 pb de la región UP de *saeRS*, durante las fases exponencial tardía y post-exponencial. Si bien se observó un alto nivel de expresión de *xylE* en la cepa salvaje ISP479C, la expresión se vió disminuída en la mutante *sae* RC106, sugiriendo que la expresión de *sae* a partir de esta región promotora es parcialmente autocatalítica. Como era de esperar, la expresión de *xylE* disminuyó marcadamente en la mutante *agr* RC185, dada la regulación positiva de *agr* sobre la expresión de *sae* [27]. El plásmido pFU7 mostró una actividad de catecol 2,3-dioxigenasa intermedia a la detectada con pFU5 y pFU9 (Figura 12), lo que confirmaría la existencia de varios promotores con diferente fuerza de transcripción.

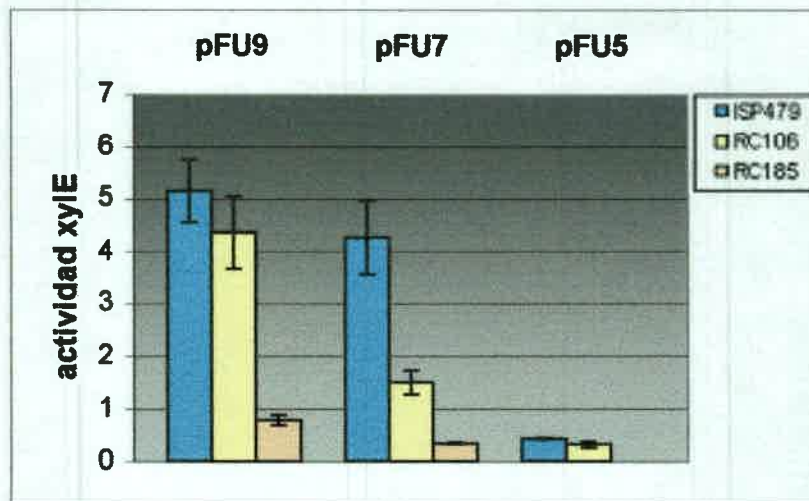


Figura 12. Actividad de *xylE* en cepas portadoras de las fusiones transcripcionales de *xylE* sin su promotor con fragmentos de distinto tamaño de la región UP de *saeRS* (pFU5, pFU7 y pFU9) durante la fase post-exponencial de crecimiento. Los valores, expresados en miliunidades por miligramo de proteína celular, son el promedio de dos determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Los *p*-valor, determinados por la prueba *t* de Student, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) entre cada una de las fusiones en las distintas cepas.

V.9.1- Determinación de la expresión del locus *sae* bajo diferentes entornos genéticos

Se investigó el efecto de distintos entornos genéticos sobre la expresión del locus *sae* en la fase post-exponencial de crecimiento. Para ello, las fusiones transcripcionales pFU5, pFU7 y pFU9 se transfirieron por electroporación a la cepa de *S. aureus* RN4220 y a partir de ésta, por transducción con el fago 80 α , a las cepas de referencia *S. aureus* Newman y RN6390. La diferente expresión entre pFU5 y pFU9 en las distintas cepas analizadas fue similar a la ya observada para ISP479 [27]. Con la fusión transcripcional pFU7, la expresión resultó ser algo mayor que con pFU5 y similar en tres de las cepas analizadas, excepto en la cepa RN4220, en la cual fue mucho más alta (Figura 13). Ésto sugiere, al menos para pFU7, un efecto cepa-dependiente en la expresión.

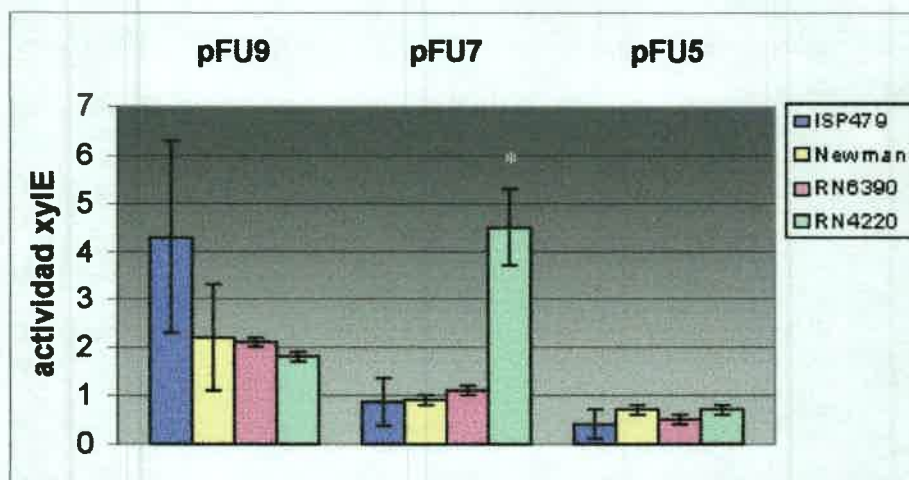


Figura 13. Actividad de *xylE* en cepas portadoras de las fusiones transcripcionales de *xylE* sin su promotor con fragmentos de distinto tamaño de la región UP de *saeRS* (pFU5, pFU7 y pFU9) durante la fase post-exponencial de crecimiento. Los valores, expresados en miliunidades por miligramo de proteína celular, son el promedio de dos determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. El asterisco indica significancia estadística ($p < 0.05$), determinada por la prueba *t* de Student, al comparar la cepa RN4220 con el resto de las cepas analizadas.

V.9.2- Determinación de la expresión del locus *sae* bajo diferentes condiciones ambientales

Varios investigadores observaron que distintos estímulos del medio ambiente afectan la síntesis de ciertas exoproteínas de *S. aureus* a través de σ^B y SarA independientemente de *agr* [14, 19, 18].

Compagnone-Post y col. [12] también observaron que cepas de *S. aureus* portadoras de copias únicas y aparentemente idénticas del sitio *agr* difieren en la producción o en los niveles de RNIII, como consecuencia de variados factores del huésped.

Con el objeto de llegar a conocer cuáles son las señales a las que responde la proteína sensora SaeS, se investigó la influencia de diferentes estímulos ambientales sobre la expresión del locus *sae*.

V.9.2.1- Disponibilidad de oxígeno

Se estudió la expresión de *xylE* en sobrenadantes de extractos de cultivos, en fase post-exponencial de crecimiento, en condiciones de agitación (aerobiosis) y en cultivos estancos (semianaerobiosis) de las cepas de *S. aureus* ISP479C, Newman, RN6390 y RN4220 portando las distintas fusiones transcripcionales. Si bien *S. aureus* es un

microorganismo anaerobio facultativo, la tasa de crecimiento de todas las cepas disminuyó bajo condiciones de semianaerobiosis en comparación con el crecimiento aeróbico. La figura 14 muestra un incremento de la expresión de *xylE* en condiciones de semianaerobiosis para todas las cepas ensayadas. El aumento de expresión en estas condiciones es mucho mayor en las cepas Newman y RN4220 con las tres fusiones, que el observado con las cepas ISP479C y RN6390, genéticamente emparentadas.

La actividad mostrada en semianaerobiosis por pFU9 y pFU7, al igual que en condiciones estandar, fue mucho mayor que la de pFU5.

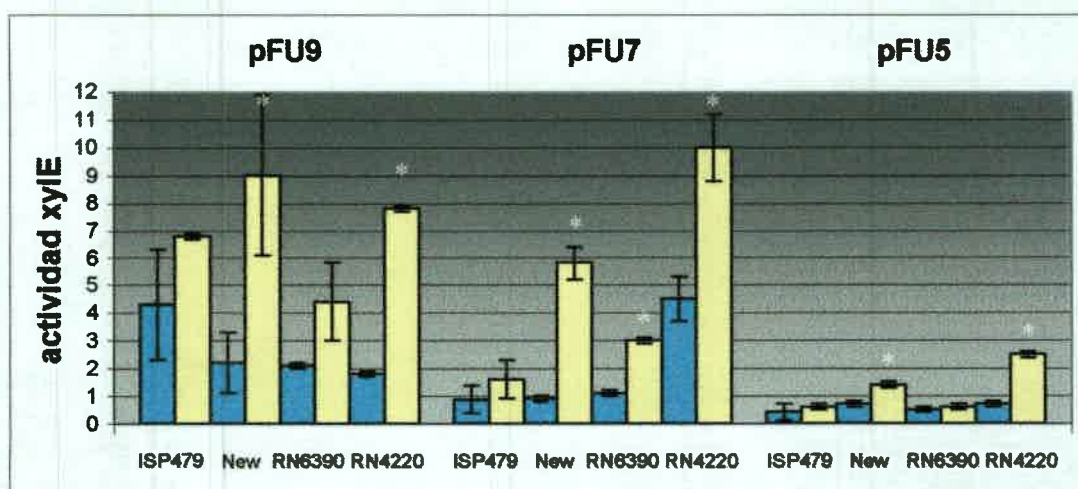


Figura 14. Actividad de *xylE* en cepas portadoras de las fusiones transcripcionales de *xylE* sin su promotor con fragmentos de distinto tamaño de la región UP de *saeRS* (pFU5, pFU7 y pFU9), durante la fase post-exponencial de crecimiento en condiciones de aerobiosis (■) y semianaerobiosis (■). Los valores, expresados en miliunidades por miligramo de proteína celular, son el promedio de dos determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Los asteriscos indican significancia estadística ($p < 0.05$), determinada por la prueba *t* de Student.

El incremento de la expresión de *xylE* observado con todas las fusiones en semianaerobiosis también ocurre en la mutante *sae* RC300 (Figura 15). Esta observación sugiere que dicho aumento es independiente del gen *sae*. Así, se puede especular que el efecto observado podría ejercerse, por ejemplo, a través de genes regulatorios que se sobreexpresen en condiciones de semianaerobiosis, por ejemplo *srrAB*.

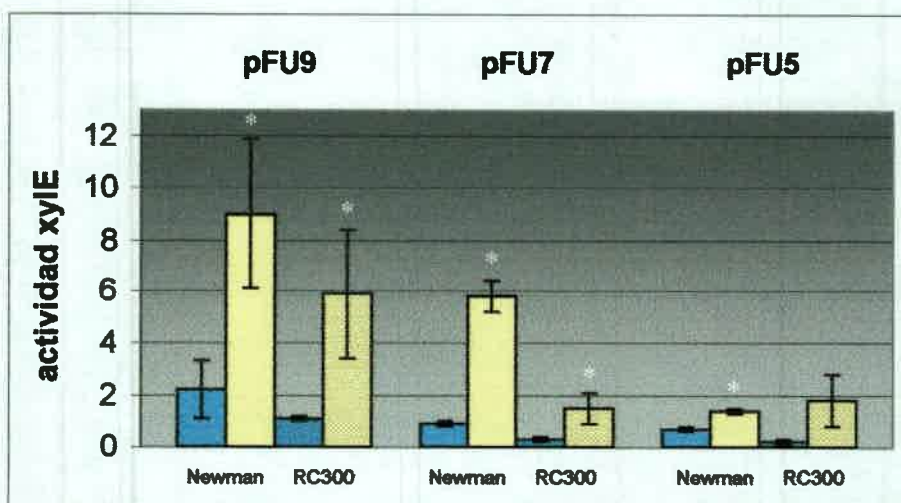


Figura 15. Actividad de *xylE* en las cepas Newman y su mutante *sae* (RC300) portadora de las fusiones transcripcionales de *xylE* sin su promotor con fragmentos de distinto tamaño de la región UP de *saeRS* (pFU5, pFU7 y pFU9), durante la fase post-exponencial de crecimiento en condiciones de aerobiosis (■) y semiaerobiosis (■). Los valores, expresados en miligramos por miligramo de proteína celular, son el promedio de dos determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Los asteriscos indican significancia estadística ($p < 0.05$), determinada por la prueba *t* de Student.

En la mutante *sae* las tres fusiones transcripcionales mostraron menor expresión que en la cepa parental, tanto en condiciones de aerobiosis como de semiaerobiosis. Estos resultados indicarían nuevamente que la proteína efectora del sitio *sae* además de regular la expresión de genes blanco también se autorregula positivamente.

V.9.2.2- Concentración salina

S. aureus es capaz de tolerar y crecer en ambientes con alta concentración de cloruro de sodio [8]. Ensayos con distintas molaridades de la sal revelaron que concentraciones superiores a 0.5 M afectaban la tasa de crecimiento, por ello, en el siguiente estudio no se superó dicha concentración de cloruro de sodio. Tanto esta condición ambiental como las que le siguen fueron evaluadas con la fusión pFU9 dado que dicha construcción abarca la totalidad de la región promotora.

Como se ve en la figura 16, la expresión de *xylE* en la fusión transcripcional pFU9, no se mostró prácticamente afectada con la adición de cloruro de sodio al medio de cultivo en todas las cepas ensayadas. Si bien el agregado de NaCl reprime la transcripción de genes blanco (hemolisina, proteína A, TSST-I) [13], la falta de efecto observada sobre el gen *sae* también había sido registrada para otros sistemas regulatorios, como *agr* y *sarA* [13].

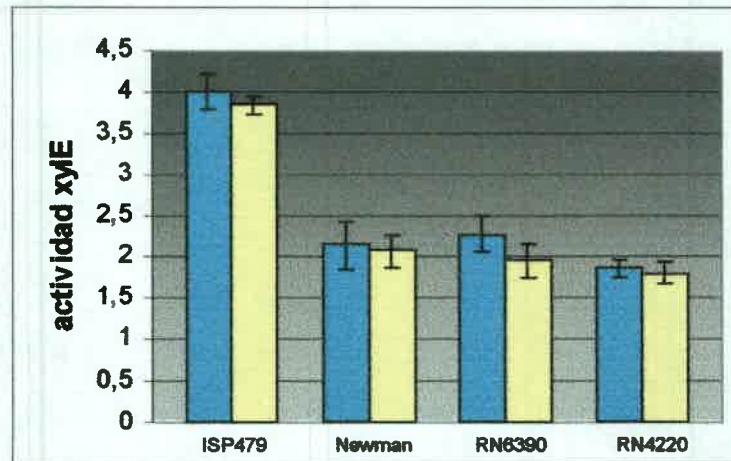


Figura 16. Efecto del NaCl sobre la actividad de *xylE* en las cepas RN4220 y RN6390 portadoras de la fusión transcripcional pFU9, durante la fase post-exponencial de crecimiento, en medio BHI (■) y en medio BHI suplementado con 0.5M NaCl (■). Los valores, expresados en miliunidades por miligramo de proteína celular, son el promedio de cuatro determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Los *p*-valor, determinados por la prueba *t* de Student, fueron estadísticamente no significativos ($p > 0.05$).

V.9.2.3- Concentración de sacarosa

Se estudió el efecto de la sacarosa sobre la actividad de *xylE* en las cepas *S. aureus* ISP479C, Newman, RN6390 y RN4220 portadoras de la fusión transcripcional pFU9, en medio BHI suplementado con 20 mM de sacarosa.

La expresión de *xylE* disminuyó, aproximadamente, un 40% en presencia del azúcar, respecto de la expresión en BHI (Figura 17). Estudios previos mostraron un efecto similar en presencia de sacarosa sobre la expresión del gen regulatorio *sarA* [13], en base a esto se podría especular que el efecto observado no se debe a una acción directa sobre el locus *sae*, sino presumiblemente sea como consecuencia de la represión del regulador global *sarA*, planteándose así una posible interacción entre estos dos sistemas regulatorios.

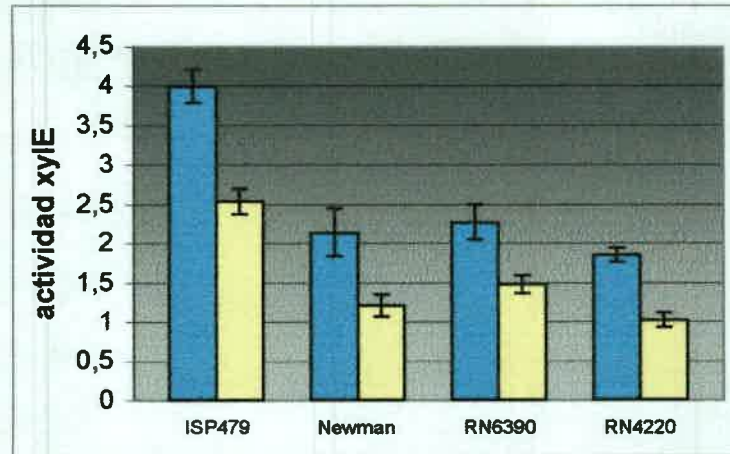


Figura 17. Efecto de la sacarosa sobre la actividad de *xyIE* en cepas portadoras de la fusión transcripcional pFU9 durante la fase post-exponencial, en medio BHI (■) y en medio BHI suplementado con 20 mM sacarosa (■). Los valores, expresados en miliunidades por miligramo de proteína celular, son el promedio de cuatro determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Los *p*-valor, determinados por la prueba *t* de Student, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

En base a la inhibición de la expresión del locus *sae* observada en presencia de sacarosa, disacárido compuesto por glucosa y fructosa, se decidió ensayar cada monosacárido por separado para determinar a cuál de ellos se debía dicha inhibición.

V.9.2.4- Concentración de glucosa

Para determinar si la actividad de *xyIE* en la fusión transcripcional pFU9 se ve afectada en presencia de glucosa, se realizaron cultivos de las cepas de *S. aureus* en medio BHI suplementado con 20mM de glucosa.

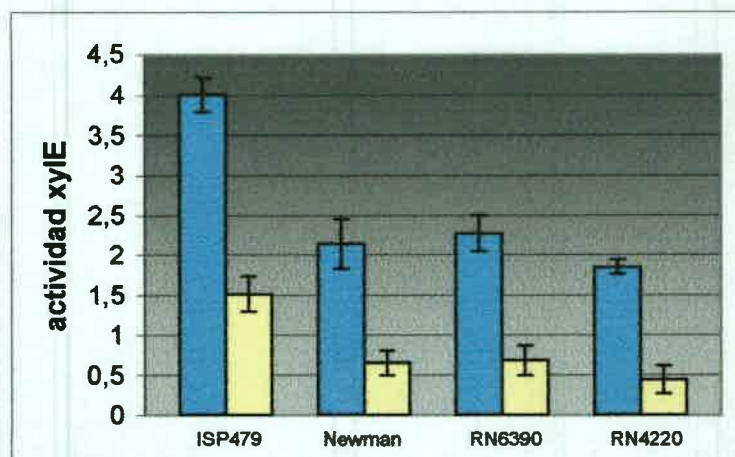


Figura 18. Efecto de la glucosa sobre la actividad de *xyIE* en cepas portadoras de la fusión transcripcional pFU9 durante la fase post-exponencial, en medio BHI (■) y en medio BHI suplementado con 20mM glucosa (■). Los valores, expresados en miliunidades por miligramo de proteína celular, son el promedio de cuatro determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Los *p*-valor, determinados por la prueba *t* de Student, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

La adición de glucosa al medio de cultivo llevó a una disminución de la expresión de *xylE* en la fusión pFU9 en todas las cepas ensayadas (Figura 18). La represión observada en presencia de glucosa podría responder a un fenómeno de represión por catabolito. Resultados similares se obtuvieron para el sistema *sarA* [13].

V.9.2.5- Concentración de fructosa

Para analizar el efecto de la fructosa sobre la expresión de *xylE*, se cultivaron las distintas cepas portadoras de la fusión transcripcional pFU9 en BHI con la adición de 20 mM de fructosa.

La adición de fructosa al medio de cultivo, al igual que con glucosa llevó a una disminución de la expresión de *xylE* en la fusión pFU9 aún mayor que la observada con sacarosa (Figura 19).

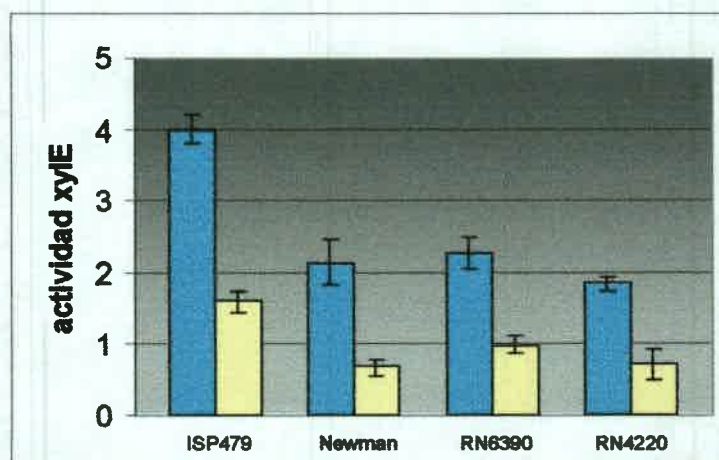


Figura 19. Efecto de la fructosa sobre la actividad de *xylE* en cepas portadoras de la fusión transcripcional pFU9 durante la fase post-exponencial, en medio BHI (■) y en medio BHI suplementado con 20mM fructosa (□). Los valores, expresados en mil unidades por miligramo de proteína celular, son el promedio de cuatro determinaciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Los *p*-valor, determinados por la prueba *t* de Student, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Las diferentes condiciones ambientales ensayadas no afectan las velocidades de crecimiento de las cepas indicando que las variaciones en la expresión del locus *sae* no se deben a tiempos de generación diferentes.

Debido a que todos los experimentos se realizaron con cepas *agr*⁺ y que algunos de los factores ambientales ensayados no afectarían la activación de *agr* [13], se infiere que las condiciones estudiadas podrían ejercer su efecto, a nivel de transcripción y/o traducción, directamente sobre *sae* e independientemente de *agr*.

La regulación de los factores de virulencia en *S. aureus* involucra una compleja red de genes regulatorios que no sólo modulan la expresión de los factores de virulencia sino que además interaccionan entre sí para modificar dicha expresión. La complejidad y especificidad de estas interacciones son probablemente la clave de la expresión altamente coordinada de los factores de virulencia en respuesta al medioambiente. Por ello, los estudios de los sistemas regulatorios apuntan a la profilaxis y/o al tratamiento de las infecciones bacterianas neutralizando la expresión de los genes que controlan la síntesis de los factores de virulencia. Moléculas que inhiban la interacción de las proteínas efectoras de los sistemas regulatorios con los promotores de los genes blanco podrían actuar como auxiliares de los agentes quimioterapéuticos, reduciendo la expresión de algunos factores de virulencia y, con ésto, disminuyendo el agresivo potencial del microorganismo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se suman a los de otros investigadores para ayudar a comprender los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del virulón estafilococal, los cuales constituyen un blanco prometedor para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Conclusiones

VI- CONCLUSIONES

La fusión de los genes *saeRS* con el fragmento de 406 pb UP, llevada en un plásmido multicopia, complementa la mutación *sae*, ya que restablece el fenotipo salvaje.

Equivalentemente, la fusión de este fragmento de 406 pb UP *saeRS* con el gen reportero *xylE* sin su promotor, en un plásmido multicopia, muestra una importante expresión en la mutante *sae*, aún mayor a la observada con la región de 181 pb UP.

Estas observaciones sugieren la presencia de un promotor en la región entre 406 pb y 181 pb UP de *saeRS*. Este promotor podría corresponder al promotor P3, a partir del cual se genera el transcripto A descritos por Wolz y col. [64] y Novick y col. [51], respectivamente.

Estos resultados, así como las investigaciones previas (Giraudó y col., 2003) permiten concluir sobre la existencia de al menos tres promotores en el locus *sae*: uno localizado 626 nt UP, otro muy débil localizado 83 nt UP y un tercero, según se deduce de estos estudios, localizado en la región UP entre 181 y 406 pb.

El locus *sae* es un sistema de dos componentes que tiene uno o más sensores, SaeS y una proteína de membrana codificada por un ORF, localizado 327 nt UP de *saeRS*, y una proteína reguladora, *saeR*. Los resultados obtenidos en ensayos de expresión (figura 15) sugieren que la proteína efectora, SaeR, tendría la propiedad de autorregularse positivamente.

Los ensayos llevados a cabo han permitido identificar respuestas en la expresión del locus *sae* frente a ciertas condiciones ambientales. Así, mediante el análisis de fusiones transcripcionales, se evidencia un aumento en la expresión de *sae* bajo condiciones de crecimiento en semianaerobiosis, y en presencia de algunos azúcares, como sacarosa, glucosa y fructosa.



Bibliografía

VII- BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C. and Tarkowski, A. (1993). The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Inf. Imm.* **61**: 3879-3885.
2. Arvidson, S. and Tegmark, K. (2001). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:159-170.
3. Bayles, K. (1994). Investigating environmental sensing mechanisms of *Staphylococcus aureus*. *ASM News* **60**:597-599.
4. Bayles, K., Wesson, C., Liou, L., Fox, L., Bohach, G. and Trumble, W. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Inf. Imm.* **66**:336-42.
5. Bernheimer, A. (1988). Assay of toxins hemolytics. *Method in enzymol.* **165**: 213.
6. Bischoff, M., Entenza, J. and Giachino, P. (2001). Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**:5171-5179.
7. Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P. and Talbot, B. (2003). In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathog.* **35**:159-68.
8. Buchanan, R. and Gibbons, N. (1986). *Bergey's Manual for Determinative Bacteriology*. Eds. Vol. II. N. Williams and Wilkins C., Baltimore.
9. Brunskill, E. and Bayles, K. (1996). Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus* *J. Bacteriol.* **178**: 811-618.
10. Buddle, B. and Cooper, M. (1978). Aspects of the epidemiology of bovine staphylococcal mastitis. *N. Z. Vet. J.* **26**: 296-298.
11. Buzzola, F., Quelle, L., Gomez, M., Catalano, M, Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Denamiel, G. and Sordelli, D. (2001). Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol. Infect.* **126**:445-452.
12. Compagnone-Post, P., Malyankar, U. and Khan, S. (1991). Role of host factors in the regulation of the enterotoxin B gene. *J. Bacteriol.* **173**:1827-1830.
13. Chan, P and Foster, S. (1998). The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiol.* **144**:2469-2479.
14. Cheung, A., Bayer, A., Zhang, G., Gresham, H. and Xiong, Y. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. and Med. Microbiol.* **40**:1-9.
15. Cheung, A., Eberhardt, K., Chung, E., Yeaman, M., Sullam, P. M., Ramos, M. and Bayer, A. (1994). Diminished virulence of a *sar⁻agr⁻* mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *The J. of Clinical Invest., Inc.* **94**: 1203-1208.
16. Cheung, A., Schmidt, K., Bateman, B. and Manna, A. (2001). SarS, a SarA homolog repressible by *agr*, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Inf. Imm.* **69**:2448-2455.

17. Cheung, A. and Zhang, G. (2002). Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front. Biosci.* **7**:D1825–D1842.
18. Chien, Y., Manna, A., Projan, S. and Cheung, A. (1999). Sar A, a Global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J. Biol. Chem.* **274**:37169-37176.
19. Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R., Bes, M., Etienne, J. and Gerard, L. (2002). High variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J. Bact.* **184**: 1180-1186.
20. Dunman, P., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E., Zagursky, R., Shlaes, D. and Projan, S. (2001). Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol.* **183**:7341-53.
21. Fabret, C., Feher, V. and Hoch, J. (1999). Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**:1975-1983.
22. Fournier, B., Klier, A. and Rapoport, G. (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**:257-261.
23. Fukuchi, K., Kasahara, Y., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S. and Ogasawara, N. (2000). The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **146**:1573-1583.
24. Giesecke, W., Van Den Heever, L. and Du Toit, I. (1972). Staphylococcal mastitis: phage types and patterns of *S. aureus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **39**:87-96.
25. Giraud, A., Calzolari, A., Cataldi, A., Bogni, C. and Nagel, R. (1999). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS. Microb. Letters.* **177**:15-22.
26. Giraud, A., Cheung, A. L. and Nagel, R. (1997). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol.* **168**:53-58.
27. Giraud, A., Mansilla, C., Chan, A., Raspanti, C. and Nagel, R. (2003). Studies on the expression of regulatory locus *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **46**:246-250.
28. Giraud, A., Rampone, H., Calzolari, A. and Nagel, R. (1996). Phenotypic characterization and virulence studies of *agr-sae* double mutants of *Staphylococcus aureus*. *Canadian J. Microbiol.* **42**: 120-123.
29. Giraud, A., Raspanti, C., Calzolari, A. and Nagel, R. (1994). Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. of Microbiol.* **40**: 677-681.
30. Goerke, C., Fluckiger, U., Steinhuber, A., Zimmerli, W. and Wolz, C. (2001). Impact of the regulatory loci *agr*, *sarA* and *sae* of *Staphylococcus aureus* on the induction of α -toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. *Mol. Microb.* **40**:1439-1447.
31. Goudreau, P. and Stock, A. (1998) Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:160-169.
32. Heinrichs, J., Bayer, M. and Cheung, A. (1996). Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**:418-423.
33. Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, R. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.

34. Jarraud, S., Lyon, G., Figueiredo, A., Gerard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T. and Novick, R. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**:6517-6522.
35. Jawetz, E., Melnick, J. and Alderberg, E. (1987). In: Apleton & Lange (ed). *Rev. of Med. Microbiol.* 17° edition. 217-222.
36. Ji, G., Beavis, R. and Novick, R. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.
37. Joklik, W., Willett, H., Amos, B. y Wilfert, C. (1995). *Microbiología Zinsser.* 20° edición.
38. Kornblum, J., Kreiswirth, B., Projan, S., Ross, H. y Novick, R. (1990). *agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*, p. 373-402. In R. P. Novick (ed.), *Molecular biology of the staphylococci*. VCH Publishers, Inc., New York.
39. Kullik, I., Giachino, P. and Fuchs, T. (1998). Deletion of the alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J. Bacteriol.* **180**:4814-4820.
40. Lachica, R., Genigeorgis, C. and Hoeprich, P. (1971). Metachromatic agar-difussion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* **21**:585-587.
41. Lyon, G., Mayville, P., Muir, T. and Novick, R. (2000). Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:13330-13335.
42. Manna, A. and Cheung, A. L. (2001). Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus*. *Inf. Imm.* **69**:885-896.
43. Martin, P., Li, T., Sun, D., Biek, D. and Schmid, M. (1999). Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**:3666-3673.
44. McDevitt, D., Vaudaux, P. and Foster, T. (1992). Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. *Inf. Imm.* **60**:1514-1523.
45. McNamara, P., Milligan-Monroe, K., Khalili, S. and Proctor, R. (2000). Identification, cloning, and characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**: 3197-3203.
46. Miller, J., Mekalanos, J. and Falkow, S. (1989). Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**:916-922.
47. Mizuno, T., Kaneko, T. and Tabata, S. (1996). Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *DNA Research* **3**:407-414.
48. Novick, R. (1991). Genetic systems in staphylococci. *Methods in Enzymol.* **204**:587-636.
49. Novick, R. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**: 1429-1449.
50. Novick, R., Edelman, I., Schwesinger, M., Gruss, D., Swanson, E. and Pattee, P. (1979). Genetic translocation in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 400-404.
51. Novick, R. and Jiang, D. (2003). The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiol.* **149**: 2709-2717.

52. Novick, R., Projan, S., Kornblum, J., Ross, S., Kreiswirth, B., Vandenesch, F. and Moghazeh, S. (1995). The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Genet.* **248**:446-458.
53. Novick, R., Ross, H., Projan, S., Kornblum, J., Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* **12**: 3967-3975.
54. Peng, H., Novick, R., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Schlievert, P. (1988). Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *S. aureus*. *J. Bacteriol.* **170**:4365-4372.
55. Pyorala, S. (2002) New strategies to prevent mastitis. *Reprod. Domest. Anim.* **37**:211-216.
56. Qazy, S., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W., Williams, P. and Hill, P. (2001). *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Inf. Imm.* **69**: 7074-7082.
57. Ray, C., Hay, R., Carter, L. and Moran, C. (1985). Mutations that affect utilization of a promoter in stationary-phase *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **163**:610-614.
58. Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. and Novick, R. (1986). Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 58-61.
59. Said-Salim, B., Dunman, P., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P., Arvidson, S., Foster, T., Projan, S. and Kreiswirth, B. (2003). Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J. Bacteriol.* **185**:610-619.
60. Sala-Trepat, J. and Evans, W. (1971) The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species. *Eur. J. Biochem.* **20**:400-413.
61. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed., Vol.1, 2, 3. Cold Spring Harbor, N.Y.
62. Scott, J., Smirnova, N. and Haldenwang, W. (1999). A *Bacillus*-specific factor is needed to trigger the stress-activated phosphatase/kinase cascade of σ^B induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**:106-110.
63. Schmidt, K., Manna, A., Gill, S. and Cheung, A. (2001). SarT, a repressor of α -hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Inf. Imm.* **69**:4749-4758.
64. Steinhuber, A., Goerke, C., Bayer, M., Döring, G. and Wolz, C. (2003). Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**:6278-6286.
65. Stock, J., Ninfa, J. and Stock, A. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:450-490.
66. Stock, A., Robinson, V. and Goudreau, P. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183-215.
67. Sullivan, M., Yasbin, R. and Young, F. (1984). New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. *Gene* **20**:21-26.
68. Takahashi, S. and Nagano, Y. (1984). Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* **20**:608-613.
69. Tegmark, K., Karlsson A. and Arvidson, S. (2000). Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **37**:398-409.

70. Tung, W. and Chow, K. (1996). A modified medium for efficient electrotransformation of *Escherichia coli*. Elsevier Trends Journals Technical Tips. 00013.
71. Wadstrom T. (1987). Molecular aspects on pathogenesis of wound and foreign body infections due to staphylococci. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. **266**:191-211.
72. Wolz, C., Pölmann-Dietze, P., Steinhuber, A., Chien, Y., Manna, A., Wamel, W. and Cheung, A. (2000). Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **36**:230-243.
73. Wu, S., de Lencastre, H. and Tomasz, A. (1996). Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J. Bacteriol. **178**:6036-6042.
74. Yarwood, J., McCormick, J. and Schlievert, P. (2001). Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **183**:1113-1123.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



60658

60658