



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS

MOLECULARES

**Caracterización del fenotipo de semi-
dependencia a antibióticos ribosomales en un
aislado clínico de *Staphylococcus aureus***

TESIS DOCTORAL

Elena Pedrero Vega

Madrid, 2022



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



CNB
CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UAM
Universidad Autónoma
de Madrid

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización del fenotipo de semi-
dependencia a antibióticos ribosomales en un
aislado clínico de *Staphylococcus aureus***

Memoria de investigación presentada por Elena Pedrero Vega, Graduada en Biología, para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid. Trabajo dirigido por el Dr. Daniel

López Serrano y la Dra. Julia García Fernández

Tutor: Dr. José Berenguer Carlos

CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA – CSIC

Madrid, 2022

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado por Elena Pedrero Vega en el departamento de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC) bajo la dirección del Dr. Daniel López Serrano y la Dra. Julia García Fernández.

Madrid, 2022

A mi familia.

" La verdad es tan rara, es encantador contarla ". — Emily Dickinson

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Dr. Daniel López la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio.

A la Dra. Julia García por el apoyo y guía constante, por ayudarme a crecer y a creer en mí. A Anabel, por escucharme y estar dispuesta siempre a ayudar. A todo el laboratorio 211, por el apoyo científico, pero también el personal. Por haberme aguantado, porque todos sabemos que cuando yo hacía un experimento, lo hacía todo el 211.

A todo el departamento de biotecnología microbiana y a todos los servicios del CNB que han permitido la realización y el avance de esta tesis.

A Rosa del Campo, porque sin cepa “yonkie”, no existiría este trabajo.

A mi familia y a mis amigos. Porque esta tesis sois vosotros. Me habéis dado la fuerza y la energía para seguir.

RESUMEN

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) es considerado un patógeno con alta relevancia en clínica debido entre otros factores, a su elevada tasa de resistencia a antibióticos y a su habilidad para establecer estrategias que le permitan cronificarse en infección. Este hecho es especialmente importante en aislados clínicos de fibrosis quística, por su capacidad de conversión a *Small Colony Variants* (SCVs), poblaciones que presentan un crecimiento ralentizado y una serie de propiedades bioquímicas que les permiten permanecer en un estado quiescente en el hospedador asegurando el carácter persistente de la infección.

En este trabajo estudiamos un aislado clínico de SARM, procedente de un paciente de fibrosis quística del año 1997 (cepa FQ-97) que presenta un problema en su crecimiento debido a una mutación en el gen *thyA* y un fenotipo de semi-dependencia a los antibióticos ribosomales eritromicina y clindamicina. La mutación genética genera un detrimento en la actividad de la enzima para la que codifica, la timidilato sintasa (TS), comprometiendo el crecimiento bacteriano ya que cataliza la reacción de síntesis del timidilato (dTMP), necesario para la replicación del ADN.

Nuestros resultados muestran que la ralentización del crecimiento es un condicionante para la visualización del fenotipo de semi-dependencia y que ambos están asociados a una condición de cultivo con bajos niveles de timidina. Tras la adición de eritromicina observamos cómo el estrés metabólico de FQ-97 disminuye, dado que la bacteria experimenta una reducción en los niveles de diferentes indicadores de respuesta a estrés como son la alarmona (p)ppGpp y los ribosomas 100S. Los resultados también ponen de manifiesto que el mecanismo molecular del fenotipo de semi-dependencia no es específico de FQ-97, dado que es reproducible a través del tratamiento con antibióticos que comprometen la vía de síntesis del dTMP. Por lo tanto, la eritromicina supone una ventaja para el crecimiento bacteriano ante un déficit de dTMP. El conjunto de datos obtenidos sugieren que la eritromicina y la clindamicina tienen un efecto a nivel regulatorio sobre genes del metabolismo bacteriano, generando flujos que favorecen la producción del dTMP, siendo capaces de sortear el detrimento de actividad de TS.

Los resultados obtenidos apuntan que el mecanismo molecular responsable del fenotipo se basa en un mecanismo riboregulador de tipo *riboswitch*, donde el antibiótico se une de manera específica a una zona del ARNm en la región 5' UTR del gen que va a regular. Por tanto y aunque lo habitual es que el estudio de los antibióticos se haya centrado en su utilidad en la lucha contra las infecciones, en esta tesis sugerimos una posible función implicada en cambios en el metabolismo bacteriano. Este descubrimiento sería especialmente relevante en procesos de infección, donde tras la adición de los antibióticos las bacterias semi-dependientes podrían ser capaces de alternar comportamientos crónicos y virulentos para mejorar su supervivencia.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is considered one of the most important clinical pathogen due to, among other factors, its high rate of antibiotic resistance and its ability to develop strategies that allow it to generate chronic infections. This fact is particularly important in clinical isolates of cystic fibrosis patients, due to its capacity to convert to *Small Colony Variants* (SCVs), populations that exhibit slowed growth and a number of biochemical properties that allow them to remain in a quiescent state in the host, ensuring the persistent nature of the infection.

In this work we study a clinical isolate of MRSA from a cystic fibrosis patient in 1997 (strain FQ-1997). This strain presents a growth problem due to a mutation in the *thyA* gene and a semi-dependent phenotype to the ribosomal antibiotics erythromycin and clindamycin. This genetic variation generates a detriment in the activity of the enzyme for *thyA* codes, thymidylate synthase (TS), compromising bacterial growth as it catalyses the thymidylate synthesis reaction (dTMP), essential for DNA replication.

Our results show that the growth problem is a necessary condition for the appearance of the semi-dependent phenotype. Both factors are associated with the specific culture condition low thymidine levels. After erythromycin addition, we observe that the metabolic stress of FQ-97 decreases. Therefore, the bacterium experiences a reduction in the levels of different indicators of stress responses or nutrient limitation conditions, such as the alarmone (p)ppGpp and the 100S ribosomes. The results also show that the molecular mechanism of the semi-dependence phenotype is not specific to FQ-97, since we reproduce the semi-dependant phenotype through treatment with antibiotics that compromised the dTMP synthesis pathway. Thus, erythromycin just provides a bacterial growth advantage when bacteria have a deficit in dTMP. The data obtained suggest that erythromycin and clindamycin has a regulatory effect on bacterial metabolism genes, generating fluxes that favoured dTMP production, being able to circumvent TS activity impairment.

The results obtained indicate that the molecular mechanism responsible for the phenotype is based on a riboswitch-type ribo-regulatory mechanism, where the antibiotic binds specifically to an mRNA site in the 5' UTR region of the gene to be regulated. Therefore, although the study of antibiotics has usually focused on their usefulness against infections, we suggest a possible function involved in changes in bacterial metabolism. This discovery would be especially relevant in infection processes, where after the addition of antibiotics, semi-dependent bacteria might be able to alternate chronic and virulent behaviours to improve their survival.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS	11
I. INTRODUCCIÓN	15
1. Los antibióticos.....	15
1.1. Tipos de antibióticos	15
1.2. Los antibióticos ribosomales	16
1.2.1. El ribosoma bacteriano como diana terapéutica	16
1.2.2. La traducción bacteriana.....	17
1.3. La eritromicina y la clindamicina.....	18
1.4. La resistencia a los antibióticos	20
1.4.1. Resistencia a antibióticos ribosomales	22
1.4.2. La resistencia MLS _B : características generales y tipos según su regulación	23
1.5. El fenómeno de semi-dependencia a antibióticos.....	26
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.1. Generalidades	28
2.2. Resistencia a antibióticos en <i>S. aureus</i>	28
2.2.1. <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	29
3. <i>Small Colony Variants</i> (SCVs).....	29
3.1. Tipos de SCVs.....	30
3.1.1. SCVs defectivas en cadena de electrones.....	31
3.1.2. SCVs defectivas en síntesis de timidina	32
3.1.3. SCVs de otros tipos	33
3.2. Representaciones clínicas relevantes de las SCVs	34
3.2.1. SCVs en fibrosis quística.....	34
II. OBJETIVOS	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	38
2. Medios y condiciones de cultivo	43
3. Caracterización fenotípica	43
3.1. Caracterización de FQ-97 como posible SCVs	43
3.1.1. Pruebas de auxotrofia	43
3.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana mediante antibiograma	44
3.3. Caracterización del fenotipo de semi-dependencia	44
3.3.1. Estabilidad del fenotipo de semi-dependencia y heteropoblacional.....	44
3.3.2. Efecto de la eritromicina sobre el número de UFC	45
4. Técnicas de ADN.....	46

4.1.	Extracción de ADN cromosómico en <i>S. aureus</i>	46
4.2.	Secuenciación genómica	46
4.2.1.	Secuenciación de los operones de ARNr 23S	46
4.2.2.	Técnicas de secuenciación masiva	47
5.	Construcción de cepas modificadas genéticamente	47
5.1.	Construcción de variantes de la timidilato sintasa en pET15B	47
5.2.	Construcción para la complementación del gen <i>thyA</i> en pJL74	48
5.3.	Construcciones con el plásmido reportero pCN51- <i>sarAP1</i> -RL(R/K)-GFPmut2	48
5.4.	Transformación de células de <i>S. aureus</i>	49
5.4.1.	Preparación y transformación de células electrocompetentes de RN4220	49
5.4.2.	Preparación y transformación de células electrocompetentes de FQ-97	49
6.	Técnicas de ARN	50
6.1.	Extracción de ARN de <i>S. aureus</i>	50
6.2.	Retrotranscripción acoplada a PCR (RT-PCR)	50
6.3.	PCR en tiempo real (qPCR)	50
7.	Técnicas de proteína	51
7.1.	Obtención de extractos proteicos en <i>S. aureus</i> y <i>Western blot</i>	51
7.2.	Extracción y purificación de ribosomas en FQ-96 y FQ-97	52
7.3.	Ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa	53
7.3.1.	Generación de perfiles ribosomales y determinación de HPF	53
7.3.2.	Determinación del patrón de oligomerización de HPF	53
7.4.	Traducción <i>in vitro</i> a partir de ribosomas purificados	54
7.5.	Ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i> de la timidilato sintasa	54
8.	Determinación de los niveles de (p)ppGpp mediante PyDPA	56
9.	Análisis bioinformáticos	56
10.	Análisis estadístico	57
IV.	RESULTADOS	59
1.	Caracterización del aislado clínico FQ-97	59
1.1.	Caracterización fenotípica	59
1.1.1.	Estudio del fenotipo de semi-dependencia	60
1.1.1.1.	Ensayos de sensibilidad antimicrobiana	61
1.1.1.2.	Estabilidad del fenotipo de semi-dependencia	63
1.1.2.	Estudio del fenotipo heteropoblacional y su relación con el fenotipo de semi-dependencia	67
1.2.	Caracterización genómica	69
1.2.1.	Búsqueda de SNPs frente a su cepa ancestral FQ-96	69
1.2.2.	Búsqueda de mutaciones en los operones ribosomales 23S ARNr	73
2.	Búsqueda del mecanismo molecular asociado al fenotipo de semi-dependencia	75
2.1.	El ribosoma de FQ-97	75
2.1.1.	Evaluación de la síntesis <i>in vitro</i> de proteínas	75

2.1.2.	Estudio de los perfiles ribosomales y su relación con la eritromicina.....	76
2.1.2.1.	Expresión de proteínas asociadas a los ribosomas 100S	80
2.1.2.2.	Variación de los niveles de (p)ppGpp en presencia de eritromicina	82
2.2.	El gen <i>thyA</i>	84
2.2.1.	Caracterización de la mutación en el gen <i>thyA</i>	86
2.2.2.	Caracterización de FQ-97 como SCVs.....	87
2.2.3.	Actividad enzimática de TS-97	87
2.2.4.	Reversión del fenotipo de semi-dependencia	89
2.2.4.1.	Reversión en presencia de timidina	89
2.2.4.2.	Reversión mediante la complementación de la mutación en el gen <i>thyA</i>	90
2.2.5.	Efecto a nivel transcripcional de la eritromicina sobre <i>thyA</i> y <i>folA</i>	91
2.3.	Determinación del perfil de sensibilidad a SxT en presencia de eritromicina	92
2.3.1.	Generación del fenotipo de semi-dependencia en el laboratorio.....	95
2.4.	Estudio de un posible mecanismo riboregulador por eritromicina.....	97
2.4.1.	Búsqueda <i>in silico</i> de dominios RL(R/K) para determinación de mecanismo riboregulador	98
V.	DISCUSIÓN.....	106
1.	El ribosoma de FQ-97 y el fenotipo de semi-dependencia.....	107
2.	El gen <i>thyA</i> y el fenotipo de semi-dependencia.....	108
3.	Efecto de la eritromicina sobre el metabolismo de FQ-97	111
3.1.	Efecto de la eritromicina sobre el metabolismo del dTMP	111
3.2.	Efecto de la eritromicina sobre indicadores de estrés metabólico.....	114
4.	Búsqueda del mecanismo molecular causante del fenotipo de semi-dependencia.....	117
VI.	CONCLUSIONES	122
VII.	BIBLIOGRAFÍA	124
	MATERIAL SUPLEMENTARIO	137

ABREVIATURAS

En estas tesis se han utilizado además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) y la *International Union of Pure Applied Chemistry* (UIPCA) las siguientes abreviaturas:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNds	ADN bicatenario
AML	Amoxicilina
Amp	Ampicilina
Amp^R	Resistencia a ampicilina
Antb	Antibióticos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN transferente
ASB	Albúmina de suero bovino
AZM	Azitromicina
BHI	Del inglés, <i>Brain heart infusion</i>
DAP	Daptomicina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHF	7,8-dihidrofolato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dTDP	Desoxitimidina difosfato
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
C	Cloramfenicol
CLSI	Del inglés, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cm^R	Resistencia a cloramfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CD	Clindamicina
CN	Gentamicina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Crio-EM	Criomicroscopía electrónica
CTP	Citidina trifosfato
CX	Cefoxitina
dUMP	2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
dUTP	2'-deoxitimidina-5'-monofosfato
Del	Delección
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHFS	Dihidrofolato sintasa
DHP	Dihidropteroato
DHPS	Dihidropteroato sintasa
DO	Densidad óptica
ER	Eritromicina
Er^R	Resistencia a eritromicina
Erm	Del inglés, <i>erythromycin ribosome methylases</i>
F	<i>Forward</i>
FEP	Cefepima
FOS	Fosfomicina
FQ	Fibrosis quística
FU	Ácido fusídico
GTP	Guanosín Trifosfato
HPF	Del inglés, <i>Hibernation promoting factor</i>

IGV	Del inglés, <i>Integrative Genomics Viewer</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalato piranosido
Ins	Inserción
K	Kanamicina
KZ	Cefazolina
LB	Del inglés, <i>lysogeny broth</i>
LNZ	Linezolid
MET	Meticilina
MH	Mueller Hinton
MLS_B	Resistencia Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas B
MLS_{BC}	Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas B constitutiva
MLS_{Bi}	Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas B inducible
mTFH	(6R)-5,10-metilen-5,6,7,8-tetrahidrofolato
NARSA	Del inglés, <i>Network on Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus</i>
NCTC	Del inglés, <i>National Collection of Type Cultures</i>
nt	Nucleótidos
ORF	Del inglés, <i>Open reading frame</i>
sORF	Del inglés, <i>Small open reading frame</i>
OX	Oxacilina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pfu	Polimerasa fusión
PBS	Del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>
PP_i	Pirofosfato inorgánico
ppgpp	Guanosina 3'-difosfato-5'-difosfato
(p)ppgpp	Guanosina 3'-difosfato-5'-trifosfato
PTC	Centro peptidil transferasa
QDA	Quinupristina-dalfopristina
RBS	Del inglés, <i>ribosomal binding site</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
RD	Rifampicina
S	Estreptomina
SAM	S-Adenosil metionina
SARM	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
SARM-AC	SARM adquirido en comunidad
SARM-AH	SARM adquirido en hospital
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SCV	Del inglés, <i>Small Colony Variant</i>
SXM	Sulfametoxazol
SNP	Del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ST	Secuencitipo o <i>sequence type</i> .
SxT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TGH	Transferencia genética horizontal
THF	Tetrahidrofolato
TIM	Timidina
TK	Timidina kinasa
TM	Trimetoprim
TOB	Tobramicina
TS	Timidilato sintasa
TSB	Del inglés, <i>Tryptic soy broth</i>

UFC
UTR
UV
Van

Unidades formadoras de colonias
Del inglés, *untranslated region*
Ultravioleta
Vancomicina

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Los antibióticos

Los antibióticos se definieron por primera vez como moléculas de origen microbiano, que tenían la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de diversas especies de microorganismos, confiriendo a los que las producían una ventaja competitiva (Waksman, 1947). Su descubrimiento supuso uno de los logros más significativos del siglo XX para el sistema de salud frente a las infecciones bacterianas, salvando miles de vidas en todo el mundo. Sin embargo, el uso indebido de estos compuestos ha acelerado la aparición de bacterias multirresistentes, en las que los antibióticos muestran cada vez menos eficacia (Alós, 2015; Schneider, 2021; Zhuang *et al.*, 2021). Actualmente, la resistencia a los antibióticos mata cada año a 33.000 personas en Europa (Cassini *et al.*, 2019), genera un gasto sanitario adicional de unos 1.500 millones de euros y en todo el mundo acaba con la vida de 700.000 personas, por lo que muchos expertos alertan sobre la proximidad a una era post-antibiótica (Kwon y Powderly, 2021). Se estima que para el año 2050, la cifra de muertes debida a infecciones causadas por bacterias multirresistentes ascienda a diez millones en todo el planeta (Murray *et al.*, 2022).

1.1. Tipos de antibióticos

Los antibióticos se pueden clasificar en base a diferentes criterios atendiendo a su efecto antimicrobiano, su espectro de actuación, su estructura química y su mecanismo de acción. Por el estudio desarrollado en esta tesis, nos centraremos en la clasificación de los antibióticos en base a su mecanismo de acción (Calvo y Martínez-Martínez, 2008; Etebu y Arikekpar, 2016) encontrando:

- **Antibióticos inhibidores de la síntesis de pared bacteriana.** Interfieren en cualquiera de las cuatro fases de síntesis del peptidoglicano generando por tanto un choque osmótico y la lisis celular.
- **Antibióticos que alteran la membrana citoplasmática.** Son compuestos que alteran la permeabilidad de membrana generando variaciones en la composición celular interna. Estos antibióticos van a alterar la entrada y salida de elementos esenciales para la vida y el metabolismo bacteriano.
- **Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas.** Son compuestos que, por unión a diferentes elementos del ribosoma, principalmente ARN ribosomal (ARNr), interrumpen la traducción bacteriana.
- **Antibióticos que actúan en el metabolismo o en la estructura de los ácidos nucleicos.** Son antibióticos cuyas dianas principales son enzimas que participan en el proceso de transcripción y replicación, o son compuestos con capacidad de dañar el ADN directamente.
- **Antibióticos de bloqueo de síntesis de factores metabólicos.** Mayoritariamente interfieren en la síntesis del folato, compuesto necesario para el metabolismo de elementos esenciales —como

los aminoácidos y las bases púricas y pirimidíricas de los nucleótidos—, dado que, a diferencia de los organismos eucariotas, la mayoría de las bacterias son incapaces de tomar el folato del medio. Podemos encontrar este grupo incluido en el anterior, ya que de forma indirecta afectan al metabolismo de los ácidos nucleicos.

A excepción de la pared celular, la mayoría de las dianas de los antibióticos también se encuentran en los organismos eucariotas. Las diferencias estructurales entre bacterias y organismos superiores son las que posibilitan que el antibiótico tenga mayor afinidad por la diana procariota, minimizando los posibles efectos adversos de estos compuestos en clínica (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

1.2. Los antibióticos ribosomales

Debido a la relevancia que tuvieron en esta tesis los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, o, antibióticos ribosomales, nos centraremos por una parte en el ribosoma bacteriano y en los mecanismos de acción de algunos de estos compuestos, así como el tipo de resistencia que las bacterias pueden desarrollar hacia ellos.

1.2.1. El ribosoma bacteriano como diana terapéutica

El proceso de síntesis proteica conocido como traducción tiene lugar en los ribosomas, complejos constituidos por ARNr y proteínas ribosomales. A pesar de ser estructuras altamente conservadas, con una organización y *modus operandi* similar, su composición y estructura varía entre los diferentes reinos (Ramakrishnan y Moore, 2001).

Por una parte, el ribosoma bacteriano está formado por 3 moléculas de ARNr y 54 proteínas ribosomales, que organizadas forman la subunidad mayor 50S y la subunidad menor 30S. La subunidad 50S está compuesta por los ARNr 23S y 5S y por 34 proteínas ribosomales L. La formación del enlace peptídico en bacterias está catalizada por el propio ARNr 23S, que contiene el centro peptidil transferasa (PTC) con actividad catalítica (Simpson *et al.*, 2020). Por otra parte, la subunidad 30S está compuesta por el ARNr 16S y 20 proteínas ribosomales S. Las dos subunidades juntas ensamblan el ribosoma bacteriano 70S (Poehlsgaard y Douthwaite, 2005) con un peso molecular de 2.3 MDa (Melnikov *et al.*, 2012).

La organización del ribosoma eucariota es similar; está constituido por 4 moléculas de ARNr y 82 proteínas ribosomales, que organizadas forman la subunidad mayor 60S y la subunidad menor 40S. En este caso, por un lado, la subunidad 60S está formada por los ARNr 28S, 5,8S y 5S y 49 proteínas ribosomales L, y la formación del enlace peptídico reside en la actividad catalítica del ARNr 28S. Por otro lado, la subunidad 40S está formada por el ARNr 18S y 33 proteínas ribosomales S (Simpson *et al.*, 2020). Juntas ensamblan el ribosoma eucariota 80S, con un peso de 4.3 MDa (Melnikov *et al.*, 2012).

Por lo tanto, estas diferencias estructurales son las que han generado que, desde el inicio de los antibióticos, los ribosomas hayan supuesto una de las principales dianas terapéuticas para combatir las

infecciones bacterianas. Particularmente, la especificidad y selectividad de este tipo de antibióticos por el ribosoma bacteriano recae en pequeñas variaciones a nivel de secuencia en el componente estructural del ribosoma (Böttger *et al.*, 2001). Estas variaciones que encontramos de manera natural en los ribosomas eucariotas se han definido ya en bacterias como mutaciones que generan resistencia a diferentes compuestos. Uno de los mayores ejemplos es la posición de la base 2058 ocupada por una A en el ARNr 23S de bacterias, a la que puede unirse el macrólido eritromicina y generar la inhibición de la síntesis proteica (Schlünzen *et al.*, 2001). Sin embargo, esa posición en los ribosomas eucariotas está ocupada por una G, lo que dota de una resistencia natural al ribosoma de estos organismos superiores (Böttger *et al.*, 2001). Mientras que, en bacterias, la posición 2058 ocupada por una G, está asociada a mutaciones que generan resistencia a algunos macrólidos (Douthwaite y Champney, 2001; Schlünzen *et al.*, 2001).

1.2.2. La traducción bacteriana

La traducción es un proceso que tiene lugar en los ribosomas, en los cuales la secuencia de nucleótidos que porta el ARN mensajero (ARNm) es leída y traducida a proteínas basándose en el código genético, que es interpretado por los ARN transferentes (ARNt) (Laursen *et al.*, 2005). Junto con los ribosomas y los diferentes tipos de ARNs, participan otras moléculas como el GTP —dado que es un proceso que requiere un alto gasto de energía— y otra serie de proteínas accesorias conocidas como factores de traducción (Voorhees y Ramakrishnan, 2013).

A pesar de que la traducción es uno de los procesos más conservados entre los diferentes reinos, compartiendo los principales pasos en los que se divide —iniciación, elongación, terminación y reciclaje— (Simpson *et al.*, 2020) existen algunas diferencias generales. Por ejemplo, durante la última década, uno de los hallazgos más interesantes del proceso de traducción procariota fue el comportamiento dinámico del ribosoma, siendo capaz de modificar su conformación a lo largo de los cuatro pasos de la traducción. Sin embargo, la complejidad a nivel estructural del ribosoma eucariota ha imposibilitado descubrir si también existe este tipo de plasticidad en estos organismos (Rodnina, 2018). Otra de las diferencias fundamentales entre eucariotas y procariotas, es que este proceso en bacterias ocurre en el citosol, de manera simultánea a la transcripción; mientras que en eucariotas son procesos separados y con una compartimentalización diferente, ocurriendo la transcripción en el núcleo y la traducción en el citosol. Por último, podríamos destacar que la cantidad de proteínas accesorias o factores de traducción que participan en la traducción eucariota es superior al número de proteínas implicadas en la traducción bacteriana (Simpson *et al.*, 2020).

Aunque los antibióticos ribosomales se puedan clasificar en base a la fase de la traducción que afecten, la mayoría de los antibióticos ribosomales que se utilizan en clínica interfieren en la fase de elongación, destacando como los más conocidos los aminoglucósidos, cloranfenicoles, ácidos fusídicos, lincosamidas, macrólidos, oxazolidonas, estreptograminas y tetraciclinas (Wilson, 2014). La eritromicina —macrólido— y la clindamicina —lincosamida—, son antibióticos que inhiben la

traducción a nivel de la elongación, y debido a la relevancia que tuvieron en esta tesis, profundizaremos sobre cada uno de ellos.

1.3. La eritromicina y la clindamicina

La **eritromicina** es un antibiótico ribosomal macrólido; tiene un efecto bacteriostático —aunque a concentraciones elevadas puede actuar como bactericida—. Al igual que el resto de los macrólidos, está formado por un anillo lactónico macrocíclico de 14 carbonos, al que se le unen por el carbono 3 un azúcar, la cladinosa, y por el carbono 14 un aminoazúcar, la desosamina (figura 1a). Actúa sobre la elongación interaccionando con el PTC (Douthwaite y Champney, 2001; Farzam *et al.*, 2021), sitio de formación del enlace peptídico de la subunidad grande que universalmente está formado por las bases conservadas del dominio V del 23S ARNr (Wilson, 2014). Específicamente, este macrólido inhibe la traducción posicionándose en el túnel de salida, bloqueando la salida del péptido naciente (Schlünzen *et al.*, 2001) (figura 1b).

La interacción entre la eritromicina y el ribosoma está mediada por el aminoazúcar y el grupo lactónico que encontramos en la estructura del antibiótico (figura 1a). El compuesto es capaz de formar puentes de hidrógeno con las bases A2058 y A2059 del PTC (numeración frente a *Escherichia coli*) (Schlünzen *et al.*, 2001). También se han descrito interacciones de este antibiótico con el dominio II del ARNr y con las proteínas ribosomales L4 y L22, que pueden participar en la interacción del antibiótico con su diana en el ribosoma (Douthwaite y Champney, 2001).

Se utiliza en clínica para infecciones comunes en las vías respiratorias como faringitis, bronquitis y neumonitis o como tratamiento combinado con sulfonamidas para infecciones como otitis y sinusitis (Washington y Wilson, 1985; Leclercq, 2002).

La **clindamicina** es un antibiótico semisintético derivado de la lincomicina, que consiste en aminoácido unido a un aminoazúcar (figura 1a). Como la eritromicina, es un antibiótico bacteriostático, pero a altas concentraciones puede actuar como bactericida. Actúa a nivel de la elongación con una ubicación próxima a la eritromicina, existiendo cierto grado de solapamiento entre ambos (Dunkle *et al.*, 2010; Spížek y Řezanka, 2004) (figura 1b). Sin embargo, la clindamicina se diferencia de la eritromicina en que actúa en un paso anterior de la elongación, ya que previene la formación del enlace peptídico bloqueando estéricamente el posicionamiento del ARNt sobre el sitio A, que se superpone con el PTC. Pese a estas diferencias, eritromicina y clindamicina comparten la interacción con las bases A2058 y A2059 de ARNr en el PTC (figura 1a) (Spížek y Řezanka, 2004).

El uso en clínica de la clindamicina es posterior al de la eritromicina, dado que surgió posteriormente como un análogo estructural de la lincomicina por sus mejores cualidades farmacológicas. Es un antibiótico cuyo espectro de actividad cubre la mayoría de bacterias Gram positivas (Rodríguez Carranza, 2015). Debido a esto, su uso en clínica es muy variado, preinscribiéndose para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones de la piel y tejidos blandos,

intraabdominales, óseas y articulares, septicemias e infecciones del tracto genital femenino (Spížek y Řezanka, 2004).

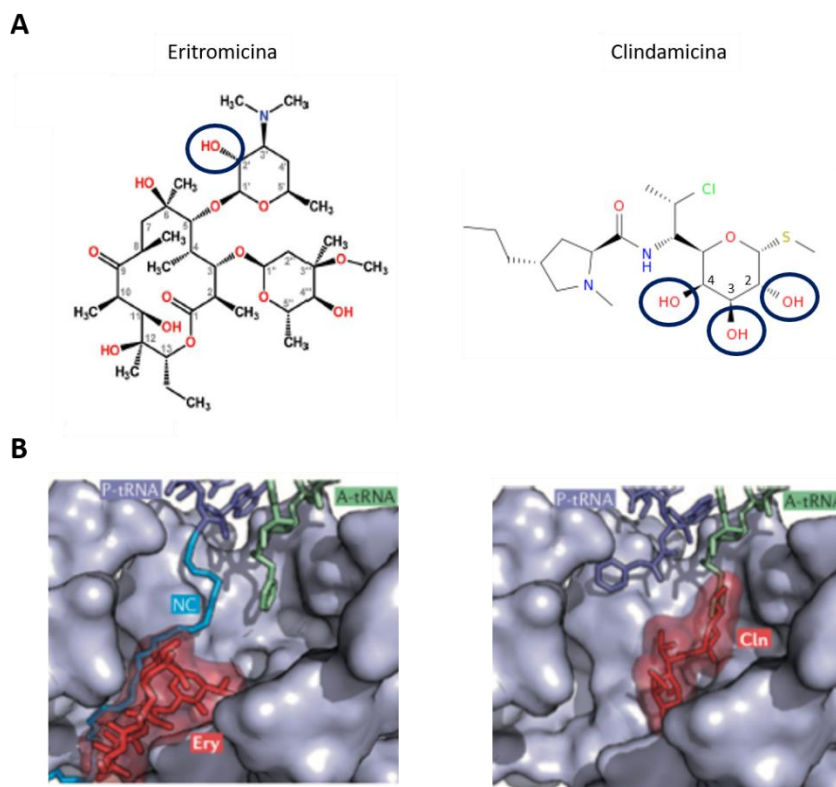


Figura 1. Estructura química de la eritromicina y la clindamicina (A), cristalografía en el ribosoma de *E. coli* de la eritromicina (izquierda) y clindamicina (derecha) y sitios de unión sobre el PTC (B). En A, se muestran las estructuras químicas de la eritromicina y la clindamicina (*Stick Model Image of Optimized Clindamycin Structure*, s. f.; Svetlov *et al.*, 2021), redondeados en azul los principales grupos reactivos de estos compuestos que interaccionan con las bases del PTC. En B, observamos que clindamicina y eritromicina están estructuralmente próximas, llegando a existir cierto grado de solapamiento. La eritromicina se posiciona en el túnel de salida ribosomal, adyacente al PTC, impidiendo el alargamiento de la cadena polipeptídica naciente (NC), mientras que la clindamicina previene la formación del enlace peptídico bloqueando estéricamente el posicionamiento del ARNt sobre el sitio A, que se superpone con el PTC (Wilson, 2014). NC, péptido naciente; Ery, eritromicina acceso PDB [3OFO-R](#); Cln; clindamicina acceso PDB [3OFX/Y/Z/0](#). Panel B, procede de Wilson *et al.* (2014).

La resistencia a eritromicina y clindamicina puede venir mediada por los mismos mecanismos moleculares, específicamente aquella generada por modificaciones de diana, debido al alto grado de solapamiento que existe entre sus zonas de unión en el ribosoma (Dunkle *et al.*, 2010; Leclercq y Courvalin, 2002). Antes de centrarnos en los mecanismos específicos de resistencia a estos antimicrobianos, haremos una breve introducción sobre la resistencia a los antibióticos y el problema que supone en la sociedad.

1.4. La resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural que se estima que pudo surgir hace 40 millones de años, junto con los primeros microorganismos del suelo productores de antibióticos (Morrison y Zembower, 2020). Este hecho se debe a que uno de los requisitos fundamentales para que un microorganismo pueda producir un compuesto con actividad antimicrobiana es la resistencia natural del mismo frente al compuesto para evitar su propia muerte (Peterson y Kaur, 2018). Por tanto, se piensa que la diseminación de los determinantes genéticos que codifican para resistencias comenzó con el intercambio de este tipo de información genética entre los organismos productores y el resto de bacterias que habitaban el suelo (Davies y Davies, 2010).

Debido a que la resistencia a los antibióticos es un proceso natural, es común que próximo a la introducción de un nuevo antibiótico en clínica, aparezcan rápidamente bacterias resistentes al nuevo compuesto (figura 2). Sin embargo, este proceso se ha visto gravemente acelerado por el uso indiscriminado de los antibióticos en diferentes actividades humanas, desde la agricultura, a la ganadería, a la práctica terapéutica (Ventola, 2015; Zhuang *et al.*, 2021).

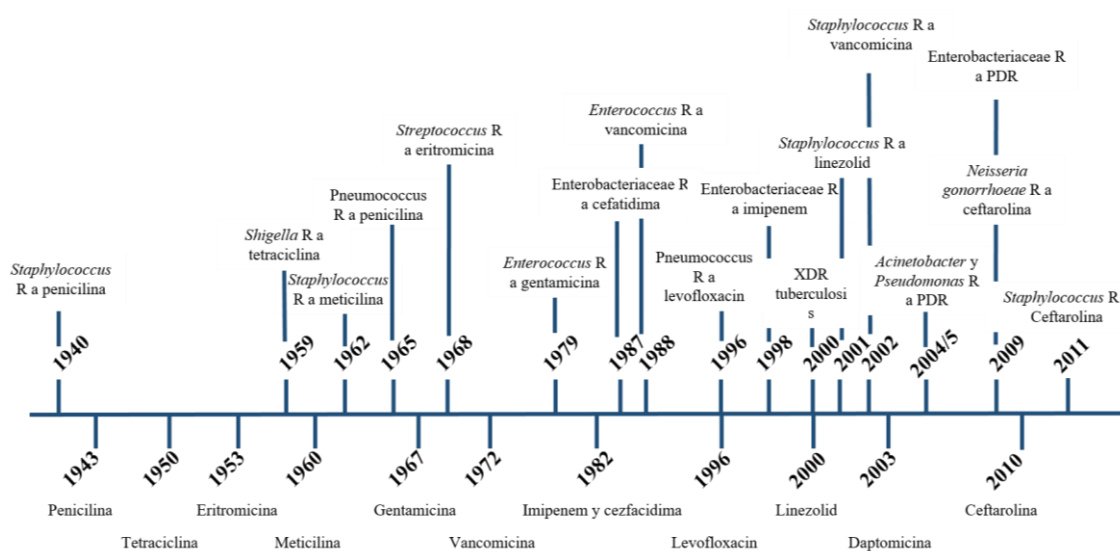


Figura 2. Cronograma sobre la introducción de un nuevo antibiótico en clínica (abajo) y aparición de la primera bacteria resistente al mismo (arriba) (Ventola, 2015). Las fechas están basadas en los primeros reportes de resistencias en la literatura, mientras que en el caso de *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, las fechas se basan en brotes y transmisiones hospitalarias. Observamos la aparición de *Staphylococcus* resistentes a penicilina (1940) incluso antes de la introducción de este antibiótico en clínica. Este hecho se debe a que se hacía un uso limitado de este antibiótico antes de 1943, hasta que se empezó a realizar un uso extensivo en clínica a partir de este año, apareciendo más bacterias resistentes. R, resistencia; XDR, resistencia extensa (susceptible a uno o dos grupos de los antimicrobianos que existen); PDR, panresistencia (resistencia a todos los antibióticos).

En agricultura, el uso descontrolado de antibióticos constituye uno de los principales reservorios naturales de intercambio de determinantes genéticos de resistencia entre las bacterias del suelo. Además, este uso intensivo contribuye a la selección y propagación de las resistencias, que se pueden distribuir

junto con los productos agrícolas o incluso a través de los agricultores que pueden actuar como vectores (Schneider, 2021).

En la ganadería, el uso masivo de antimicrobianos ha generado la transmisión de bacterias multirresistentes desde la microbiota intestinal del animal a la del consumidor, a través de la ingesta directa de alimentos procedentes del organismo tratado (Piddock, 2012; Xiong *et al.*, 2018). El uso de estos compuestos era común hasta el 2006, año en el que el uso de antibióticos para promover el crecimiento y engorde del ganado fue prohibido en la Unión Europea excepto bajo preinscripción veterinaria (*Ban on Antibiotics as Growth Promoters in Animal Feed Enters into Effect.*, 2005). A pesar de las restricciones, los datos de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) señalan que desde el 2014 España es uno de los países donde más uso se hace de los antibióticos en términos absolutos en la cría ganadera (EMA, 2021).

En la práctica terapéutica, el laxo control sobre los tratamientos antimicrobianos junto con una prescripción indebida, ha generado la exposición innecesaria de estos compuestos a los microorganismos (Vaughn *et al.*, 2021). Este tipo de prácticas pueden desencadenar a largo plazo en: 1) cambios en la expresión génica que conducen un aumento en la expresión de diferentes factores de virulencia, y 2) un incremento de mutaciones en el ADN y un aumento de los eventos de transferencia genética horizontal (TGH), contribuyendo a la diseminación de las resistencias (Viswanathan, 2014). Datos de la Unión Europea del 2007, indicaron que, tanto en atención primaria como en el ámbito hospitalario, la instauración de tratamientos inadecuados acontecía porcentajes próximos al 50% (Dellit *et al.*, 2007). También en América, en unidades de cuidado intensivo, se estimó que en torno al 30 – 60 % de las prescripciones de antibióticos no eran necesarias o eran directamente inapropiadas (Luyt *et al.*, 2014).

Debido a que la resistencia antimicrobiana amenaza tanto a la salud animal, como a la agricultura, como a la salud pública, el problema se debe tratar bajo una perspectiva global a todos los niveles: sanitario, veterinario, medioambiental y socioeconómico, una iniciativa que se conoce como One Health (McEwen y Collignon, 2018; Zhuang *et al.*, 2021). Ésta, contempla la interrelación entre salud humana, sanidad animal y medio ambiente para prevenir y abordar los problemas sanitarios a nivel local, regional, nacional y mundial como recomiendan las principales organizaciones supranacionales como la OMS. Además, propone la comunicación entre profesionales de las tres áreas para hacer frente al problema (Zhuang *et al.*, 2021).

El estudio reciente de Murray *et al.* (2022) calcula que en torno a 1,2 millones de personas mueren en el mundo debido a infecciones bacterianas. Uno de los principales avances de este trabajo es que recoge las muertes que se producen directamente por infecciones generadas por bacterias multirresistentes y aquellas muertes que se producen en pacientes con una infección, aunque ésta no sea la principal causa de muerte. Además, alerta sobre que la cifra de muertes se multiplicará por diez de aquí a 2050, incidiendo sobre la necesidad de investigar nuevos fármacos eficaces contra las bacterias multirresistentes (Murray *et al.*, 2022). Sin embargo, uno de los principales problemas sobre la

investigación de nuevos antibióticos, es que las grandes farmacéuticas no apuestan por este tipo de inversiones, debido a la elevada velocidad con la que las bacterias son capaces de volverse resistentes a estos compuestos (Demain, 2009). Por esto, la concienciación de la población sobre el buen uso de los antibióticos, junto a la búsqueda de terapias alternativas, suponen dos importantes aproximaciones para enfrentar el problema.

Una vez vista la problemática general sobre las resistencias a antibióticos, nos centraremos en los mecanismos de resistencia de los antibióticos con los que se trabajó en esta tesis, los antibióticos ribosomales.

1.4.1. Resistencia a antibióticos ribosomales

Según la manera en la que las bacterias desarrollan la resistencia a antibióticos podemos distinguir la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida. Por un lado, la **resistencia intrínseca** es aquella en la que el microorganismo es de manera natural resistente al compuesto. Por otro lado, la **resistencia adquirida**, se genera mediante mutaciones o eventos de TGH a través de plásmidos, casetes genéticos, elementos transponibles o demás elementos móviles. Este tipo de resistencia es el principal motor de diseminación de resistencias entre bacterias y, por lo tanto, la que entraña un mayor riesgo a nivel social (Allen *et al.*, 2010).

Por otro lado, si atendemos al mecanismo molecular que genera la resistencia, podemos encontrar la siguiente clasificación:

1. **Permeabilidad de membrana y bombas de expulsión.** Algunas bacterias, como las Gram-negativas y las micobacterias, presentan la resistencia intrínseca que acabamos de comentar a algunos antibióticos ribosomales como los macrólidos, por la naturaleza de su membrana externa que impide el paso al interior celular. Por otro lado, muchas bacterias portan bombas de expulsión o eflujo, que son transportadores que expulsan el antibiótico al exterior (Wilson, 2014).
2. **Mutación o modificación de diana.** Al modificar o mutar la diana el efecto conseguido es una disminución de la afinidad del antibiótico por la misma, lo que se traduce en la resistencia al compuesto (Leclercq, 2002). Es común encontrar la mutación o modificación a nivel del ARNr, dado que salvo escasas excepciones es la diana de la mayoría de los antibióticos ribosomales (Poehlsgaard y Douthwaite, 2005).
3. **Protección de la diana.** La protección de la diana es un mecanismo bien descrito en antibióticos como la tetraciclina, como son las proteínas parálogas TetO y TetM del factor de elongación de la traducción EF-G (Li *et al.*, 2013).
4. **Modificación y degradación del antibiótico.** Algunas bacterias portan enzimas que les permiten tanto modificar como degradar el antibiótico. Un ejemplo puede ser las acetiltransferasas que modifican el cloranfenicol, o las estererasas EreA o EreB que degradan el anillo macrocíclico característico de los macrólidos (Wright, 2005).

En concreto, la eritromicina y la clindamicina pueden desarrollar varios mecanismos de resistencia, aunque el más extendido en clínica es el mediado por modificación de diana (Schmitz *et al.*, 2000); específicamente, el llevado a cabo por metilación o dimetilación del N6 de la adenina en la posición A2058 en el dominio V del 23S, en el PTC (Svetlov *et al.*, 2021). Así, se genera la **resistencia de tipo MLS_B**, que recibe ese nombre ya que confiere resistencia a antibióticos Macrólidos, Lincosamidas y eStreptograminas B (Dunkle *et al.*, 2010).

1.4.2. La resistencia MLS_B: características generales y tipos según su regulación

La **resistencia MLS_B** es llevada a cabo por las metiltransferasas del tipo Erm (del inglés, *erythromycin ribosome methylases*) (Petinaki y Papagiannitsis, 2018). Las enzimas Erm actúan metilando o dimetilando las bases A2058/A2059 (numeración respecto a secuencia 23S de *E. coli*) del dominio V del ARNr 23S, en el PTC (figura 3). Esta metilación sobre las bases de ARNr, impide la formación de enlaces covalentes entre los antibióticos ribosomales y sus dianas, lo que genera que el antibiótico pierda afinidad por su diana y no se pueda unir, convirtiendo a la bacteria resistente (Schlünzen *et al.*, 2001).

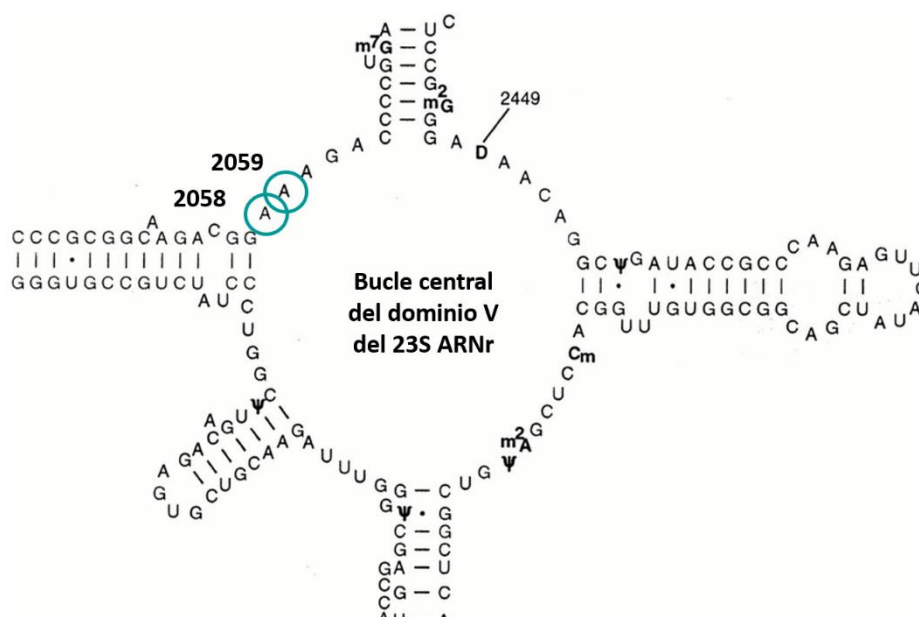


Figura 3. Secuencia y estructura secundaria del dominio V del 23S del ARNr en el PTC en *E. coli* (O'Connor *et al.*, 2001). Rodeadas por un círculo azul encontramos las bases de ARNr susceptibles de metilación por las enzimas Erm, A2058 y A2059. Modificado de O'Connor *et al.* (2001).

Según como sea la regulación de los genes *erm* se pueden generar dos tipos de resistencia MLS_B, constitutiva e inducible. Ambos tipos de regulación son fácilmente distinguibles a través de estudios fenotípicos de resistencia frente los antibióticos del grupo MLS_B. De esta forma, en una regulación de tipo constitutiva, la bacteria es resistente a todos los antibióticos de la familia MLS_B, dado que la diana está metilada de manera basal impidiendo la interacción de los antibióticos con el PTC (Leclercq, 2002). Por el contrario, en la regulación inducible, es necesaria la presencia de un antibiótico inductor de tipo

macrólido para que se genere un cambio conformacional en el ARNm que permita la transcripción del gen *erm* (Weisblum, 1995). La bacteria es en este caso resistente a los macrólidos, pero susceptible a las lincosamidas. Una resistencia de tipo MLS_B inducible se identifica en clínica al presentarse como un D-test positivo (figura 4), por la forma tan característica que adquieren estos antibiogramas.



Figura 4. Antibiograma de estafilococo con resistencia inducible a la clindamicina (D-test positivo) (Torres y Cercenado, 2010). En las proximidades al disco de eritromicina (izquierda) la bacteria presenta resistencia a clindamicina (derecha), dado que es el propio macrólido quien activa la transcripción de la metilasa que media la resistencia. En la zona alejada del disco de eritromicina, la transcripción está bloqueada y por tanto la bacteria es sensible a la clindamicina. La imagen procede de Torres y Cercenado (2010).

Por una parte, el fenotipo constitutivo MLS_B se debe a una expresión constitutiva de los genes *erm*, generado por mutaciones presentes en la región 5' UTR del gen. Esto genera que no puedan existir mecanismos riboregulatorios conocidos como atenuación de la traducción o de la transcripción.

Por otra parte, el mecanismo molecular que regula la resistencia de tipo MLS_B inducible se basa en mecanismos de atenuación de la transcripción o de la traducción. Ambos se basan en la presencia de elementos reguladores de ARN no codificantes en *cis* en las regiones 5' UTR del gen susceptible de regulación (Dar y Sorek, 2017). Los genes sometidos a esta regulación con antibióticos ribosomales, comúnmente están relacionados con funciones de resistencia a estos compuestos (Dar y Sorek, 2017). En esta tesis, nos centraremos en la regulación de las Erm metiltransferasas como *ermC*, dado que su regulación es una de las más descritas en la literatura, por aparecer en clínica en importantes patógenos como *S. aureus*, del que hablaremos a continuación. Además, la explicación de este tipo de mecanismo riboregulatorio será fundamental para entender parte del trabajo desarrollado en esta tesis.

Las secuencias de ARNm que codifican para las diferentes enzimas Erm son bicistrónicas, es decir, contienen dos secuencias codificantes sucesivas. La primera secuencia es un sORF (del inglés, *small open reading frame*) que codifica para un péptido líder o inicial. La función fundamental de este péptido, será que cuando el antibiótico esté presente en la célula, el antibiótico reconozca unos dominios específicos en su secuencia, y se una a él. Esto ocurre mientras el péptido está siendo sintetizado en el ribosoma, de tal manera que el antibiótico se une al ribosoma a través de estas secuencias de reconocimiento. La segunda secuencia codifica para el gen que va a ser el responsable de mediar la resistencia, en este caso la metilasa tipo Erm. El RBS (sitio de unión al ribosoma o del inglés, *ribosome*

binding site) de este segundo gen se encuentra en una horquilla o bucle impidiendo la unión del ribosoma y por tanto su traducción. Para que este ARNm se pueda traducir, es necesario un cambio conformacional que deshaga la horquilla y exponga el RBS. Cuando el antibiótico inductor está presente, se une al ribosoma involucrado en la síntesis del péptido líder generando un estancamiento mediante un cambio conformacional en la hebra de ARNm adyacente. Este cambio promueve la disponibilidad del segundo RBS a otros ribosomas, permitiendo la traducción del ARNm del gen *erm* (Dersch *et al.*, 2017; Mayford y Weisblum, 1990) (figura 5).

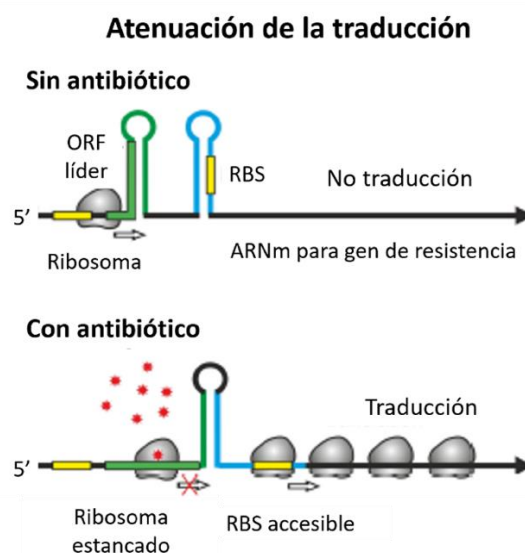


Figura 5. Regulación del gen de resistencia *ermC* inducible mediante atenuación de la traducción (modificado de Dersch *et al.*, 2017). Los genes de resistencia *erm* contienen en su región 5' UTR un sORF que codifica para un péptido líder. Mientras el ribosoma está traduciendo este péptido líder, la estructura secundaria del ARNm que le sigue es tal que imposibilita la unión del ribosoma al RBS del gen de resistencia (arriba). Cuando el antibiótico está presente (abajo), la unión del mismo al ribosoma bloquea la síntesis del péptido líder, y este estancamiento genera un cambio conformacional en el ARNm, que permite el acceso del ribosoma al RBS del gen de resistencia.

La longitud y la secuencia del péptido líder codificado por el sORF, son los principales factores que determinarán la especificidad por el antibiótico en el mecanismo riboregulador (Dar y Sorek, 2017). Hasta la fecha los principales antibióticos que se han descrito como inductores de mecanismos de atenuación son los macrólidos de 14 átomos de carbono como la eritromicina y los macrólidos de 15 átomos como la azitromicina, mientras que la capacidad de inducción de los de macrólidos de 16 átomos de carbono es menor (Leclercq, 2002). Sin embargo, las lincosamidas, como la clindamicina y las estreptograminas prácticamente carecen de esta capacidad inductora (Leclercq, 2002; Weisblum, 1995). Aparte de *ermC*, existen muchos otros genes de resistencia relacionados con antibióticos ribosomales, que se regulan mediante mecanismos de atenuación. Un ejemplo, son aquellas enzimas que median la resistencia a cloranfenicol mediante modificación del compuesto a través de acetiltransferasas (Lovett, 1996), o como la bomba de extrusión codificada por el operón *msr* (Chancey *et al.*, 2015).

Como hemos ido comentando a lo largo de este apartado, los mecanismos de atenuación regulados por antibióticos ribosomales siempre han estado ligados a genes con funciones de resistencia. En 2018 se descubre una nueva función de resistencia a los antibióticos eritromicina y lincomicina en el gen *hflX*, que previamente solo había estado asociado a la función de desensamblaje de los complejos hibernantes o ribosomas 100S en bacterias (Basu y Yap, 2017). El gen se regula mediante un mecanismo de atenuación de la transcripción y algo novedoso de este trabajo que influyó en el desarrollo de esta tesis, es que la regulación es capaz de inducirse con eritromicina y lincomicina, que como comentamos anteriormente, ésta última no se caracteriza por tener capacidad inductora (Leclercq, 2002; Weisblum, 1995). Ambos antibióticos, son capaces de reconocer los mismos dominios en el péptido líder y unirse a él—concretamente dominios RL(R/(K)— (Duval *et al.*, 2018).

Una vez comprendida la problemática de la resistencia a antibióticos, y los principales mecanismos que utilizan las bacterias para hacerles frente, específicamente a los antibióticos ribosomales, nos centraremos en el fenómeno de la dependencia y semi-dependencia a antibióticos, sobre el que se desarrolla esta tesis.

1.5. El fenómeno de semi-dependencia a antibióticos

Más allá de la preocupante evolución de la resistencia bacteriana a los antibióticos, también podemos encontrar el **fenómeno de dependencia a los antibióticos**, en el que la bacteria necesita el antibiótico para poder crecer.

Las primeras cepas dependientes se aislaron a finales de los años 40. Fueron Miller y Bohnhoff (1947) los primeros en observar este fenómeno en bacterias dependientes de estreptomina tras una exposición a elevadas concentraciones de este compuesto (Miller y Bohnhoff, 1947). Además, los autores determinaron que estas variantes dependientes perdían su virulencia en ratones si no estaban en presencia del antibiótico, indicando que el fenómeno de dependencia se mantenía tanto *in vitro* como *in vivo* (Miller y Bohnhoff, 1947). Un año después, Paine y Finland describieron el mismo fenómeno en algunos géneros bacterianos —*S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Proteus morgani*— con el mismo antimicrobiano (Paine y Finland, 1948).

Durante los años posteriores se reportaron más casos de dependencia a la estreptomina en cepas clínicas (Finland, 1955). También se definió el fenómeno de semi-dependencia para la tetramicina, aureomicina y cloromicetina —todos ellos inhibidores de la síntesis de proteínas—, en el que la bacteria no necesitaba los antimicrobianos para crecer, pero su crecimiento mejoraba con ellos (Schiøtt y Stenderup, 1953). Con el tiempo, algunos autores se centraron en generar cepas de laboratorio dependientes a otra serie de antibióticos como la eritromicina, para tratar de comprender el mecanismo molecular que las generaba (Sparlink y Blackman., 1973).

Hasta el año 1976 no se vuelve a reportar este fenómeno, esta vez en una cepa de *Staphylococcus Epidermidis* dependiente de tetraciclina (Ruhen, 1976). En los años posteriores se describe una cepa de *Neisseria pharyngis* semi-dependiente a eritromicina, clindamicina, rifampicina y tetraciclina

(Winstanley y Spencer, 1986) (figura 6), un enterococo dependiente a vancomicina (Dever *et al.*, 1995), un *S. aureus* dependiente también a vancomicina (Périchon y Courvalin, 2009), un *S. epidermidis* dependiente a linezolid (Pournaras *et al.*, 2013) y, por último, en 2015 un *S. aureus* también dependiente a linezolid (López-Hernández, 2015).

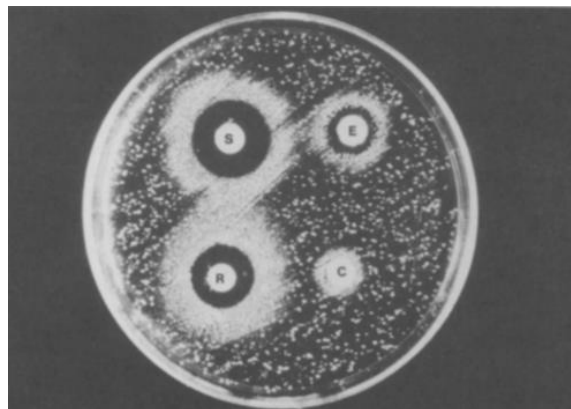


Figura 6. Fenómeno de semi-dependencia en un aislado clínico de *N. pharyngis* (Winstanley y Spencer, 1986). El aislado es capaz de crecer por toda la placa, pero presenta una mejora en su crecimiento a concentraciones específicas de estreptomicina (S), eritromicina (E), rifampicina (R) y clindamicina (C). La imagen procede de Winstanley y Spencer (1986).

A juzgar por el número de organismos diferentes en los que se ha descrito este fenómeno, la dependencia a antibióticos apunta a ser un acontecimiento evolutivo relativamente universal en las bacterias. Sin embargo, el mecanismo molecular que genera el fenómeno de dependencia se ha llegado a conocer en contadas ocasiones. En el caso de la cepa de *S. epidermidis* dependiente a linezolid (Pournaras *et al.*, 2013), la dependencia se asoció con mutaciones en el ARNr 23S y en el gen que codificaba para la proteína ribosomal L3. A falta de estudios estructurales, los autores hipotizaron con que como resultado de estas mutaciones se generaban partículas precursoras ribosomales con una conformación diferente, que las hacía ser dependientes de linezolid (Pournaras *et al.*, 2013). En el caso de los enterococos dependientes a vancomicina, la dependencia se asoció a mutaciones que generaban defectos en la síntesis de la pared bacteriana y que se veían compensadas por este antibiótico (Périchon y Courvalin, 2009). A pesar de que lo más obvio sería pensar que la causa genética de la dependencia o semi-dependencia, debía estar relacionada con mutaciones en las dianas o en los mecanismos de acción los propios compuestos que la generaban, no siempre ha ocurrido así. Es el caso de la cepa de *S. aureus* con dependencia a linezolid descrita por López-Hernández *et al.* (2015), que tras la secuenciación de todos los operones ribosomales 23S y las proteínas ribosomales diana de este antibiótico, ninguna presentaba una mutación (López-Hernández *et al.*, 2015).

Es posible que este fenómeno esté subestimado en clínica, dado que encontrar este tipo de cepas dependientes puede ser algo complicado en los cribados de los hospitales. Para facilitar su detección necesitaríamos incluir en los métodos de cultivo rutinario de diagnóstico placas suplementadas con

compuestos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos —para cepas dependientes— o la realización de antibiogramas en todos los aislados —en cepas semi-dependientes—.

2. *Staphylococcus aureus*

2.1. Generalidades

S. aureus es una bacteria Gram positiva con forma de coco, con un diámetro entre 0.5 – 1.5 μm , perteneciente al orden Bacillales, Familia Staphylococcaceae, género *Staphylococcus* (Ogston, 1882). De las 51 especies pertenecientes a este género (Rocchetti *et al.*, 2018), *S. aureus* destaca por ser la más patógena de todas ellas (Cheung *et al.*, 2021). Los miembros de este género se caracterizan por crecer juntos formando racimos, de ahí que su nombre derive del griego staphile (racimo de uvas) y kokkus (frutilla) (Ogston, 1882). Son inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos y catalasa positivos (solo las especies patógenas) (Quinn *et al.*, 2002). Además, *S. aureus* se caracteriza por ser capaz de crecer a elevadas concentraciones de cloruro sódico y presentar una elevada adaptabilidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (7- 48 °C) y pHs (4- 10) (Graham y Wilkinson, 1992).

A pesar de ser una especie patógena, es habitual encontrar a *S. aureus* formando parte de la microbiota de la piel y de las fosas nasales, y en menor proporción en garganta y tracto intestinal, siendo el humano el mayor reservorio de este microorganismo (Boucher y Corey, 2008). Hasta un 50 % de individuos adultos sanos son portadores, de los cuales, entre un 25- 30 % pueden llegar a ser portadores persistentes. Esto supone un elevado factor de riesgo para padecer una infección, dado que ante una rotura de la barrera epitelial o mucosa este microorganismo puede acceder al torrente sanguíneo y generar infecciones tales como endocarditis, bacteriemia, osteomielitis e infecciones de piel y tejido blando (Lee *et al.*, 2018).

Desde el inicio del uso de los antibióticos, este patógeno siempre ha estado asociado a la generación de resistencias hacia los diferentes compuestos a los que estaba expuesto.

2.2. Resistencia a antibióticos en *S. aureus*

En la era pre-antibiótica las muertes ocasionadas por bacteriemia por *S. aureus* superaban el 80 % (Skinner y Keefer, 1941). La introducción de la penicilina redujo drásticamente estas cifras, sin embargo, pocos años después aparecieron los primeros estafilococos resistentes a este antibiótico (Rammelkamp y Maxon, 1942). Durante la década de los 50 a medida que se iban observando resistencias, se empezaron a introducir nuevos antibióticos, pero para 1957, *S. aureus* ya era resistente a penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina (Shanson, 1981). Parte de estas resistencias fueron consecuencia de que un elemento móvil de un gran plásmido contenía genes de resistencia para múltiples antibióticos (Lowy, 2003).

2.2.1. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM)

En 1959 se vuelve a tomar el control de las infecciones por *S. aureus* debido a la introducción de la meticilina, una penicilina semisintética resistente a la acción de las betalactamasas. Sin embargo, dos años después de su introducción aparece la primera cepa de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (Jevons, 1961), a través de la adquisición de un elemento genético móvil, el *cassete mec* (SCCmec). La presencia de este elemento en el cromosoma de *S. aureus* convierte a las cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos (Katayama *et al.*, 2000), por lo que los tratamientos para patologías generadas por esta bacteria no se basan en el uso de este tipo de compuestos (Lowy, 2003).

Las cepas SARM han adquirido una especial relevancia en los ambientes hospitalarios, en lo que se conoce como cepas de SARM adquiridas en hospital (SARM-AH), dado que es un ambiente donde la presión selectiva que ejercen los antibióticos es muy elevada (Davies y Davies, 2010). Así se generan no solo cepas resistentes a los β -lactámicos, sino también a antibióticos pertenecientes a otras familias. Los portadores asintomáticos de los que hablamos anteriormente, suponen un gran foco de diseminación de estas cepas, situando a SARM como el patógeno comunitario más adquirido en infecciones nosocomiales (Beyer y Paulin, 2020). Además, la relevancia clínica de este patógeno es tal, que, en 2017, la OMS decidió incluirla en su lista de patógenos de elevada prioridad para investigar y desarrollar nuevos antimicrobianos (*La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*, 2017)

Junto al desarrollo de estas multiresistencias, *S. aureus* presenta un amplio rango de mecanismos de virulencia, desde la producción de supertoxinas a la utilización de diferentes estrategias para cronificarse en infección (Watkins *et al.*, 2012). La formación de biofilms es quizá uno de los mecanismos de cronicidad y persistencia más estudiados hasta la fecha y, aunque quizás sea algo menos descrito, la generación de poblaciones conocidas en inglés como *Small Colony Variants* (SCVs) es otro tipo de adaptación de gran relevancia que *S. aureus* es capaz de desarrollar.

3. *Small Colony Variants* (SCVs)

Una de las principales estrategias que utiliza *S. aureus* para causar infecciones persistentes y de carácter recurrente es la conversión a *Small colony variants* (SCVs). Estas poblaciones se caracterizan por presentar una tasa de crecimiento lenta, una morfología atípica y variable y un metabolismo ralentizado que altera su susceptibilidad a muchos grupos de antimicrobianos (García *et al.*, 2013). Además, suelen tener la capacidad de replicarse intracelularmente protegiéndose tanto de la respuesta inmune del hospedador como de un posible tratamiento (Tuchscherr *et al.*, 2010), lo que ha supuesto un gran reto a la hora de su identificación y de su erradicación en clínica (Kahl, 2013; von Eiff *et al.*, 2006).

Las SCVs ya se han descrito en diferentes géneros y especies bacterianas patógenas aparte de *S. aureus* —*S. epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella* (diferentes serovares), *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Brucella melitensis*, *E. coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Serratia marcescens* y *Neisseria gonorrhoeae* — (Proctor *et al.*, 2006) y

muchas de ellas, aparte de aparecer ante tratamientos antimicrobianos, surgen en respuesta a diferentes estreses como puede ser un aumento de las especies reactivas de oxígeno, un bajo pH, la presencia de péptidos catiónicos y unas condiciones nutricionales limitantes (Tuchscherer *et al.*, 2010).

En *S. aureus* poseen una elevada relevancia clínica debido a su asociación con las infecciones SARM de carácter crónico y persistente, tales como la fibrosis quística, rinosinusitis crónica, endocarditis y osteomielitis crónica (Kahl, 2010; Atalla *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2014). Además, las SCVs presentan una elevada capacidad para revertir a su cepa progenitora o *wild type* (WT), o incluso para revertir a un estado diferente al de su cepa progenitora (Loss *et al.*, 2019) alternando un estado de metabolismo ralentizado que favorece la cronicidad, a un estado metabólico más activo con un perfil de infección más virulento. Debido a la alta tasa de reversión de este tipo de poblaciones, algunos grupos de investigación generan SCVs con mutaciones estables para poder trabajar con ellas en el laboratorio (Lannergård *et al.*, 2008).

3.1. Tipos de SCVs

Las SCVs se generan por mutaciones en rutas metabólicas que afectan al crecimiento de la bacteria. En función de dónde recaiga la mutación se ha establecido una clasificación de los diferentes tipos que existen, según la auxotrofia o dependencia que presenten. Podemos encontrar dos grupos principales: 1) aquellas cuya auxotrofia está asociada a mutaciones en la cadena de electrones, y 2) aquellas timidina-dependientes por presentar mutaciones en la vía de síntesis de la timidina (Kriegeskorte *et al.*, 2015). En general todas ellas independientemente de la auxotrofia que presenten comparten características bioquímicas y fenotípicas, entre las que podríamos destacar un tamaño reducido, aproximadamente 10 veces menor al de su cepa progenitora (figura 7), ausencia de la típica pigmentación dorada de *S. aureus* y de su actividad hemolítica, prueba coagulasa negativa y una reducción en la actividad del metabolismo de los carbohidratos (Bui y Kidd, 2015; Kahl *et al.*, 2005; Proctor *et al.*, 2006; Johns *et al.*, 2015). También, se caracterizan por crecer como poblaciones mixtas, debido a la alta tasa de reversión que presentan al fenotipo WT (Kriegeskorte *et al.*, 2015). Dos de las incógnitas sobre las SCVs que a día de hoy se siguen sin resolver, son 1) la elevada tasa de reversión que presentan al fenotipo parental y 2) las similitudes bioquímicas que comparten los dos principales grupos de SCVs que se han descrito, las deficientes en la cadena de electrones y las dependientes de timidina (Proctor *et al.*, 2006).

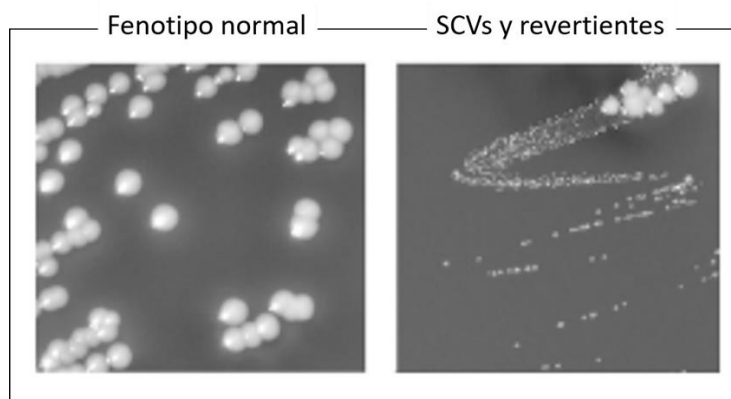


Figura 7. Fenotipo normal y de SCVs en *S. aureus* (Nguyen *et al.*, 2019). *S. aureus* cultivado durante 24 h a 37 °C en placas de Columbia sangre con el fenotipo WT a la izquierda y con el típico fenotipo SCVs donde encontramos una morfología mixta, con colonias de diferente tamaño y forma y revertientes espontáneos. Imagen modificada de Nguyen *et al.* (2019).

3.1.1. SCVs defectivas en cadena de electrones

Las SCVs defectivas en la cadena de electrones poseen mutaciones que les impiden sintetizar correctamente menadiona, tiamina o hemina, por lo que presentan una dependencia para alguno de estos compuestos. Dado que la tiamina es necesaria para la síntesis de menadiona, estas SCVs se incluyen dentro de las dependientes de crecimiento de menadiona (Dean *et al.*, 2014). Su aparición está relacionada con los tratamientos con aminoglucósidos (Dean *et al.*, 2014; Kahl *et al.*, 2016; McNamara y Proctor, 2000).

Las bacterias dependientes de menadiona son incapaces de sintetizar menaquinona mientras que las dependientes de hemina, al ser un cofactor requerido en importantes enzimas como los citocromos respiratorios, afectan directamente a su actividad (Roggenkamp *et al.*, 2004). Ambos compuestos son imprescindibles para un correcto funcionamiento de la cadena de electrones, por lo que su ausencia genera una serie de cambios metabólicos y energéticos que explican las principales características asociadas a estas SCVs (figura 8).

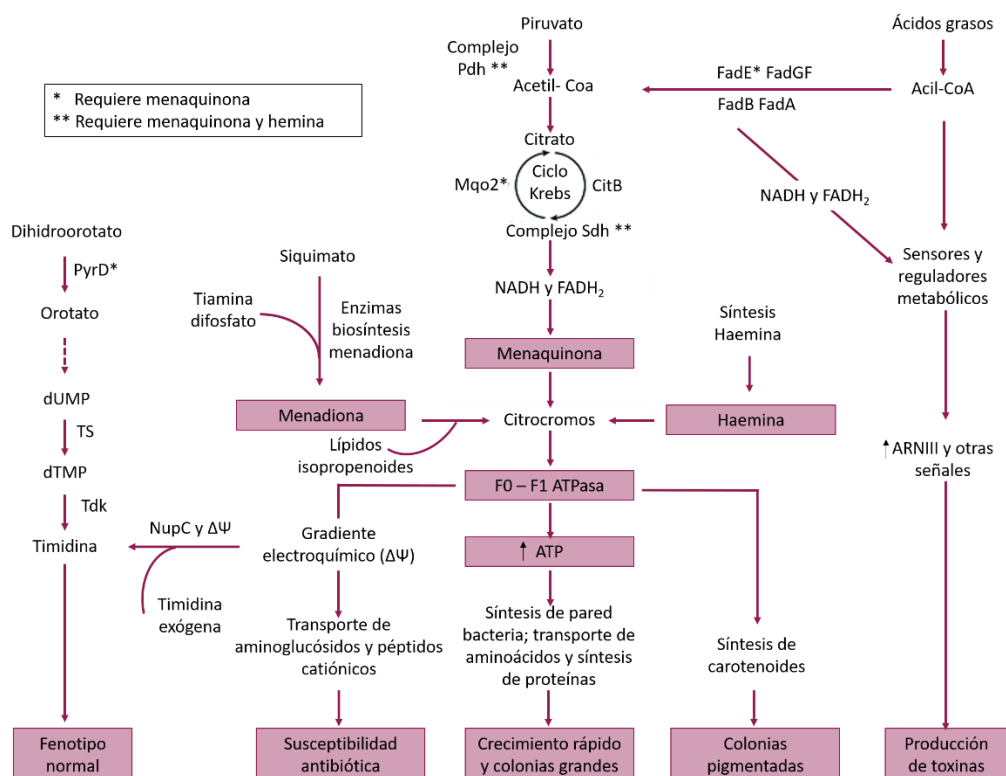


Figura 8. Vías energéticas y metabólicas asociadas las SCVs en *S. aureus* (Proctor *et al.*, 2006). Una deficiencia en la cadena de electrones supone una disminución directa de los niveles intracelulares de ATP y por lo tanto de su disponibilidad para la biosíntesis de pared celular, lo que conduce a una tasa de crecimiento más lenta, justificando el menor tamaño de las colonias SCVs. Por otra parte, la afectación de la cadena de electrones reduce el potencial de membrana ($\Delta\Psi$), generando por un parte, una disminución en la absorción de compuestos catiónicos, como son los antibióticos aminoglucósidos, por eso las SCVs deficientes en cadena de electrones suelen ser más resistentes a todos ellos, y además una disminución en la formación de pigmentos, de ahí que éstas carezcan de pigmentación. Todas las características típicas de SCVs pueden ser argumentadas por defectos en la cadena de electrones, sin embargo, hasta el momento, no se ha encontrado un link entre la regulación del ARN III y los sensores metabólicos que vinculen la cantidad de energía con una menor producción de toxinas. Muchas de las enzimas que participan en esta ruta necesitan o menaquinona o hemina o bien ambas para su funcionamiento. CitB, aconitasa; FadA, β -ketotiolasa; FadB, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; FadE, flavoproteína de transporte de electrones; FadFG, Acil-Coa deshidrogenasa; Mqo2, malato:quinona oxireductasa; NupC, proteína de toma de nucleosidos; Pdh, piruvato deshidrogenasa; Tdk, timidilato kinasa; TS, timidilato sintasa. Modificado de Proctor *et al.* (2006).

3.1.2. SCVs defectivas en síntesis de timidina

Este tipo de SCVs son dependientes de timidina al estar generadas por mutaciones en el gen *thyA*, que codifica para la enzima timidilato sintasa (TS). Esta enzima cataliza la reacción de síntesis de timidilato (dTMP), precursor de la desoxitimidina trifosfato, (dTTP), necesaria para la replicación del ADN (Kriegeskorte *et al.*, 2015). Al comprometer la replicación del ADN, el crecimiento celular se ve afectado, generando el comportamiento SCVs.

Están poblaciones están principalmente asociadas a infecciones de fibrosis quística dado que las mutaciones en *thyA* pueden surgir ante el tratamiento antimicrobiano que se les receta a estos pacientes

(Besier *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008), siendo las causantes de hasta un 17 % de las fibrosis crónicas que se identifican en clínica (Besier *et al.*, 2007). El comportamiento SCVs en fibrosis quística no es exclusivo de *S. aureus*, ya que también se han descrito en aislados clínicos de *P. aeruginosa* poblaciones de este tipo (Häußler *et al.*, 2003). Sin embargo, el mecanismo molecular que las causa no está claro, y actualmente existen varias hipótesis acerca de cómo se pueden estar generando. La mayoría de ellas giran en torno a la regulación de los niveles de di-GMP cíclico, dado que, aunque se haya comprobado que el aumento de esta molécula no es suficiente para generar SCVs, todas las poblaciones presentan un aumento en los niveles de este segundo mensajero (D'Argenio *et al.*, 2002; Simm *et al.*, 2004).

Como hemos dicho, las mutaciones en *thyA* pueden surgir ante el tratamiento antimicrobiano que los pacientes con fibrosis quística reciben, basado en una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim (referidos conjuntamente bajo las siglas de SxT) (Kahl *et al.*, 2016; Kriegeskorte *et al.*, 2015). Aunque estos compuestos no tienen una actividad directa sobre la TS, afectan al metabolismo del folato, donde interviene el principal cofactor que utiliza la TS para catalizar la reacción de síntesis del dTMP (Proctor *et al.*, 2014). En general, las SCVs dependientes de timidina suelen diagnosticarse como resistentes al tratamiento SxT. Esto se debe a que *S. aureus* en infección tiene la capacidad de liberar la timidina de las células eucariotas en las que replica a través de una termonucleasa (Proctor, 2008) e incorporarla a través del transportador NupC (Kriegeskorte *et al.*, 2014). Al recibir este aporte exógeno de timidina, el efecto de los antibióticos queda inhabilitado, al no ser necesaria la vía de síntesis endógena (Kriegeskorte *et al.*, 2015).

3.1.3. SCVs de otros tipos

Aunque las SCVs deficientes en la cadena de electrones o dependientes de timidina son las más estudiadas hasta la fecha, se han descrito SCVs de otros tipos, que, aunque en menor proporción, también han aparecido en clínica.

Por ejemplo, las SCVs de *S. aureus* dependientes de CO₂ se describieron por primera vez en 1955 (Thomas y Cowlard, 1955), aunque con el paso del tiempo se empezaron a encontrar en aislados clínicos de otras especies bacterianas (Gómez-González *et al.*, 2010; Matsumoto *et al.*, 2020; Pinto y Merlino, 2011). Sin embargo, no es hasta 2020, cuando a través del estudio de un aislado clínico de *E. coli* procedente de un hemocultivo, se asocia la dependencia a una delección en el gen *can*, que codifica para una anhidrasa carbónica (Matsumoto *et al.*, 2020).

También existen SCVs asociadas a respuestas generales de estrés como la respuesta estricta, habitualmente relacionada con situaciones de limitación nutricional. La respuesta estricta está mediada por la acumulación intracelular de la alarmona (p)ppGpp, cuya cantidad está controlada en *S. aureus* por la enzima RSH que posee actividad sintetasa e hidrolasa (Geiger *et al.*, 2010). En 2008, se describe el primer aislado clínico de SARM con comportamiento SCVs debido a una mutación en *rsh*, que genera una deficiencia en la actividad hidrolasa de la enzima. Esto genera un aumento de los niveles de (p)ppGpp, y por tanto una respuesta estricta continuamente activa. Los autores, atribuyen el crecimiento

lento directamente a los elevados niveles de (p)ppGpp y a la respuesta estricta activa en el patógeno (Gao *et al.*, 2010).

En definitiva, con los años, sobre todo en *S. aureus*, se han ido describiendo más tipos de SCVs, y, aunque éstos aparecen con menos frecuencia en aislados clínicos, su estudio supone un enorme campo de investigación, dado que en la mayoría de ellos o no se conoce la causa genética que las genera, o el compuesto que las revierte.

3.2. Representaciones clínicas relevantes de las SCVs

Las infecciones generadas por *S. aureus* con comportamiento SCVs solo se asocian a infecciones de tipo crónico. La mayoría de las SCVs, o al menos las que pertenecen a los dos grandes grupos que acabamos de describir, deficientes en la cadena de electrones y dependientes de timidina, están asociadas a osteomielitis y fibrosis quística, respectivamente (Kahl *et al.*, 2016). Debido a que el estudio de la bacteria que se hace en esta tesis procede de un aislado clínico de fibrosis quística, mencionaremos brevemente en qué consiste la enfermedad.

3.2.1. SCVs en fibrosis quística

La fibrosis quística es la principal enfermedad hereditaria autosómica recesiva causante de muerte en poblaciones de origen europeo. Aunque la causa de la enfermedad se deba a mutaciones en el gen que codifica para la proteína transmembrana CFTR, del inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, la morbilidad y la mortalidad de esta patología está principalmente ocasionada por el grado de afectación broncopulmonar que presentan los pacientes (Besier *et al.*, 2007; Blanchard *et al.*, 2019). La disfunción de CFTR genera un engrosamiento de la mucosa pulmonar imposibilitando la una correcta limpieza genera infecciones del tracto respiratorio (Blanchard *et al.*, 2019). Por lo tanto, las personas con fibrosis quística desarrollan infecciones recurrentes a lo largo de su vida; los principales patógenos bacterianos que las causan son *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *Haemophilus influenzae*, (Besier *et al.*, 2007), aunque hasta un 20-50 % de las infecciones se deben a una co-infección entre *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 2017; Camus *et al.*, 2021). Las fibrosis quísticas causadas por *S. aureus* se asocian con comportamiento SCVs frente a los NCVs (*non colony variants*) (Goss y Muhlebach 2011; Suwantararat *et al.*, 2018), dado que el principal tratamiento para esta patología es el SxT y como hemos comentando, las SCVs dependientes de timidina surgen con este tipo de tratamiento (Kriegeskorte *et al.*, 2015).

Finalmente, la relación entre las SCVs dependientes de timidina y el SxT, podría generar un debate sobre la utilización de este compuesto en fibrosis quística, dado que, a la larga, podríamos estar promoviendo el carácter crónico y persistente de la infección

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis fue determinar el mecanismo molecular responsable del fenotipo de semi-dependencia a los antibióticos ribosomales, eritromicina y clindamicina, en el aislado clínico de *S. aureus* del año 1997 (FQ-97). Los objetivos específicos para lograr el objetivo principal fueron:

1. Caracterización fenotípica del aislado clínico FQ-97 y búsqueda de posibles mutaciones responsables del fenotipo de semi-dependencia.
2. Estudio del efecto de la eritromicina sobre la estructura, estabilidad o capacidad de síntesis proteica de los ribosomas de FQ-97.
3. Estudio de la implicación de la eritromicina en la redirección de los flujos metabólicos en *S. aureus*.
4. Búsqueda del mecanismo molecular responsable del fenotipo de semi-dependencia en FQ-97: posible papel de la eritromicina como compuesto riboregulador.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas de *S. aureus* y *E. coli* empleadas en este trabajo se detallan junto a una breve descripción en las tablas 1 y 2, respectivamente. Los plásmidos, construcciones y oligonucleótidos utilizados se presentan en las tablas 3 y 4.

Cepas	ST ^a	CC ^b	Descripción ^c	Referencia/Origen ^d
BAA- 44	ST-247	CC8	Aislado clínico de fibrosis quística, SARM	NCTC, <i>S. aureus</i> , FDAARGOS_766 NZ_CP041010.1
FQ-96	ST-247	CC8	Aislado clínico de fibrosis quística del año 1996, SARM	López-Collazo <i>et al.</i> (2015)
FQ-97	ST-247	CC8	Aislado clínico de fibrosis quística del año 1997, SARM, semi-dependencia a E y CD	López-Collazo <i>et al.</i> (2015)
FQ-97_ptyA	ST-247	CC8	Aislado clínico FQ-97 que contiene el plásmido de alto número de copias pJL74-ptyA_ptyA para complementación del gen <i>thyA</i>	Este trabajo
FQ-97 _R	ST-247	CC8	Aislado clínico FQ-97 sometido a diferentes pases hasta reversión del fenotipo de semi-dependencia	Este trabajo
FQ-05	ST-247	CC8	Aislado clínico de fibrosis quística del año 2005, SARM	López-Collazo <i>et al.</i> (2015)
NE178	ST-8	CC8	Tn _{bursa} :: <i>leuA1 erm</i>	Colección NARSA (<i>Nebraska Transposon Mutant Library CSR University of Nebraska Medical Center</i> , s. f.)
RN4220	ST-8	CC8	Mutante derivado de NCTC 8325-4, cepa deficiente en sistema de restricción	Kreiswirth <i>et al.</i> (1983)
RN4220_pCN51-psarAP1-RL(R/K) <i>fdA</i> -GFP	ST-8	CC8	Cepa RN4220 que contiene la construcción pCN51-psarAP1-RL(R/K) <i>fdA</i> -GFP para determinación de un mecanismo de <i>riboswitch</i>	

RN4220_ pCN51-psarAP1-RL(R/K) rsgA-GFP	ST-8	CC8	Cepa RN4220 que contiene la construcción pCN51-psarAP1-RL(R/K) rsgA-GFP para determinación de un mecanismo de <i>riboswitch</i>	
USA300 TCH1516	ST-8	CC8	SARM- AC, aislado clínico de septicemia	Highlander <i>et al.</i> (2007)

Tabla 1. Cepas de *S. aureus* utilizadas en este estudio. ^a ST, secuencitipo o *sequence type*; ^b CC, complejo clonal; ^c SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; AC, adquirido en comunidad; E, eritromicina; CD, clindamicina; ^d NCTC, del inglés *National Collection of Type Cultures*; NARSA, del inglés *Network on Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus* es una biblioteca de mutantes de aproximadamente 2.000 genes no esenciales de *S. aureus* obtenidos por la inserción del elemento transponible Tn *bursa aurealis* (Fey *et al.*, 2013).

Cepas	Descripción/ Utilización	Referencia/Origen
DH10B	Cepa para clonaje. F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr\ hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> λ , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
BL21 gold (DE3)	Cepa para producción de proteínas recombinantes. F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB(rB-mB-)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda DE3$ (portador del gen 1 de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor PlacUV5)	Agilent
IM08	Cepa para clonaje modificada genéticamente que alberga el perfil de metilación de adeninas tipo I característico del CC8 de <i>S. aureus</i> . SA08B_PN25- <i>hsdS</i> (CC8-1) (SAUSA300_0406) de NRS384 integrado entre los genes <i>essQ</i> y <i>cspB</i>	Monk <i>et al.</i> (2015)

Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio.

Plásmido	Descripción/ Utilización ^a	Referencia/Origen
pCN51	Vector de clonaje para Gram-Positivos que contiene el origen de replicación de <i>E. coli</i> ColE1, el replicón para Gram-Positivos de bajo número de copias del plásmido pT181 <i>cop-wt-repC</i> , el promotor inducible por cadmio <i>Pcad-cadC</i> y el terminador transcripcional <i>blaZ</i> . Amp ^R , Em ^R	Charpentier <i>et al.</i> (2004)
pCN51-sarAP1-RL(R/K)fdA-GFP	Vector de clonaje que contiene el posible dominio de reconocimiento RL(R/K) de la región 5' UTR del gen <i>fdA</i> y la proteína fluorescente GFP bajo control del promotor fuerte constitutivo <i>sarAP1</i> , Amp ^R , Em ^R	Este trabajo
pCN51-sarAP1-RL(R/K)rsgA-GFP	Vector de clonaje que contiene el posible dominio de reconocimiento RL(R/K) de la región 5' UTR del gen <i>rsgA</i> y la proteína fluorescente GFP bajo control del promotor fuerte constitutivo <i>sarAP1</i> , Amp ^R , Em ^R	Este trabajo
pET15b	Vector de expresión en <i>E. coli</i> bajo control del promotor T7 inducible por IPTG, His-Tag en extremo N-terminal, Amp ^R	Calder <i>et al.</i> (1999)

pET15b -TS96	pET15b que contiene el gen <i>thyA</i> de FQ-96 clonado entre las dianas de restricción <i>NdeI/BamHI</i> , Amp ^R	Este trabajo
pET15b -TS97	pET15b que contiene el gen <i>thyA</i> de FQ-97 clonado entre las dianas de restricción <i>NdeI/BamHI</i> , Amp ^R	Este trabajo
pJL74-sarAP1-GFPmut2	Vector de alto número de copias para la expresión de genes en <i>S. aureus</i> bajo el control del promotor fuerte constitutivo <i>sarAP1</i> , Amp ^R , Em ^R	Liese <i>et al.</i> (2013)
pJL74-pthyA_thyA	Vector diseñado para la complementación en FQ-97 del gen <i>thyA</i> clonado entre las dianas <i>PstI</i> y <i>BamHI</i> , Amp ^R , Cm ^R	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos y construcciones utilizados en este estudio. ^a Amp, resistencia a ampicilina en *E. coli*; Em^R, resistencia a eritromicina en *S. aureus*; Cm^R, resistencia a cloranfenicol en *S. aureus*.

Nombre ^a	Secuencia (5'→3') ^b	Utilización ^c
ermA_F	ATGAACCAGAAAAACCTAAAGACA	Amplificación gen <i>ermA</i> para determinación MLS _{BR}
ermA_R	TTAGTGAAACAATTTGTA ACTATTGAAA	
ermB_F	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	Amplificación <i>ermB</i> para determinación MLS _{BR}
ermB_R	AGTAACGGTACT TAAATTGTTTAC	
ermC_F	TCAAAACATAATATAGATAAA	Amplificación <i>ermC</i> para determinación MLS _{BR}
ermC_R	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	
rb_EcoRI_gfp_F	GCGCGAATTCATGAGTAAAGGAGAAGA ACTT	Amplificación <i>gfp</i> para clonaje sin RBS en PCN51 desde pJL74
rb_AseI_gfp_R	AGGCGCGCCTTTATTTGTATAGTTC	
rb_sphI_sarAP1_F	GCGCGCATGCCTGATATTTTTGACTAAACCAAATGCTAACCC	Amplificación promotor <i>sarAP1</i> con cola <i>fdA</i> para PCR solapante
rb_sarAP1+fdA_R	ACAATTCCCTAATCGAACAAAATTATGCGCGATGCATCTTGCTCGATACATTTGC	
rb_fdA+sarAP1_F	ATCGGGCAAATGTATCGAGCAAGATGCATCGCGCATAATTTTGTTCGATTAGGGAA	Amplificación <i>fdA</i> con cola <i>sarAP1</i> para PCR solapante
rb_fdA+GFP_R	TCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATACTTTCCACTCCTTA ACTTTTCAATACAC	Amplificación gen <i>fdA</i> con cola <i>gfp</i> para PCR solapante
rb_GFP+fdA_F	GGTGTATTGAAAAGTTAAGGAGTGGAAAGTATGAGTAAAGGAGAAGA ACTTTTCACTG	Amplificación gen <i>gfp</i> con cola <i>fdA</i> para PCR solapante
rb_sarAP1_rsgA_R	GAAACCTCGGTACATTTACTTCAATTATATGATGCATCTTGCTCGATACATTTGC	Amplificación <i>sarAP1</i> con cola <i>rsgA</i> para PCR solapante
rb_rsgA+sa rAP1_F	ATCGGGCAAATGTATCGAGCAAGATGCATCATATAATTGAAGTAAATGTACCGAGGTTTCTATTTG	Amplificación gen <i>rsgA</i> con cola <i>sarAP1</i> para PCR solapante
rb_rsgA+GFP_R	TCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATAATGGCACCTCTCGATTAATTTTACT	Amplificación gen <i>rsgA</i> con cola <i>gfp</i> para PCR solapante

rb_GFP+rs gA_F	ATGCAGTAAAATTAATCGAGAGGTGCCATTATGA GTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCTACTG	Amplificación <i>gfp</i> con cola <i>rsgA</i> para PCR solapante	
rb_pCN51_ F	TGTGGATAACCGTATTACCGCCTTT	Chequeo construcciones en pCN51	
rb_pCN51_ R	CTCTTTCCGCAAAGGCGCC		
rplD_F	GGCTAATTATGATGTTTTAAAATTAGACG	Amplificación <i>rplD</i> para secuenciación (proteína L4)	
rplD_R	CACCTCCTCAACTTTTTTAGCA		
rlpV_F	GCGGTTGCTAGAACATAAG	Amplificación <i>rplV</i> para secuenciación (proteína L22)	
rlpV_R	GCTTCTTCTTTACCGTCACT		
rrn1_F	GCGGTGTTTTGAGAGATTATTTA	Amplificación extremo operones ARNr 23S	
rrn1_R	GCTTCATGATATACGCTTCCTTT		
rrn2_F	GCAGACGCACAGGACTTA		
rrn2_R	GATACCGTCTTACTGCTCTTCTC		
rrn3_F	AGGCCGGCAATATGTAAG		
rrn3_R	GTCGTCAAACGGCACTAATA		
rrn4_F	TGTGGACGGTGCATCTGTAG		
rrn4_R	ATCACCCGCTCCATAGATAA		
rrn5_F	GCCGATAGCTCTACCACTG		
rrn5_R	AGGTGCGATGGCAAACA		
rrn6_F	GATACCGTCTTACTGCTCTTCTC		
rrn6_R	CGTTGACATATTGTCATTCAG		
rrn1_1F	GAATTCATAAGAAATAATCGCTAGTGT		Secuenciación operón ARNr 1
rrn1_2F	TACAAAGGACGACATTAGACGAA		
rrn1_3F	CGTAGACCCGAAACCAGG		
rrn1_1R	ACCACTCCTCTTAACCTTCCAG		
rrn1_2R	TTAGGAGATGGTCCTCCAGAT		
rrn1_3R	TCTCTCGTTGAGACAGTGCC		
rrn1_4R	TTTAGCCCCGGTACATTTTCG	Secuenciación operón ARNr 2	
rrn2_1F	CCAAGCAAACCGAGTGAATA		
rrn2_2F	GGAGAACTGAAACATCTTAGTACC		
rrn2_3F	GAAGCCGATGAAGGACG		
rrn2_1R	GGCATTCCGGAGTTTGTCTG		
rrn2_23	TTTCGTGCGGGTCCGGAA		
rrn2_3R	GTCTTTCCGTCCTGTCTG	Secuenciación operón ARNr 3	
rrn2_4R	CCCTTATGCCTTTACACTCTATG		
rrn3_1F	GAATAACGTGACATATTGTATTCAGT		
rrn3_2F	ATAATCGCTAGTGTTTCGAAAGAA		
rrn3_3F	GGAGTTACAAAGGACGACATTAG		
rrn3_1R	AATCGGTGGACGGGATTC		
rrn3_2R	CTCACGTTTCAAAGGCTCCTA	Secuenciación operón ARNr 4	
rrn3_3R	GCGTACCGCTTTAATGGG		
rrn3_4R	GTCACCAGACATATGAATGTAAATT		
rrn4_1F	TTCATAAGAAATAATCGCTAGTGTTTCG		
rrn4_2F	AAGAAAATTCGATTCCCTTAGTAGC		
rrn4_3F	TAGACCCGAAACCAGGTGATCT		
rrn4_1R	TACAGTAAAGCTCCACGGGG	Secuenciación operón ARNr 4	
rrn4_2R	TCTCCCACCACGATAAGTG		
rrn4_3R	GCCGTTGGCACGACAAC		
rrn4_4R	GGAGCTTAACTTCTGTGTTTCG		

rrn5_1F	CCGAGTGAATAAAGAGTTTTAAATAA	
rrn5_2F	CCTAAGGCTAAATACTCTCTAGTGAC	
rrn5_3F	GGGAGTCAGAACATGGGT	Secuenciación operón ARNr 5
rrn5_1R	TTTGATAAACAGTCGCTTGGG	
rrn5_2R	TTCGCTACCTTAGGACCG	
rrn5_3R	GGAGCTTAACTTCTGTGTTC	
23s_DomV_F	GCGGTTCGCCTCCTAAAAG	Amplificación dominio V ARNr 23S
23s_DomV_R	ATCCCGGTCCTCTCGTACTA	
thyA_F	AGTGATAACAAAATGCTACATAAAGT	Amplificación <i>thyA</i> para secuenciación
thyA_R	GCACTTGAAAATACTATGATGTCAT	
thyA_P_spHI_F	GCGCCTGCAGCAACACATTTTATAATATTAATAAAA TGGTGTCT	Amplificación gen y promotor de <i>thyA</i> para complementación
thyA_BamHI_R	GCGCGGATCCCTACACTGCTATTGGAGCTTTTATT G	
TS_NdeI_F	GGAATTCCATATGTTGAATTCATTTGATGCAGC	Amplificación <i>thyA</i> para clonaje en pET15b
TS96_BamHI_R	CGGGATCCCTACACTGCTATTGGAGCTTTTATT	
TS97_BamHI_R	CGGGATCCCTACACTGCTATTGGAGTTTTTATTG	
q_fdA_F	GGATCGCGAAGTAGAAAGCA	qRT-PCR
q_fdA_R	AATGTGACGTTTCGTTTGCAC	
q_folA_F	CCACTACCGAATCGTCGAAATGTT	qRT-PCR
q_folA_R	TGAAAACATGGCCCGGTAGT	
q_gyrB_F	ATATTGCACAGCCACCGTTG	qRT-PCR
q_gyrB_R	CCGCTTCAATCGCATCTTCA	
q_hflX_F	GCCCTGGTCAAACGAAGTTA	qRT-PCR
q_hflX_R	TTCTACCGTCCGCAATTGAT	
q_hpf_F	TGGATTGAGAAGAAGCGGTA	qRT-PCR
q_hpf_R	CGGCGGTAAACGATACTTGT	
q_obgE_F	AAAGGTGAACCAGGTGAGGA	qRT-PCR
q_obgE_R	CTACGTTGATCAGGCGTTGA	
q_rsgA_F	TGAGCGGGAAAATGAGTTGA	qRT-PCR
q_rsgA_R	CGAACTGCTTTTCAATTGGTGT	
q_thyA_F	TGACAGATTTTCGGGCATCGT	qRT-PCR
q_thyA_R	GGATTGAAGCTTTCACGTGCT	

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. ^a F: *forward*, R: *reverse*, q, oligonucleótido utilizado para qRT-PCR; Las parejas de oligonucleótidos rrn1- rrn5 fueron diseñados por Pillai *et al.* (2002) basados en los genomas de *S. aureus* N315 (GenBank n° acceso. NC_002745), *S. aureus* MW2 (GenBank n° acceso. NC_003923) y *S. aureus* COL (*The Institute for Genomic Research Web site* [http://www.tigr.org]). Los correspondientes al par rrn6 por Prunier *et al.* (2002). ^b Las bases subrayadas indican las secuencias de ADN reconocidas por las enzimas de restricción correspondientes. ^c Determinación de la resistencia MLS_B (resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y eStreptograminas B) mediante la presencia del gen/los genes *ermA*, *ermB* o *ermC* en las cepas de estudio.

2. Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo que utilizamos para el crecimiento de *S. aureus* fueron LB (BD), MH (BD), y TSB (BD). Para *E. coli* el único medio utilizado fue LB, suplementado con ampicilina si el experimento lo requería.

En *S. aureus*, algunos de los experimentos requirieron la adición bien de agar (14 g/l), para empleo de los medios en sólido; timidina, para experimentos de auxotrofia y reversión o antibióticos, tales como SxT (trimetoprim-sulfametoxazol), SXM (sulfametoxazol), TM (trimetoprim) y ER (eritromicina), donde la concentración usada en cada ensayo se detalla en cada apartado. La composición específica de cada uno de los medios se describe en la tabla 5.

LB	MH	TSB
Triptona (digerido pancreático de caseína) 10g	Extracto de carne bovina 3g	Triptona (digerido pancreático de caseína) 17g
Extracto de lavadura 5g	Hidrolizado ácido de caseína 17,5g	Digerido péptico de harina de soja 3g
		Glucosa 2,5g
Cloruro de sodio (NaCl) 5g	Almidón 1,5g	Cloruro de sodio (NaCl) 5g
		Fosfato de dipotasio 2,5g

Tabla 5. Medios y composición en g/l utilizados para el crecimiento de *S. aureus*.

La mayoría de las curvas de crecimiento realizadas en el transcurso de este proyecto, salvo indicación, compartieron las siguientes características: inicio del cultivo a una $DO_{600} = 0,05$ a partir de biomasa obtenida desde placa sólida, 37 °C, 200 rpm, aireación 1:5 y el tiempo requerido según el objetivo a alcanzar. Los ensayos en medio sólido los utilizamos sobre todo para la caracterización fenotípica, por eso, las condiciones de cultivo, tiempo y temperatura que empleamos en cada experimento se especifican en el apartado 3. Caracterización fenotípica.

3. Caracterización fenotípica

3.1. Caracterización de FQ-97 como posible SCVs

Para la caracterización del posible comportamiento SCVs en FQ-97 sembramos la bacteria en los medios descritos en tabla 5 y evaluamos la presencia o no de una heteropoblación y una posible auxotrofia a timidina.

3.1.1. Pruebas de auxotrofia

La mayoría de SCVs descritas en clínica suelen deberse a mutaciones de genes implicados en la cadena de electrones o en la síntesis de timidina (Kahl, 2014), presentando diferentes auxotrofias según la mutación. En nuestro caso, solo determinamos si FQ-97 presentaba auxotrofia a timidina. Para ello realizamos pruebas de suplementación e impregnamos discos *whatman* con timidina (1 mg/ml)

(Norström *et al.*, 2007) que depositamos sobre placas de MH. Dejamos incubar durante 16 h a 37 °C y esperamos ver si se producía un efecto en el crecimiento.

3.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana mediante antibiograma

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) en cada una de las cepas de *S. aureus* usamos el sistema de difusión en agar E-test (Liofilchem) (Farrell *et al.*, 2017). Sembramos la cepa de estudio a una $DO_{600} = 0,01$ en MH suplementado con diferentes antibióticos, según el objetivo del estudio. Realizamos una siembra en césped mediante hisopo y una vez que la placa estaba seca depositamos la tira comercial impregnada con el antibiótico (Liofilchem). Posteriormente incubamos la placa en posición invertida a 37 °C durante 16 h. Transcurrido ese tiempo evaluamos la zona de inhibición, considerando como CMI el punto más bajo del halo que presentaba crecimiento (figura 9). Basándonos en los criterios de interpretación de resultados de CLSI (CLSI, 2018) determinamos mediante el valor de CMI si cada cepa era resistente/sensible al antibiótico probado. Siguiendo el mismo protocolo también realizamos antibiogramas en medios como LB y TSB, aunque no para la determinación de la CMI, sino para la caracterización del fenotipo de semi-dependencia.

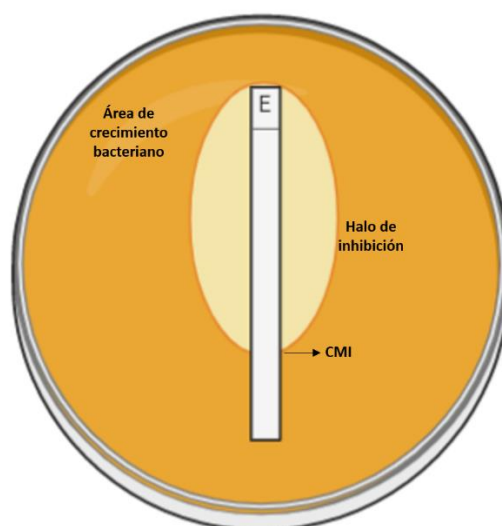


Figura 9. Esquema antibiograma mediante E- test. Se considera CMI al punto de la elipse que intercepta con la tira.

3.3. Caracterización del fenotipo de semi-dependencia

La caracterización del fenotipo de semi-dependencia se realizó a diferentes niveles.

3.3.1. Estabilidad del fenotipo de semi-dependencia y heteropoblacional

Determinamos la estabilidad del fenotipo de semi-dependencia y heteropoblacional a través de las diferentes condiciones y aproximaciones que detallaremos a continuación.

- **En placa:**
 - Desde placas de MH. Realizamos pases secuenciales entre placas de MH y determinamos el número de pases a partir del cual se mantenía o se perdía el fenotipo heteropoblacional. En paralelo a cada pase, realizamos antibiogramas con eritromicina y clindamicina para primero, establecer si existía una relación entre ambos, y segundo, para evaluar también la estabilidad del fenotipo de semi-dependencia.
 - Desde el halo de semi-dependencia en placas de MH. Realizamos un primer antibiograma y desde éste dividimos las colonias en dos tipos, aquellas que se encontraban en el interior del halo, bajo la influencia del antibiótico y que crecían mejor, y aquellas que habían crecido más lentas en los laterales de la placa. Hicimos un nuevo antibiograma a cada subtipo de colonia, y determinamos si el hecho de haber estado con/sin el antibiótico afectaba para mantener o perder el fenotipo de semi-dependencia.
- **En líquido:** realizamos curvas de crecimiento con y sin eritromicina (50 µg/ml) y recogimos muestras a diferentes tiempos (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h y 48 h). Realizamos un antibiograma a eritromicina a cada una de ellas, ajustando previamente la DO₆₀₀ a 0,01 y determinamos si el fenotipo de semi-dependencia se perdía o se mantenía según el tiempo que las cepas hubieran estado creciendo en medio líquido.

3.3.2. Efecto de la eritromicina sobre el número de UFC

Conocida la capacidad de la cepa FQ-97 para crecer mejor en presencia de eritromicina, determinamos si su retirada le suponía un problema en el crecimiento. Como suspensión inicial del ensayo utilizamos bacterias crecidas en placas de MH o MH + ER 50 µg/ml. Resuspendimos la biomasa obtenida de cada una de las condiciones en PBS 1X y, tras ajustar la DO₆₀₀ a 6, analizamos la capacidad de crecimiento través del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Las condiciones que estudiamos fueron las siguientes:

- Bacterias procedentes de MH sembradas en MH.
- Bacterias procedentes de MH sembradas en MH + ER 50 µg/ml.
- Bacterias procedentes de MH + ER 50 µg/ml sembradas en MH.
- Bacterias procedentes de MH + ER 50 µg/ml sembradas en MH+ ER 50 µg/ml.

Mediante la cuantificación de UFC, evaluamos: 1) la ventaja que suponía la presencia de la eritromicina a la cepa FQ-97 y 2) si existían defectos de crecimiento al retirarle el antibiótico que le había supuesto una ventaja.

4. Técnicas de ADN

La manipulación de ADN y las técnicas de biología molecular realizadas en esta tesis se realizaron siguiendo los protocolos establecidos por Green y Sambrook (2012).

Las enzimas de restricción, la Pfu polimerasa y la T4 ligasa fueron suministradas por New England Biolabs, todas ellas se utilizaron atendiendo a las especificaciones de la casa comercial. Los fragmentos de ADN se purificaron con los kits NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit y NucleoSpin® Plasmid Miniprep kit de Macherey-Nagel.

4.1. Extracción de ADN cromosómico en *S. aureus*

Para la extracción de ADN cromosómico de *S. aureus* utilizamos el Minikit de ADN genómico PureLink™ (Invitrogen) siguiendo el protocolo salvo modificaciones en el apartado de rotura que se indican a continuación.

Partimos de biomasa obtenida de placas de MH que resuspendimos en PBS 1X con 1 mg/ml de lisostafina (Ambi Products Lawrence) y la incubamos a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, añadimos 20 µL de proteinasa K (stock 20 mg/ml), 20 µL de RNasa A K (stock 20 mg/ml) y purificamos y limpiamos el material genético siguiendo las indicaciones del protocolo. Cuantificamos el ADN genómico mediante absorbancia a 260 nm en un nanodrop ND-1000 spectrophotometer. Para evaluar la calidad cargamos 5 µl de la muestra en un gel de agarosa 0,8 % (p/v).

Parte del ADN genómico de la cepa FQ-97 la destinamos a la secuenciación *de novo* del genoma, posterior ensamblaje y análisis de los SNPs, mientras que la otra parte la utilizamos para secuenciación por Sanger o generación de construcciones genéticas en el laboratorio.

4.2. Secuenciación genómica

4.2.1. Secuenciación de los operones de ARNr 23S

Los operones de ARNr 23S de FQ-97 se secuenciaron por el método *primer walking* (Fraser y Fleischmann, 1997). Inicialmente, amplificamos los extremos de cada operón para cuantificarlos y diferenciarlos. Este primer par de cebadores generó el primer ADN molde sobre el que trabajar. Después, secuencialmente generamos más oligonucleótidos en base a las secuencias que obteníamos. Los posibles huecos que iban quedando se rellenaron mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación del nuevo amplicón hasta tener un solapamiento absoluto de todos los fragmentos generados. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 2. Realizamos este método dado que la secuenciación masiva no permite resolver regiones multicopia en el genoma con una alta homología, como es el caso de los operones ARNr 23S en *S. aureus*.

4.2.2. Técnicas de secuenciación masiva

Se realizó una secuenciación del genoma de FQ-97, ensamblaje del mismo y análisis de los SNPs frente a su estirpe progenitora FQ-96 (GCA_000496095.1), secuenciada y ensamblada previamente por el Hospital Ramón y Cajal (López-Collazo *et al.*, 2015). Es importante mencionar esta publicación dado que es en este estudio donde se nombra por primera vez la cepa FQ-97 de estudio en esta tesis. Particularmente, en esta publicación evalúan los cambios genéticos acontecidos entre la primera cepa aislada en el año 1996 y el último aislado que recuperan en el año 2009 de un paciente con fibrosis quística, y cómo influyen estos cambios genéticos en diferentes factores de inmunidad.

Para generar la librería se utilizó la tecnología Illumina Hiseq 4000 generando una librería fragmentos de 150 pares de bases por ambos extremos (secuenciación de extremos pareados). La secuenciación fue realizada por la empresa Genoma4U.

Aparte, hicimos otra ronda de secuenciación masiva con la empresa inglesa MicrobesNG. En este caso, se enfrentaron los genomas correspondientes a FQ-97 y FQ-97 revertiente (FQ-97_R) al de FQ-96, y se estudiaron aquellos SNPs exclusivos de FQ-97_R. FQ-97_R fue una cepa que tras sucesivos pases en placa había perdido el fenotipo de semi-dependencia con antibiótico de manera definitiva. Para generar la librería de fragmentos se utilizó la tecnología Illumina Miseq.

Tanto el ensamblaje de las lecturas obtenidas, como la determinación de los SNPs, fue llevado a cabo por el servicio de Bioinformática del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), por el Doctor Juan Carlos Oliveros.

5. Construcción de cepas modificadas genéticamente

La preparación de células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B y BL21 y su transformación la realizamos siguiendo los protocolos descritos por Green y Sambrook (2012), así como la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* IM08.

5.1. Construcción de variantes de la timidilato sintasa en pET15B

Clonamos la TS de FQ-96 y FQ-97 en el plásmido de sobreexpresión pET15B entre las dianas de restricción *NdeI/BamHI*. Amplificamos el gen *thyA* desde ADN genómico de FQ-96 (TS_*NdeI*_F, TS96_*BamHI*_R) y FQ-97 (TS_*NdeI*_F y TS97_*BamHI*_R). Digerimos los fragmentos obtenidos, así como el plásmido receptor pET15B con *NdeI* y *BamHI*, ligamos toda la noche con la T4 ligasa a 16 °C y transformamos en células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B. Plaquemos en LB + 100 µg/ml AMP y seleccionamos los clones positivos mediante PCR de colonia. Chequeamos las construcciones mediante el servicio de secuenciación de Macrogen y transformamos en *E. coli* BL21 gold para producir las proteínas tal y como se detalla en el apartado 7 de material y métodos.

5.2. Construcción para la complementación del gen *thyA* en pJL74

Para complementar el gen *thyA* en FQ-97 transformamos FQ-97 con el plásmido de alto número de copias pJL74-*pthyA_thyA* desde cepas de *E. coli* IM08. Este tipo de cepas permiten transformar cepas clínicas de *S. aureus* directamente porque imitan el sistema de restricción del CC8, impidiendo el reconocimiento de ADN exógeno por parte de la cepa receptora (Monk *et al.*, 2015).

Para ello, amplificamos mediante PCR el gen *thyA* junto a su promotor nativo mediante los oligonucleótidos indicados en la tabla 3 (*thyA_P_SphI_F* y *thyA_BamHI_R*) e insertamos el fragmento resultante en el plásmido pJL74 entre las dianas de restricción *PstI/BamHI*.

Posteriormente transformamos en *E. coli* IM08, extraíamos el plásmido y de nuevo transformamos en FQ-97 tal y como se detallará a continuación. Comprobamos mediante extracción de plásmido (previa incubación con 1 mg/ml lisostafina durante 30 min a 37 ° C para romper la pared de FQ-97) los clones positivos.

5.3. Construcciones con el plásmido reportero pCN51-*sarAP1*-RL(R/K)-GFPmut2

Para determinar la existencia de un dominio regulatorio RL(R/K) y por tanto un mecanismo riboregulatorio en determinados genes de FQ-97, construimos un plásmido reportero con la proteína fluorescente GFP, bajo el promotor constitutivo de *S. aureus sarAP1*, procedente del plásmido pJL74 (Liese *et al.*, 2013) y lo clonamos en el plásmido de bajo número de copias pCN51 (~20 - 25 copias/célula) (Charpentier *et al.*, 2004). Estas construcciones se realizaron a través de PCRs solapantes (figura 10), que consistían fundamentalmente en que aquellos fragmentos que queríamos solapar, les introducimos o bien una cola en el extremo 5' o en el extremo 3' de aproximadamente 30 pares de bases, para establecer una homología de secuencias y poder fusionar fragmentos.

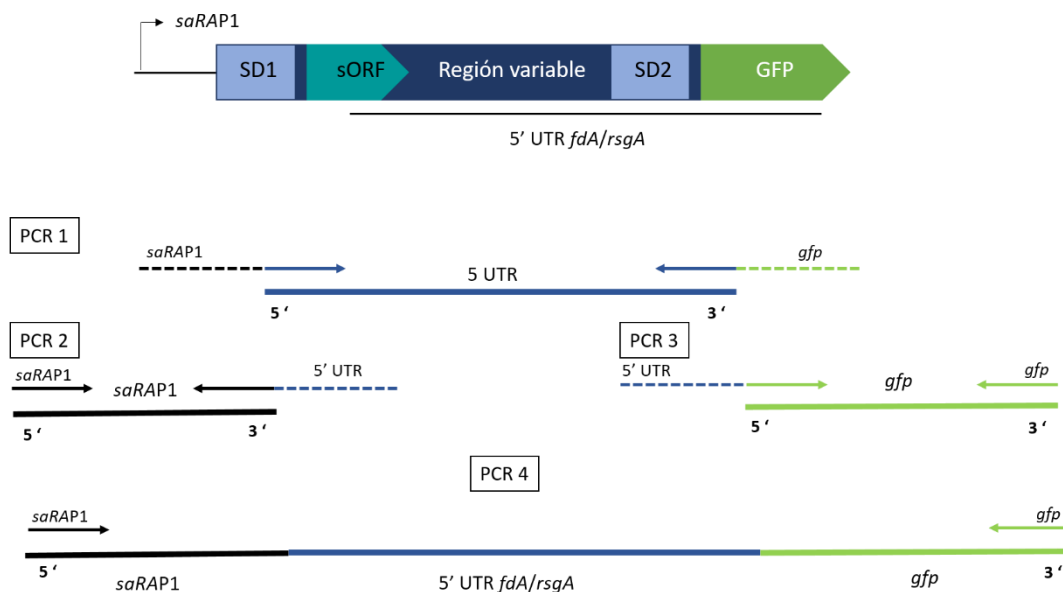


Figura 10. Protocolo seguido de PCRs solapantes para obtener la construcción final y evaluar un posible mecanismo riboregulatorio en los genes *rsgA* y *fdA*. En la PCR 1 amplificamos las regiones 5' UTR de *fdA* y *rsgA* e introducimos extremos solapantes para el promotor *sarAP1* y para *gfp*. En la PCR

2 amplificamos el promotor *sarAP1* con una cola solapante para la región 5' UTR de *fdA* y de *rsgA*. En la PCR 3 amplificamos *gfp* con una cola solapante para el extremo 3' de *fdA* y *rsgA*. Realizamos la PCR final 4 con cada uno de los fragmentos obtenidos. Arriba se ilustra el fragmento final perseguido.

Siguiendo el protocolo planteado (figura 10), la última PCR solapante la realizamos con 250 ng de cada uno de los fragmentos obtenidos. Clonamos el fragmento resultante en el plásmido pCN51 mediante las enzimas de restricción *SphI* y *AscI* y transformamos en la cepa *E. coli* DH10B. Tras comprobar su secuencia, transformamos en *S. aureus* RN4220.

5.4. Transformación de células de *S. aureus*

5.4.1. Preparación y transformación de células electrocompetentes de RN4220

Para la preparación de células electrocompetentes de *S. aureus* RN4220 partimos de un preinóculo O/N que posteriormente diluimos en TSB a $DO_{600}=0,05$. Una vez el cultivo alcanzó la densidad de 0,2 – 0,25 recogimos las células por centrifugación, lavamos y concentramos secuencialmente con sacarosa fría 0,5 M (1- 0,25- 0,1- 0,05 v). Almacenamos las células competentes resultantes en alícuotas de 100 μ l – 80 °C hasta su uso.

Transformamos mediante electroporación a 8 kV con 1 μ g de ADN plasmídico de las diferentes construcciones en pCN51 (tabla 3), que procedían de *E. coli* DH10B. Las cepas de *S. aureus* RN4220 carecen de sistema de restricción por lo que se pueden electroporar de manera directa sin pasar por cepas de *E. coli* con un sistema de restricción especial. Incubamos en 1 ml de TSB durante 1 h a 37 ° C 200 rpm y finalmente sembramos en placas de TSB + antibiótico de selección correspondiente a 37 °C O/N.

5.4.2. Preparación y transformación de células electrocompetentes de FQ-97

Para la preparación de células electrocompetentes de FQ-97 seguimos el protocolo establecido por Penewit y Salipante (2020) utilizando medio MH en vez de BHI (Penewit y Salipante, 2020).

Partimos de un cultivo de 150 ml a una DO_{600} de 0,05 en MH, que dejamos creciendo hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. En ese momento paramos el crecimiento enfriando los cultivos a 4 °C 15 min. Dividimos el cultivo inicial en 4 tubos de 50 ml y centrifugamos las células a 4.600 x g durante 10 min a 4 ° C y volvimos a juntarlas en un único tubo. A la misma velocidad y temperatura realizamos 3 lavados con 30 ml de agua fría estéril, y 2 lavados con 30 ml de glicerol frío estéril al 10 %. Posteriormente, centrifugamos a 5.000 x g durante 1 min a RT, y resuspendimos en 50 μ l de glicerol 10 % con 500 mM sacarosa para electroporar a 1,8 kV con 5 μ g del plásmido pJL74-*pthyA*_thyA extraído desde *E. coli* IM08. Tras la transformación, replicamos durante 2h en MH + 500 mM de sacarosa. Sembramos en placas de MH + Cm 10 μ g/ml a 37 ° C y dejamos crecer durante 48-72 h. En el caso de no utilizar las células el mismo día, las almacenamos a -80 ° C en alícuotas de 50 μ l en glicerol 10 %.

6. Técnicas de ARN

6.1. Extracción de ARN de *S. aureus*

Realizamos la extracción de ARN de *S. aureus* con el kit *RNeasy*® Mini Kit (Quiagen) siguiendo los pasos señalados en el protocolo exceptuando el método de rotura de la pared bacteriana. Se ensayaron diferentes condiciones, pero los resultados que se ilustran en esta tesis corresponden a una extracción de ARN desde placa, donde recogimos la biomasa desde placas de MH que llevaban incubándose a 37 °C durante 16 h. Después ajustamos la DO₆₀₀ a 6 e incubamos durante 1 h en MH en presencia o no de eritromicina (50 µg/ml), 37 °C, 200 rpm con aireación 1:5. Elegimos esta condición dado que había suficiente biomasa, el ARN no estaba degradado y conocíamos que el fenotipo no se perdía tras incubarlo 1 h en MH. Incubamos en eritromicina 1 h para poder determinar el posible efecto regulatorio generado por el antibiótico. Centrifugamos los cultivos a 11.000 x g 4 °C 15 min y con las células preparamos una suspensión en PBS 1X que incubamos a 37 °C durante 15 min con 1 mg/ml de lisostafina. Posteriormente, seguimos las instrucciones de limpieza y purificación del ARN tal y como se detallan en el kit.

Para eliminar los posibles residuos de ADN, tratamos durante 1 h a 37 °C con DNasa con el kit TURBO DNA-free™ (ThermoFisher).

Una vez extraído el ARN, cuantificamos mediante absorbancia a 230 nm (Nanodrop) y comprobamos la calidad e integridad del mismo cargando 5 µl en gel de agarosa 0,8 % (p/v) esperando ver las bandas correspondientes al ARNr.

6.2. Retrotranscripción acoplada a PCR (RT-PCR)

Utilizamos el kit High-Capacity cDNA-Reverse Transcription (ThermoFisher) para la conversión de 1.000 ng de ARN a ADNc. La reacción fue la siguiente:

Extensión	10 min, 25 °C
Síntesis de ADNc	120 min, 37 °C
Terminación	5 min, 85 °C

Tabla 6. Protocolo reacción retrotranscripción.

Utilizamos el ADNc obtenido como molde en las reacciones de PCR a tiempo real o qPCR.

6.3. PCR en tiempo real (qPCR)

Con el objetivo de evaluar los niveles de transcripción de diferentes genes en presencia o no de eritromicina llevamos a cabo experimentos de qPCR (Bustin & Mueller, 2005). Para cuantificar la fluorescencia utilizamos la sonda *SYBR Green* por su capacidad para unirse al ADNc naciente y detectar el producto de PCR conforme se acumula durante la PCR.

Cada reacción contenía un total de 20 µl de los siguientes compuestos:

Master Mix SYBR® Green PCR	12,5 µl
100 µM oligonucleótido <i>forward</i>	0,2 µl
100 µM oligonucleótido <i>reverse</i>	0,2 µl
Agua milliQ	7,1 µl

Tabla 7. Mix de la reacción de qRT.

Distribuimos las reacciones en una placa óptica de 96 pocillos MicroAmp™ (Applied Biosystems) junto con 5 µl de diferentes concentraciones de ADNc en cada pocillo. Utilizamos tres réplicas biológicas independientes y ejecutamos cada reacción por triplicado (réplicas técnicas). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 2. Para las qPCR utilizamos un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Cada ciclo consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, un segundo paso de hibridación durante 30 s y para finalizar una etapa de elongación a 60 °C durante 1 min. Determinamos la cantidad relativa de ARNm para cada gen siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001) usando los niveles del ARNm del gen *gyrB* como control interno. Para la obtención de los datos utilizamos el Software 7500 v 2.0.6.

7. Técnicas de proteína

7.1. Obtención de extractos proteicos en *S. aureus* y *Western blot*

Realizamos la obtención de extractos proteicos en FQ-96, FQ-97 y *S. aureus* RN4220 con distintas finalidades. En el primer caso, para la obtención de extractos proteicos en FQ-96 y FQ-97, recolectamos biomasa desde placas de MH que habían estado incubándose a 37 °C durante 16 h. Ajustamos la DO_{600} e incubamos a 37 °C durante 1 h nuevamente en MH con y sin eritromicina 50 µg/ml —para poder determinar el posible cambio que la eritromicina estaba generando— a 200 rpm aireación 1:5. Transcurrido el periodo de incubación, lavamos las células con PBS 1X a 4 °C y 11.000 x g. Resuspendemos en el mismo tampón e incubamos a 37 °C durante 30 min con 1 mg/ml de lisostafina. Posteriormente, añadimos bolas de vidrio (Sigma-Aldrich, 5mm) para romper en un 2010 Geno/Grinder® (ThermoFisher) a 7500 rpm 2,5 min durante 4 ciclos. Para eliminar las células que no se rompieron centrifugamos durante 15 min a 11.000 x g a 4 °C dos veces. Determinamos la concentración total de proteína mediante el método Bradford (Bradford, 1976) usando una recta de calibrado obtenida con albúmina de suero bovino (ASB) como patrón.

En los extractos proteicos de las cepas de *S. aureus* RN4220 que contenían las diferentes construcciones del plásmido reportero pCN51, el protocolo fue ligeramente diferente, dado que trabajamos directamente desde placa. La biomasa se obtuvo desde placas de MH y MH + 50 µg/ml de eritromicina. En el caso de las células crecidas solo en MH, nos aseguramos que el plásmido pCN51 —cuyo antibiótico de selección es la eritromicina— no se perdía, realizando un conteo de UFC en MH con y sin eritromicina al día siguiente. Posteriormente, ajustamos la DO_{600} y preparamos una suspensión en PBS 1X. En este caso, solo rompimos las células con lisostafina 1 mg/ml durante 30 min a 37 °C.

Con los extractos proteicos obtenidos en FQ-96 y FQ-97, analizamos mediante *Western blot* (Green y Sambrook, 2012) la producción de la proteína HPF en las cepas y el patrón de oligomerización de la misma (solo en FQ-97). El anticuerpo anti-HPF fue cedido por el laboratorio de Mee-Ngan F. Yap en el Departamento de Bioquímica y Medicina molecular de la Universidad de Saint Louis (USA). Mientras que con los extractos proteicos obtenidos desde *S. aureus* RN4220, también mediante *Western blot*, comparamos la cantidad de GFP producida en ausencia/presencia de eritromicina para determinar un posible mecanismo riboregulador, con el anticuerpo policlonal anti- GFP (1:10.000).

7.2. Extracción y purificación de ribosomas en FQ-96 y FQ-97

Para la extracción y purificación de ribosomas seguimos el protocolo establecido por Basu y Yap (2016) con ligeras modificaciones. Para empezar, crecimos las bacterias en placas de MH durante 16 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, recogimos biomasa y resuspendimos en PBS 1X a una DO_{600} de 6. Incubamos a 37 °C durante 1 h en MH líquido, con y sin eritromicina (50 µg/ml) a 200 rpm, aireación 1:5. Posteriormente, lavamos las células con el tampón A, las pesamos y resuspendimos a una concentración de 0,5 g de células / ml en el tampón B (tabla 8). Para romperlas, congelamos la solución celular en nitrógeno líquido y pulverizamos en un Geno/Grinder® 2010 (Thermofisher) a 7 500 rpm 2,5 min repitiendo la operación 4 veces. Centrifugamos el lisado $20.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C y volvimos a centrifugar a $21.000 \times g$ a 4 °C durante 10 min para eliminar el resto de componentes celulares residuales.

Para eliminar los factores asociados a los ribosomas, preparamos una solución 1:1 (v/v) de lisado y tampón AS 2X (tabla 8) e incubamos a 4 °C en rotación durante 1 h. Cargamos la mezcla en un colchón de sacarosa 1 M disuelto en el tampón AS 1X en un rotor 90 Ti (Beckman) a 4 °C y $435.000 \times g$ durante 30 min. Resuspendimos el extracto crudo total que se encontraba en pellet y en $\frac{1}{4}$ del volumen inicial utilizado del tampón B.

Tampón A	Tampón B	Tampón C	Tampón AS 2X
HEPES 20 mM pH 7,5	HEPES 20 mM pH 7,5	20 Mm HEPES pH 7,5	HEPES 40 Mm pH 7,5
MgOAc 14 mM	MgOAc 14 mM	MgCl2 10 mM	MgOAc 28 mM
KOAc 100 mM	KOAc 100 mM		KOAc 1M
PMSF 0,5 mM	PMSF 0,5 mM	NH ₄ Cl 100 mM	EDTA 1 mM
β mercaptoetanol 6 mM	1 mM DTT		

Tabla 8. Composición y concentraciones de los tampones utilizados para la purificación de ribosomas.

Determinamos la concentración de ribosomas totales con un espectrofotómetro NanoDrop mediante la relación $1 \text{ Abs}_{260} = 23 \text{ pmol} / \text{ml ribosoma } 70\text{S}$ (Spedding, 1990). En el caso de no utilizarlos al momento, los almacenamos a - 80 °C.

7.3. Ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa

7.3.1. Generación de perfiles ribosomales y determinación de HPF

La última parte de la generación de perfiles ribosomales comprendió la ultracentrifugación en gradientes de densidad. Los gradientes de sacarosa continuos sometidos a una ultracentrifugación diferencial permite separar las diferentes subunidades ribosomales presentes en un extracto crudo ribosomal. Para estandarizar la cantidad de ribosomas cargados en cada gradiente y posteriormente hacer medidas comparativas precisas, en cada perfil cargamos siempre 10U de Abs₂₆₀ (1 Abs₂₆₀ = 23 pmol/ml ribosoma 70S). A través de gradientes de sacarosa 5-25 % (p/v) preparados en tampón D (tabla 8), generados con un BioComp Gradient Master (BioComp) y una ultracentrifugación a $210.000 \times g$ a 4 °C en un rotor SW41 durante 15,5 h separamos las diferentes fracciones ribosomales según su coeficiente de sedimentación, determinado por su tamaño, distribuyéndose de manera diferencial a lo largo del gradiente (figura 11).

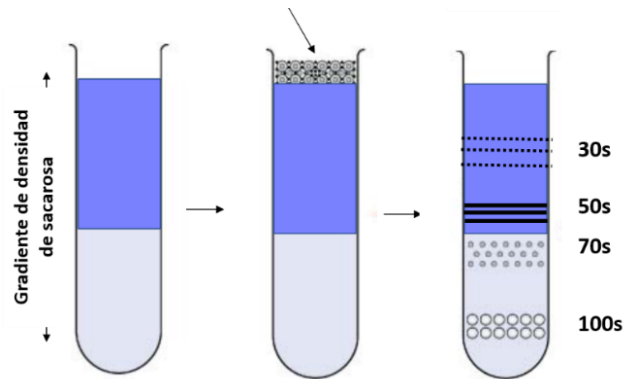


Figura 11. Generación de gradientes de sacarosa para separación diferencial de fracciones ribosomales.

Para generar el perfil ribosomal, medimos las fracciones obtenidas en nanodrop a 254 nm y las representamos hasta obtener la curva del perfil. Una vez finalizado el perfil ribosomal determinamos la cantidad de proteína HPF presente en cada una de las fracciones. Para ello, precipitamos éstas con ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich) al 10% (v/v), centrifugamos a máxima velocidad a 4 °C durante 15 min y lavamos 3 veces con acetona fría. Finalmente, resuspendimos en tampón 50 Mm Tris base que contenía el tampón de muestra Laemmli y las cargamos en un gel SDS-PAGE al 12,5 % (Bio-Rad) para realizar *Western blots* con el anticuerpo anti-HPF (1: 8.000).

7.3.2. Determinación del patrón de oligomerización de HPF

También se utilizó la generación de gradientes de sacarosa para determinar el estado de oligomerización de la proteína HFP en presencia o no de eritromicina en FQ-97. Para ello, cargamos 5 mg/ml de extracto proteico en gradientes de sacarosa 5-20 %, generados de la misma manera que en el caso anterior, pero centrifugamos a $210.000 \times g$ durante 2,5 h. Posteriormente, recogimos fracciones de 250 µl que cargamos en un gel SDS-PAGE al 12,5% y analizamos el patrón de oligomerización mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-HPF (1: 8.000).

7.4. Traducción *in vitro* a partir de ribosomas purificados

Con el fin de determinar si se producía un aumento en la síntesis de proteínas en aquellas células de la cepa FQ-97 que se encontraban en presencia de eritromicina, utilizamos los ribosomas purificados de la bacteria para ensayos de traducción *in vitro* con el kit PURExpress® Δ Ribosome Kit (New England Biolabs). Las condiciones de cultivo y purificación fueron exactamente las que se han indicado en el apartado anterior. Para ello, seguimos los pasos establecidos en el protocolo, preparamos reacciones de 12,5 μ l (tabla 9) y realizamos las siguientes reacciones de síntesis:

A: Ribosomas purificados desde MH.

B: Ribosomas purificados desde MH + ER 50 μ g/ml.

C: Ribosomas purificados desde MH a los que añadimos eritromicina 50 μ g/ml durante la reacción de síntesis *in vitro*.

Control: ribosomas procedentes de *E. coli*.

	A	B	C	Control
Solución A	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Factor mix	1,5 μ l	1,5 μ l	1,5 μ l	1,5 μ l
Ribosomas purificados (30 pmoles)	3 μ l	3 μ l	3 μ l	2,25 μ l
Suplementos	1 μ l inhibidor de ARNsas	1 μ l inhibidor de ARNsas	1 μ l inhibidor de ARNsas, 1 μ l ER 50	1 μ l inhibidor de ARNsas
Agua DEPC	1	1	1	1,73
ADN molde	1	1		1

Tabla 9. Composición reacciones de síntesis *in vitro* de proteínas a partir de ribosomas purificados de FQ-97 en diferentes condiciones.

Como ADN molde utilizamos el producto de reacción de PCR del gen *pbp2a*. Siguiendo el protocolo estableciendo incubamos las muestras de reacción mostradas en la tabla 9 durante 2 h y evaluamos mediante *Western blot* si existían diferencias en la producción de PBP2a mediante el anticuerpo anti-PBP2a 1: 2.000 (RayBiotech).

7.5. Ensayos de actividad enzimática *in vitro* de la timidilato sintasa

Para determinar la actividad enzimática de la TS-97 respecto a la de su cepa ancestral TS-96 realizamos ensayos de actividad *in vitro* desde extractos celulares enriquecidos en TS en cepas de *E. coli* BL21 gold. Las cepas sobreproducían las TS correspondientes a las secuencias del gen *thyA* de FQ-96 y FQ-97. Como control negativo del ensayo utilizamos una cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET15b sin ninguna construcción. El protocolo utilizado fue el utilizado por Islam *et al.* (2007), con la diferencia de que ellos trabajaron con proteína TS purificada (Islam *et al.*, 2007) y en nuestro caso trabajamos con extractos celulares enriquecidos.

Sobreproducimos las diferentes proteínas en *E. coli* BL21 gold, TS-96 Y TS-97. Desde un preinóculo incubado toda la noche a 37 ° C 250 rpm en LB + 100 µg/ml de ampicilina, realizamos un primer inóculo en matraces de 1 L. Dejamos incubar las células aproximadamente 3 h a 37 ° C 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0,4 – 0,6, cuando inducimos con 0,1 mM de IPTG y dejamos crecer toda la noche a 18 ° C 200 rpm. En el caso de tener que parar en el protocolo, centrifugamos durante 30 min a 5.000 rpm, pesamos y guardamos los pellets a – 80 °C. En el caso de poder seguir con él, resuspendimos los pellets en 1 ml de tampón de resuspensión (25 mM fosfato de potasio, 200 mM NaCl, pH 7,5) por gramo de biomasa. Todos los pasos desde aquí los realizamos a 4 ° C. Una vez resuspendido rompimos las células con un sonicador (Qsonica) durante 30 segundos, 5 pulsos a un 30 % de amplitud. Centrifugamos el lisado durante 30 min a 15.000 rpm y nos quedamos con el sobrenadante, donde estaba nuestra proteína de interés. Medimos la A₂₈₀ para igualar la concentración y analizamos los extractos cargamos 10 µl en un gel SDS al 12,5% al que teñimos con comassie para tener una estimación cualitativa del contenido proteico de cada muestra. De esta manera evaluamos que ambos cultivos contenían la misma cantidad de TS para poder realizar el experimento.

Realizamos los ensayos con una concentración de proteínas total de 1,97 mg/ml. A pesar de estar trabajando con un extracto que debía contener todos los elementos necesarios para la reacción de la TS, añadimos 1 mM de dUMP (Sigma-Aldrich) 1 mM EDTA y 150 µM, β-mercaptoetanol (Bio-Rad) (Kriegeskorte *et al.*, 2014). Realizamos las medidas en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible durante 20 min a 30 °C en cubetas de cuarzo (Hellma Analytics) en un volumen final 50 µl.

Para determinar la actividad enzimática monitorizamos el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reacción de oxidación del cofactor mTHF a DHF que cataliza la TS (figura 12), gracias a las capacidades del DHF de absorber luz a 340 nm (Wahba y Morris, 1962).

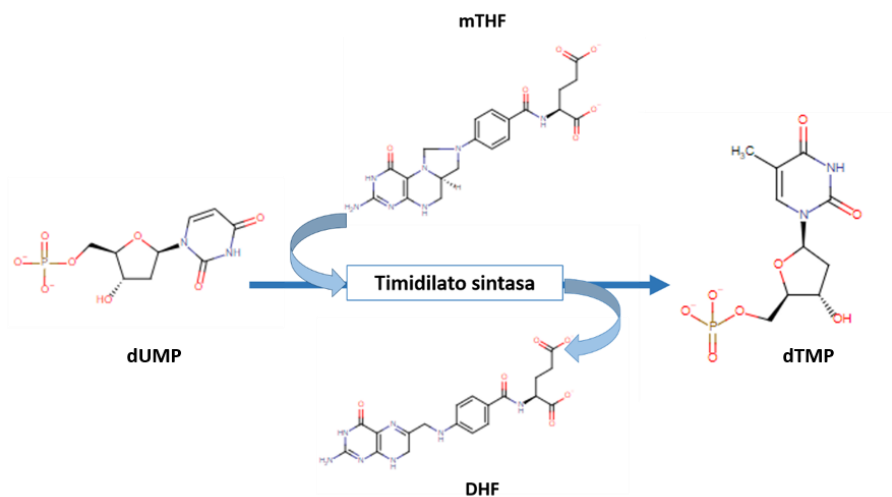


Figura 12. Reacción que cataliza la TS. La TS es una enzima que cataliza la reacción de metilación del 2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) a 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato/timidilato (dTMP) utilizando como donador del grupo metilo el cofactor (6R)-5,10-metilen-5,6,7,8-tetrahidrofolato (mTHF), se oxida generando 7,8-dihidrofolato (DHF).

8. Determinación de los niveles de (p)ppGpp mediante PyDPA

Para determinar si existían diferencias significativas en los niveles de (p)ppGpp en la cepa FQ-97 con respecto a su cepa progenitora, así como estudiar la variación de estos mismos en MH y MH + ER 50 µg/ml, procedimos a la cuantificación de este nucleótido mediante el uso del quimiosensor PyDPA (Rhee *et al.*, 2008).

El PyDPA es un compuesto que consta de dos componentes: un grupo pireno (Py) y una parte bis (Zn^{2+} -dipicolilamina) (dipicolilamina) (DPA)). Debido a su estructura química, en presencia de grupos pirofosfato (PP_i) es capaz de unirse a ellos y sufrir un cambio conformacional que se traduce en una emisión de fluorescencia a 470 nm (Rhee *et al.*, 2008). De esta manera cuanto más PP_i tenga unido el compuesto, mayor cantidad de (p)ppGpp está presente en la muestra y por tanto mayor emisión de fluorescencia a 470 nm detectaremos.

Para la extracción del (p)ppGpp recolectamos biomasa desde placas de MH, MH+ ER 50 µg/ml. A partir de aquí seguimos el protocolo establecido por Gao *et al.* (2010) con ligeras modificaciones. Las células se lavaron con PBS 1X frío centrifugando a 11.000 x g a 4 °C; posteriormente, de acuerdo con el protocolo, ajustamos a una DO_{600} de 0,5 en 15 ml de PBS 1X, asegurándonos de que todas las condiciones contenían la misma cantidad celular. Volvimos a centrifugar y almacenamos las muestras obtenidas -80 °C hasta su uso. Posteriormente, las células se rompieron añadiendo 3 ml de metanol al 80 % (v/v) a cada una de las muestras y agitando vigorosamente. Tras una centrifugación separamos el sobrenadante, que contenía el (p)ppGpp extraído y que concentramos en el servicio de liofilizado en frío (Facultad de Químicas en la Universidad Complutense de Madrid) con un *Sharp Freeze*. Las muestras se estuvieron liofilizando durante 16 h a -100 °C. Los extractos secos se disolvieron en tampón HEPES 1 mM pH 7,4 con un 16 % de DMSO (v/v), se les añadió 20 µM de PyDPA y se redistribuyeron en placas multipocillo de fondo claro (Costar). Para determinar la fluorescencia de cada muestra utilizamos una lámpara ultravioleta (Ex 345/ Em 470 nm) de un lector de microplacas Spark® (Tecan).

9. Análisis bioinformáticos

Para el análisis de secuencias de ADN y proteínas utilizamos el software SnapGene. Para la comparación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las depositadas en bases de datos utilizamos los algoritmos BLASTN y BLASTP respectivamente, a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los alineamientos de secuencias de ADN y proteínas los realizamos con CLUSTAL, alojado en el servidor EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para los estudios de traducción de una secuencia de nucleótidos a proteínas, utilizamos la herramienta Translate del servidor Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>).

El análisis de los SNPs fue llevado a cabo por el Dr. Juan Carlos Oliveros. Las secuencias de Illumina de FQ-97 se alinearon con los 27 fragmentos del genoma de FQ-96, cepa ancestral previamente depositada por el Hospital Ramón y Cajal en el NCBI, con el nombre PSP1996 (GCF_000496095.1).

Se utilizó el navegador genómico IGV (Robinson *et al.*, 2011) para su visualización y el interfaz *BioinfoGP* diseñado por el Dr. Juan Carlos Oliveros.

La clasificación funcional de estas variantes genéticas entre FQ-96 y FQ-97 se hizo con ayuda de Tamara Alonso Blanco, estudiante predoctoral en el laboratorio de Daniel López. Para ello utilizó el servidor Web eggNOG-mapper v2 (<http://eggnog-mapper.embl.de/>). Utilizamos una clasificación basada en las categorías COGs, que analiza los genes ortólogos (genes en otras especies que provienen de un gen ancestral común).

Para la búsqueda de los motivos regulatorios RL(R/K) en las posiciones 5' UTR no codificantes de los transcritos de FQ-97 se llevó a cabo un análisis bioinformático de todas las regiones promotoras del genoma con una longitud igual o superior a 20 nucleótidos (desde el ATG inicial) y se analizó, en las tres pautas abiertas de lectura (+1, +2 y +3), si dicha secuencia podría codificar un péptido que contuviese el motivo RL(R/K). Aquellos genes que contenían dicho motivo fueron anotados automáticamente y revisados posteriormente a mano. Para este análisis se diseñó un *script* de Python específico en colaboración con el Dr. Joaquín Giner Lamia del CBGP y se utilizó el genoma de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* NCTC 8325 depositada en NCBI (Accession number: NZ_LS483365.1). Para la predicción de las posibles secuencias SD utilizamos el servidor EMOPEC (<http://emopec.biosustain.dtu.dk/>).

Para el estudio los posibles genes candidatos regulados bajo este mecanismo de atenuación y las rutas metabólicas relacionadas utilizamos la base de datos KEGG-*patway maps* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

10. Análisis estadístico

Realizamos el análisis estadístico de los datos obtenidos con el programa GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, EE.UU.). Para la comparación del promedio de una variable entre dos grupos independientes aplicamos el test paramétrico T-Student. Para la comparación entre tres o más grupos aplicamos el análisis de la varianza de una sola vía ANOVA. Tras realizar el ANOVA, determinamos entre qué grupos específicos podían existir diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de comparación múltiple post hoc Tukey que permite la comparación en parejas. Consideramos las diferencias significativas a partir de un $p < 0,05$. Los datos se presentan acompañados de las barras de error (\pm error estándar).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

El fenotipo de estudio de esta tesis surge a partir de la detección en el Hospital Ramón y Cajal de un aislado clínico de *S. aureus* con un defecto en crecimiento y una dependencia a un antibiótico ribosomal. La cepa procede de un paciente con fibrosis quística, que estuvo sometido desde el inicio de la enfermedad, en 1996, a un tratamiento basado en diferentes antimicrobianos (figura 13). La combinación se basó en compuestos que afectaban tanto a la síntesis de la pared bacteriana, como la vancomicina (VAN) (glucopéptido) y el aztreonam (AZT) (beta-lactámico), a otros que afectaban a la síntesis de importantes factores metabólicos, como el sulfametoxazol- trimetoprim (SxT) (López-Collazo *et al.*, 2015). En el estudio realizado, evaluaron los cambios genéticos acontecidos en los 13 años que duró la enfermedad, desde el primer aislado clínico en 1996 (FQ-96, o cepa ancestral), hasta el último aislado en 2009 (FQ-09). De todos los aislados obtenidos, solo detectaron el fenotipo mencionado en la cepa perteneciente al año 1997 (FQ-97) y, por tanto, es sobre ésta en la se centra la mayor parte del trabajo realizado en esta tesis. Dada la posible relevancia clínica de este fenotipo, el objetivo principal de esta tesis fue determinar el mecanismo molecular responsable del fenotipo de semi-dependencia encontrado en el aislado clínico FQ-97.

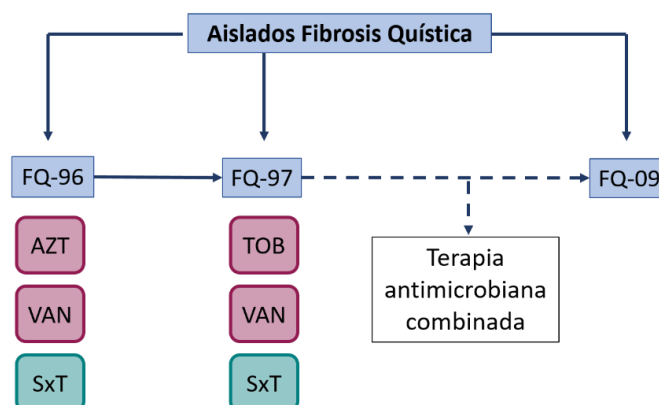


Figura 13. Tratamiento combinado al que estuvieron sometidas FQ-96 y FQ-97 desde su aislamiento en un paciente de fibrosis quística (López-Collazo *et al.*, 2015). AZT, aztreonam; VAN, vancomicina; SxT, sulfametoxazol- trimetoprim; FQ-96, cepa ancestral procedente del año 1996; FQ-97, cepa semi-dependiente procedente del año 1997; FQ-09, cepa evolucionada procedente del año 2009.

1. Caracterización del aislado clínico FQ-97

Para lograr el objetivo principal de esta tesis, lo primero que realizamos fue una caracterización fenotípica y genómica de la cepa FQ-97.

1.1. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de FQ-97 se dividió a su vez en dos grandes apartados, 1) estudio del fenotipo de semi-dependencia y 2) estudio del fenotipo heteropoblacional. Aunque dividimos el

estudio de estos fenotipos en dos apartados, ambos fenotipos estaban relacionados como se irá ilustrando a lo largo de esta sección de resultados.

1.1.1. Estudio del fenotipo de semi-dependencia

Con el objetivo de determinar si el fenotipo de semi-dependencia aparecía solo con antibióticos ribosomales, o este efecto se generaba con compuestos pertenecientes a otras familias, realizamos un barrido mediante antibiograma con E-test. Para ello utilizamos varios compuestos representantes de los principales grupos de antibióticos que existen según su mecanismo de acción: inhibidores de síntesis de pared bacteriana, inhibidores de síntesis proteica, antibióticos que actúan en el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos y de bloqueo de síntesis de factores metabólicos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Encontramos un fenotipo de semi-dependencia con dos antibióticos, eritromicina, un macrólido, y clindamicina, una lincosamida. Dicho fenotipo se observaba de manera óptima entre las 16 y 24 h desde la realización del antibiograma en MH placa a 37 °C (figura 14). Transcurrido ese periodo de tiempo, empezaban a aparecer colonias de FQ-97 en los laterales de la placa lejos de la tira de antibiótico.

Los antibióticos con los que encontramos el efecto de semi-dependencia comparten su mecanismo de acción, ya que ambos inhiben la síntesis de proteínas mediante unión reversible a la subunidad 50S del ribosoma e interfieren en la fase de elongación de la traducción bacteriana. Este resultado sugería, que el mecanismo molecular causante del fenotipo de semi-dependencia podía tener su origen en las dianas en común de estos antibióticos, lo que fomentó que el resto de esta tesis se centrara en el estudio del ribosoma y en las posibles mutaciones relacionadas con las dianas de estos compuestos.

Dado que FQ-97 también era capaz de crecer en ausencia de los antibióticos ribosomales eritromicina y clindamicina, y que su viabilidad y supervivencia por tanto no dependían de la presencia de estos compuestos, denominamos al fenotipo encontrado “semi-dependencia”, utilizado también en el pasado por otros autores (Schiøtt y Stenderup, 1953). Los experimentos de antibiograma mostraban que FQ-97 podía crecer sin los antimicrobianos en MH, pero cuando éstos estaban presentes le suponían una ventaja, creciendo mejor y más rápido aquellas colonias próximas a la tira del antibiótico frente aquellas que estaban alejadas, que necesitaban más horas para aparecer en la placa.

Los resultados obtenidos en este primer ensayo de antibiograma también indicaron que el fenotipo de semi-dependencia era exclusivo de la cepa FQ-97, ya que no aparecía ni en la cepa ancestral FQ-96 ni en la cepa evolucionada procedente del año 2005 con la que trabajamos, FQ-05 (figura 14) tal y como mostraron en el primer estudio donde las describieron (López-Collazo *et al.*, 2015).

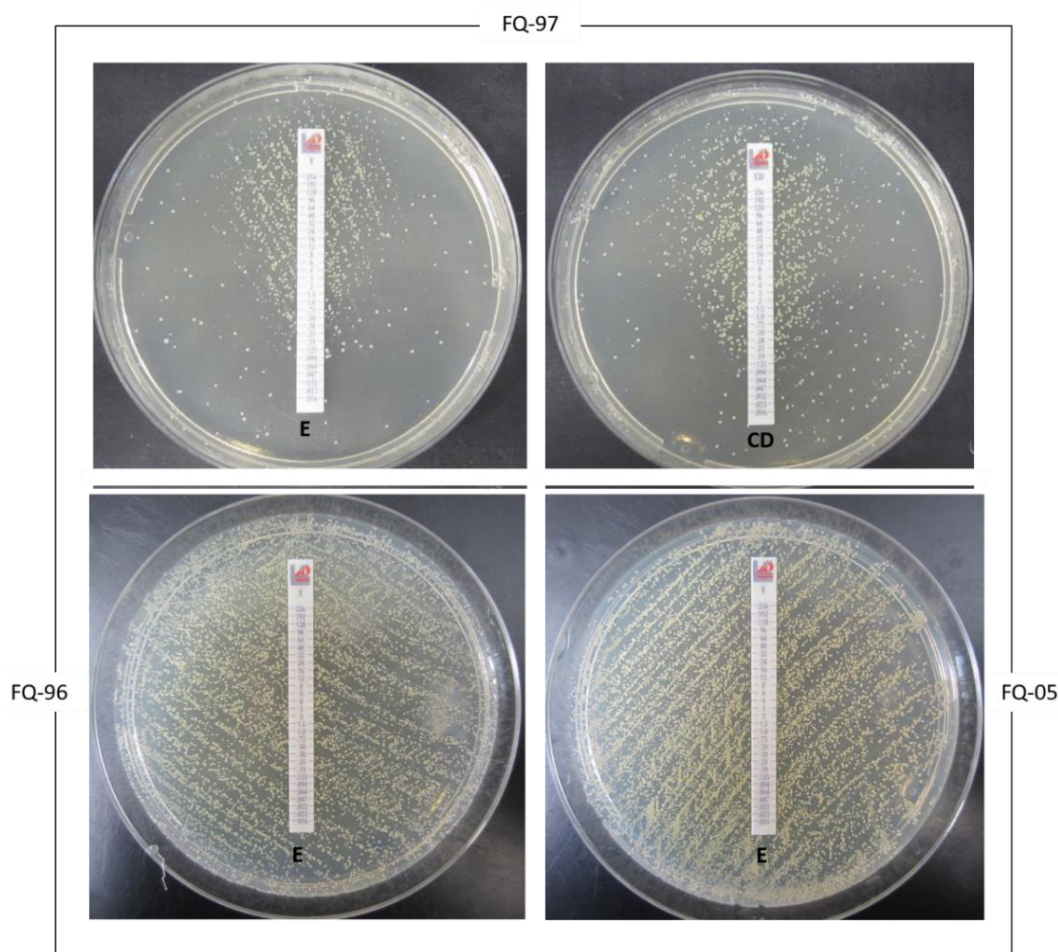


Figura 14. Antibiogramas de FQ-96, FQ-97 y FQ-05 en MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. El panel superior muestra el fenotipo de semi-dependencia en FQ-97 con eritromicina (izquierda) y clindamicina (derecha). En panel inferior muestra el antibiograma con eritromicina en FQ-96, cepa ancestral y FQ-05, cepa evolucionada. E, eritromicina; CD, clindamicina.

1.1.1.1. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

A la par que realizamos la búsqueda de antibióticos con los que FQ-97 podía presentar el fenotipo de semi-dependencia, con el fin de caracterizar también el perfil de resistencias de las cepas FQ-96 y FQ-97, realizamos ensayos de sensibilidad y determinamos la concentración mínima inhibitoria (CMI) para diferentes compuestos. A partir de este punto focalizamos el estudio en las cepas FQ-96 y FQ-97, tratando de averiguar los posibles eventos que habían tenido lugar entre el año 1996 y 1997 para generar el fenotipo de semi-dependencia. Los resultados de CMI obtenidos (tabla 10) indicaron que tanto FQ-96 como FQ-97 eran bacterias multirresistentes a antibióticos, ya que presentaron resistencia a la mayoría de los antimicrobianos —pertenecientes a diferentes clases— que probamos (Magiorakos *et al.*, 2012).

Inhibición síntesis de pared bacteriana CMI (µg/ml)									
Cepa	AML	KZ	CX	FEM	FOX	DAP	FOS	OX	VA
FQ-96	64	>256	>256	>256	>256	1	1	>256	0,75
FQ-97	64	>256	>256	>256	>256	1	1	>256	0,75

Inhibición síntesis proteica CMI (µg/ml)												
Cepa	A	C	CD	FU	E	CN	K	LNZ	QDA	S	TE	TOB
FQ-96	>256	12	>256	0,94	>256	>256	>256	1	0,50	>1024	16	>256
FQ-97	>256	8	>256	0,94	>256	>256	>256	2	0,75	>1024	16	>256

Inhibición síntesis ácidos nucleicos CMI (µg/ml)		
Cepa	RD	CIP
FQ-96	0,38	6
FQ-97	0,38	6

Inhibición de factores metabólicos CMI (µg/ml)			
Cepa	SxT	SXM	TM
FQ-96	0,75	12	3
FQ-97	0,125	0,19	0,50

Tabla 10. Determinación de CMI en FQ-96 y FQ-97 en presencia de diferentes grupos de antibióticos en placas de MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. En gris se muestran aquellos antibióticos a los que las cepas se determinaron como resistentes mientras que en azul a los que fueron sensibles, siguiendo los criterios establecidos por las guías CLSI (2018). Aparecen subrayados aquellos antibióticos con los que apareció el fenotipo de semi-dependencia: eritromicina y clindamicina. AML, amoxicilina; KZ, cefazolina; CX, cloxacilina; FEP, cefepima; FOX, ceftioxitina; DAP, daptomicina; FOS, fosfomicina; OX, oxacilina; Van, vancomicina; AZM, azitromicina; C, cloramfenicol; CD, clindamicina; FU, ácido fusídico; E, eritromicina; CN, gentamicina; K, kanamicina; LNZ, linezolid; QDA, quinupristina-dalfopristina; S, estreptomicina; TE, tetraciclina; TOB, tobramicina; RD, rifampicina; CIP, ciprofloxacina; SxT, trimetoprim-sulfametoxazol; SXM, sulfametoxazol; TM, trimetoprim.

Con el objetivo de determinar el mecanismo de resistencia a los antibióticos con los que FQ-97 presentaba el fenotipo de semi-dependencia, macrólido y lincosamida, nos fijamos en los resultados obtenidos de E-Test, dado que las resistencias a este tipo de antibióticos pueden venir mediada por diferentes mecanismos moleculares. En función del resultado en antibiograma se pueden definir 2 tipos de resistencia o fenotipos MLS_B: 1) resistencia de tipo constitutiva o fenotipo cMLS_B, la bacteria presenta una resistencia cruzada a los antibióticos MLS, es resistente a eritromicina, clindamicina y estreptomicina; 2) resistencia inducible o fenotipo iMLS_B, la bacteria presenta resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un achatamiento del halo de la clindamicina en la proximidad de la eritromicina (D-test positivo).

FQ-97 era resistente a eritromicina, a clindamicina y a estreptomicina —un tipo de estreptogramina B—, (tabla 10) y como los resultados de CMI indican no era necesaria la presencia de ningún agente inductor para que la bacteria fuera resistente a ninguno de los compuestos pertenecientes al grupo MLS_B. Por lo tanto, los resultados de los antibiogramas obtenidos con los antibióticos del grupo

Con este ensayo, estudiamos si en base a la exposición previa o no del antibiótico, el fenotipo de semi-dependencia se perdía o se mantenía en el tiempo.

El ensayo mostró que existían diferencias en el mantenimiento del fenotipo de semi-dependencia según la exposición previa de FQ-97 al antibiótico.

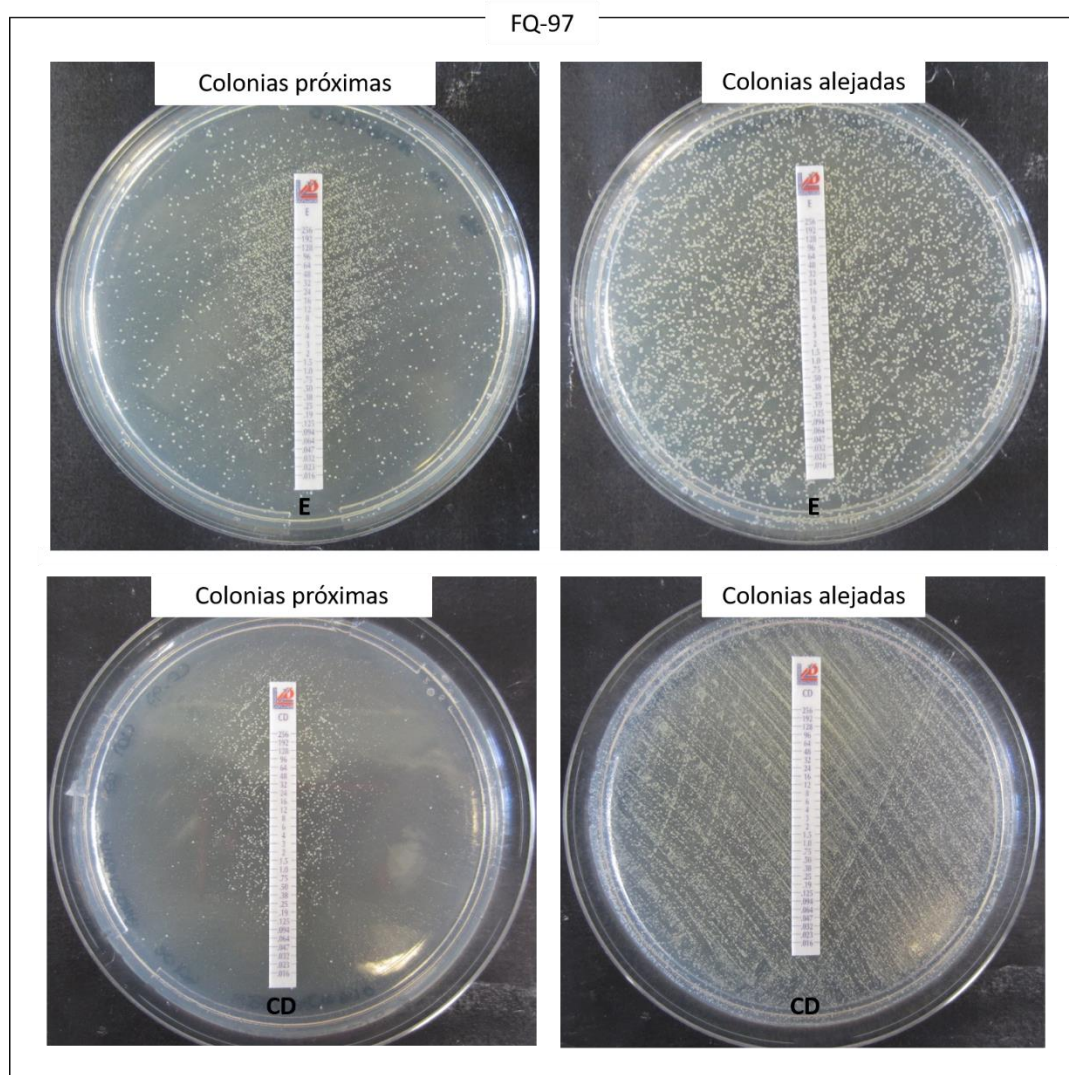


Figura 16. Antibiogramas con eritromicina y clindamicina en FQ-97 desde colonias próximas y colonias alejadas a la tira tras 16 h de incubación a 37 ° C. En los paneles de la izquierda encontramos los antibiogramas desde colonias que estaban próximas a la tira de antibiótico desde un antibiograma interior, arriba eritromicina y abajo clindamicina. En los paneles de la derecha encontramos los antibiogramas desde colonias que crecían alejadas de la tira en los laterales de la placa de MH, arriba eritromicina, abajo clindamicina. E; eritromicina; CD, clindamicina.

Por una parte, el antibiograma realizado desde las colonias próximas a la tira de antibiótico mostraba que aquellas colonias que habían estado en contacto con la eritromicina o la clindamicina seguían manteniendo el fenotipo de semi-dependencia tras repetirles el antibiograma. Sin embargo, el fenotipo de semi-dependencia con la eritromicina era menor, y transcurridas 16 h FQ-97 era capaz de empezar a crecer por toda la placa (figura 16), indicando que tras un pase la ventaja del antibiótico empezaba a ser menos evidente.

Por otra parte, las colonias que habían crecido lejos del antibiótico, con un único pase no mostraban el fenotipo de semi-dependencia tras repetir el antibiograma, lo que indicaba que en ausencia del antibiótico tras un único pase el fenotipo dejaba de ser evidente y la eritromicina ya no le suponía una ventaja a FQ-97.

Con el objetivo de seguir caracterizando el fenotipo y su estabilidad, determinamos si la retirada de la eritromicina podía suponerle un defecto en crecimiento a FQ-97. Para evaluar este posible problema en crecimiento realizamos experimentos unidades formadoras de colonias (UFC) en las siguientes condiciones:

- A. Bacterias procedentes de MH sembradas de nuevo en MH.
- B. Bacterias procedentes de MH sembradas en MH + ER 50 $\mu\text{g/ml}$.
- C. Bacterias procedentes de MH + ER 50 $\mu\text{g/ml}$ sembradas en MH.
- D. Bacterias procedentes de MH + ER 50 $\mu\text{g/ml}$ sembradas de nuevo en MH+ ER 50 $\mu\text{g/ml}$.

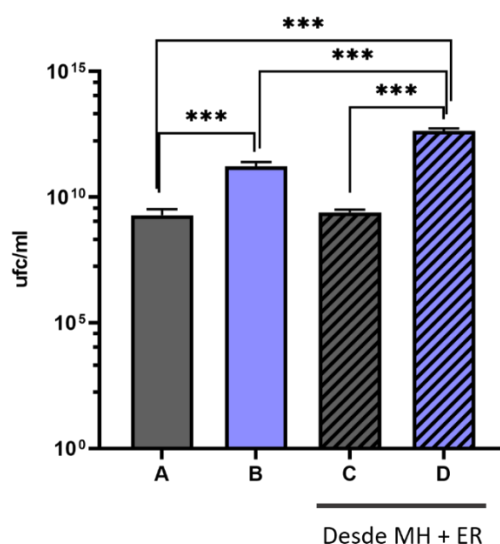


Figura 17. Ensayo UFC de FQ-97 en placas de MH y MH + ER, desde MH y MH + ER, tras 16 h de incubación a 37 ° C. A) Bacterias procedentes de MH sembradas de nuevo en MH, B) Bacterias procedentes de MH sembradas en MH + ER 50 $\mu\text{g/ml}$, C) Bacterias procedentes de MH + ER 50 $\mu\text{g/ml}$ sembradas en MH, D) Bacterias procedentes de MH + ER 50 $\mu\text{g/ml}$ sembradas de nuevo en MH+ ER 50 $\mu\text{g/ml}$. Representación de las medias obtenidas en tres réplicas biológicas con las barras de error correspondientes al error estándar. Las rayas hacen referencia a aquellas bacterias que procedían de placas suplementadas con eritromicina 50 $\mu\text{g/ml}$ (ER). Test ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple Tukey (***) P < 0,001).

Centrando la atención en la parte del ensayo donde FQ-97 procedía de MH y se plaqueaba en MH y MH + ER, podemos observar como la eritromicina le suponía una ventaja —al igual que el efecto observado en los antibiogramas—, dado que transcurridas 16 h, el número de UFC era superior en la condición en la que el antibiótico estaba presente (figura 17). Si por otro lado, prestamos atención al resultado obtenido desde la condición en la que FQ-97 procedía de placas con eritromicina y se plaqueaba en MH y MH + ER, podríamos destacar que: 1) al retirarle la eritromicina y plaquear a FQ-97 en MH la bacteria no presentaba un defecto en crecimiento, sino que crecía en MH prácticamente

como la condición ensayada en la cual no había estado expuesta a eritromicina y 2) la presencia de eritromicina le suponía una ventaja porque observamos más UFC en esta condición frente a cuando se plaqueaban en MH (figura 17). Si comparamos todas las condiciones a la vez, podemos destacar que cuando FQ-97 procedía de eritromicina y se le seguía manteniendo el antibiótico en el medio, observamos un mayor número de colonias que desde la condición en la que se le añadía por primera vez.

Por tanto, todo el conjunto de resultados obtenidos respecto a la retirada o presencia continua de la eritromicina en el medio indicaban que la retirada del antibiótico no le suponía un defecto en crecimiento a FQ-97, y que la presencia del macrólido le suponía una ventaja porque cuando estaba presente en el medio observábamos mayor cantidad de UFC.

Siguiendo con la caracterización fenotípica del fenotipo de semi-dependencia y su estabilidad, estudiamos si éste estaba presente en las diferentes etapas del crecimiento bacteriano de FQ-97, —dado que hasta el momento solo habíamos sido capaces de reproducirlo en placa—. Para ello realizamos curvas de crecimiento de FQ-96 y FQ-97 en medio líquido MH y MH + ER.

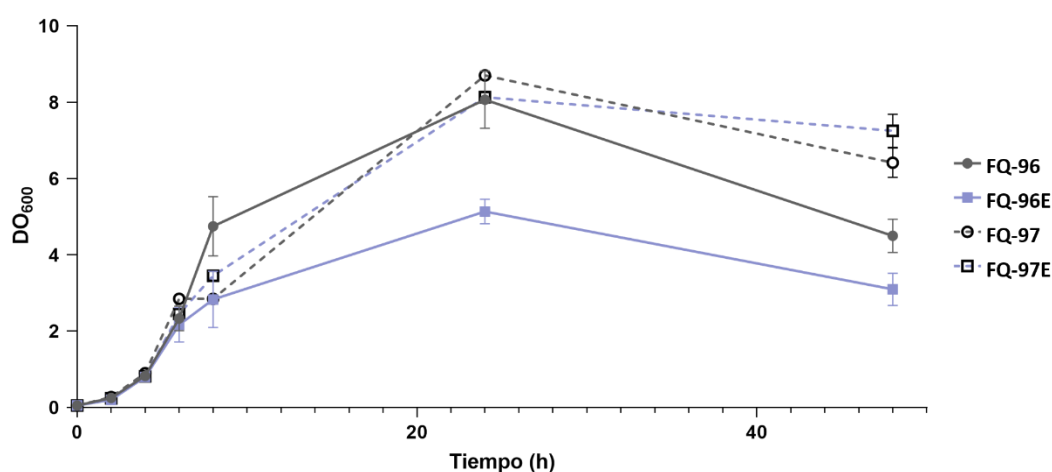


Figura 18. Curva de crecimiento de FQ-96 y FQ-97 en MH y MH + ER a 37 ° C. Realizamos medidas de la DO₆₀₀ a diferentes tiempos (h, eje x). Representamos las medias obtenidas de cada medida de 3 réplicas biológicas independientes. FQ-96, cepa ancestral en MH; FQ-96E, cepa ancestral en MH + 50 µg/ml ER; FQ-97, cepa semi-dependiente en MH; FQ-97E, cepa semi-dependiente en MH + 50 µg/ml ER.

Por una parte, los resultados indicaron que en estas condiciones de crecimiento el fenotipo de semi-dependencia no era evidente, y la eritromicina no parecía suponer una ventaja para FQ-97, dado que no observamos un mayor crecimiento en esta cepa cuando el antibiótico estaba presente en la condición MH + ER (figura 18). Por otra parte, los resultados de las curvas de crecimiento indicaron diferencias en el comportamiento entre FQ-96 y FQ-97. Por un lado, la DO₆₀₀ final a la que llegaba FQ-97 tanto en la condición MH como MH + ER era superior a la que alcanzaba FQ-96 en ambas condiciones; también la tasa de duplicación de FQ-96 era inferior a la de FQ-97, y observamos como a pesar de ser FQ-96 resistente a la eritromicina, al añadir el compuesto su tasa de duplicación se reducía, efecto que no encontrábamos en FQ-97. Por lo tanto, aunque no observáramos el fenotipo de semi-

dependencia en este medio, si observamos comportamientos diferentes entre FQ-96 y FQ-97 en presencia/ausencia de eritromicina (figura 18).

Con el objetivo de determinar si a pesar de no encontrar el fenotipo de semi-dependencia en FQ-97 mediante cuantificación de la densidad óptica, el fenotipo seguía estando presente o había perdido definitivamente, recogimos muestras de cultivo a diferentes tiempos desde las curvas de crecimiento (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h y 48 h) y realizamos de nuevo el antibiograma.

Los resultados indicaron que FQ-97 era capaz de mantener el fenotipo de semi-dependencia hasta 2 h después de haber estado en cultivo líquido. Una vez transcurrido ese tiempo, el resto de muestras que tomamos no presentaban la semi-dependencia, mostrando un fenotipo de resistencia común como el que podía presentar la cepa ancestral FQ-96. Este hecho marcó que a lo largo de toda esta tesis el diseño experimental de los ensayos tratara de reducir al máximo trabajar en medio líquido, o en el caso de necesitarlo, no sobrepasar las 2 h de cultivo. Además, si se trabajaba en medio líquido, se chequeaba que el fenotipo seguía presente mediante la realización de un antibiograma.

1.1.2. Estudio del fenotipo heteropoblacional y su relación con el fenotipo de semi-dependencia

Junto al fenotipo de semi-dependencia determinamos otro fenotipo exclusivo en FQ-97 respecto a su cepa ancestral FQ-96. FQ-97 presentaba un defecto en su crecimiento lo que le hacía crecer como una heteropoblación, pudiendo observar colonias con diferentes tamaños (figura 19). En primer lugar, comprobamos no se trataba de una contaminación y que estábamos trabajando con una única cepa mediante la realización de cultivos puros.

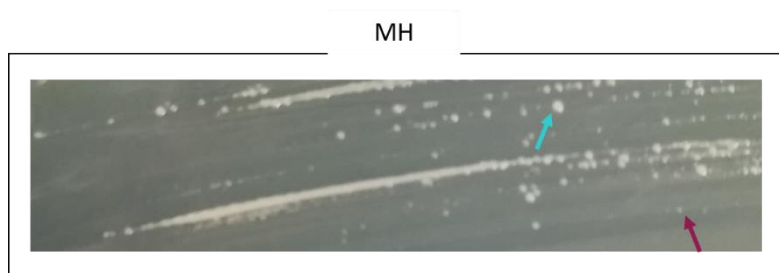


Figura 19. Fenotipo heteropoblacional de la cepa FQ-97 en MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. FQ-97 presenta una heterogeneidad en el tamaño de sus colonias. La flecha morada señala una colonia con menor tamaño mientras que la flecha azul una colonia con un tamaño superior.

Siguiendo el mismo razonamiento que el usado en el estudio del fenotipo de semi-dependencia, y con el objetivo de caracterizar este fenotipo, determinamos su estabilidad. Observamos que tras solo un pase en MH la población mixta se perdía volviéndose homogénea (figura 20). La posterior realización de un antibiograma a eritromicina confirmó que la pérdida del fenotipo heteropoblacional iba ligada a la pérdida del de semi-dependencia. El resultado sugería que ambos fenotipos estaban relacionados y

que el fenotipo heteropoblacional o problema en crecimiento podría ser un condicionante para que apareciera el fenotipo de semi-dependencia.

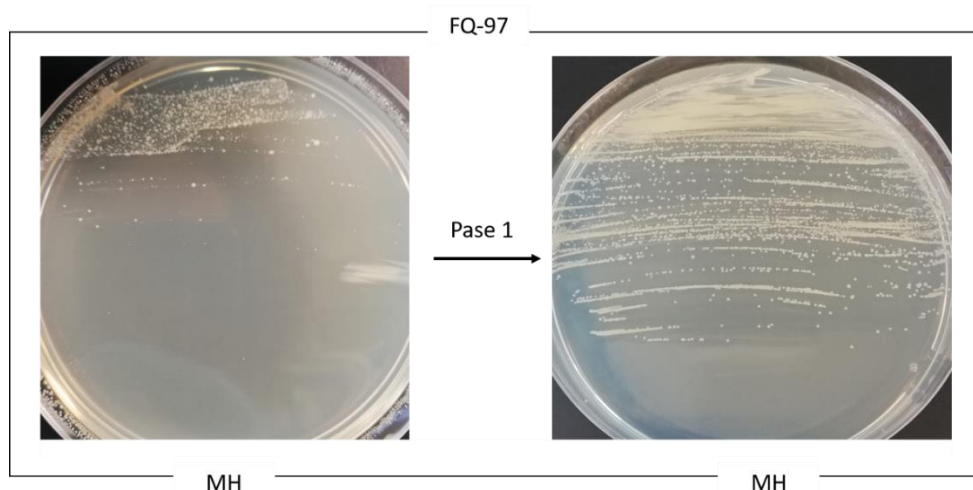


Figura 20. Estabilidad del fenotipo heteropoblacional de FQ-97 en MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. A la izquierda, FQ-97 plaqueada en MH desde glicerol, a la derecha, el fenotipo que muestra tras la realización de un único pase de 16 h a 37 ° C en MH.

Dada la posible relación entre ambos fenotipos, estudiamos si al igual que ocurría con el fenotipo de semi-dependencia, el fenotipo heteropoblacional solo aparecía en MH y no en otros medios como LB o TSB. Los resultados de este ensayo mostraron que el fenotipo heteropoblacional de FQ-97 solo aparecía en el medio de cultivo MH, observando también un menor tamaño de las colonias en esta condición frente a los demás medios (figura 21). Por otra parte, al igual que el fenotipo de semi-dependencia, la heteropoblación solo aparecía en FQ-97 y no en FQ-96.

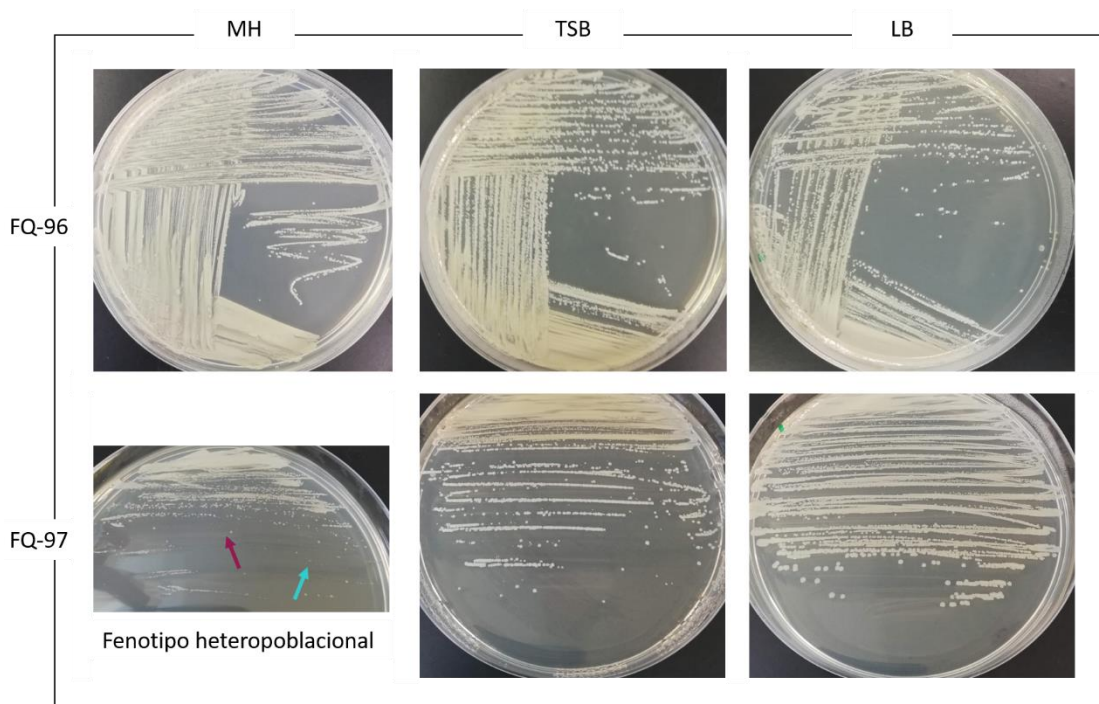


Figura 21. Crecimiento en MH, TSB y LB de FQ-96 y FQ-97 tras 16 h de incubación a 37 ° C. En el panel superior, crecimiento de FQ-96 en los medios MH, TSB y LB. En el panel inferior, crecimiento de FQ-97 en los mismos medios. En MH La flecha morada indica la colonia más grande mientras que la azul señala una colonia más pequeña en el comportamiento heteropoblacional de FQ-97.

Estos resultados indicaban que además de ser el fenotipo heteropoblacional un posible condicionante para la aparición del fenotipo de semi-dependencia, que ambos estaban asociados a la condición de cultivo específica MH placa.

En general, las principales conclusiones de este apartado de caracterización fenotípica fueron que el fenotipo de semi-dependencia dependía del heteropoblacional, que ambos estaban asociados a la condición de cultivo específica MH placa, que eran inestables al perderse con un único pase y que era exclusivos de FQ-97. Además, dado que el fenotipo heteropoblacional parecía ser un condicionante para que apareciera el fenotipo de semi-dependencia, y que ambos se mostraban en la misma condición específica de cultivo, podría estar indicando, que estaban causados por la misma mutación.

Una vez fijamos las condiciones óptimas de estudio el resto de la caracterización genómica y diferentes abordajes experimentales se realizaron ya solo con la eritromicina y no con la clindamicina, dado que el efecto que encontrábamos con ambos era similar.

1.2. Caracterización genómica

1.2.1. Búsqueda de SNPs frente a su cepa ancestral FQ-96

Con el fin de encontrar la posible mutación responsable del fenotipo de semi-dependencia y heteropoblacional observados en FQ-97, realizamos un análisis comparativo de los SNPs presentes en esta cepa frente a su cepa ancestral FQ-96, dado que en ésta el fenotipo no aparecía. La secuenciación y

ensamblaje del genoma de FQ-96 fue llevado a cabo en un estudio realizado por el Hospital Ramón y Cajal, y la secuencia del genoma se encuentra depositada en el NCBI (SAMN02469896) (López-Collazo *et al.*, 2015).

Tras el análisis comparativo encontramos los SNPs que se muestran en la tabla 11. Se agruparon en base a los 4 grandes *scaffolds* en los que está ensamblado el genoma de FQ-96: NZ_KI542646.1, NZ_KI542647.1, NZ_KI542648.1 y NZ_KI542649.1 y se realizó una clasificación funcional con la ayuda de Tamara Blanco, estudiante predoctoral en el laboratorio, en base a la clasificación COGs (del inglés, *Clusters of Orthologous Groups*).

Por otra parte, la tabla mostrada solo incluye aquellos SNPs de FQ-97 frente a FQ-96 que realmente fueran mutaciones respecto a otras cepas depositadas en las bases de datos. Es decir, en muchas ocasiones la mutación realmente estaba presente en FQ-96, y FQ-97 la había revertido y la secuencia que figuraba en su genoma era la que aparecía en la mayoría de los genomas de *S. aureus*. Este filtrado se hizo principalmente con el objetivo de encontrar una posible mutación relacionada con el fenotipo y restar ruido al análisis. La mayoría de los SNPs encontrados entre FQ-96 y FQ-97 pertenecían al grupo funcional S, sin predicción funcional, seguido de una alta cantidad relacionados con el metabolismo y transporte de iones inorgánicos, P (figura S1).

Proteína	Mut nt ^a	Gen ^b	H ^c	Efec ^d	Cal ^e	Locus ^f	Ref ^g	F ^h
NZ_KI542646.1								
Timidilato sintasa	G291043A	290104 - 291060	+	Mcs Ala31 4Thr	197	SA1_116 862	SAV14 27 <i>thyA</i>	F
SAM-ribosiltransferasa ARNt QueA	T33179G	32655- 33680	+	Ms Ala17 5Ala	228	SA1_117 091	SAV16 40 <i>queA</i>	J
Proteína hipotética YphP	T289561C	289243 - 289680	+	Mcs Tir107 His	228	SA1_156 485	SAV14 28	S
Proteína de unión a fosfato PstS	T*A 329002	329237 - 330220	+	Ri	31	SA1_116 797	SAV13 89 <i>pstS</i>	P
Aminoaciltransferasa femB	G*A 341874	341831 - 343090	-	Mcs Ser406 Leu	228	SA1_116 771	SAV13 75 <i>femB</i>	V
Péptido metionina sulfóxido reductasa MsrA	T356973A	356741 - 357250	+	Mcs Val78 Asp	228	SA1_138 645	SAV13 61 <i>msrA</i>	O
ADN polimerasa III tipo PolC	A470737G	469771 - 474087	-	Ms Asp11 15Asp	59	SA1_116 651	SAV12 64 <i>polC</i>	L
Proteína de unión a la penicilina FtsL	A570454T	568244 - 570370	-	Ri	38	SA1_116 556	SAV11 80 <i>ftsL</i>	D
Proteína similar sistema	A705674 AT	705670 - 706320	-	Cml Ile216f s	56	SA1_213 07	SAV10 88	P

absorción de potasio Trk								
Chaperona ClpB	C825711A	824662 - 827271	-	Mcs Asp52 1Tir	228	SA1_116 275	SAV09 75 <i>clpB</i>	O
Transportador ABC de unión a ATP	T891663C	904409 - 904903	-	Mcs Glu24 8Gli	39	SA1_211 09	SAV08 42	O
Nucleasa	G910276A	910271 - 910957	-	Ccs Gln22 8*	228	SA1_454 01	SAV08 15 <i>nuc</i>	L
Transportador bacitracina ABC de unión a ATP	T1056977 A	105626 8- 105703 0	-	Ms Ile18Il e	149	SA1_209 59	SAV07 23	P
Proteína hipotética	G1120917 A, T	112003 4- 112066 3	-	Ri	195	SA1_128 941	SAV05 99	S
Proteína hipotética	TG114381 6T	114380 4- 114408 2	-	Cml Thr87f s	30	SA1_101 129	SAV05 78	-
NZ_KI542647.1								
Lipoproteína de pliegue tipo cistatina	A227839 T	227192 - 227566	-	Ri	91	SA1_234 82	SAV03 03	S
Transportador dependiente de sodio	G27179A	26557- 27894	-	Mcs Ser239 Phe	228	SA1_118 432	SAV04 58	P
Proteína YycI	T537456C	536810 - 537598	-	Mcs p.Gli2 16Ser	55	SA1_358 98	SAV00 21	S
Permeasa de hierro	A137537T AT	137474 - 139246	-	Cml & Mes Asn57 0fs	43	SA1_118 032	SAV03 45	P
Enzima de síntesis del polisacárido capsular	T402174C	401593 - 402717	-	Mcs Lis182 Glu	228	SA1_119 371	SAV01 55 <i>capG</i>	G
Proteína accesoria Sistema sec Asp3	C632820A	632066 - 633025	+	Ms His252 His	21	SA1_516 19	SAV26 50	S
Proteína G de unión a superficie de pared celular	G814211A	812757 - 815105	+	Ccs Cis485 *	182	SA1_118 891	SAV24 97	S
Factor de clumping B	A664096G	661953 - 664643	+	Mcs Asn71 5Asp	100	SA1_119 257	SAV26 30 <i>clfB</i>	M
Metaloproteasa intramembrana familia CPBP	T1006073 C	100531 1-	+	Ri	33	SA1_194 79	SAV23 13	S

		100604						
		8						
Regulador transcripcional SarR	TA102724 4T	102757 5- 102792 2	+	Ri	51	SA1_558 10	SAV22 95 <i>sarR</i>	K
Bomba de flujo multiR a antib SepA	T1136929 A	113692 4- 113731 9	+	Mcs Val29I le	190	SA1_144 534	SAV21 67 <i>sepA</i>	U
NZ_KI542649.1								
N-acetiltransferasa	T132663G	132250 - 132693	+	Mcs Ser11 Arg	94	SA1_541 56	SAV08 10	S
Proteína accesoria reguladora C	Ins 3560 IS256	142898 - 144190	+	— —	50	SA1_361 68	SAV20 38 <i>agrC</i>	T
Represor transcripcional sensor redox Rex	A152449C	152138 - 152773	-	Mcs Tir109 Asp	228	SA1_392 0	SAV20 46	K

Tabla 11. SNPs obtenidos tras la secuenciación de FQ-97 respecto al genoma de su cepa ancestral FQ-96. En la tabla se muestran los SNPs encontrados entre las secuenciaciones de los genomas de FQ-97 y FQ-96. ^a Mut nt, posición de la mutación a nivel de nucleótido que ocupa en el genoma FQ-96 (SAMN02469896); Ins, inserción. ^b Gen, posición en nt que ocupa el gen respecto al genoma FQ-96. ^c H, Hebra en la que está la lectura del gen. ^d Efec, efecto de la mutación a nivel de aminoácido; Ms, mutación silenciosa; Mcs, mutación cambio de sentido; Ccs, codón de terminación o de stop; Cml, cambio en el marco de lectura; Ri, región intergénica. ^e Cal, calidad; ^f Locus, locus respecto al genoma FQ-96 (SAMN02469896). ^g Ref: Referencia gen en base a *S. aureus* Mu50. ^h F, Grupo funcional al que corresponde en tabla S1.

Pournaras *et al.* (2013) describieron una cepa de *S. epidermidis* dependiente de linezolid cuya causa genética se debía a mutaciones en proteínas L y en varios operones ribosomales 23S, principales dianas de este antibiótico (Pournaras *et al.*, 2013). Siguiendo el mismo razonamiento que la cepa descrita por Pournaras *et al.* (2013), planteamos como primera hipótesis la posible existencia de mutaciones en el ribosoma de FQ-97, que pudieran generar un defecto en el crecimiento y una conformación más estable del ribosoma tras la unión de la clindamicina y la eritromicina, ya que ambos compuestos compartían prácticamente su diana estructural y sus bases de unión en el ARNr 23S. Debido a esto, en el primer análisis de los SNPs nos centramos en aquellas mutaciones que pudieran afectar al ribosoma de FQ-97, específicamente en la subunidad 50S.

En paralelo a este análisis, realizamos la secuenciación de los genes que codificaban para las proteínas ribosomales L4 (*rplD*) y L22 (*rplV*), dado que pueden interactuar en la unión de la eritromicina a sus bases diana en el dominio V del 23S (Douthwaite y Champney, 2001).

Tanto los resultados de secuenciación obtenidos por NGS, tanto la secuenciación de los genes de las proteínas ribosomales L4 y L22 mostraron que no existían mutaciones en el ribosoma de FQ-97

frente a FQ-96, indicando que mutaciones a este nivel no eran la causa genética del fenotipo de semi-dependencia.

Otra de las aproximaciones genéticas que utilizamos para determinar la causa genética del fenotipo de semi-dependencia y su elevada tasa de reversión, fue realizar la secuenciación y posterior análisis de los SNPs de FQ-97 frente a la cepa que denominamos en material métodos FQ-97 revertida (FQ-97_R). FQ-97_R consistió en una cepa procedente de FQ-97, a la que sometimos a sucesivos pases en placas de MH hasta asegurarnos que tanto el fenotipo heteropoblacional como el de semi-dependencia habían desaparecido. En el análisis obtuvimos un total de 13 variaciones en regiones no codificantes del genoma distribuidas de la siguiente manera: 5 cambios aparecían en el NZ_KI542646.1, 5 cambios en el NZ_KI542647.1, 3 cambios en el NZ_KI542648.1 y un cambio en el NZ_KI542649.1. Solo apareció un SNP en el NZ_KI542647.1, que generaba una mutación silenciosa de un cambio de C*T en la proteína hipotética SA1_161015 (posición 531201), por lo que no generaba ningún cambio de aminoácido en la proteína resultante. La falta de mutaciones entre FQ-97 y FQ-97_R en regiones codificantes del genoma podía apuntar que la posible causa de reversión se debía a una cuestión adaptativa.

1.2.2. Búsqueda de mutaciones en los operones ribosomales 23S ARNr

Siguiendo con la hipótesis inicial de que la causa del fenotipo de semi-dependencia estaba relacionada con el ribosoma de FQ-97, realizamos la secuenciación de los diferentes operones ribosomales 23S con el objetivo de encontrar mutaciones en estas regiones. Como comentamos en la introducción, eritromicina y clindamicina, comparten sus bases de interacción en el dominio V de este ARNr; por lo tanto, mutaciones en esta región, podrían estar relacionadas con el fenotipo de semi-dependencia.

Los ARNr no se pueden resolver por secuenciación masiva por encontrarse en el genoma en multicopia y poseer un alto grado de homología, por lo que secuenciamos cada operón mediante *primer walking* para identificar posibles mutaciones. Primero, determinamos que FQ-97 tenía 5 operones 23S y, después, secuenciamos cada uno de ellos, centrándonos principalmente en el dominio V.

Operón	Mutación/ Variación
<i>rnn1</i>	C261T
	G312A
	A1585T
<i>rnn2</i>	C261T
	A280C
	A1585T

	G224A
<i>rnn3</i>	G429A
	C503T
	T1585A
<i>rnn4</i>	–
<i>rnn5</i>	–

Tabla 12. Polimorfismos naturales encontrados en los diferentes operones ribosomales de FQ-97. *rnn1*- *rnn5*, cada uno de los operones de ARNr 23S determinados en FQ-97; En granate se muestra un polimorfismo único de FQ-97 y la cepa de *S. aureus* BAA- 44, procedente de un aislado de fibrosis quística. Variación/mutación, posición a nivel de nucleótido dentro de cada operón ribosomal respecto al genoma de *S. aureus* N315 (GenBank NC_002745) y *S. aureus* MW2 (GenBank NC_003923).

La secuencia de cada operón se analizó mediante Blastn para determinar si los polimorfismos encontrados eran únicos de la cepa FQ-97 o si estaban presentes en otras cepas de *S. aureus*. Aquellas diferencias que encontramos se ilustran en la tabla 12. La mayoría de los cambios encontrados se definen como polimorfismos naturales porque se encuentran en las secuencias de operones de ARNr 23S de otras cepas. Sin embargo, la secuenciación mostró un cambio que estaba solo presente en FQ-97 y la cepa de *S. aureus* BAA- 44 (FDAARGOS_766 (locus NZ_CP041009)). Dicha cepa compartía características con FQ-97, tales como ser un aislado clínico de fibrosis quística, ser un clon ibérico ST-247, y describirse como una población mixta. Debido a estas similitudes conseguimos la cepa para realizarle un antibiograma a eritromicina y clindamicina, y determinar si era la mutación **C503T** en el *rnn3*, la causante del fenotipo de semi-dependencia y el comportamiento heteropoblacional. Una vez realizamos el ensayo, observamos que BAA- 44 no presentaba ni el fenotipo heteropoblacional ni el fenotipo de semi-dependencia, por lo tanto, el resultado indicaba que esta mutación no era la responsable de los fenotipos observados en FQ-97.

Dado que las principales bases de interacción de la eritromicina y la clindamicina en el dominio V son la A2058 y A2059, centramos la atención en la secuencia de las mismas. La resistencia a clindamicina y eritromicina puede venir mediada por mutaciones en estas bases o bien por una posible metilación por parte de la enzima ErmA. Al analizar la secuencia de los 5 operones ribosomales, observamos que todos portaban una A en la posición 2058 y 2059. Por tanto, la ausencia de mutaciones indicaba que ni el mecanismo de resistencia, ni el fenotipo de semi-dependencia a eritromicina y clindamicina estaban causados por mutaciones en la principal zona de interacción de la eritromicina y la clindamicina con el ribosoma. Además, la secuencia A en las bases de ARNr 2058 y 2059, junto a la determinación del gen *ermA* en FQ-97 y una resistencia cruzada a los antibióticos MLS_B mostrada en los antibiogramas, señalaban que el mecanismo molecular de resistencia a eritromicina y clindamicina estaba mediado por el gen *ermA*.

2. Búsqueda del mecanismo molecular asociado al fenotipo de semi-dependencia

Con el objetivo de determinar el mecanismo molecular responsable del fenotipo de semi-dependencia, dividimos el estudio en dos grandes bloques. Por una parte, continuamos con el estudio del ribosoma de FQ-97, desde la determinación de su estructura por Criomicroscopía electrónica por análisis de partícula sencilla (Criomicroscopía electrónica) (Dra. Ilaria Peschiera), a su tasa de síntesis de proteínas *in vitro*, a la caracterización de sus perfiles ribosomales. Por otra parte, el otro gran bloque de estudio se centró en el estudio del gen *thyA*, dado que FQ-97 portaba una mutación en el mismo. Las mutaciones en este gen han adquirido una especial relevancia clínica dada su asociación con la formación de *Small Colony Variants* (SCVs) en pacientes de fibrosis quística. Debido a que FQ-97 presentaba ciertos comportamientos que recordaban a una SCVs —que desarrollaremos a continuación—, junto que procedía también de un paciente de fibrosis quística, y que ya se ha descrito una cepa de *S. aureus* dependiente a linezolid también con una mutación en este gen (López-Hernández *et al.*, 2015), investigamos la posible relación entre esta mutación y los fenotipos heteropoblacional y de semi-dependencia.

2.1. El ribosoma de FQ-97

La hipótesis con la que se inició esta tesis fue que el fenotipo de semi-dependencia estaba relacionado con cambios en el ribosoma de FQ-97. A pesar de no encontrar ninguna mutación, en paralelo a todo el trabajo de secuenciación y análisis de datos, la Dra. Ilaria Peschiera determinó la estructura del ribosoma de FQ-97, con y sin eritromicina, con el objetivo fundamental de determinar si existía algún cambio estructural a nivel de ribosoma tras la unión de la eritromicina. Por una parte, los resultados estructurales indicaron que no había diferencias entre el ribosoma de FQ-97 y el resto de ribosomas depositados en las bases de datos de *S. aureus* y, por otra parte, que no existían cambios estructurales entre ribosomas tratados y sin tratar con eritromicina (datos no mostrados).

2.1.1. Evaluación de la síntesis de proteínas *in vitro*

Con el objetivo de determinar si la eritromicina tenía un efecto directo sobre la actividad o capacidad de síntesis proteica de los ribosomas de FQ-97, realizamos pruebas de síntesis de proteínas *in vitro*. Si el fenotipo se debía a un efecto directo de la eritromicina sobre el ribosoma, un cambio en la tasa de síntesis proteica indicaría que el ribosoma estaba implicado en el fenotipo, ya que trabajamos fuera del sistema natural de la célula de FQ-97. Para este experimento determinamos la tasa de síntesis de la proteína PBP2a, ya que FQ-97 como cepa SARM, porta el gen *mecA* que codifica para esta proteína (Katayama *et al.*, 2000).

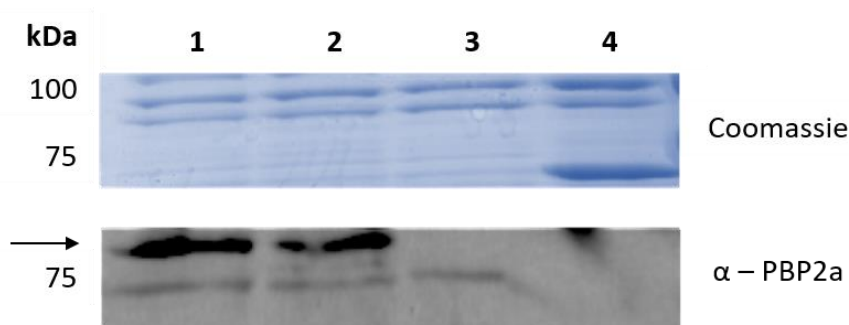


Figura 22. Síntesis *in vitro* de la proteína PBP2a a partir de ribosomas purificados de FQ-97. 1. Reacción llevada a cabo con ribosomas procedentes de MH; 2. Reacción llevada a cabo con ribosomas procedentes de MH suplementado con 50 µg/ ml de eritromicina; 3. Reacción llevada a cabo con ribosomas procedentes de MH a los que se les incubó una vez purificados durante 1h con eritromicina 50 µg/ml; 4. Reacción llevada a cabo con ribosomas procedentes de *E. coli* como control negativo. La flecha muestra la banda correspondiente a la proteína PBP2a con un tamaño de 76 kDa. Se utilizó el anticuerpo anti-PBP2a (1: 2.000).

Tras realizar el experimento, los resultados indicaron que no existían diferencias en la producción de PBP2a entre la síntesis llevada a cabo por ribosomas que procedían de MH (1) y aquellos procedentes de MH + ER (2) (figura 22). También indicaron que aquellos ribosomas que fueron tratados *in vitro* con eritromicina no eran capaces de sintetizar la proteína PBP2a. La posible explicación que le dimos a este resultado fue que la concentración de antibiótico que utilizamos en este ensayo fue demasiado alta, generando reacciones inhibitorias en la traducción, al no utilizar una estequiometría precisa entre concentración de ribosomas-antibiótico (Svetlo *et al.* 2021). Por lo tanto, los resultados confirmaron que el fenotipo de semi-dependencia no estaba relacionado con un efecto directo de la eritromicina sobre los ribosomas de FQ-97.

El conjunto de datos obtenidos tanto a nivel de secuenciación, a nivel estructural como a nivel de síntesis proteica, nos permitieron concluir que no existía ninguna mutación o diferencia relacionada con el ribosoma de FQ-97 que fuera responsable del fenotipo de semi-dependencia observado.

2.1.2. Estudio de los perfiles ribosomales y su relación con la eritromicina

Muchas bacterias son capaces de formar ribosomas 100S o complejos hibernantes que se generan en situaciones desfavorables como en respuesta a un estrés o falta de nutrientes. Los ribosomas 100S están formados por la unión de dos ribosomas 70S y en *S. aureus* esta unión está mediada por un dímero de la proteína HPF (del inglés, *hibernation promoting factor*) (figura 23) (Basu y Yap, 2016; Khusainov *et al.*, 2017; Ueta *et al.*, 2010). La formación de estos complejos genera una ralentización del metabolismo bacteriano, dado que éstos son inactivos a nivel de traducción mientras las condiciones nutricionales no son óptimas. Una vez las condiciones mejoran, existe un mecanismo de desensamblaje de los ribosomas 100S, mediado principalmente por la GTPasa HflX en *S. aureus* (figura 23) (Basu y Yap, 2017).

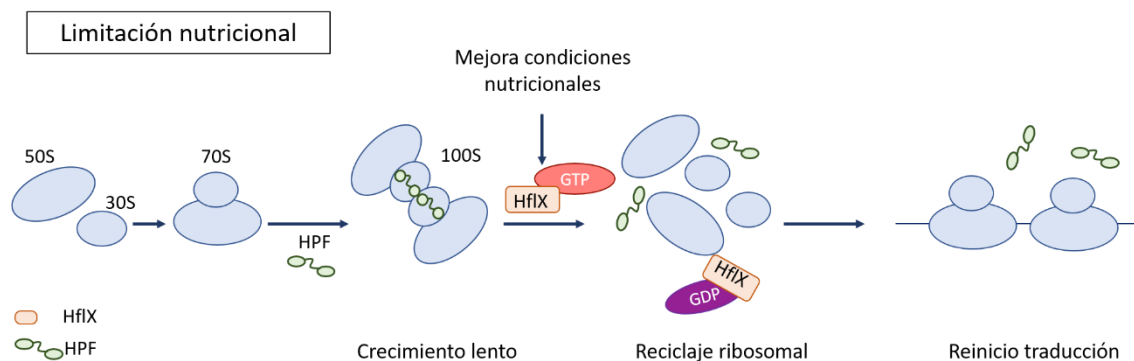


Figura 23. Regulación de la formación y desensamblaje de los ribosomas 100S en *S. aureus* ante una condición de estrés nutricional. En una condición de falta de nutrientes, la formación de los ribosomas 100S está mediada por dímeros de la proteína HPF, lo que provoca una reducción de la capacidad de la traducción de los ribosomas y genera un crecimiento más lento. Cuando las condiciones metabólicas mejoran, los dímeros se desensamblan mediante la GTPasa HflX unida a GTP, y se convierten en reciclables, iniciándose un nuevo ciclo de traducción (Basu y Yap, 2017).

Debido a que FQ-97 no presentaba mutaciones en el ribosoma que explicasen el defecto en crecimiento ni el fenotipo de semi-dependencia, pero los resultados indicaban que ambos estaban relacionados y sujetos a una condición nutricional muy específica, planteamos la hipótesis de que en la condición nutricional MH, la cepa podía estar enfrentando una situación de estrés nutricional, causando un defecto en su crecimiento. Como consecuencia de esta situación, FQ-97 respondía elevando los niveles de sus ribosomas 100S hasta que las condiciones de estrés nutricional mejorasen. La eritromicina y la clindamicina podían estar mejorando estas condiciones de estrés nutricional, lo que se traducía en un crecimiento más rápido de FQ-97 en presencia de estos antibióticos y, por ende, en una disminución de los ribosomas 100S si la hipótesis propuesta era cierta.

Con el objetivo de corroborar o rechazar esta hipótesis, y determinar si existían cambios en los perfiles ribosomales de FQ-97 con y sin eritromicina, realizamos estos ensayos en MH y MH + ER, tanto en FQ-96, que no presentaba crecimiento ralentizado, como en FQ-97. Hemos de mencionar que hasta la fecha la mayoría de este tipo de estudios en *S. aureus* se han realizado desde diferentes puntos de la curva de crecimiento de la bacteria, pero debido a la limitación de pérdida del fenotipo, optimizamos el protocolo para realizarlos desde biomasa de placas de MH, que posteriormente se incubó durante una hora con y sin eritromicina.

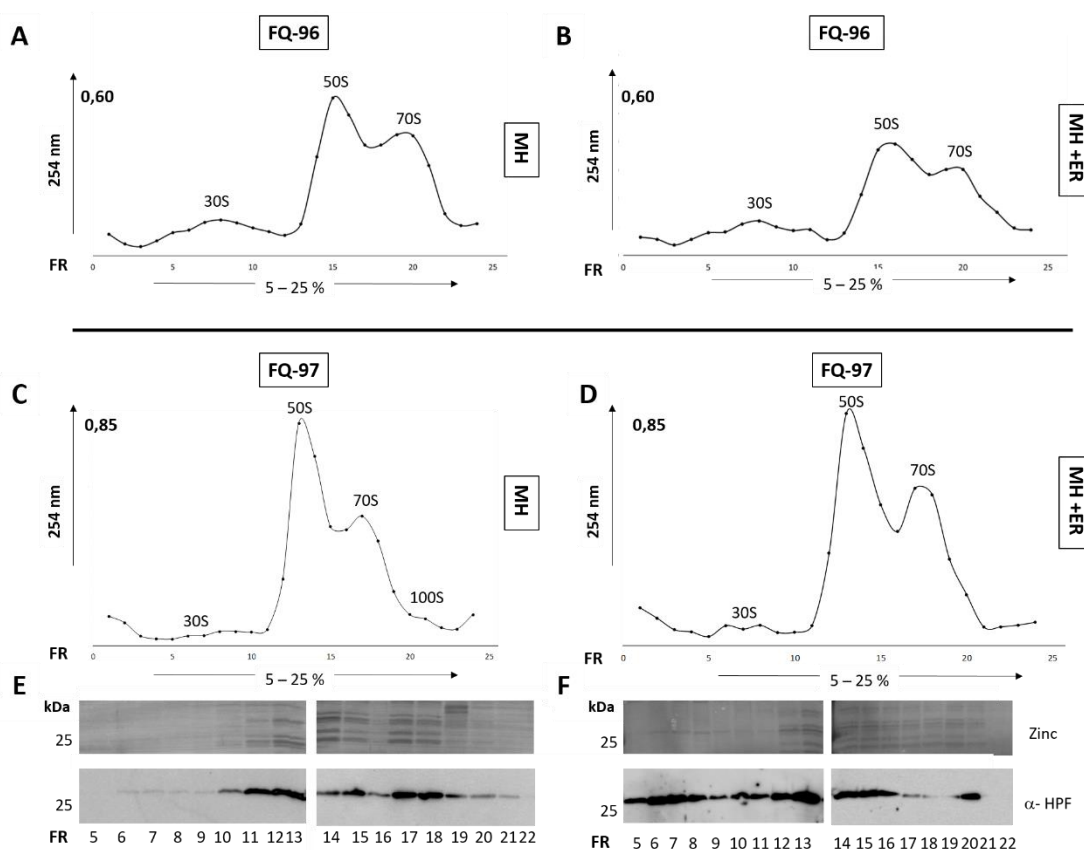


Figura 24. Perfiles ribosomales a partir de gradientes de sacarosa de FQ-96 y FQ-97 desde biomasa de placas de MH posteriormente incubada 1 h sin y con eritromicina. En los paneles superiores A y B observamos los perfiles ribosomales de FQ-96 en ausencia (A) y presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ eritromicina (B). En los paneles C y D observamos los perfiles ribosomales de FQ-97 sin (C) y con 50 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina (D). El eje y corresponde a la absorbancia a 254 nm de las diferentes especies ribosomales (30, 50, 70 y 100S) separadas a través de un gradiente de sacarosa del 5 al 25%. Los valores de Abs_{254} a la derecha representan el valor máximo obtenido en cada perfil y sirven para relativizar los valores obtenidos entre cada condición. Cada panel corresponde a diez unidades Abs_{260} de ribosomas cargados. En la parte inferior E y F mostramos la distribución de HPF en los gradientes ribosomales de FQ-97 sin (E) y con eritromicina (F) mediante *Western blot* con el anticuerpo α -HPF (1: 8.000) con los geles de Zinc correspondientes como control de carga. FR, fracciones ribosomales.

Los resultados obtenidos a través de los gradientes ribosomales indicaron que FQ-97 tenía mayores niveles de ribosomas 100S en MH frente a los de su cepa ancestral FQ-96, que directamente no presentaba este tipo de complejos hibernantes o ribosomas 100S (figura 24, paneles A y C). Los resultados también mostraron cómo, de acuerdo a nuestra hipótesis, los ribosomas 100S disminuían y los 70S aumentaban en FQ-97 tras la exposición a eritromicina (figura 24, paneles C y D). Sin embargo, FQ-96 presentaba una tendencia diferente a la de FQ-97 frente la adición de eritromicina, dado que experimentaba una reducción tanto en las subunidades 50S como en los ribosomas 70S respecto a la condición basal MH (figura 24, paneles A y B).

Por lo tanto, los resultados sugerían que FQ-97 se encontraba en una situación de estrés nutricional en la condición basal MH que FQ-96 no presentaba, y que ante la adición de eritromicina

esta situación mejoraba, ya que de manera directa o indirecta el antibiótico reducía los ribosomas 100S y aumentaba los 70S.

Debido a la implicación de la proteína HFP en la formación los ribosomas 100S evaluamos tanto su abundancia como su distribución a lo largo de las diferentes fracciones obtenidas en los perfiles ribosomales. Realizamos este experimento ya que estudios previos han concluido que alteraciones en la cantidad de esta proteína pueden generar cambios en la cantidad de las diferentes subunidades ribosomales (Basu y Yap, 2016). En esta misma línea los resultados sugerían que en presencia de eritromicina la cantidad de HFP presente en las fracciones ribosomales de FQ-97 era superior frente a la condición control MH, y parecía tener una distribución más inespecífica, ya que prácticamente se encontraba en todas las fracciones ribosomales (figura 24, panel E y F). De esta manera, los resultados señalaban que la adición de eritromicina aumentaba la cantidad de HFP y que en estas condiciones la proteína presentaba una tendencia a unirse inespecíficamente a todas las subunidades ribosomales. Debido a esta observación, y para confirmar los resultados obtenidos, determinamos la cantidad de proteína desde extractos proteicos totales de placas con y sin eritromicina. De nuevo los resultados indicaban un aumento de la proteína HFP en la condición MH + ER frente a MH en la cepa FQ-97 (figura 25).

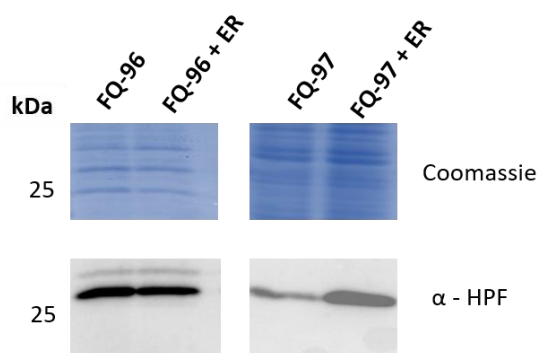


Figura 25. Determinación de la cantidad de proteína HFP desde extractos proteicos de FQ-96 y FQ-97 desde MH con y sin eritromicina (ER) tras 16 h de incubación a 37 ° C. La parte superior muestra el gel Coomassie como control de carga del ensayo. La parte inferior muestra mediante *western blot* la cantidad de HFP en placas de FQ-96 y FQ-97 con y sin eritromicina determinada con el anticuerpo α - HFP (1: 8.000).

Dado que la formación de los ribosomas 100S en *S. aureus* está mediada por un dímero de la proteína HFP (Khusainov *et al*, 2017), también determinamos si como consecuencia de alterar la cantidad de proteína total, la eritromicina podría estar alterando también el patrón de oligomerización de HFP y por tanto su interacción con las fracciones ribosomales a la hora de formar los ribosomas 100S. Tras este ensayo, los resultados indicaron que en presencia del antibiótico el patrón de oligomerización de HFP era diferente, dando lugar a complejos de menor tamaño frente a la condición control MH (figura 26), lo que coincidía con la reducción de los ribosomas 100S en presencia de eritromicina.

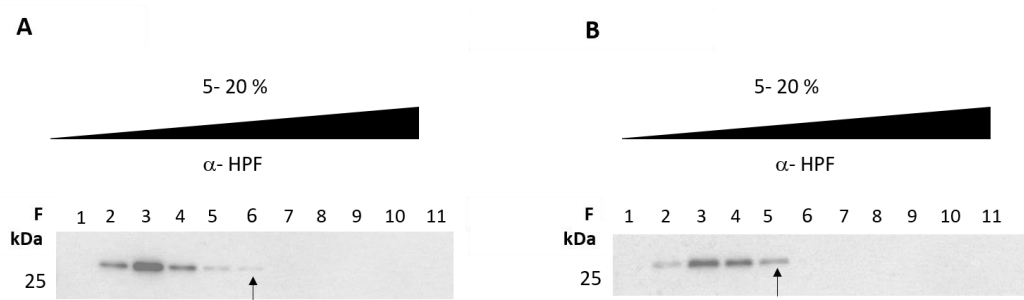


Figura 26. Análisis del estado de oligomerización de la proteína HPF mediante gradientes de sacarosa y *Western blots* en ausencia (A) y presencia (B) de eritromicina en FQ-97. Gradientes de sacarosa del 5 – 20 % donde se cargaron 5 mg/ml de extractos proteicos totales desde biomasa de placas de MH y MH + 50 μ g/ml ER tras 16 h de incubación a 37 ° C para determinar cambios en el estado de oligomerización de la proteína HFP en ausencia (A) y presencia del antibiótico (B). F, fracciones de sacarosa recogidas a lo largo del gradiente. La flecha indica la última fracción en la que apareció la banda correspondiente a HPF. α -HPF (1: 8.000).

Por lo tanto, los resultados de este apartado indicaban que la eritromicina no solo aumentaba la cantidad de HPF, sino que también modificaba el patrón de oligomerización de la misma pudiendo afectar a su posible interacción con las subunidades ribosomales y formación de los ribosomas 100S.

Con el fin de determinar el posible mecanismo por el cual la eritromicina generaba estos cambios tanto en los perfiles ribosomales como sobre la cantidad de HFP en FQ-97 y no en FQ-96, profundizamos en el estudio a nivel regulatorio.

2.1.2.1. Expresión de proteínas asociadas a los ribosomas 100S

Las principales proteínas que median la formación y desensamblaje de los ribosomas 100S en *S. aureus* son HPF y HflX, respectivamente (figura 23). Dado que FQ-97 experimentaba cambios en sus perfiles ribosomales en presencia de eritromicina, evaluamos si el antibiótico afectaba el nivel de transcrito de *hpf* y *hflX* mediante ensayos de qRT-PCR. Como control negativo evaluamos la expresión de la GTPasa ObgE, ya que esta enzima no está implicada en el desensamblaje de los ribosomas 100S en *S. aureus* (Basu y Yap, 2017). Como control del ensayo utilizamos la tetraciclina, antibiótico ribosomal con el que FQ-97 no mostraba el fenotipo de semi-dependencia (figura 27).

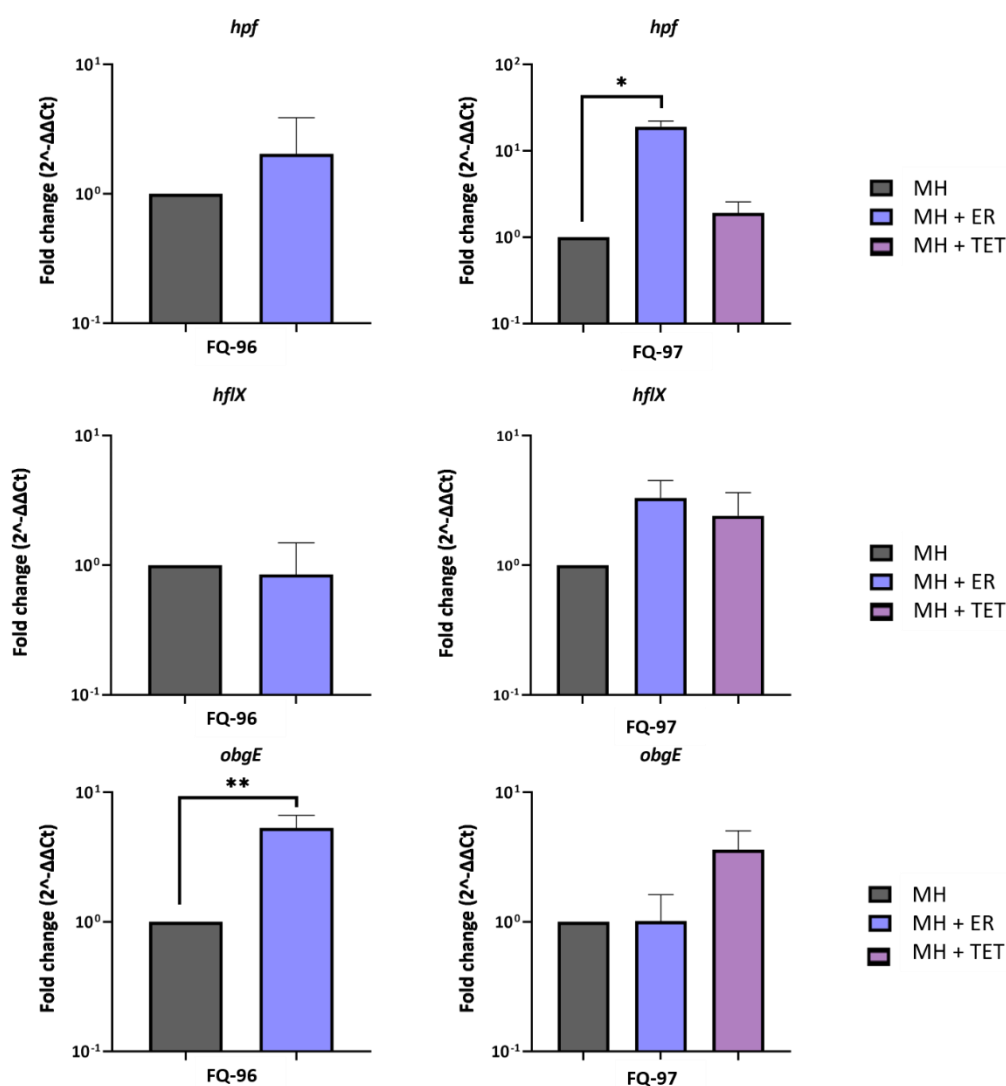


Figura 27. Estudio de la expresión de los genes *hpf*, *hflX* y *obgE* en FQ-96 y FQ-97 mediante qRT-PCR. El *fold change* representa los cambios de expresión del gen diana (*hpf*, *hflX* y *obgE*) relativizados en base al gen *housekeeping* utilizado, *gyrB*. Las barras de error representan el error estándar de 3 réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. La estadística se aplicó en cada cepa por separado respecto a la condición control MH, frente a MH + ER (FQ-96 y FQ-97) y MH + TET (FQ-97). ER, eritromicina; TET, tetraciclina. Test estadístico T-student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Tras la realización de las qRT-PCRs los resultados indicaron que en FQ-97 solo existían diferencias significativas en los niveles de expresión de *hpf* con eritromicina (figura 27), lo que podía coincidir con el incremento en la cantidad de la proteína HPF. Aunque no fue significativo, los resultados también mostraron un incremento de la expresión de *hflX* con eritromicina en FQ-97 y no en FQ-96, sin embargo, también encontramos este aumento con tetraciclina, lo que sugería que no era un efecto relacionado con el fenotipo de semi-dependencia. En FQ-96, el gen *obgE* aparecía significativamente sobreexpresado ante la adición de eritromicina, hecho que no observábamos en FQ-97. Este resultado sugería dos maneras diferentes de responder ante la adición del antibiótico entre FQ-96 y FQ-97. Aunque posiblemente esta sobreexpresión en FQ-96 no estaba relacionada con los ribosomas 100S, dado que ya se ha demostrado *in vitro* que esta GTPasa al contrario que HflX no tiene la capacidad para desensamblarlos (Basu y Yap, 2017).

2.1.2.2. Variación de los niveles de (p)ppGpp en presencia de eritromicina

Como acabamos de comentar, la GTPasa que media en desensamblaje de los ribosomas 100S en *S. aureus* es HflX y su actividad se regula en base a los niveles de GTP y (p)ppGpp intracelulares (Basu y Yap, 2017). A su vez, HPF, también responde en base a los niveles de GTP y (p)ppGpp, ya que aumenta ante un estado de falta de nutrientes, que va asociado a un aumento de la alarmona (p)ppGpp (Basu y Yap, 2017) (figura 28). Esta situación de aumento de los niveles de (p)ppGpp en respuesta a una limitación nutricional, se denomina respuesta estricta (Steinchen *et al.*, 2020). Aunque en este apartado solo hagamos referencia al aumento de los niveles de (p)ppGpp por limitaciones nutricionales, esta alarmona se puede acumular en respuesta a otras señales de estrés ambiental (variación de los niveles de oxígeno, descenso del pH, choque osmótico, cambio de temperatura o incluso exposición a la oscuridad) (Pacios *et al.*, 2020).

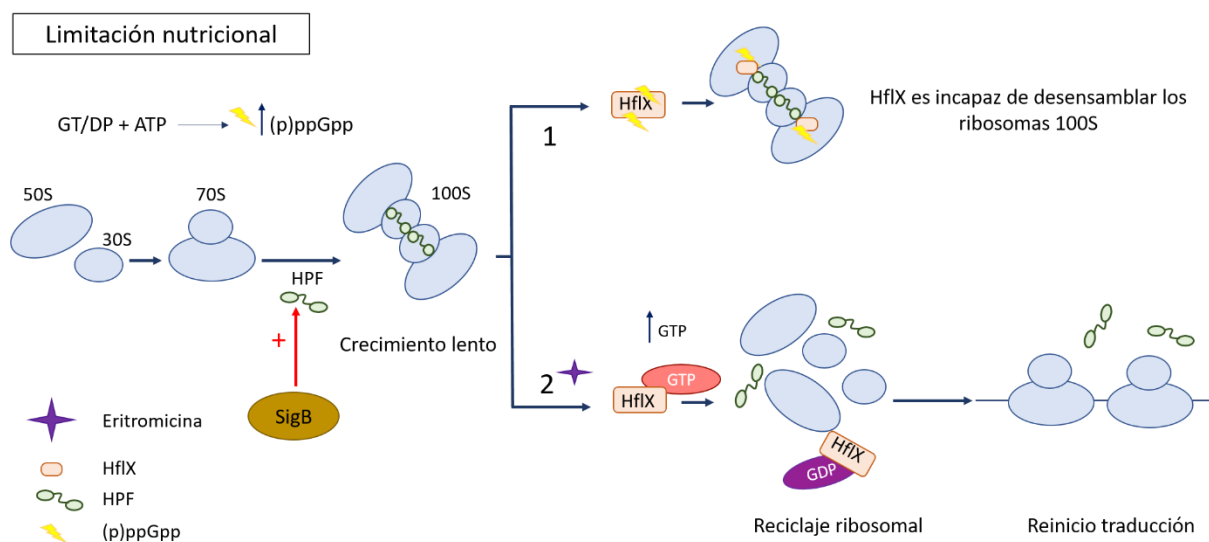


Figura 28. Regulación de la formación y desensamblaje de los ribosomas 100S en *S. aureus* en base a los niveles de GTP y (p)ppGpp. Ante una condición de falta de nutrientes, la alarmona (p)ppGpp es sintetizada a partir de los sustratos GT(D)P y ATP y se forman los ribosomas 100S es a través de dímeros de la proteína HPF. Ante un escenario 1) en el que persiste la falta de nutrientes, el ppGpp puede unirse a HflX (HflX · ppGpp). Con esta unión la GTPasa HflX no puede disociar los complejos, pero si puede unirse al centro peptidiltransferasa (PTC) en la subunidad 50S. En el escenario 2), ante una mejora de las condiciones nutricionales, una situación similar a lo que estaría generando la eritromicina, los niveles de GTP aumentan. La hidrólisis de GTP por una parte promueve la liberación de HFP y por otra parte a través de la formación del complejo HflX · GTP, la GTPasa ya es capaz de desensamblar los ribosomas 100S. La respuesta a estrés general mediante sigma-factor B (SigB) también activa la expresión de *hpf* a 37 ° C.

Dado que los resultados mostraron una disminución en los ribosomas 100S, cambios tanto en la expresión como en la producción de HPF ante la adición de eritromicina en FQ-97, determinamos también si existían diferencias en los niveles de (p)ppGpp. El principal objetivo de este análisis fue establecer si de acuerdo a nuestra hipótesis, FQ-97 enfrentaba una situación de estrés nutricional en MH que mejoraba en presencia de eritromicina. Modificaciones en los niveles de esta alarmona —dado que también interviene en el ciclo de formación/ desensamblaje de los ribosomas 100S (figura 28)— podrían

ser un buen indicador de las condiciones de estrés metabólico bacterianas. Para medir estos niveles utilizamos el quimiosensor PyDPA, que como se explicó en materiales y métodos (apartado 8) cuánto más PPI tenga unido el compuesto, mayor cantidad de (p)ppGpp existe en las células, y mayor emisión de fluorescencia a 470 nm detectaremos.

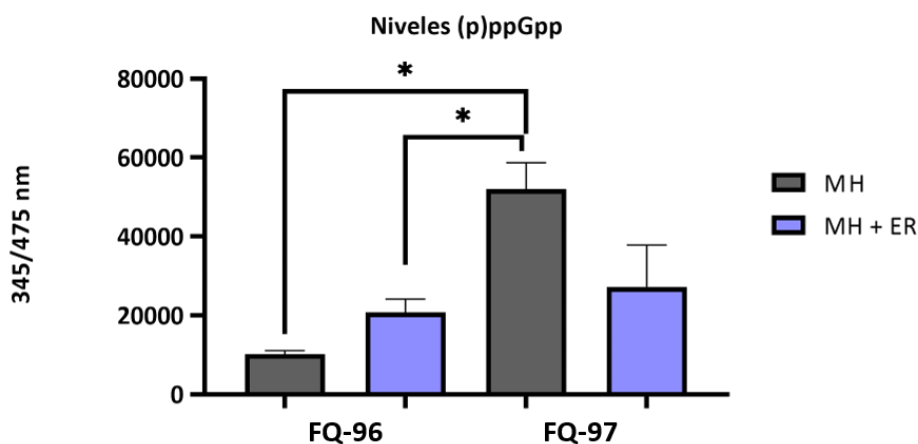


Figura 29. Análisis de los niveles de (p)ppGpp en FQ-96 y FQ-97 en MH y MH + ER mediante el quimiosensor fluorescente PyDPA. Representación de las medias obtenidas de 3 experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar. Test ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple Tukey (* P <0,05).

Tras esta aproximación, los resultados indicaron que los niveles basales de FQ-97 en MH quintuplicaban los niveles de (p)ppGpp respecto a los de su cepa ancestral en la misma condición (figura 29). Los resultados también mostraban que, al añadir eritromicina, aunque sin ser una diferencia significativa, los niveles de (p)ppGpp en FQ-97 se reducían prácticamente a la mitad. Este patrón no se repetía en FQ-96, dado que tras la adición del antibiótico los niveles de (p)ppGpp aumentaban ligeramente frente a la condición MH, lo que indicaba de nuevo dos maneras diferentes de responder ante la adición del antibiótico entre FQ-96 y FQ-97.

Por tanto, en la misma línea que lo observado con los ribosomas 100S, este ensayo sugirió por un lado que FQ-97 en la condición basal MH podría encontrarse en una situación de estrés metabólico, dado los elevados niveles de esta alarmona frente a su cepa ancestral FQ-96. Y por otro lado, la adición de eritromicina y la evidente reducción de los niveles de (p)ppGpp que ésta generaba, apuntaban a que el antibiótico pudiese estar teniendo algún efecto directo o indirecto sobre el metabolismo, mejorando estas condiciones de estrés nutricional o metabólico.

En conjunto de los resultados sugería que la hipótesis planteada era correcta, y que en presencia de eritromicina se producía una disminución del estrés metabólico en FQ-97 en la condición específica MH, que se veía reflejada en una disminución en los ribosomas 100S y en los niveles de (p)ppgpp. El antibiótico parecía estar generando cambios metabólicos que se traducían en una mejora del crecimiento bacteriano. Por ello, las colonias de FQ-97 próximas a la tira de antibiótico experimentaban una mejora en su crecimiento frente aquellas colonias alejadas, lo que podía estar generando el fenotipo de semi-dependencia.

Estos resultados más relacionados con el metabolismo bacteriano generaron una nueva búsqueda de los SNPs obtenidos entre FQ-96 y FQ-97, con el fin de determinar la causa genética que pudiese explicar esta hipótesis y por tanto el fenotipo de semi-dependencia. En esta ocasión, centramos la búsqueda de SNPs en genes relacionados con el metabolismo bacteriano.

Previamente, Gao *et al.* (2010), ya asociaron los altos niveles de (p)ppGpp a comportamientos SCVs debido a una mutación en el gen *rsh*, que codifica para la principal hidrolasa de este compuesto en *S. aureus* (Gao *et al.*, 2010). En búsqueda de una explicación genética similar, analizamos de nuevo los SNPs obtenidos y no existían mutaciones en *rsh*. Una nueva búsqueda nos permitió encontrar una mutación en el gen *thyA*, previamente asociado a poblaciones SCVs, como las descritas por Gao *et al.* (2010), y con una alta implicación en el metabolismo bacteriano.

En base a nuestros resultados previos decidimos estudiar este gen, así como la mutación encontrada en el mismo (tabla 11) basándonos, por un lado, en su posible implicación en el metabolismo bacteriano y por otro lado, en los resultados publicados por López-Hernández *et al.* (2015). En este estudio describen por primera vez una cepa de *S. aureus* dependiente de linezolid que guarda ciertas similitudes con la cepa FQ-97. La cepa descrita en este estudio procedía de un paciente con fibrosis quística y presentaba un problema en su crecimiento comportándose como una SCVs dependiente de timidina, asociadas a mutaciones en el gen *thyA*. También presentaba una dependencia a un antibiótico ribosomal, el linezolid, sin presentar mutaciones en el dominio V del 23S, diana de este compuesto (López-Hernández *et al.*, 2015). En este sentido, FQ-97 también presentaba un problema en su crecimiento, dado que se comportaba como una heteropoblación, y, además, el fenotipo de semi-dependencia tampoco estaba causado por mutaciones en las dianas de los antibióticos ribosomales eritromicina y clindamicina.

2.2. El gen *thyA*

El estudio del gen *thyA* en bacterias ha adquirido una especial relevancia en aislados clínicos de *S. aureus* procedentes de fibrosis quística con comportamiento SCVs. Aunque existen diferentes tipos de SCVs, todas ellas se caracterizan por presentar un defecto en su crecimiento causado por mutaciones en importantes vías del metabolismo bacteriano (Proctor *et al.*, 2006). En concreto, las SCVs dependientes de timidina están generadas por mutaciones en el gen *thyA*, que codifica para la timidilato sintasa (TS). Esta enzima cataliza la reacción de síntesis de 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) o timidilato, mediante metilación de 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP), utilizando como donador del grupo metilo el cofactor (6R)-5,10-metilen-5,6,7,8-tetrahidrofolato/ N5, N10, metilen-TFH (mTHF). A partir del dTMP que se genera en esta reacción, se va a sintetizar el dTTP o desoxitimidina trifosfato, necesario para replicación de ADN (figura 30). Una mutación en *thyA* puede generar comportamientos SCVs por una disminución en los niveles de dTMP y por lo tanto de dTTP, debido a deficiencias o total inactividad de la enzima TS (Kriegeskorte *et al.*, 2015).

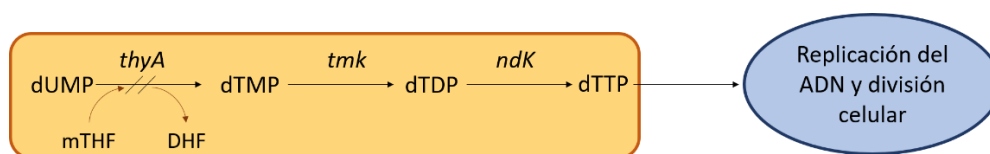


Figura 30. Ruta de síntesis endógena del timidilato (dTMP). El dTMP, producto de reacción de la TS, es un precursor fundamental para la generación de dTTP, necesario para la replicación del ADN y por tanto en la división celular. Mutaciones en *thyA* que comprometan la actividad enzimática de TS pueden generar una reducción en los niveles de dTMP y generar SCVs. DHF, dihidrofolato; dUMP, desoxiuridina-monofosfato; dTMP, desoxitimidina monofosfato; dTDP, desoxitimidina difosfato; dTTP, desoxitimidina trifosfato; mTHF, N5, N10, metilen-TFH. *thyA* (SAV1427), *tmk* (SAV0482), *ndK* (SAV1469).

La enzima TS establece una conexión a través de un bucle metabólico entre la síntesis de pirimidinas y la síntesis del folato, dado que es la que provee nuevo dihidrofolato (DHF) a la ruta de síntesis del tetrahydrofolato (THF), como producto de reducción del mTHF. Por tanto, además de estar implicada en la síntesis de ADN participa en el metabolismo folato, necesario para la síntesis de purinas (Fernández-Villa *et al.*, 2019). A su vez, la TS necesita mTHF —que deriva del metabolismo del tetrahydrofolato— como principal donador del grupo metilo de la reacción que cataliza (figura 31).

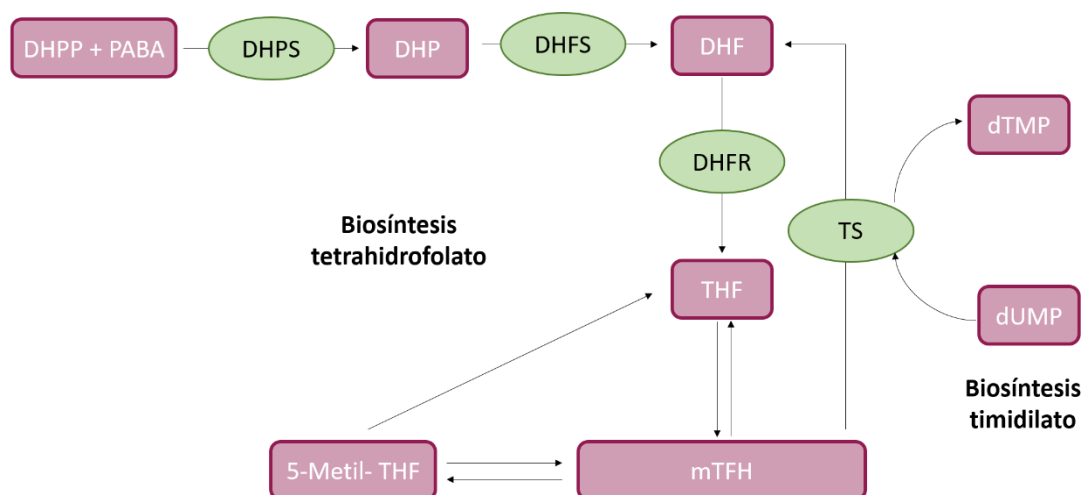


Figura 31. Relación entre vía de síntesis del tetrahydrofolato y el timidilato en *S. aureus*. TS media un bucle metabólico suplementando dihidrofolato (DHF) a la vía de síntesis del tetrahydrofolato (THF), mientras que a su vez necesita el N5, N10, metilen-TFH (mTFH) que se genera en la ruta del folato para sintetizar dTMP (timidilato). Los cuadrados granates representan los sustratos o productos de reacción, los círculos verdes representan las enzimas. * DHPS, dihidropteroato sintasa, codificada por el gen *folP* (SAV0514); DHP, dihidropteroato, DHFS, dihidrofolato sintasa, codificada por el gen *folC* (SAV1662); DHFR, dihidrofolato reductasa, codificada por el gen *folA* (SAV1426), TS, timidilato sintasa, codificada por el gen *thyA*, TK.

Por lo tanto, como hemos comentado al inicio de este apartado, consideramos importante el estudio de la mutación de *thyA* en FQ-97 basándonos en que era una mutación que podría afectar al metabolismo bacteriano. Además, FQ-97 compartía una serie de características con las SCV dependientes de timidina, como que, 1) suelen proceder de infecciones de fibrosis quística (Besier *et al.*, 2007), 2) presentan un alto porcentaje de reversión a una cepa WT lo que genera comportamientos heteropoblacionales (Kriegeskorte *et al.*, 2015), 3) crecen con dificultad o no pueden crecer en medios

con bajos niveles de timidina, como es el MH (Haltiner *et al.*, 1980) y 4) previamente se han descrito poblaciones SCVs con niveles elevados de (p)ppGpp (Gao *et al.*, 2010) aunque FQ-97 no presentase mutaciones en *rsh*.

En base a estos motivos, planteamos que el efecto de la eritromicina podía estar relacionado con la mutación en *thyA*. Si la mutación encontrada afectaba a la actividad de TS, podía ser la principal explicación al problema de crecimiento observado en FQ-97. Y además, dado que previamente los resultados habían indicado que el fenotipo heteropoblacional y de semi-dependencia estaban relacionados, y el primero era un condicionante para que el segundo apareciera, si la mutación en *thyA* era la causante del problema de crecimiento, también podía serlo del fenotipo de semi-dependencia.

2.2.1. Caracterización de la mutación en el gen *thyA*

Tras volver a analizar los SNPs y encontrar la sustitución G940A en el gen *thyA* presente en FQ-97 (tabla 11), realizamos una primera aproximación bioinformática de la calidad de las lecturas obtenidas por NGS. Esta aproximación mostró que la mutación aparecía en la mayoría de las lecturas de secuenciación masiva y presentaba una alta calidad. Posteriormente secuenciamos en el laboratorio el gen *thyA* en FQ-96 y FQ-97. Los resultados de secuenciación indicaron que la mutación estaba presente en FQ-97 y no en FQ-96 —coincidiendo con los datos de secuenciación masiva—.

La mutación encontrada generaba un SNPs de cambio de sentido, generando una sustitución G940A, lo que a nivel de proteína se traducía en una sustitución de una Ala314Thr, un cambio de una alanina, aminoácido (aa) pequeño e hidrofóbico por una treonina, de carácter hidrofílico. Dado que el gen *thyA* tiene una longitud total de 957 nt, y codifica para una proteína de 318 aa, la sustitución encontrada recaía sobre el extremo C-terminal, prácticamente al final de la secuencia proteica. Dicha mutación ya se había descrito previamente en un aislado clínico de *S. aureus* procedente de un paciente con fibrosis quística (Kriegeskorte *et al.*, 2014). Con el principal objetivo de evaluar cómo de frecuente era la aparición de la sustitución encontrada en FQ-97, realizamos un alineamiento múltiple con Blastp frente a aquellas secuencias depositadas en el NCBI del gen *thyA* en *S. aureus*. Tras el análisis, los alineamientos mostraron que no existían otras cepas de *S. aureus* depositadas en las bases de datos tuviesen la misma mutación que FQ-97. Sin embargo, el análisis mostraba dos cepas de *S. aureus* con una sustitución en la misma posición a nivel de aminoácido, aunque el cambio era de una alanina por una valina (Ala314Val) (WP_123118444.1). Ambas cepas procedían de una infección por fibrosis quística, en mujer (*biosample* SAMN15307025) y en niño (*biosample* SAMN09847815). Por lo tanto, los resultados indicaban que no era la primera vez que esta mutación aparecía en la clínica en cepas de *S. aureus* y que podía estar asociada a la patología de fibrosis quística.

Una vez se confirmó la presencia de la mutación en el gen *thyA* de FQ-97, caracterizamos a FQ-97 como posible SCVs, ya que mutaciones sobre este gen ya se había asociado a SCVs (Chatterjee *et al.*, 2008). Posteriormente evaluamos cómo podía estar afectando la sustitución Ala314Thr tanto a la actividad enzimática como a su posible regulación, ya que como explicamos, si ésta era la principal

causa del fenotipo heteropoblacional, también podía serlo del de semi-dependencia dada la relación que guardaban ambos.

2.2.2. Caracterización de FQ-97 como SCVs

Dado que FQ-97 compartía ciertos aspectos en su comportamiento con los de las SCVs, decidimos caracterizarla como una posible población de este tipo. Lo primero que realizamos fue un ensayo de auxotrofia con discos impregnados de timidina, para observar si se producía un mayor crecimiento alrededor del disco.

Por una parte, al intentar realizar este tipo de ensayo, FQ-97 revertía y perdía el fenotipo heteropoblacional, por lo que era imposible determinar esta auxotrofia. Además, el hecho de que FQ-97 creciera como una heteropoblación en MH ya era un indicativo de que no era una bacteria auxótrofa de timidina ya que, aunque como heteropoblación, la bacteria era capaz de crecer en este medio que posee bajos niveles de timidina (Haltiner *et al.*, 1980).

Por otra parte, FQ-97 compartía con las SCVs la alta tasa de reversión que caracteriza a estas poblaciones, lo que genera en ellas la aparición de comportamientos heteropoblacionales. Este fenotipo heterogéneo se empieza a observar en las SCVs conforme las poblaciones empiezan a sufrir pases en medios como el MH, sin embargo, en FQ-97 lo observábamos desde el plaqueo inicial. Este resultado podría indicar que FQ-97 se encontrase intentando revertir el fenotipo heteropoblacional que le causó la mutación en *thyA*, y estar ya en el típico estado de reversión que caracteriza a las SCVs. Por estos motivos, aunque es posible que FQ-97 procediera de una población SCVs, cosa que abarcaremos en la discusión de esta tesis, no la catalogamos como una población de este tipo.

2.2.3. Actividad enzimática de TS-97

Con el fin de determinar si la mutación encontrada en *thyA* afectaba a la actividad enzimática de TS, y pudiese ser la principal explicación al problema de crecimiento en FQ-97, realizamos ensayos de actividad enzimática desde extractos celulares de cepas de *E. coli* BL21 gold que sobreexpresaban la TS-96 y la TS-97. Previamente, se comprobó que la producción de las dos variantes era similar en las condiciones ensayadas (figura 32) por lo que ensayamos diferentes concentraciones de lisado proteico y dUMP hasta obtener una recta lineal en el tiempo, lograda a 1,97 mg/ml de extracto proteico y 1 mM de dUMP.

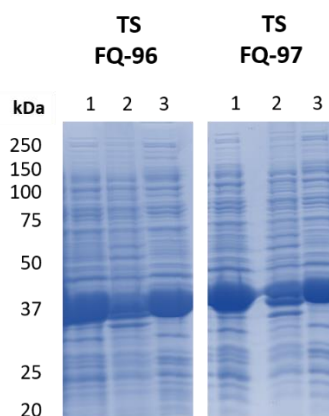


Figura 32. Coomassies de sobreproducción de TS-96 y TS-97. Producción de TS de FQ-96 y FQ-97 desde células de *E. coli* BL21 gold inducidas con 0,1 mM de IPTG durante toda la noche a 18 ° C 200 rpm. Carril 1, cultivo total roto; carril 2, resto celular; carril 3 parte citosólica. Tamaño TS 36,83 kDa.

Para determinar la actividad enzimática monitorizamos el incremento de absorbancia a 340 nm que se produce debido a la reacción de oxidación de mTHF a DHF (Wahba y Morris, 1962). Este ensayo permite determinar a igualdad de concentración de proteínas en el extracto celular, la velocidad de transformación de mTFH a DFH, que equivale a la pendiente de la recta, m ($y = mx + b$). De este modo, trabajando con el extracto, asumimos que el cofactor mTHF se encontraba de manera natural en la célula.

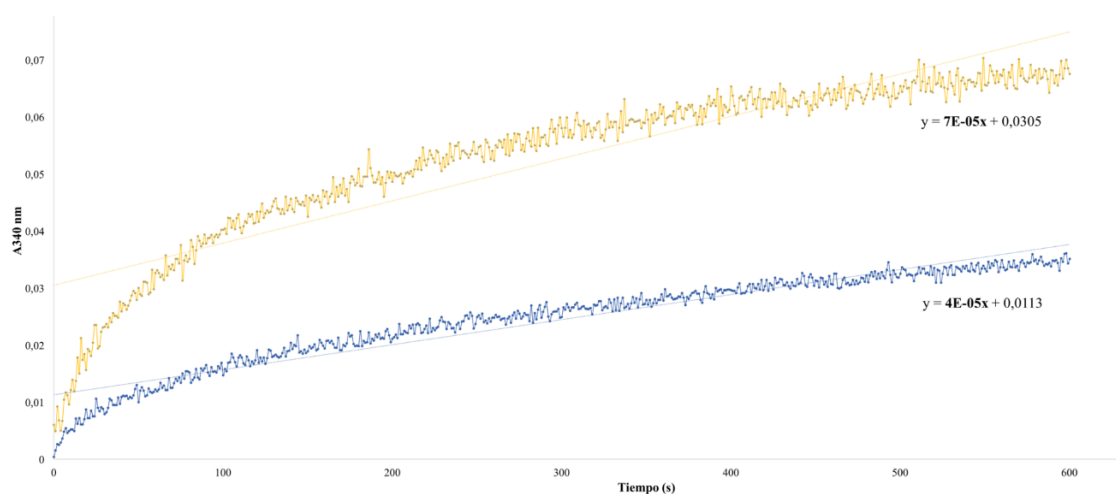


Figura 33. Determinación de la actividad enzimática de TS-96 y TS-97. Mediante monitorización de la absorbancia emitida a 340 nm debida a transformación del cofactor mTHF a DHF determinamos la actividad de TS-96 (amarillo) y TS-97 (azul).

Los resultados de actividad enzimática revelaron que la actividad de TS-97 era menor que la de TS-96, (figura 33) a través de un cambio en la velocidad relativa de reacción de 2,36 en la TS de FQ-96, a 1,35 en FQ-97 (tabla 13), una reducción del orden de 1,7 veces. Por lo tanto, la mutación en *thyA* generaba una deficiencia en la actividad de TS-97, pero no una pérdida de la misma, por lo tanto, la bacteria todavía podía catalizar la reacción de síntesis de dTMP.

Cepa	Ecuación de la recta	Velocidad relativa a concentración (m/ µg) ^b
FQ-96	$y = 7E-05x + 0,0305$	2,36
FQ-97	$y = 4E-05x + 0,0113$	1,35

Tabla 13. Valores de actividad enzimática de TS-96 y TS-97. ^a Ecuación de la recta de la curva de actividad de TS-96 y TS-97, el valor de la pendiente corresponde a velocidad de la reacción. ^b Velocidad de reacción relativa a la concentración de proteínas del extracto celular enriquecido en TS.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en este apartado, junto con los resultados obtenidos previamente sobre la relación entre el efecto de la eritromicina y las condiciones metabólicas en las que se encontraba FQ-97 en MH, formulamos una nueva hipótesis sobre la causa del fenotipo de semi-dependencia. Planteamos que la eritromicina era capaz de generar un redireccionamiento metabólico hacia la producción de dTMP, compensado la falta de actividad en TS debida a la mutación en *thyA*. Este redireccionamiento explicaría por qué FQ-97 crecía más rápido en torno a la tira de eritromicina generándose un fenotipo de semi-dependencia. Y por qué aquellas colonias que crecían en los laterales de la placa, necesitaban más tiempo para poder sintetizar dTMP debido al detrimento en actividad de TS. A su vez, tema que abarcaremos en la discusión de esta tesis, la mutación en *thyA*, podía ser la responsable de las condiciones de estrés metabólico en las que se encontraba FQ-97 en MH, dado que este medio posee bajos niveles de timidina, por lo que también podría ser la principal causa de los altos niveles de ribosomas 100S y (p)ppGpp.

Para poder comprobar si la nueva hipótesis era la correcta, realizamos una aproximación que nos permitiera establecer una conexión entre el fenotipo de semi-dependencia, el heteropoblacional y la mutación en *thyA*.

2.2.4. Reversión del fenotipo de semi-dependencia

2.2.4.1. Reversión en presencia de timidina

Para determinar si la mutación en *thyA* estaba relacionada con el fenotipo de semi-dependencia y heteropoblacional, suplementamos MH con 1 mg/ml de timidina. Tras esta suplementación, ambos fenotipos se perdían en FQ-97 (figura 34). El resultado indicaba que la mutación en *thyA* y la falta de actividad en TS que ésta generaba, era la responsable del defecto en crecimiento, y que, de nuevo, los fenotipos heteropoblacional y de semi-dependencia estaban relacionados, ya que, ante un suplemento exógeno de timidina, ambos desaparecían. Además, el resultado confirmaba que la ralentización en el crecimiento era una condición necesaria para que la eritromicina supusiera una ventaja en crecimiento a FQ-97.

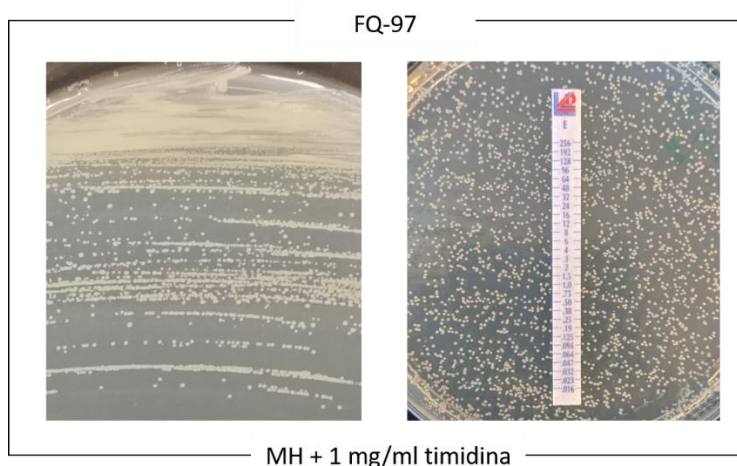


Figura 34. Reversión del fenotipo heteropoblacional (izquierda) y de semi-dependencia (derecha) de la cepa FQ-97 en MH suplementado con 1 mg/ml timidina tras 16 h a 37 ° C.

2.2.4.2. Reversión mediante la complementación de la mutación en el gen *thyA*

En la misma línea que el apartado anterior, complementamos la mutación en *thyA* para determinar si los fenotipos se perdían, tal y como pasaba ante una suplementación con timidina. Para ello, transformamos FQ-97 con el plásmido pJL74_ptyA_thyA desde cepas de *E. coli* IM08, modificadas genéticamente de tal manera que permitieran transformar cepas clínicas correspondientes al CC8 (Monk *et al.*, 2015) al que pertenecía FQ-97. A través de la introducción de un plásmido con una copia WT del gen *thyA*, el resultado indicó que la cepa FQ-97 perdía el fenotipo de semi-dependencia en MH (figura 35), al igual que lo que ocurría con un suplemento exógeno de timidina. Es importante destacar, que en todo momento se llevó un control de la cepa FQ-97 sin plásmido, asegurando que durante todo el proceso de transformación las células electrocompetentes de FQ-97 no perdían el fenotipo.



Figura 35. Complementación del fenotipo de semi-dependencia de la cepa FQ-97 en MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. Complementación de FQ-97 con una copia WT del gen *thyA* mediante transformación con la construcción pJL74_ptyA_thyA.

Por lo tanto, los resultados indicaban que una vez el detrimento en la actividad de TS se veía compensando o bien por un suplemento exógeno de timidina, o bien mediante la complementación de la mutación en *thyA*, los fenotipos heteropoblacionales y de semi-dependencia se perdían. Estos datos confirmaban la relación de ambos fenotipos y que el defecto en creciendo era una condición necesaria para que la eritromicina fuera una ventaja en FQ-97.

2.2.5. Efecto a nivel transcripcional de la eritromicina sobre *thyA* y *folA*

Dada la hipótesis planteada y la posible relación entre la mutación en *thyA* y la eritromicina, con el principal objetivo de determinar si el efecto encontrado tenía una causa regulatoria, estudiamos si la eritromicina modificaba los niveles de expresión en *thyA* y en *folA*, su gen contiguo, ya que su regulación está estrechamente relacionada (Schober *et al.*, 2019) a través de qRT-PCRs (figura 36). Varios autores han apuntado que el gen *thyA* en procariontes podría tener una regulación negativa por producto (Chatterjee *et al.*, 2008), por lo que si la eritromicina estaba redireccionando los flujos metabólicos hacia dTMP compensando la falta de actividad de TS, esperábamos ver una represión en la expresión de *folA* y *thyA*.

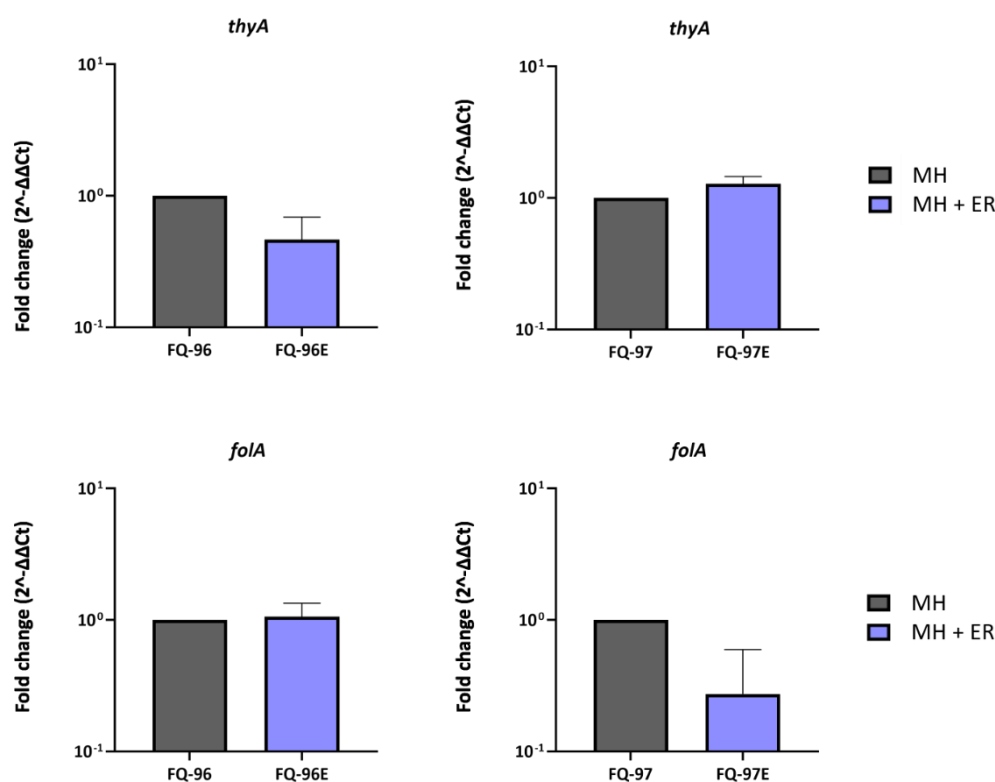


Figura 36. Expresión de los genes *thyA* y *folA* en FQ-96 y FQ-97 cuantificada mediante qRT-PCR. El *fold change* representa los cambios de expresión del gen diana (*thyA* y *folA*) relativizados en base al gen *housekeeping* utilizado, *gyrB*. Las barras de error representan el error estándar al menos de 3 réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. La estadística se aplicó en cada cepa por separado respecto a la condición control MH, frente a MH + ER. Test estadístico T-student.

Sin embargo, los resultados de qRT-PCR indicaron que no existían cambios significativos en la regulación de *thyA* y *folA* tras la suplementación con eritromicina, lo que sugería que el efecto de semi-

dependencia y el posible redireccionamiento de flujos metabólicos hacia dTMP no estaba relacionado con cambios a nivel de la transcripción de estos genes.

2.3. Determinación del perfil de sensibilidad a SxT en presencia de eritromicina

Basándonos en que la mutación en *thyA* afectaba a la actividad enzimática de TS, y con ello, a la síntesis de dTMP, continuamos con el estudio de relación entre la eritromicina, el fenotipo de semi-dependencia y la mutación en este gen.

Para ello, nos centramos en el efecto antimicrobiano de los denominados antibióticos que interfieren en el metabolismo del folato, como son el sulfametoxazol (SXM), y el trimetoprim (TM). Estos antibióticos se aplican de manera conjunta en pacientes que presentan fibrosis quística y una infección asociada de *S. aureus*. El sulfametoxazol inhibe la dihidropteroato sintasa (DHPS), interrumpiendo la ruta de síntesis del folato, mientras que el trimetoprim inhibe la dihidrofolato reductasa (DHFR), imposibilitando la conversión de DHF a THF (figura 37). El efecto de ambos antibióticos (SxT), genera por tanto una reducción en la disponibilidad del cofactor mTFH que la TS necesita para la conversión de dUMP a dTMP. Por lo tanto, estos antibióticos además de afectar al metabolismo del folato, afectan de manera indirecta a la síntesis del dTMP y por tanto dTTP (figura 37).

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan en los hospitales es la habilidad de *S. aureus* para evadir el efecto antimicrobiano de estos compuestos SxT. De manera endógena *S. aureus* solo porta una vía de síntesis de dTMP y dTTP, por lo que el tratamiento con SxT alteraría estos niveles inhibiendo la vía del folato (figura 37). Sin embargo, en infección *S. aureus* es capaz de liberar la timidina de las células eucariotas en las que se está replicando a través de la termonucleasa Nuc (Proctor, 2008) e internalizarla a través del transportador NupC (Kriegeskorte *et al.*, 2014). En el momento en el que *S. aureus* asimila la timidina exógena, el efecto de los antibióticos SxT sobre la ruta de síntesis de dTMP queda eliminado ya que no es necesaria la ruta de síntesis endógena (figura 37).

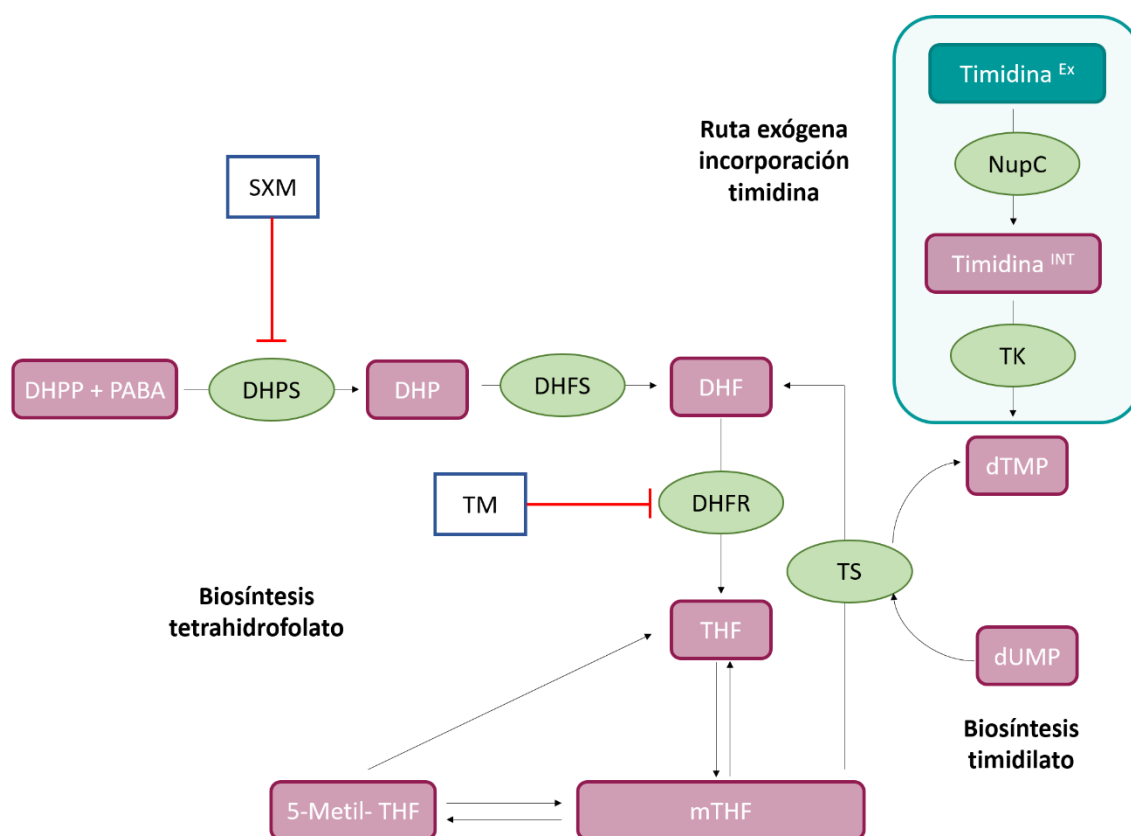


Figura 37. Relación entre vía de síntesis del tetrahidrofolato y el timidilato en *S. aureus*. TS media un bucle metabólico suplementando dihidrofolato (DHF) a la vía de síntesis del tetrahidrofolato (THF), mientras que a su vez necesita el N5, N10, metilen-TFH (mTFH) que se genera en la ruta del folato para sintetizar dTMP. A la derecha, en un recuadro azul encontramos la vía de síntesis exógena de dTMP cuando *S. aureus* es capaz de incorporar el nucleósido de timidina desde una fuente exógena, que mediante TK transformará a dTMP, y sintetizará dTTP. Los cuadrados granates representan los sustratos o productos de reacción, los círculos verdes representan las enzimas. En rojo encontramos indicado la reacción de inhibición que median el SXM y TM. * DHPS, dihidropteroato sintasa, codificada por el gen *folP* (SAV0514), DHP, dihidropteroato; DHFS, dihidrofolato sintasa, codificada por el gen *folC* (SAV1662); DHFR, dihidrofolato reductasa, codificada por el gen *folA* (SAV1426); TS, timidilato sintasa, codificada por el gen *thyA*; TK, timidina kinasa, codificada por el gen *tdk* (SAV2119); NupC, transportador codificado por el gen *nupC* (SAV0521).

Planteamos que un tratamiento con SXM, TM o SxT podría suponer un escenario similar a lo que ocurre de manera natural en FQ-97 por la mutación encontrada en el gen *thyA*. Esto es así dado que, en última instancia, el tratamiento con cualquiera de estos antimicrobianos supone un defecto en la síntesis de dTMP.

Basándonos en la capacidad de *S. aureus* de volverse resistente a los antibióticos SxM a través de la toma exógena de timidina, con el principal objetivo de verificar si nuestra hipótesis era correcta y la eritromicina era capaz de redirigir los flujos metabólicos hacia la síntesis de dTMP, compensando la falta de actividad de la TS, realizamos antibiogramas a SXM en placas de MH y MH suplementadas con eritromicina, esperando ver cambios en las CMI a estos compuestos.

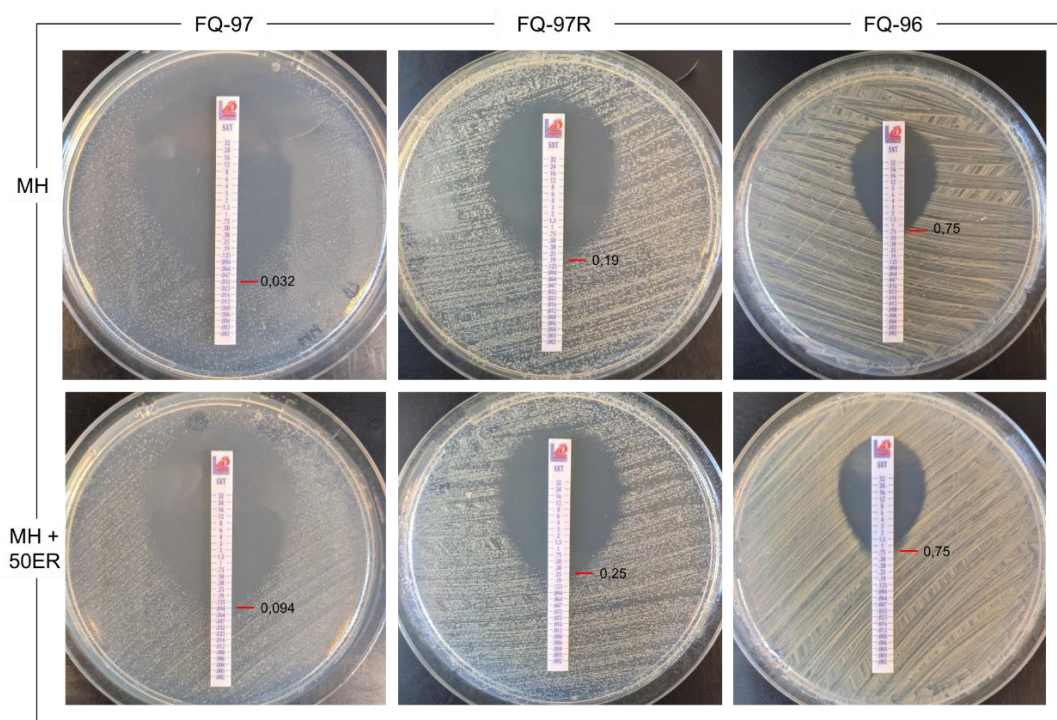


Figura 38. Antibiogramas a SxT en MH y MH + ER tras 16 h de incubación a 37 °C. La línea roja marca la CMI para cada una de las condiciones. FQ-97, cepa que presenta fenotipo de semi-dependencia; FQ-97_R, cepa revertida tras sucesivos pases de FQ-97; FQ-96, cepa ancestral sin fenotipo de semi-dependencia.

Los resultados mostraron que en presencia de eritromicina FQ-97 se volvía tres veces más resistente a SxT, pasando de tener una CMI de 0,032 en MH a 0,094 en MH + ER. Por otra parte, en FQ-97_R, bacteria revertida, a pesar de que ya no mostraba el fenotipo de semi-dependencia, también experimentaba un aumento en la resistencia a SxT cuando la eritromicina estaba presente, aunque en este caso desde 0,19 en MH a 0,25 en MH + ER. En el caso de FQ-96, la eritromicina no modificaba la CMI a SxT, además su CMI era 0,75, superior a la CMI de FQ-97 (figura 38).

Estos resultados, junto a la reversión del fenotipo de semi-dependencia ante la adición de timidina exógena o ante la complementación de la mutación del gen *thyA*, indicaban que el efecto que tenía la eritromicina sobre FQ-97 estaba relacionado con la reacción que catalizaba la TS.

Utilizamos como control positivo del ensayo placas de MH suplementadas con timidina, condición en la cual FQ-97 debería volverse resistente al antibiótico SxT al ser capaz de internalizar el compuesto y no necesitar la vía de biosíntesis endógena. De acuerdo con el razonamiento y a la literatura el ensayo mostró que FQ-97 se volvía resistente a SxT (figura 39). A las 24 h ya aparecían colonias resistentes alrededor de la tira del antibiótico, y a las 48 h observamos cómo había crecimiento en toda la placa y FQ-97 ya no presentaba una CMI de 0,094 y sensibilidad al compuesto.

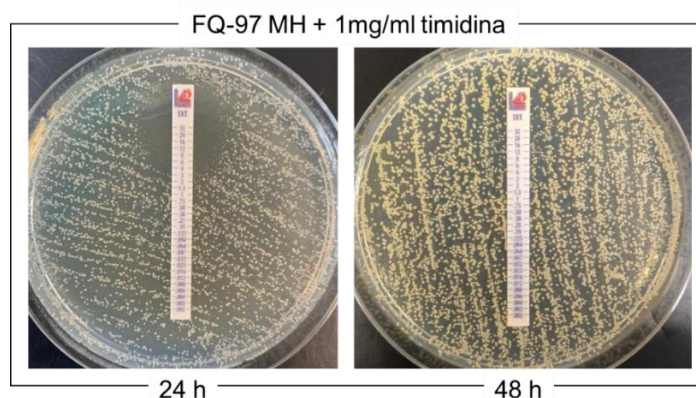


Figura 39. Antibiograma a SxT en MH complementado con timidina a las 24 h y 48 h en MH a 37 ° C.

Aunque el efecto de la eritromicina sobre la CMI de FQ-97 no era el similar al obtenido ante la adición de timidina exógena, que suponía una resistencia total a SxT, los resultados sugerían, de acuerdo a nuestra hipótesis, que la eritromicina podía estar compensando la falta de actividad en TS a través de un redireccionamiento de flujos metabólicos hacia la síntesis de dTMP, al observar un aumento de tres veces en la resistencia a estos compuestos cuando el macrólido estaba presente.

A partir de estos resultados, centramos el estudio en el mecanismo molecular que pudiese explicar este efecto, y la posible relación entre la eritromicina y los niveles de dTMP en FQ-97.

2.3.1. Generación del fenotipo de semi-dependencia en el laboratorio

Con el objetivo de determinar si el posible redireccionamiento de los flujos metabólicos por parte de la eritromicina era un efecto específico de FQ-97 o se debía a un mecanismo molecular general, tratamos de reproducir el fenotipo en la cepa *S. aureus* USA 300, aislado clínico procedente de una septicemia (Highlander *et al.*, 2007). De esta manera, intentamos inducir un problema en síntesis de dTMP por medio de los antibióticos SxT, SXM y TM, tratando de imitar el escenario natural de FQ-97 por la mutación en *thyA*.

En primer lugar, determinamos la CMI para USA 300 para poder interrumpir la vía de síntesis del folato y con ello la del dTMP (tabla 14). Uno de los motivos por los que realizamos la reproducción del fenotipo con esta cepa es que presentaba los mismos niveles de CMI a los compuestos SxT que FQ-97 (tabla 10).

Cepa	CMI (µg/ml)				
	E	CD	SxT	SXM	TM
USA 300	8	0,094	0,094	6	0,5

Tabla 14. CMI para USA 300 en MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. Determinación de las CMI para generación del fenotipo de semi-dependencia en USA 300. E, eritromicina; CD, clindamicina; SxT; Sulfametoxazol- trimetoprim; SXM, sulfametoxazol; TM, trimetoprim;

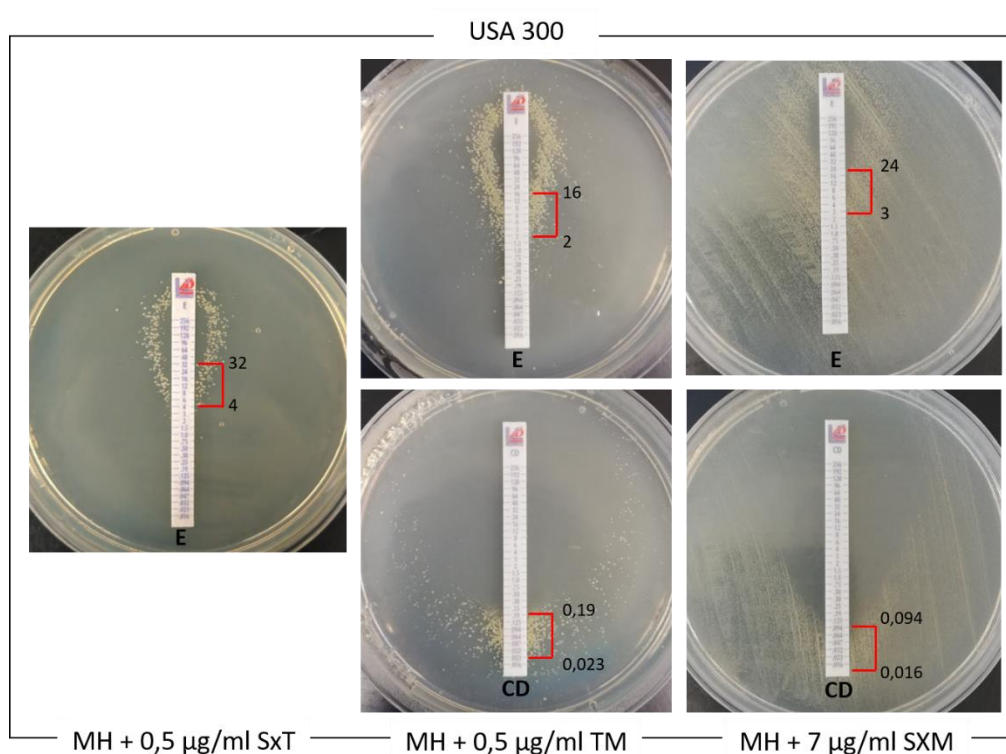


Figura 40. Generación fenotipo de dependencia en USA 300 en MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. La imagen de la izquierda muestra el fenotipo de dependencia en USA 300 a eritromicina en una placa suplementada con 0,5 µg/ml de SxT. Los paneles superiores muestran el mismo fenotipo en USA 300 en placas de MH con la combinación de SxT por separado, TM a 0,5 µg/ml y SXM 7 µg/ml. Las placas de los paneles inferiores muestran las mismas condiciones que los paneles superiores, pero con la tira de antibiótico clindamicina. En rojo se señala el rango de concentraciones en el que se genera la dependencia con eritromicina (arriba) y clindamicina (abajo) (µg/ml). E, eritromicina; CD, clindamicina; SxT; Sulfametoxazol- trimetoprim; TM, trimetoprim; SXM, sulfametoxazol.

Los resultados mostraron que en presencia de la tira de eritromicina, cuando el medio estaba suplementado con SxT, TM o SXM, la dependencia se producía a diferentes concentraciones, pero siempre en un intervalo de 8 veces la concentración mínima a la que empezaba el halo de dependencia a la máxima donde ya se producía inhibición de crecimiento en USA 300 (figura 40). Cuando las placas tenían SxT la dependencia ocurría a una concentración de eritromicina entre 4 – 32 µg/ml, mientras que cuando tenían los antibióticos por separado, TM y SXM los intervalos eran de 2 – 16 µg/ml y 3 – 24 µg/ml, respectivamente. Según el grado de afectación en la ruta o las concentraciones utilizada de SxT, TM y SXM, las concentraciones específicas en las que se generaba la dependencia con la eritromicina variaban. Con SXM el grado de dependencia que mostraba USA 300 era menor, dado que posiblemente la concentración de antibiótico utilizada aún permitía el crecimiento de USA 300 por toda la placa, observando un halo de “sobrecrecimiento” alrededor de la tira de eritromicina y un leve crecimiento en el resto de la placa.

Introducimos de nuevo la clindamicina en este ensayo para determinar si con este antibiótico también se producía el efecto de dependencia en USA 300, como ocurría en FQ-97. En este caso, la cepa mostraba el fenotipo, aunque a concentraciones inferiores (figura 40), dado que esta cepa es

sensible a esta lincosamida (tabla 14). A diferencia de lo ocurrido con la eritromicina, USA 300 no presentaba el mismo intervalo de 8 veces la concentración mínima donde empezaba el fenotipo a la concentración máxima donde acababa. Cuando la placa estaba suplementada con TM el fenotipo se observaba en un intervalo de 8 veces, de 0,023 – 0,19 $\mu\text{g/ml}$ mientras que con SXM, el intervalo era menor, de 0,016 – 0,094 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados sugerían que el fenotipo producido era dependiente de unas concentraciones específicas, tanto de los antibióticos SxT con los que se inhibía la ruta del folato, como del intervalo de concentraciones con eritromicina y clindamicina donde se observaba el fenotipo.

Aunque las concentraciones en las que USA 300 mostraba el fenotipo en cada ensayo eran diferentes, mostraba el fenotipo tanto con SxT, como con cada compuesto por separado, TM y SXM, lo que sugería que la afectación de la vía del folato y por ende la del dTMP era necesaria para generar este efecto de dependencia.

Por lo tanto, en resumen, los resultados obtenidos en este ensayo indicaron que el mecanismo molecular que generaba el fenotipo de semi-dependencia no era específico de FQ-97 si no que se podía reproducir en cepas como USA 300 mediante la alteración de la ruta de síntesis del folado, afectando por tanto la producción del dTMP, tal y como ocurría de manera natural en FQ-97 por el detrimento en actividad en su TS. Los resultados volvían a sugerir que la eritromicina era capaz de compensar el efecto de los antibióticos del grupo SxT, ya que USA 300 era capaz solo de crecer en las zonas próximas a la tira de eritromicina, o crecer mejor cuando había SXM, como si en estas zonas la capacidad de la bacteria para sintetizar dTMP no quedase inhibida por el efecto de los antibióticos. Además, los resultados apuntaban que según las concentraciones utilizadas de los antibióticos SxT y el grado de afectación de la ruta del folato, el intervalo de concentraciones en las que USA 300 mostraba la dependencia o semi-dependencia era diferente.

En base a los resultados y basándonos en la literatura sobre cómo la eritromicina es capaz de actuar regulando genes de resistencia antimicrobiana, estudiamos la posible existencia de este tipo de mecanismos riboreguladores sobre genes del metabolismo bacteriano.

2.4. Estudio de un posible mecanismo riboregulador por eritromicina

Se ha demostrado que antibióticos como la eritromicina, pueden regular la transcripción de genes responsables de su propia resistencia, como es el caso de *ermA* o *msrA* (Chancey *et al.*, 2015). Ambos genes se regulan mediante un mecanismo de atenuación de la transcripción o de la traducción y solo se transcriben o traducen, respectivamente, en presencia del propio antibiótico, que actúa como inductor (Dersch *et al.*, 2017). Para que exista este tipo de regulación mediante inducción, las regiones 5' UTR de estos genes deben contener un sORF (del inglés, *small ORF*) que codifica para un pequeño péptido que contiene los dominios específicos RL(R/K) que la eritromicina es capaz de reconocer.

Como comentamos en la introducción de esta tesis, en el mecanismo de atenuación de la traducción, la eritromicina se une al ribosoma a través del reconocimiento de dominios específicos presentes en el pequeño péptido generando un cambio conformacional en la estructura del ARNm

adyacente, que es el correspondiente al del gen susceptible de regulación. El cambio conformacional genera que se pueda iniciar la traducción del gen de resistencia (Dar y Sorek, 2017). En 2018 se describe el gen *hflX* y una regulación mediante atenuación de la transcripción por parte de la eritromicina y la lincomicina —similar a la clindamicina— a través del reconocimiento de los dominios RL(R/K) (Duval *et al.*, 2018).

Basándonos en que la clindamicina y la eritromicina podían reconocer los mismos dominios en las regiones 5' UTR de un gen, planteamos la hipótesis de que ambos antibióticos podrían estar reconociendo este tipo de dominios en genes relacionados con el metabolismo del dTMP, favoreciendo el flujo hacia la síntesis de este compuesto. Con el principal objetivo de confirmar esta hipótesis y averiguar el mecanismo molecular responsable del fenotipo de semi-dependencia, realizamos la búsqueda de dominios RL(R/K) en las regiones 5' UTR de todos los genes anotados en el genoma de FQ-97, prestando especial atención a aquellos que pudieran relacionarse con el metabolismo.

2.4.1. Búsqueda *in silico* de dominios RL(R/K) para determinación de mecanismo riboregulador

Un requisito imprescindible en un mecanismo riboregulatorio de atenuación tanto a nivel de la transcripción como de la traducción, es que el antibiótico pueda unirse al ribosoma para poder reconocer los dominios RL(R/K) en el pequeño péptido que se está sintetizando. Sin embargo, la cepa FQ-97 porta el gen *ermA* y todos los resultados de la tesis sugerían que se trataba de una expresión de tipo constitutiva, por lo que las bases de unión A2058 y A2058 debían estar metiladas impidiendo la unión del antibiótico al ribosoma.

Con el fin de determinar si era posible una regulación de tipo atenuación en FQ-97, basada en la unión del antibiótico al ribosoma, realizamos una aproximación sencilla para conocer si el fenotipo era dependiente de la unión del antibiótico al ribosoma. Para ello, utilizamos diferentes cepas con presencia/ausencia del gen *ermA* y por tanto diferentes estados de metilación del dominio V del 23S, que impidiesen o permitiesen la unión de la eritromicina a su diana en el ribosoma (tabla 15). En el caso de que la cepa siguiese conservando el fenotipo de semi-dependencia ante la presencia del gen *ermA* constitutivo, indicaría que el mecanismo riboregulatorio causante del fenotipo de semi-dependencia no dependía de la unión del antibiótico al ribosoma, y que por tanto el efecto no se trataba de un mecanismo regulador de tipo atenuación.

Cepa	<i>ermA</i>
USA 300	Ausente
NE178 (<i>Tnbursa::leuA1 ermA</i>)	Monocopia
USA 300 pJL74_ <i>sarAP1_GFP_ermA</i>	Multicopia

Tabla 15. Cepas utilizadas para comprobación fenotipo semi-dependencia según estado de metilación del dominio V del ARNr 23S. USA 300, aislado clínico de *S. aureus* que no presenta el gen *ermA*; NE178 (*Tnbursa::leuA1 ermA*), cepa procedente de la colección NARSA con el gen *leuA1*

interrumpido por el elemento transponible *Tnbursa* y gen *ermA* como elemento de selección en monocopia; USA 300 pJL74_ *sarAP1*_GFP_ *ermA*, cepa de USA 300 que porta un plásmido de alto número de copias con el gen de resistencia *ermA* constitutivo.

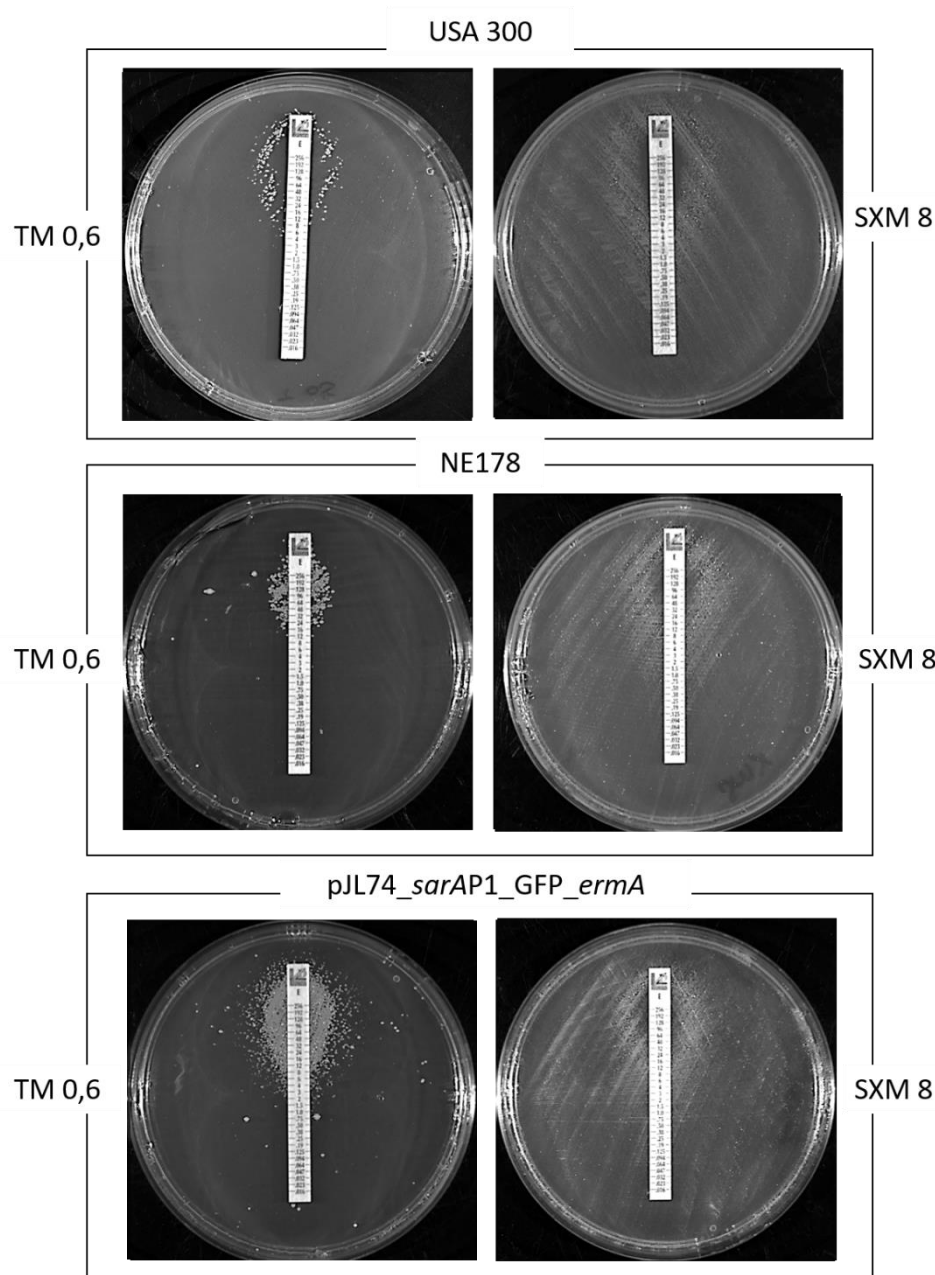


Figura 41. Estudio fenotipo semi-dependencia según estado de metilación del dominio V del ARNr 23S en MH tras 16 h de incubación a 37 ° C. USA 300, aislado clínico de *S. aureus* que no presenta el gen *ermA*; NE178 (*Tnbursa::leuA1 ermA*), cepa procedente de la colección NARSA con el gen *leuA1* interrumpido por el elemento transponible *Tnbursa* y gen *ermA* como elemento de selección en monocopia; USA 300 pJL74_ *sarAP1*_GFP_ *ermA*, cepa de USA 300 que porta un plásmido de alto número de copias con el gen de resistencia *ermA* constitutivo. SXM, sulfametoxazol 8 µg/ml; TM, trimetoprim 0,6 µg/ml.

Todas las cepas estudiadas seguían mostrando el fenotipo de dependencia independientemente de la presencia o ausencia del gen *ermA*. Aquellas cepas como NE178 o USA 300 pJL74_ *sarAP1*_GFP_ *ermA*, que poseían el gen *ermA* en monocopia o multicopia, respectivamente,

mostraban el fenotipo de dependencia, por lo que los datos indicaban que no era necesaria la unión al ribosoma para la generación del mismo (figura 41). Esta información sugería que el mecanismo regulador por el que la eritromicina estaba generando el efecto de semi-dependencia no podría ser de tipo atenuación, dado que el principal requisito para esta regulación es la unión del antibiótico al ribosoma. También se observaba cómo al introducir el gen *ermA* en USA 300, el halo de semi-dependencia era diferente y no observábamos una zona de inhibición a partir de 16 µg/ml, dado que la introducción de este gen aumentaba los niveles de resistencia al macrólido.

Una vez se descartó un posible mecanismo de regulación de tipo atenuación, se propuso que el otro posible mecanismo riboregulador por el que la eritromicina generaba el fenotipo de semi-dependencia podía ser un *riboswitch*. Este tipo de mecanismos se basa en una unión directa de una molécula denominada ligando, que en este caso sería la eritromicina, a una región que reconoce el antibiótico en la región 5' UTR del gen que se va a regular, denominada aptámero, pero el ribosoma no interviene en la unión (Garst *et al.*, 2011).

Este tipo de regulación ya se ha descrito con otros antibióticos ribosomales como los aminoglucósidos (Jia *et al.*, 2013). Específicamente, para descubrir este tipo de regulación, Jia *et al.* (2013) realizaron un alineamiento de las regiones 5' UTR de diferentes genes de resistencia inducibles por aminoglucósidos. En todos los genes inducibles por estos antibióticos encontraron una serie de secuencias conservadas: un sORF con su correspondiente SD1, tras esta secuencia, una región variable en secuencia y longitud de nucleótidos, y posteriormente, otro SD2, correspondiente al gen que se iba a regular por el antibiótico y que iba a ser responsable de la resistencia. Siguiendo esta metodología, se planteó que en el caso de realizar una búsqueda de dominios conservados en las regiones 5' UTR de genes cuya expresión se veía inducida por eritromicina que se hubieran descrito hasta la fecha, encontraríamos los genes de resistencia regulados por mecanismos de atenuación de la transcripción. Por lo que, las regiones que aparecerían conservadas en esta búsqueda serían las regiones 5' UTR con los dominios de reconocimiento RL(R/K), dado que es el único mecanismo riboregulador que se ha descrito hasta la fecha en eritromicina y clindamicina, aunque estos dominios nunca se hayan relacionado con un *riboswitch*. El Dr. Joaquín Giner de la Universidad Politécnica de Madrid diseñó un *script* para la búsqueda de dominios reguladores en las regiones 5' UTR de todos los genes anotados en genoma de FQ-97. El principal criterio de búsqueda utilizado fue que estas regiones codificaran para un sORF y que éste al traducirse contuviera los dominios de reconocimiento RL(R/K). Una vez encontrados, se generó una lista de 32 genes (tabla S2). Por lo tanto, basándonos en el abordaje de Jia *et al.* (2013), y en lo que estaba descrito sobre las regiones 5' UTR respecto a la eritromicina y la clindamicina, utilizamos el *script* con el objetivo de determinar si la eritromicina y clindamicina estaban llevando a cabo un *riboswitch*.

De la lista de 32 genes obtenidos en el análisis bioinformático (tabla S2) se realizó otro análisis para determinar cuántos de ellos portaban delante del sORF la correspondiente secuencia de unión al ribosoma SD1, y posteriormente una secuencia variable de nucleótidos, y el siguiente SD2 como se había descrito previamente para los aminoglucósidos (Jia *et al.*, 2013) (figura 42).

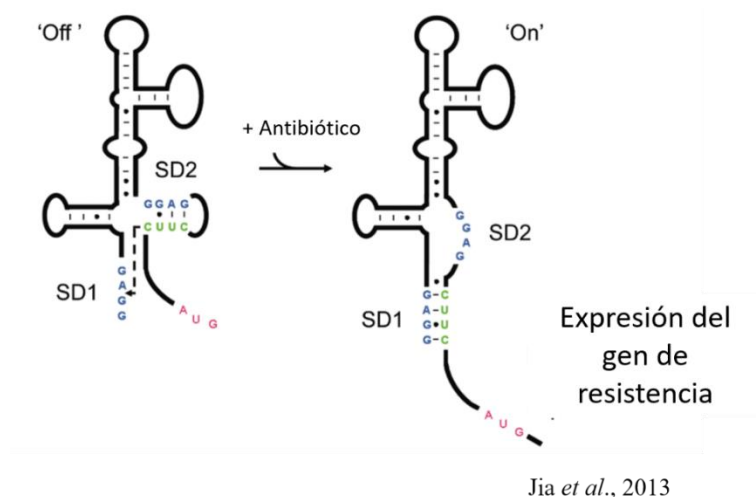


Figura 42. Esquema mecanismo regulación por *riboswitch* en aminoglucósidos (Jia *et al.*, 2013). En ausencia del antibiótico inductor el ARNm posee tal conformación que impide el reconocimiento por parte del ribosoma a su región de unión SD2. Imagen modificada de Jia *et al.* (2013).

De todos los genes analizados, solo *rsgA* y *fdA* tenían una secuencia SD1 delante del sORF que contenía los dominios de reconocimiento RL(R/K) en la región 5' UTR (figura 43). La secuencia SD consenso en procariotas es «AGGAGG», por lo que la búsqueda de las secuencias SD — tanto del sORF como del gen susceptible de regulación— se realizó en base a estos criterios con posibles variaciones. Utilizamos el servidor EMOPEC para la búsqueda de las posibles SD en cada gen (<http://emopec.biosustain.dtu.dk/>).

El gen *rsgA* (SAV1221), codifica para una GTPasa cuya función principal está relacionada con la biosíntesis de la subunidad pequeña del ribosoma. Sin embargo, aunque menos estudiada, parece que posee una función fosfatasa sobre la tiamina-fosfato, por lo tanto, está también implicada en el metabolismo de la tiamina o vitamina B1, importante cofactor en gran cantidad de reacciones del metabolismo de los carbohidratos (Müller *et al.*, 2009).

El gen *fdA* (SAV2606) codifica para una enzima homóloga a la fructosa-bisfosfato aldolasa, *fdA* (SAV2125) en *S. aureus*. La principal reacción que cataliza es la escisión reversible de β -D-fructosa 1,6-bisfosfato a D-gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Está implicada en diversas rutas metabólicas como la glicólisis/gluconeogénesis, la ruta de las pentosas fosfato, el metabolismo de la fructosa y la manosa, metabolismo del metano, la biosíntesis de metabolitos secundarios, el metabolismo del carbono y la biosíntesis de aminoácidos.



Figura 43. Predicción de las posibles secuencias SD y regiones promotoras en las regiones 5' UTR del gen *fdA* y *rsgA*. En verde aparecen los sORF que codifican para la secuencia aminoacídica RL(R/K) de reconocimiento para la eritromicina. En azul aparecen los SD1 y SD2 tanto para el sORF como para el gen *fdA* (arriba) o *rsgA* (abajo), basándonos en las secuencias consenso en procariontes SD, con la herramienta de predicción EMOPEC. En la parte de abajo, se muestra la secuencia en aminoácidos de los sORF, donde se observan los dominios RL(R/K) recuadrados.

Con el objetivo de confirmar la capacidad reguladora de la eritromicina sobre estos dos genes, se realizaron fusiones traduccionales de sus regiones 5' UTR con la proteína fluorescente GFP. Para ello, se clonó toda la región 5' UTR susceptible de regulación por eritromicina, es decir, desde la primera secuencia SD1 para el sORF que contenía el dominio RL(R/K), hasta el inicio del gen *rsgA* o *fdA*. La secuencia correspondiente a los genes se sustituyó por la de la proteína reportera GFP para que, en el caso de existir diferencias, fuéramos capaces de determinarlo en un *western blot* mediante cambios en su producción en presencia de eritromicina (figura 44). La construcción se clonó en el plásmido con bajo número de copias pCN51 (Charpentier *et al.*, 2004) bajo el promotor de *S. aureus* *SarAP1*.

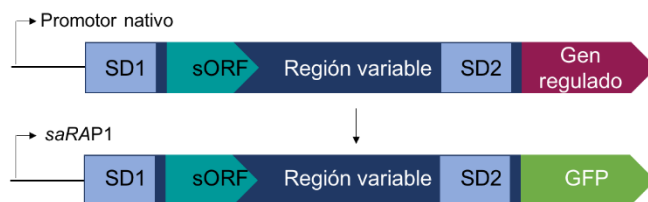


Figura 44. Estrategia de clonaje para el estudio de un posible mecanismo de *riboswitch* mediado por eritromicina. Se clonó toda la región 5' UTR necesaria para este tipo de regulación sustituyendo el gen *rsgA* y *fdA* por la secuencia de la proteína reportera GFP.

Para determinar si existían diferencias en la producción de GFP entre la condición MH y MH + ER por un posible mecanismo de *riboswitch*, realizamos ensayos de *Western blot* con las construcciones pCN51-*psarAP1*-RL(R/K) *rsgA*-GFP y pCN51-*psarAP1*-RL(R/K) *fdA*-GFP.

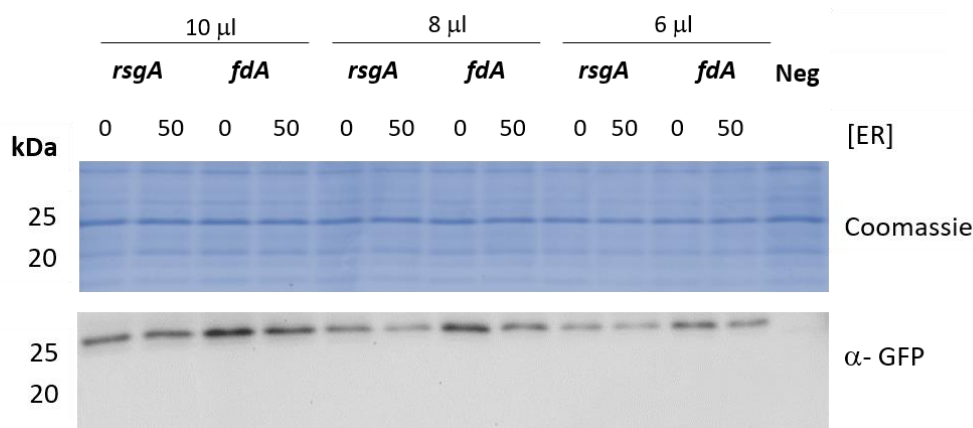


Figura 45. Determinación producción de GFP mediante *Western blot* en las construcciones pCN51-*psarAP1*-RL(R/K) *rsgA*-GFP (*rsgA*) y pCN51-*psarAP1*-RL(R/K) *fdA*-GFP (*fdA*) en ausencia (0) y presencia de eritromicina (50). Los números (10, 8 y 6 µl) en la parte superior de la figura indican los diferentes volúmenes que cargamos de la misma muestra en cada uno de los gels. *fdA*, cepa pCN51-*psarAP1*-RL(R/K)*fdA*-GFP; *rsgA*, cepa pCN51-*psarAP1*-RL(R/K)*rsgA*-GFP de *S. aureus*. Neg, control negativo cepa RN4220 sin plásmido. Tamaño GFP 27 kDa. α- GFP (1:10.000).

Los resultados obtenidos mediante *western blot* mostraron que existía producción de GFP tanto en MH como en MH + ER, tanto en la construcción de *rsgA* y como en la de *fdA*. En la condición control MH que no presentaba antibiótico ya aparecía la banda correspondiente a la proteína GFP de 27 kDa. Ante la adición de eritromicina, los resultados indicaban que no existían diferencias en la cantidad de proteína GFP en ninguno de los volúmenes ensayados, ni para *rsgA* ni para *fdA*. Por lo tanto, los resultados de este experimento indicaban que no existía una regulación de tipo *riboswitch* por parte de la eritromicina ni en *rsgA* ni en *fdA* mediante el reconocimiento de los dominios RL(R/K), que supusiese un aumento en la producción de la proteína GFP (figura 45).

Por último, determinamos si en la propia FQ-97 existían diferencias a nivel de regulación mediante qRT-PCRs en *fdA* y *rsgA* en presencia de eritromicina. Tras este ensayo, los resultados volvieron a indicar que no existían diferencias significativas en la expresión de ambos genes entre la

condición MH y MH + ER (figura 46). El gen *fdA* aunque sin ser significativo, aparecía reprimido, mientras que *rsgA* aparecía ligeramente sobreexpresado tras añadir eritromicina.

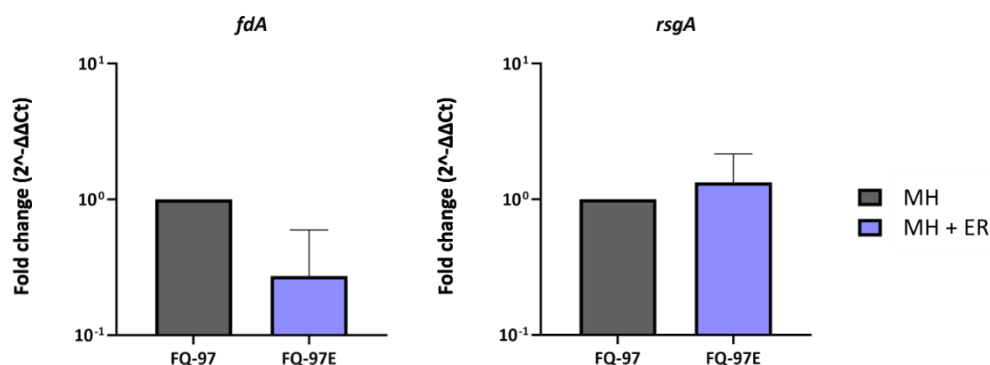


Figura 46. Expresión de los genes *fdA* y *rsgA* en FQ-97 cuantificada mediante qRT-PCR. El *fold change* representa los cambios de expresión del gen diana (*fdA* y *rsgA*) relativizados en base al gen *housekeeping* utilizado, *gyrB*. Las barras de error representan el error estándar al menos de 3 réplicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. La estadística se aplicó en cada cepa por separado respecto a la condición control MH, frente a MH + ER. Test estadístico T-student.

A pesar de que el análisis bioinformático mostraba la presencia de los dominios de reconocimiento RL(K/R) y una posible organización de la región 5' UTR que podría obedecer a una riboregulación por eritromicina, los resultados de *western blot* y qRT-PCR indicaron que la eritromicina no ejercía un mecanismo de *riboswitch* sobre *fdA* y *rsgA* y, por tanto, no era la explicación molecular al fenotipo de semi-dependencia estudiado.

Aunque no se determinó el mecanismo molecular por el cual la mutación en *thyA* y el fenotipo de semi-dependencia estaban relacionados, la mayoría de los resultados sugerían que los antibióticos ribosomales estaban teniendo un efecto a nivel metabólico generando un redireccionamiento de flujos hacia la síntesis de dTMP, que permitían sortear la falta de actividad en TS, permitiendo a la bacteria FQ-97 crecer mejor en presencia de la eritromicina y la clindamicina.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

En 1947, el bioquímico y microbiólogo ucraniano Selman Abraham Waksman realizó la primera definición de antibiótico, obteniendo posteriormente en 1952 el premio Nobel por sus estudios sobre la estreptomicina y su efectividad contra la tuberculosis. Según Waksman, los antibióticos son moléculas de origen microbiano que inhiben el crecimiento de las bacterias y dan una ventaja evolutiva a los organismos que los producen (Waksman, 1947). Aunque desde su descubrimiento la humanidad ha aprovechado la cualidad inhibitoria de los antibióticos para aislarlos y producirlos a elevadas concentraciones como herramienta contra las infecciones bacterianas, en ambientes naturales la producción de estos compuestos a bajas concentraciones ha demostrado que tienen un papel como importantes mediadores de señalización bacteriana (Allen *et al.*, 2010). Debido a este avance en el conocimiento de los antibióticos, ahora se sabe que éstos tienen otras funciones aparte de la de inhibir el crecimiento bacteriano, lo que ha generado que la visión antropocéntrica que se tiene de ellos haya cambiado. Existe una variedad de procesos modulados por ellos dependientes de concentración (Monier *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayoría de estudios sobre estos efectos de señalización se ha centrado en cepas productoras y cómo el propio compuesto producido puede modular diferentes procesos, como es el caso de la surfactina —lipopéptido con función antibiótica— también capaz de activar una cascada de señalización en fase estacionaria que induce la formación de biofilms en el organismo productor *B. subtilis* (López *et al.*, 2009). No obstante, en este mismo estudio también estudian un antibiótico con uso en clínica, como es la nistatina, y demuestran como éste también es capaz de inducir la formación de biofilms en *B. subtilis* (López *et al.*, 2009). Este hecho pone de manifiesto que el uso terapéutico de los antibióticos no refleja necesariamente su única función (Davies, 2006).

En esta misma línea, el estudio realizado en esta tesis demuestra cómo dos antibióticos ribosomales, eritromicina y clindamicina, tienen una función diferente a la que se espera de ellos en clínica, ya que en vez de inhibir el crecimiento bacteriano lo estarían mejorando a través de un posible mecanismo riboregulatorio no descrito hasta la fecha. Por ello, planteamos como objetivo fundamental determinar el mecanismo molecular responsable de lo que denominamos fenotipo de semi-dependencia. Calificamos así al fenotipo porque, como vieron otros autores (Schiøtt y Stenderup, 1953), los antibióticos mejoraban el crecimiento de la cepa FQ-97, pero la viabilidad y la supervivencia de la bacteria no dependían de estos compuestos, ya que la cepa también era capaz de crecer sin ellos, aunque en su ausencia presentaba un defecto en su crecimiento. Este defecto era una condición necesaria para la aparición del fenotipo de semi-dependencia, lo que impulsó a pensar que la causa genética del defecto en crecimiento estaba relacionada con el fenotipo de semi-dependencia.

1. El ribosoma de FQ-97 y el fenotipo de semi-dependencia

Debido a que el fenotipo de semi-dependencia solo aparecía con dos antibióticos ribosomales, planteamos como hipótesis inicial que el fenotipo estaba causado por mutaciones en el ribosoma de FQ-97, dado que las zonas de unión de ambos compuestos solapan en el ribosoma y comparten parte de sus mecanismos de resistencia (Dunkle *et al.*, 2010; Schlünzen *et al.*, 2001).

Coincidiendo con esta hipótesis inicial, mutaciones en las proteínas L de la subunidad 50S del ribosoma podrían generar defectos en crecimiento y poblaciones con heterogeneidad en su morfología, como es el caso de las SCVs asociadas a mutaciones en la proteína L6 del ribosoma bacteriano o del gen *rplF* en *S. aureus* (Proctor *et al.*, 2014). Además, estas mutaciones en el ribosoma podrían estar generando un cambio conformacional en el mismo que, tras la unión de los antibióticos a su diana, generase una conformación más estable, aumentando la tasa de síntesis proteica y mejorando el crecimiento bacteriano, como se ha descrito en otras cepas dependientes de antibióticos (Pournaras *et al.*, 2013).

Otro de los motivos por los que estudiamos posibles mutaciones en el ribosoma de FQ-97 fue la descripción de cepas dependientes de linezolid, cuyo origen se debía a mutaciones en las propias dianas del compuesto; concretamente en la proteína L3 y el dominio V del 23S (Pournaras *et al.*, 2013). En el estudio, todas las cepas dependientes mostraban una combinación única de mutaciones —dos sustituciones en el ARNr 23S junto con otras dos sustituciones en la proteína L3—, por lo que los autores atribuyeron el fenotipo de semi-dependencia al conjunto de mutaciones encontradas (Pournaras *et al.*, 2013). A falta de una aproximación estructural, especularon con que estas mutaciones podrían generar partículas ribosomales con una conformación estructural diferente que generaba la dependencia al linezolid. Por este motivo, en presencia del antibiótico, tanto el ensamblaje ribosomal como la tasa de síntesis de proteínas eran más rápidas y el crecimiento aumentaba (Pournaras *et al.*, 2013). Además, debido a que estas mutaciones ya se habían relacionado previamente con mecanismos de resistencia, el fenotipo de semi-dependencia en este trabajo fue definido como una transición desde un fenotipo de resistencia, dado que los mecanismos moleculares que los causaban eran los mismos.

En esta misma línea, los estudios iniciales llevados a cabo en esta tesis se centraron en las principales dianas que compartían la eritromicina y la clindamicina: el dominio V del ARNr 23S y las proteínas L4 y L22, que participan en la interacción de estos compuestos con el ribosoma (Douthwaite y Champney, 2001). Sin embargo, nuestros análisis indicaron que FQ-97 no presentaba mutaciones relacionadas con el ribosoma (tabla 11). Además, las mutaciones tanto en L22 como en L4, están más relacionadas con la resistencia a macrólidos como la eritromicina, (Fyfe *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2009; Zaman *et al.*, 2007) pero no a lincosamidas como clindamicina. Por lo tanto, mutaciones en estas proteínas no hubieran podido dar explicación al fenotipo de semi-dependencia con ambos antibióticos.

Siguiendo la hipótesis de que el posible mecanismo molecular del fenotipo de semi-dependencia estaba relacionado con el de resistencia (Pournaras *et al.*, 2013), prestamos especial atención a las bases de interacción de eritromicina y clindamicina en el dominio V del 23S, A2058 y A2059 (Spížek y

Řezanka, 2004), ya que en cepas como FQ-97, procedente de fibrosis quística, es común observar mutaciones en estas secuencias que generan resistencia a eritromicina y clindamicina (Garza-Ramos *et al.*, 2001; Vester y Douthwaite, 2001). Sin embargo, los resultados de secuenciación *primer walking* mostraron que no existían mutaciones en los ARNr 23S, por lo tanto, no era el mecanismo que mediaba ni la resistencia ni la semi-dependencia.

En esta misma línea, FQ-97 presentaba el gen *ermA*, que media la resistencia MLS_B (Petinaki y Papagiannitsis, 2018), que junto con los resultados obtenidos en los antibiogramas con eritromicina, clindamicina y estreptomina (tabla 10), apoyaban la existencia de una resistencia de tipo constitutiva mediada por la metiltransferasa ErmA para la que codifica este gen. Sin embargo, la ausencia de mutaciones en el mismo, por lo que descartamos la existencia de mutaciones en los mecanismos de resistencia como posible causa genética del fenotipo de semi-dependencia, a diferencia de lo descrito por Pournaras *et al.* (2013). Además, la cepa dependiente de linezolid había estado previamente expuesta al antibiótico ribosomal (Pournaras *et al.*, 2013) mientras que FQ-97 no había estado previamente expuesta ni a eritromicina ni a clindamicina (López-Collazo *et al.*, 2015), por lo que las causas genéticas que determinaron la aparición de la semi-dependencia podían ser diferentes.

Por último, pese a determinar que no existían mutaciones en el ribosoma de FQ-97, seguimos la hipótesis basada en un posible cambio conformacional en el ribosoma en presencia de eritromicina y clindamicina. Dicho cambio podía suponer un aumento en la tasa de síntesis de proteínas lo que se traduciría en una mejora del crecimiento bacteriano, por lo que realizamos un abordaje estructural mediante Crio-EM y la determinación de la tasa de síntesis de proteína *in vitro*. Ambas aproximaciones, coincidiendo con la falta de mutaciones en el ribosoma, mostraron que la eritromicina no tenía un efecto directo sobre el ribosoma de FQ-97, ya que no había cambios ni en su estructura ni en su tasa de traducción (figura 22).

Por lo tanto, los datos de secuenciación y estructurales confirmaron que el fenotipo de semi-dependencia con eritromicina y clindamicina no estaba relacionada con mutaciones ni en la diana de estos antibióticos ni en el gen responsable del mecanismo de resistencia *ermA* y que no existían diferencias estructurales en el ribosoma de FQ-97. Además, al ser un fenotipo que solo aparecía en la condición nutricional específica MH, medio que se caracteriza por sus bajos niveles de timidina (Haltiner *et al.*, 1980), centramos la atención en posibles SNPs que afectasen al metabolismo bacteriano, lo que desencadenó el estudio del gen *thyA*.

2. El gen *thyA* y el fenotipo de semi-dependencia

Como se trató en la introducción de esta tesis, es común encontrar comportamientos SCVs dependientes de timidina en aislados clínicos de *S. aureus* procedentes de pacientes con fibrosis quística. Este tipo de SCVs se generan por mutaciones en el gen *thyA*, y su aparición está asociada al tratamiento antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprim (SxT) (Kriegeskorte *et al.*, 2015). El gen *thyA* codifica para la enzima TS, que cataliza la reacción de síntesis del timidilato (dTMP), precursor de la desoxitimidina

trifosfato (dTTP), necesaria para la replicación del ADN (figura 30). Por lo tanto, mutaciones en este gen que comprometan la actividad de la TS, generan defectos en el crecimiento y poblaciones SCVs por una falta o disminución en los niveles de dTMP y dTTP (Chatterjee *et al.*, 2008; Kahl *et al.*, 2005).

El análisis de los SNPs centrado en mutaciones que afectasen al metabolismo bacteriano mostró la existencia de la sustitución G940A en el gen *thyA* en FQ-97 (tabla 11), lo que a nivel de proteínas se traducía en una sustitución de Ala314Thr. La sustitución encontrada generaba un defecto en la actividad de la TS-97 (figura 33, tabla 13), motivo por el cual la bacteria mostraba un defecto en su crecimiento, ya que ante una suplementación exógena con timidina o una complementación con una copia WT del gen, el fenotipo heteropoblacional desaparecía y la cepa revertía al fenotipo parental (figura 34 y 35).

La mutación encontrada recaía sobre el extremo C-terminal de la enzima TS, una de las enzimas más conservadas entre los diferentes reinos (Costi *et al.*, 2002). En ella existen dos predicciones de dominios de unión, el sitio de unión al cofactor (mTFH) y al sustrato dUMP, entre las posiciones 142-172 (aa 48-58) y otro sitio de unión en la posición 586-618 (aa 196 a 206) (Carreras y Santi, 1995). Este último, también se ha descrito como el posible sitio activo en otros organismos como *Cryptococcus neoformans* (Finer-Moore *et al.*, 2005), por lo que es lógico que mutaciones próximas o en estos aa afecten la actividad. Coincidiendo con este hecho, la mayoría de mutaciones descubiertas en este gen asociadas a comportamientos SCVs en *S. aureus* se ubican dentro o en los alrededores del dominio de unión al dUMP (Chatterjee *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2020).

Sin embargo, fueron Kriegeskorte *et al.* (2014) quienes publicaron una cepa de *S. aureus* con un comportamiento SCVs dependiente de timidina debido a una mutación en la posición C941A, por lo que no es de extrañar que una mutación justo en la posición contigua a la encontrada en FQ-97, también pudiese generar un defecto en la actividad de la enzima. La principal explicación a este hecho podría ser que TS es una enzima que actúa como dímero y una vez forma el complejo TS-dUMP-mTFH, en organismos como *C. neoformans*, se ha demostrado que existe un movimiento del extremo C-terminal hacia el centro activo de la enzima, que genera una conformación estable y ordenada que es necesaria para que TS medie su actividad catalítica (Finer-Moore *et al.*, 2005). Este es el motivo de que existan inhibidores dirigidos específicamente hacia la región C-terminal, que evitan este movimiento hacia el centro activo (Finer-Moore *et al.*, 2005). Esta explicación haría posible que la mutación encontrada en FQ-97 no afectase directamente a la unión del dUMP o el cofactor mTHF a la enzima, pero sí que afectase a la estructura terciaria del C-terminal y por lo tanto, a las interacciones que han de producirse para que TS pueda mediar su actividad catalítica.

A pesar de que FQ-97 poseía una mutación en *thyA* que generaba un defecto en la actividad de la TS y por tanto un problema en su crecimiento, no se clasificó como una SCVs. Primero, FQ-97 no era auxótrofa de timidina como las SCVs dependientes de este compuesto, ya que la bacteria no crecía a un ritmo tan lento como al que lo hacen las SCVs en medios como MH —donde no empiezan a observarse colonias hasta 72h aproximadamente— (Chatterjee *et al.*, 2008; Connolly *et al.*, 2017) con bajos niveles de timidina (Haltiner *et al.*, 1980). Además, FQ-97 era capaz de crecer en este medio, aunque como una

heteropoblación. Como se ha indicado varias veces a lo largo de esta tesis, las SCVs presentan una elevada inestabilidad fenotípica y tienden a revertir al fenotipo parental generando poblaciones heterogéneas con diferentes tamaños (Kriegeskorte *et al.*, 2015). Este estado en que la población SCV comienza a revertir y a presentar un fenotipo heterogéneo es el que mejor definiría el comportamiento heteropoblacional encontrado en FQ-97. Por lo tanto, planteamos que sería posible que entre FQ-96 y FQ-97 hubiese llegado a existir una cepa FQ-97 SCVs dependiente de timidina, pero debido a la alta inestabilidad de estas poblaciones, es posible que la cepa empezara a revertir dando lugar a FQ-97 y su comportamiento heteropoblacional.

El hecho de que el medio MH tenga bajos niveles de timidina (Haltiner *et al.*, 1980) explica que FQ-97 solo mostrara el problema en crecimiento en él, dado que un detrimento en actividad de TS solo podía ser evidente en medios con bajos niveles en este compuesto (Kriegeskorte *et al.*, 2015). Sin embargo, en medios como LB y TSB, que contienen timidina, el fenotipo no aparecía (figura 21) ya que la ruta de síntesis endógena de este compuesto no era necesaria ante la suplementación externa (Kriegeskorte *et al.*, 2015).

Siguiendo con el MH, los ensayos de caracterización fenotípica indicaron que el fenotipo heteropoblacional y de semi-dependencia estaban relacionados, dado que el problema en crecimiento —cuyo origen era metabólico— por la mutación en *thyA*, era una condición necesaria para poder ver el efecto ventajoso de la eritromicina en FQ-97. Por este motivo, el fenotipo de semi-dependencia era evidente en las mismas condiciones que el heteropoblacional, cuando FQ-97 se encontraba en un medio con bajos niveles de timidina (figura 15). Por lo tanto, de la misma forma que el fenotipo heteropoblacional desaparecía ante la suplementación exógena con timidina y ante la complementación con una copia WT del gen *thyA*, el fenotipo de semi-dependencia revertía en estas condiciones, cuando la bacteria ya no presentaba un problema en su crecimiento (figuras 34 y 35).

Respecto a la alta tasa de reversión de FQ-97 una de las posibles explicaciones es que, como se acaba de comentar, FQ-97 procediera de otra FQ-97 con comportamiento SCVs, sujetas a una alta tendencia a revertir al fenotipo parental (Kriegeskorte *et al.*, 2015; Proctor *et al.*, 2006). A día de hoy, se desconoce la causa genética que explica esta alta reversión en SCVs, aunque ya empiezan a aparecer estudios al respecto. La mayoría de ellos se basan en mutaciones compensatorias en el gen *thyA* o una reversión de la propia mutación que las causó (Besier *et al.*, 2007; Kriegeskorte *et al.*, 2015). Sin embargo, ninguna de estas explicaciones era posible en nuestro caso ya que FQ-97_R también mostraba la mutación en *thyA* y no había presencia de mutaciones compensatorias. Pensamos que la ausencia de variaciones genéticas entre FQ-97 y FQ-97_R podía explicarse porque la reversión se debiese a una cuestión de adaptación metabólica en la que la TS fuese capaz de recuperar su actividad y producir el dTMP al mismo tiempo que el de su TS ancestral.

3. Efecto de la eritromicina sobre el metabolismo de FQ-97

3.1. Efecto de la eritromicina sobre el metabolismo del dTMP

Ante la mutación encontrada en *thyA* y el defecto de actividad en la TS, una de las hipótesis planteadas en esta tesis fue que el efecto de la eritromicina generaba una redirección de flujos metabólicos hacia la síntesis de dTMP, y con ellos una compensación de la actividad de la TS-97.

Los experimentos de tratamiento con SxT mostraron como FQ-97 experimentaba un aumento en sus niveles de CMI de tres veces cuando la eritromicina estaba presente (figura 38), indicando una posible relación entre la eritromicina y la vía de síntesis del dTMP (figura 47).

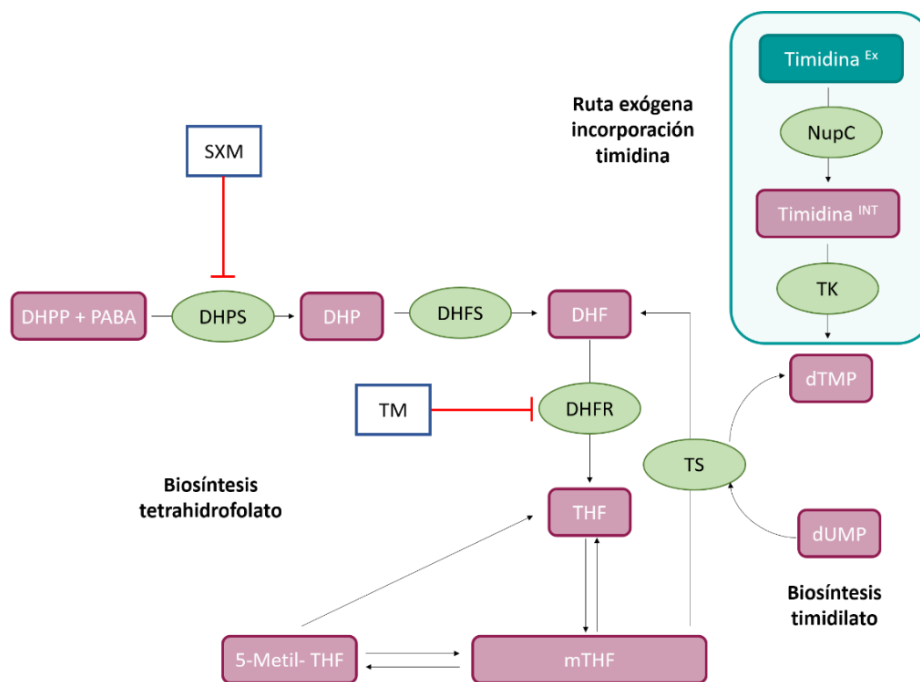


Figura 47. Relación entre vía de síntesis del tetrahidrofolato y el timidilato en *S. aureus*. TS media un bucle metabólico suplementando dihidrofolato (DHF) a la vía de síntesis del folato (THF), mientras que a su vez necesita el N5, N10, metilen-TFH (mTFH) que se genera en la ruta del folato para sintetizar dTMP. A la derecha, en un recuadro azul encontramos la vía de síntesis exógena de dTMP cuando *S. aureus* es capaz de incorporar el nucleósido de timidina desde una fuente exógena, que mediante TK transformará a dTMP. Los cuadrados granates representan los sustratos o productos de reacción, los círculos verdes representan las enzimas. En rojo encontramos indicado la reacción de inhibición que median el SXM y TM. * DHPS, dihidropteroato sintasa, codificada por el gen *folP* (SAV0514), DHP, dihidropteroato; DHFS, dihidrofolato sintasa, codificada por el gen *folC*; DHFR, dihidrofolato reductasa, codificada por el gen *folA* (SAV1426); TS, timidilato sintasa, codificada por el gen *thyA*; TK, timidina kinasa, codificada por el gen *tdk* (SAV2119); NupC, transportador codificado por el gen *nupC* (SAV0521).

Este efecto podría corresponder a un efecto de supresión por parte de la eritromicina sobre el SxT, ya que la inhibición del crecimiento por parte del SxT sobre FQ-97 era menor cuando la eritromicina estaba presente, con respecto a cuando se le daba el antibiótico solo por separado (Yeh *et al.*, 2006). Cuando este tipo de efecto se encuentra entre antibióticos cuyas dianas o vías no están relacionadas, como es el caso, se han propuesto dos escenarios posibles: o bien que el fármaco, en este estudio la eritromicina, afectase la vía de captación del SxT, o que se produjesen interacciones farmacológicas

entre ambos (Cokol *et al.*, 2011; Brochado *et al.*, 2018). Sin embargo, descartamos ambas opciones ya que, si la explicación al efecto encontrado con la eritromicina sobre el SxT se debiese a una menor entrada del compuesto en la célula bacteriana, o a una interacción farmacológica, se hubiera encontrado un efecto similar en FQ-96, y la cepa no mostraba una modificación en su CMI cuando la eritromicina estaba presente (figura 38). Además, el efecto de la eritromicina no podría basarse únicamente en modificar la permeabilidad celular a SxT, dado que encontramos el fenotipo de semi-dependencia en FQ-97 sin necesidad de añadir el antibiótico.

De entre los posibles mecanismos de resistencia que puede desarrollar una bacteria hacia SxT, para determinar como la eritromicina podía estar influyendo en los CMI en FQ-97, encontramos por una parte respecto a trimetoprim (TM) (Eliopoulos y Huovinen, 2001; Huovinen, 2001): 1) mutaciones en el gen *folA* —que codifica para la enzima DHFR, diana de este compuesto— pero FQ-97 no presentaba mutaciones en este gen; 2) un aumento de la expresión de este mismo gen, *folA*, pero como se determinó a través de ensayos de qRT-PCR (figura 36), este gen no sufría cambios significativos en su expresión en presencia de eritromicina; 3) adquisición del gen *dfirK* por eventos de TGH que codifique para una enzima DHFR resistente a TM (Kadlec y Schwarz, 2009). Sin embargo, esta explicación no daría tampoco sentido a un aumento de la resistencia al antibiótico solo en presencia de eritromicina, ya que en el caso de que FQ-97 portase el gen *dfirK* debería haber sido directamente resistente al compuesto, independientemente de la presencia/ausencia de la eritromicina; 4) modificaciones en la permeabilidad de membrana o bombas de expulsión, algo que como se ha discutido anteriormente no daría explicación a por qué este fenómeno no aparecía en FQ-96.

Respecto a la sulfonamida sulfametoxazol (SXM), los posibles mecanismos de resistencia son similares, desde mutaciones en su diana en el gen *dhps*, adquisición de genes de resistencia o alteraciones en la entrada del antibiótico a la célula (Eliopoulos y Huovinen, 2001; Sköld, 2000). De nuevo ninguna de estas explicaciones era posible, por lo que se propuso que la eritromicina —al igual que un suplemento exógeno con timidina volvía a las bacterias completamente resistentes a SxT— podía generar un aumento en los niveles de dTMP, haciendo a la bacteria más resistente a los compuestos. Dicho de otra forma, la eritromicina podía estar reduciendo el nivel de inhibición de los antibióticos SxT. Esta explicación encajaba con la hipótesis propuesta para el fenotipo de semi-dependencia, ya que, si la eritromicina generaba un redireccionamiento metabólico que aumentase los niveles de dTMP, podía compensar el defecto en actividad de TS y, por otra parte, que FQ-97 se volviera más resistente a SxT.

En esta misma línea, los ensayos de reproducción del fenotipo de dependencia en USA 300 (figura 40) también indicaron que el efecto de la eritromicina está posiblemente relacionado con un redireccionamiento metabólico y la ruta del folato. El tratamiento con SxT en esta cepa inhibió la producción del cofactor mTFH (figura 47), generando el mismo efecto que la mutación *thyA* en FQ-97, un déficit de dTMP que se veía sorteado a un rango de concentraciones muy específicas con eritromicina y clindamicina. En esta dirección, pensamos que en mutantes totales de *thyA*, o mutaciones que generasen una pérdida total en la actividad de TS, no podría existir un efecto compensatorio dado que

la eritromicina no sustituye la actividad de TS, ni proporciona timidina exógena, si no que favorece flujos hacia síntesis de dTMP.

Respecto a la hipótesis planteada y los resultados obtenidos, los estudios metabólicos realizados por Dörries *et al.* (2014) ya demostraron el alto impacto sobre el metabolismo de *S. aureus* de diferentes antibióticos (Dörries *et al.*, 2014). Concretamente mostraron cómo la eritromicina puede modificar los niveles de metabolitos como el 5-fosfo-d-ribosil1, α -difosfato (PRPP), dUMP, 2-deoxiuridina y el citidina trifosfato (CTP), relacionados con el metabolismo de las pirimidinas, entre otros. Específicamente, este antibiótico es capaz de canalizar la glucosa del medio hacia la ruta de las pentosas 5 fosfato (PPP), en vez de oxidar la glucosa mediante la glucólisis (Dörries *et al.*, 2014). En el último tramo de la ruta PPP, se producen compuestos necesarios para la síntesis de PRPP, que es un precursor común para la síntesis de *de novo* de purinas y pirimidinas (Hayar-Kayali, 2010) (figura 48).

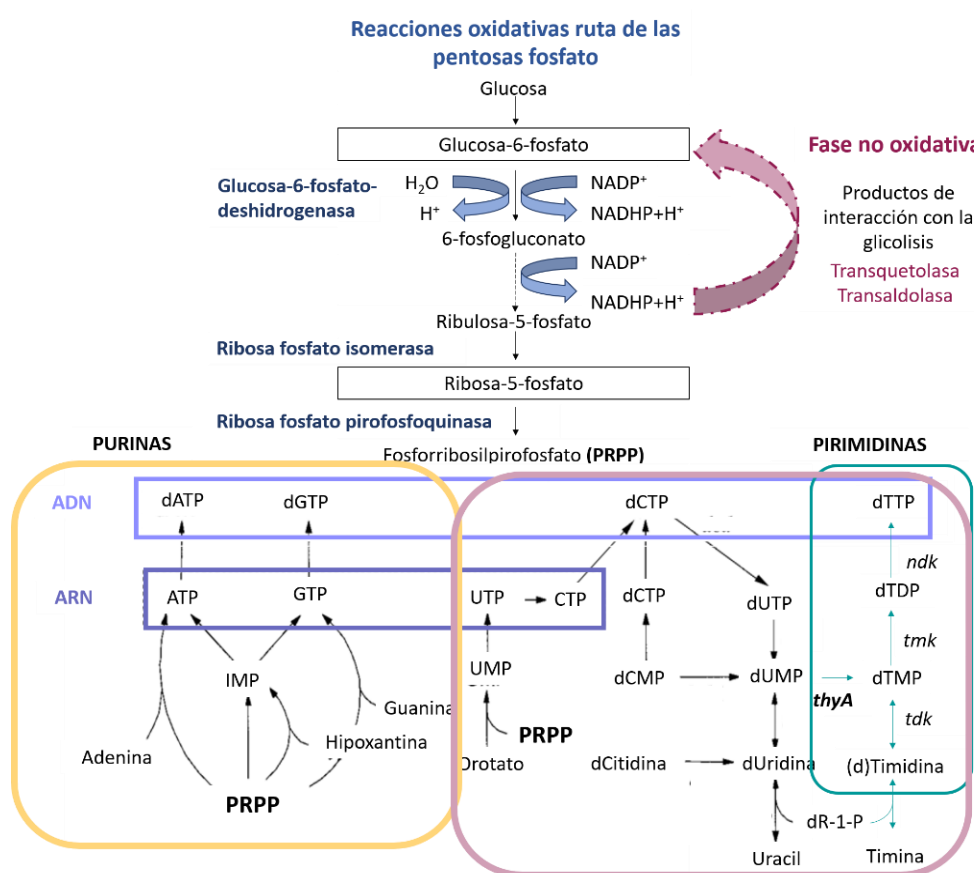


Figura 48. Reacciones oxidativas en la ruta PPP para la producción de purinas y pirimidinas (Hove-Jensen., *et al* 2016; Litwack, 2018). El último tramo de esta ruta comprende la fase oxidativa que transforma la glucosa 6-fosfato (G6P) en ribosa 5-fosfato (R5P). El R5P es necesario para la síntesis de PRPP, que es un precursor común para la síntesis de *de novo* de purinas purinas (recuadro amarillo) y pirimidinas (recuadro morado) (Hayar-Kayali, 2010). En verde a la derecha, podemos ver la principal vía afectada en FQ-97 por la mutación en *thyA* y por el efecto de los antibióticos SxT, influyendo en la síntesis de dTMP y la cantidad de reacciones implicadas en estas rutas.

Si se ha demostrado que la eritromicina es capaz de aumentar el PRPP, principal precursor de pirimidinas, ésta podría ser la principal explicación a cómo la eritromicina compensa la falta de actividad de TS-97 que genera un déficit en dTMP y dTTP, apoyando la hipótesis planteada en esta tesis. La

interrelación entre la ruta del folato y la síntesis de dTMP, y a su vez la relación de ambas rutas con la de las PPP es compleja y contribuyen diversos genes que se podrían ver alterados por la presencia de eritromicina (figura 49). Por lo tanto, para confirmar la relación entre el fenotipo de semi-dependencia estudiado y la redirección de flujos metabólicos propuesta con la eritromicina, consideramos necesaria la realización de un ensayo de metabolómica dirigida en células de FQ-97 con y sin eritromicina. Mediante este ensayo podríamos determinar a qué nivel está actuando el antibiótico, y cuáles son los metabolitos específicos cuyos niveles está alterando.

Respecto a un posible aumento de los niveles de dTMP en presencia de eritromicina, los ensayos de qRT-PCR mostraron que no existía una represión sobre los genes *thyA* y *folA* (figura 36), lo que indicaba que en el caso de que hubiese un aumento en los niveles de dTMP por parte de la eritromicina, este no era tan pronunciado como el efecto de añadir timidina exógena. Dicha explicación se debe a que estudios previos han sugerido una represión por producto final en *thyA*, ya que aquellas SCVs dependientes de timidina en medios ausentes en este compuesto, muestran una sobreexpresión del gen ante la falta de producto (Chatterjee *et al.*, 2008). Y, por otra parte, existen estudios que demuestran cómo otros genes relacionados con la síntesis *de novo* de pirimidinas o el transportador *nupC* (encargado de transportar la timidina exógena al interior celular) (figura 47) ante un suplemento exógeno de timidina también se ven reprimidos a través de una represión por producto final (Kriegeskorte *et al.*, 2014).

El hecho de no observar este tipo de represión coincidía con el efecto observado en los antibiogramas a SxT en presencia de eritromicina. La suplementación con timidina no tenía un efecto idéntico a la adición de eritromicina (figuras 38 y 39), dado que en presencia del primer compuesto la bacteria al no necesitar la vía endógena de dTMP se volvía completamente resistente a los antibióticos SxT. Sin embargo, la eritromicina solo generaba un aumento del orden de tres veces a estos compuestos. Por lo que el posible aumento en los niveles de dTMP a través del redireccionamiento a la ruta de las pentosas no era suficiente para que hubiese represión por producto de *thyA* ni *folA*, ya que este tipo de represión por producto solo se observado añadiendo directamente timidina exógena (Kriegeskorte *et al.*, 2014).

Por lo tanto, al igual que lo descrito con la nistatina, el efecto de los antibióticos no es solamente el que se les ha atribuido por sus propiedades terapéuticas (López *et al.*, 2009), sino que pueden jugar un importante papel en procesos de señalización o como se muestra en esta tesis, implicaciones en el metabolismo bacteriano.

3.2. Efecto de la eritromicina sobre indicadores de estrés metabólico

Gran parte de esta tesis se dedicó al estudio de los complejos ribosomales 100S de FQ-97 y a la cuantificación de la alarmona (p)ppGpp, dos indicadores de estrés general o condiciones metabólicas desfavorables.

Los perfiles ribosomales mostraron en FQ-97 la presencia de unos elevados niveles de ribosomas 100S en la condición MH basal que no aparecían en FQ-96 (figura 24). Siguiendo el mismo patrón, los

niveles de (p)ppGpp de FQ-97 en MH eran superiores a los de su cepa ancestral FQ-96 en la misma condición (figura 29). Ambos niveles, podrían estar indicando una situación de estrés nutricional o metabólico en la cepa FQ-97 (Basu y Yap, 2017; Pacios *et al.*, 2020).

Sin embargo, ante la adición de eritromicina, FQ-97 experimentaba una reducción tanto en los ribosomas 100S que parecía traducirse en un aumento en sus ribosomas activos 70S —aunque no se conoce con exactitud la interconversión exacta entre 100S-70S (Basu y Yap, 2016)— y una bajada de sus niveles de (p)ppGpp. La disminución en los niveles de estos dos indicadores de estrés, podría estar indicado la capacidad de la eritromicina de mejorar la situación de estrés metabólico a la que FQ-97 se enfrentaba en MH. Aunque no existen estudios previos asociados a un déficit de dTMP y altos niveles de ribosomas 100S y (p)ppGpp, es posible que ante el detrimento de actividad en la enzima TS se genere una situación de estrés metabólico que cause los elevados niveles de (p)ppGpp y de ribosomas 100S en FQ-97.

Asociado al descenso de los ribosomas 100S, FQ-97 también experimentaba un aumento en la proteína HPF tras la adición de eritromicina, tanto a nivel de fracciones ribosomales (figura 24) como en un extracto proteico total (figura 25). Este incremento en sus niveles, podría ser la principal explicación a por qué en presencia de eritromicina HPF también presentaba una unión más inespecífica a todas las fracciones ribosomales, dado que ya se ha demostrado que cuando ésta está en exceso se pueden generar uniones inespecíficas al resto de fracciones ribosomales (Basu y Yap, 2016; Ueta *et al.*, 2009). Además, la modificación en los patrones de oligomerización de HPF ante la adición de eritromicina —encontrando complejos de menor tamaño— (figura 26), encajaba con una interacción inespecífica de la proteína con fracciones ribosomales de menor tamaño. Por lo tanto, la eritromicina aumentaba los niveles de HPF generando posiblemente un cambio en la estequiometría HPF-ribosoma, propiciando una unión inespecífica a otras fracciones ribosomales, y cambiando el patrón de oligomerización del factor de hibernación.

A diferencia de lo que ocurre con los ribosomas 100S, de los que no existe literatura asociada entre estos complejos y defectos en crecimiento, sí existe literatura asociando cepas con defectos en su crecimiento —concretamente comportamientos SCVs— debida a unos altos niveles de (p)ppGpp (Gao *et al.*, 2010). Sin embargo, la causa de este comportamiento tiene su origen en mutaciones en el gen *rsh*, dado que mutaciones en éste pueden aumentar la actividad sintetasa de la enzima RSH, elevando los niveles de la alarmona (Geiger *et al.*, 2010; Hogg *et al.*, 2004). Sin embargo, la explicación genética a los elevados niveles de (p)ppGpp no podía ser ésta dado que FQ-97 no mostraba mutaciones en este gen. Existen otras dos pequeñas sintetasas de (p)ppGpp en *S. aureus*, codificadas por *relP* y *relQ* (Geiger *et al.*, 2014), que se pueden activar ante otros estreses diferentes a los que se activa RSH y cuya sobreexpresión puede aumentar los niveles de (p)ppGpp (Geiger *et al.*, 2014). Planteamos que o bien RSH o estas dos GTPasas, podrían estar respondiendo a una situación de estrés metabólico inducida por la mutación en *thyA*. Al igual que en otros firmicutes se ha observado una sobreexpresión del gen *spoT* a diferentes condiciones de estrés nutricional, como la falta de carbono (Xiao *et al.*, 1990), ácidos grasos

(Battesti y Bouveret, 2006) o hierro (Vinella *et al.*, 2005), no sería extraño encontrar una respuesta inducida por una condición metabólica de déficit de dTMP.

Por lo tanto, recopilando toda la información obtenida hasta el momento, la mutación en *thyA* era la principal responsable del defecto en crecimiento en FQ-97, necesario para que la eritromicina generase un efecto ventajoso en la bacteria. La misma mutación generaba una situación de estrés metabólico, en la que FQ-97 respondía elevando sus niveles de ribosomas 100S y la alarmona (p)ppGpp. Al añadir eritromicina, el antibiótico compensaba el defecto en crecimiento debido a un posible redireccionamiento de flujos metabólicos hacia dTMP, compensando la falta de actividad de TS. El efecto de la eritromicina generaba en última instancia una mejora en las condiciones metabólicas, confirmada por una reducción en los niveles de ribosomas 100S y la alarmona (p)ppGpp. Por lo tanto, la respuesta a estrés metabólico encontrada en FQ-97 parecía tener su origen en la mutación en *thyA* y en el déficit de síntesis en dTMP que ésta generaba.

Para finalizar este apartado, consideramos crucial destacar la capacidad de adaptación de las cepas de *S. aureus* procedentes de fibrosis quística para establecer infecciones de carácter crónico. Esta habilidad ya se ha estudiado previamente, ya que estas cepas son capaces de establecer biofilms o generar poblaciones SCVs que les permiten cronificarse en infección y pasar desapercibidas al sistema inmune, garantizando la coexistencia bacteria - hospedador (López-Collazo *et al.*, 2015; Tuchscher *et al.*, 2011). En este sentido, las mutaciones en *thyA* asociadas con tratamientos a SxT como la observada en FQ-97 pueden suponer una ventaja a largo plazo en la bacteria, ya que promueven como estrategia de supervivencia una internalización en las células pulmonares donde la bacteria replica. Ante la amenaza de un tratamiento con SxT, la bacteria tendrá la capacidad de volverse resistente al mismo a través de la asimilación de la timidina exógena procedente de las células eucariotas pulmonares en las que replica (Kriegeskorte *et al.*, 2015). Pero el estudio llevado a cabo en esta tesis muestra como un problema en crecimiento generado por una mutación en *thyA* puede llegar también a convertirse en una ventaja ante el tratamiento con antibióticos ribosomales, de los que hasta la fecha no existe ningún tipo de relación con el metabolismo del dTMP. Aunque demostramos que el mecanismo molecular de la eritromicina y la clindamicina sobre la dirección de flujos metabólicos ha de ser algo general por la reproducción del fenotipo en el laboratorio, la redirección solo supondrá una ventaja a la bacteria cuando ésta tenga un problema en la vía de síntesis del dTMP, como es el caso de las bacterias SCVs presentes en las infecciones de fibrosis quística. Además, dado que ambos antibióticos son capaces de compensar el defecto en crecimiento en la bacteria, se podría llegar a pensar que, ante un tratamiento con éstos, bacterias con comportamientos similares a FQ-97 tendrían la opción de combinar dos estrategias de supervivencia: un comportamiento semiSCVs que le permitiera cronificarse en infección frente a un comportamiento más virulento en presencia del antibiótico ribosomal, ya que compensaría su defecto en crecimiento. Respecto a la importante repercusión clínica del fenotipo de semi-dependencia descrito en esta tesis, debemos señalar el riesgo que podría entrañar el tratamiento combinado basado en eritromicina/clindamicina con SxT en pacientes con fibrosis quística.

4. Búsqueda del mecanismo molecular causante del fenotipo de semi-dependencia

Los atenuadores y los *riboswitches* son mecanismos riboreguladores que se encuentran en las regiones 5' UTR del gen cuya expresión se va a regular y que responden ante la presencia de diferentes ligandos, que pueden ser desde pequeños antibióticos, aminoácidos, nucleótidos a iones (Breaker, 2012; Dar *et al.*, 2016; Dersch *et al.*, 2017). La principal diferencia entre estos dos mecanismos es la implicación del ribosoma bacteriano en el proceso. En los mecanismos de atenuación, tal y como se comentó en la introducción de esta tesis, es necesaria la unión del antibiótico al ribosoma, mientras que, en el *riboswitch*, existe una unión directa del antibiótico al ARNm (Dersch *et al.*, 2017). Sin embargo, ambos mecanismos comparten que han de existir regiones de reconocimiento por parte del antibiótico en las regiones 5' UTR del gen cuya expresión o traducción se va a regular (Dar *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2013; Panchal y Brenk, 2021).

Hasta la fecha, la mayoría de genes que se regulan por atenuación se han asociado a funciones de resistencia a los propios antibióticos que actúan como inductores. Estos antibióticos suelen ser macrólidos de 15 carbonos como la eritromicina (Weisblum, 1995), aunque recientemente se ha descrito a la clindamicina —o el antibiótico del que deriva ésta, lincomicina— como compuesto inductor en mecanismos de atenuación de la transcripción en *L. monocytogenes* (Dar *et al.*, 2016; Duval *et al.*, 2018).

Basándonos en la literatura existente sobre la capacidad inductora de la eritromicina y la clindamicina a través del reconocimiento de los dominios conservados RL(R/K) (Chancey *et al.*, 2015; Duval *et al.*, 2018; Vázquez-Laslop y Mankin, 2018), planteamos que la posible redirección de flujos metabólicos hacia dTMP en FQ-97 tenía su origen en un mecanismo de atenuación sobre genes del metabolismo bacteriano.

Sin embargo, descartamos una riboregulación por atenuación dado que la unión del antibiótico al ribosoma no era necesaria para que el fenotipo de semi-dependencia estuviera presente, ya que tanto la cepa USA 300 en la que se introdujo el gen *ermA* en alto número de copias, como aquella que lo tenía en monocopia (NE178), seguían manteniendo el fenotipo de dependencia (figura 41). La introducción de este gen debía mediar una resistencia a través de la metilación de las bases de ARNr en el 23S de interacción con la clindamicina y la eritromicina e impedir la unión de estos compuestos en el ribosoma (Petinaki y Papagiannitsis, 2018).

Una vez descartado un mecanismo de tipo atenuación, planteamos una regulación de tipo *riboswitch*, en la que eritromicina y clindamicina pudieran unirse de manera directa al ARNm del gen que metabólico que fueran a regular. Como hemos comentado, *riboswitch* y atenuación comparten la presencia de una organización y secuencias conservadas en la región 5' UTR del gen que se va a regular. Particularmente, el *riboswitch* presentan una organización estructural y funcional en dos dominios. El primer dominio es el de reconocimiento, llamado aptámero. Esta región va a adoptar una estructura tridimensional específica y va a mediar el reconocimiento de una molécula con gran afinidad y especificidad. El segundo dominio es la plataforma de expresión, con capacidad de formar estructuras secundarias que van a controlar directamente la expresión del gen tras la unión de la molécula al

aptámero. Según la conformación que tome esta plataforma de expresión, favoreciendo la formación de antiterminadores o terminadores transcripcionales, la expresión del gen se inducirá o se reprimirá respectivamente (Panchal y Brenk, 2021). La identificación de este tipo de dominios conservados fueron las que permitieron a Jia *et al.* (2013) demostrar una regulación de tipo *riboswitch* en aminoglucósidos (Jia *et al.*, 2013), la primera regulación de tipo *riboswitch* asociada a antibióticos ribosomales.

Basándonos en la información que existe sobre la eritromicina y la clindamicina, los genes que se sobreexpresan en su presencia y teniendo en cuenta los dominios conservados que debían aparecer en las regiones 5' UTR de estos genes, planteamos que tras realizar una búsqueda de regiones conservadas similar a la de Jia *et al.* (2013), se podrían encontrar los dominios RL(R/K) (Chancey *et al.*, 2015; Duval *et al.*, 2018; Vázquez-Laslop y Mankin, 2018). Esta aproximación, ya ha sido previamente utilizada por Duval *et al.* (2018) para descubrir nuevos genes regulados por atenuación de la transcripción con dominios de reconocimiento RL(R/K) (Duval *et al.*, 2018). Siguiendo esta aproximación planteamos un mecanismo de *riboswitch* y basándonos en la presencia de estos dominios de reconocimiento, así como de una estructura similar a los genes de resistencia a aminoglucósidos regulados por *riboswitch* (Jia *et al.*, 2013) (figura 49), aparecieron solo los genes *rsgA* y *fda*.

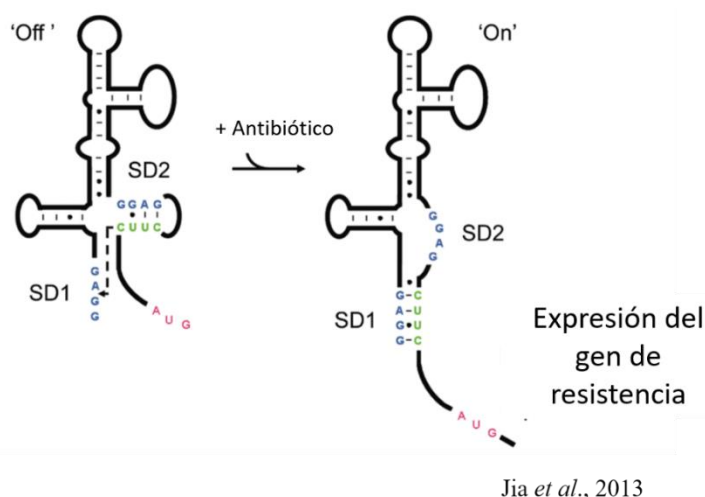


Figura 49. Esquema mecanismo regulación por *riboswitch* en aminoglucósidos (Jia *et al.*, 2013). En ausencia del antibiótico inductor el ARNm posee tal conformación que impide el reconocimiento por parte del ribosoma a su región de unión SD2. Imagen modificada de Jia *et al.* (2013).

Ambos genes presentaban una mayor variación en la secuencia que iba desde la región de reconocimiento o aptámero, hasta el SD2 del gen a regular, lo que podría coincidir con la plataforma de expresión (figura 43). Este hecho encajaba con la literatura dado que el aptámero es la región más conservada y en base a la secuencia de éste se clasifican los diferentes tipos de *riboswitch*, y la plataforma de expresión es la que está sujeta a más variaciones (Breaker, 2012).

Sin embargo, los experimentos de *western blot* y qRT-PCRs (figura 45 y 46) mostraron que en FQ-97 no existía regulación de este tipo por parte de la eritromicina en estos genes. En este sentido, no se observaron variaciones significativas ni en los niveles de la proteína reportera GFP ni en los niveles

de expresión de *rsgA* y *fdA* en presencia de eritromicina, dado que un mecanismo de *riboswitch* puede afectar tanto a la transcripción como a la traducción (Breaker, 2012).

Es importante destacar que aunque la búsqueda de posibles genes sometidos a una riboregulación de tipo *riboswitch* se basó en la presencia de los dominios RL(R/K) (Vázquez-Laslop y Mankin, 2018), éstos solo han sido asociados a mecanismos de atenuación (Chancey *et al.*, 2015; Duval *et al.*, 2018) y nunca a mecanismos de *riboswitch*, dado que éste último no necesita que se sintetice un péptido que contenga motivos de reconocimiento (Dar y Sorek, 2017), sino que el aptámero corresponde a una secuencia de ARNm no traducido (Breaker, 2012; Panchal y Brenk, 2021). Por lo tanto, es posible que, aunque recurrimos a la presencia de regiones conservadas previamente descritas y relacionadas con eritromicina y clindamicina, la región de reconocimiento para un mecanismo de *riboswitch* sea otra diferente, ya que la interacción entre el antibiótico y la estructura tridimensional del aptámero es altamente específica (Breaker, 2012).

Aunque pueda parecer sorprendente pensar en un nuevo tipo de riboregulación mediado por antibióticos con los que se lleva trabajando años como son la clindamicina y la eritromicina, ya otros autores como Dar *et al.* (2016) plantearon la posibilidad de un mecanismo de *riboswitch* con el gen *lmo0919* (Dar *et al.*, 2016).

A diferencia de lo que ocurre con los mecanismos de atenuación, desde el descubrimiento del *riboswitch* de pirofosfato de tiamina (TPP) llevado a cabo por el grupo del Dr. Ronald Breaker (Winkler *et al.*, 2002), estos mecanismos se han encontrado fundamentalmente asociados a genes de biosíntesis y transporte de metabolitos esenciales (Serganov y Nudler, 2013). Sin embargo, a excepción del estudio de Jia *et al.* (2013), no existen trabajos relacionados con regulaciones de tipo *riboswitch* por parte de antibióticos ribosomales.

Por lo tanto, hasta la fecha ya se ha demostrado la enorme implicación que tienen los antibióticos sobre el metabolismo bacteriano (Dörries *et al.*, 2014), el papel de los aminoglucósidos como ligandos de *riboswitch* (Jia *et al.*, 2013) y la amplia distribución que tiene este mecanismo riboregulatorio en los genomas bacterianos, sobre todo en rutas metabólicas (Breaker, 2012). Combinando toda esta información, consideramos que sería posible la existencia de una regulación de tipo *riboswitch* en genes del metabolismo con antibióticos ribosomales como la eritromicina y la clindamicina.

Todo esto se basa en que como comentamos, muchos antibióticos tienen un potente efecto sobre el metabolismo bacteriano (Dörries *et al.*, 2014). Sin embargo, de la mayoría de ellos se desconoce el por qué de este efecto. Centrados en la eritromicina, se ha demostrado que al igual que ocurre en *S. aureus*, existe una canalización de la glucosa hacia PRPP en vez de hacia la glucólisis en *B. subtilis*, por lo que sus niveles de PRPP también aumentan en presencia del antibiótico (Dörries *et al.*, 2014). Además, en esta misma bacteria, se ha observado que los niveles de dos proteínas implicadas en el metabolismo de las purinas —recordemos que PRPP es un precursor de síntesis de purinas y pirimidinas—, como son PurC (fosforibosil-aminoimidazol-succinocarboxamida sintasa) y YqiI (6-fosfogluconato putativa deshidrogenasa), también aumentan en presencia de eritromicina (Bandow

et al., 2003). También en *B. subtilis*, hay estudios que muestran una variación en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de las purinas y las pirimidinas en presencia de eritromicina, que parecen ser dependientes de concentración (Lin *et al.*, 2005). Sin embargo, en ninguno de estos estudios se ha profundizado en el mecanismo molecular que explique este efecto, o en los cambios metabólicos que podría producir la eritromicina para observar estos cambios en regulación. Además, el hecho de que en *B. subtilis* también se haya demostrado un aumento del PRPP en presencia de eritromicina (Dörries *et al.*, 2014), implicaría que el mecanismo causante se podría extrapolar a otros géneros bacterianos. Esto coincidiría si el mecanismo fuera de tipo *riboswitch*, dado que los aptámeros y las plataformas de expresión están altamente conservadas en bacterias (Breaker, 2012).

Para poder llegar a determinar si el mecanismo molecular causante del fenotipo estudiado en FQ-97 es un *riboswitch*, consideramos que la siguiente aproximación sería la realización de un RNAseq en presencia de clindamicina y eritromicina, y una posterior búsqueda de dominios conservados en las regiones 5' UTR de aquellos genes que saliesen sobreexpresados o reprimidos con ambos compuestos. Posteriormente, la búsqueda se centraría en genes relacionados con el metabolismo bacteriano, y más concretamente el metabolismo del dTMP o rutas relacionadas, dado los resultados que se obtuvieron en esta tesis.

Por último, aunque es normal que el estudio de los antibióticos se haya centrado en su utilidad en la lucha contra las infecciones bacterianas, esta tesis es ejemplo de que, si solo nos centramos en sus funciones terapéuticas y no en las posibles funciones que estos tienen como reguladores de diferentes procesos, podríamos estar utilizándolos en clínica de manera incorrecta.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La cepa FQ-97 presenta un fenotipo heteropoblacional y de semi-dependencia con los antibióticos ribosomales eritromicina y clindamicina. Ambos fenotipos solo son visibles en la condición de cultivo específica MH y no aparecen ni en la cepa ancestral FQ-96 ni en la cepa evolucionada FQ-05.
2. No existen mutaciones ni cambios estructurales en el ribosoma de FQ-97 que puedan explicar el fenotipo de semi-dependencia ni el comportamiento heteropoblacional de la cepa. Tampoco existen mutaciones en el gen encargado de mediar la resistencia a ambos antibióticos, *ermA*. Por lo tanto, la semi-dependencia no es una transición de la resistencia ni está relacionada con el mecanismo molecular que la media.
3. FQ-97 presenta elevados niveles basales de ribosomas 100S y (p)ppGpp, sugiriendo un estrés metabólico posiblemente relacionado con un déficit en la síntesis de dTMP. Los niveles de ribosomas 100S y (p)ppGpp se ven reducidos ante la adición de eritromicina, indicando una disminución en este estrés y por tanto un posible efecto del antibiótico a nivel metabólico.
4. FQ-97 presenta una mutación en *thyA* que genera un déficit en la actividad para la enzima que codifica, la timidilato sintasa (TS), comprometiendo la síntesis del dTMP y por tanto la replicación del ADN. Esta mutación es la principal causante del defecto de crecimiento de FQ-97 y es un condicionante para que se observe el fenotipo de semi-dependencia.
5. El fenotipo de semi-dependencia a eritromicina en FQ-97 podría estar explicado por un redireccionamiento de los flujos metabólicos hacia la síntesis de dTMP. El cambio de flujos podría compensar la falta de actividad de la TS en FQ-97 en medios sin timidina, explicando la mejora en la velocidad de crecimiento en presencia de eritromicina y su evidencia en la condición de cultivo específica MH.
6. El fenotipo de semi-dependencia es independiente de la unión del antibiótico al ribosoma, lo que descarta una regulación sobre genes del metabolismo de tipo atenuación. Basándonos en ejemplos previos de mecanismos reguladores con otros antibióticos ribosomales que no precisan de la unión del compuesto al ribosoma, planteamos como hipótesis final un mecanismo de *riboswitch*. La eritromicina podría estar uniéndose directamente a regiones específicas del ARNm de la región 5' UTR del gen metabólico a regular, generando así una redirección de flujos metabólicos hacia dTMP.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251-259.
- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699.
- Bandow, J. E., Brötz, H., Leichert, L. I. O., Labischinski, H., & Hecker, M. (2003). Proteomic Approach to Understanding Antibiotic Action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 948-955.
- Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. (2005, 22 diciembre).* European Commission. Recuperado 15 de febrero de 2022, de https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687
- Basu, A., & Yap, M.-N. F. (2016). Ribosome hibernation factor promotes Staphylococcal survival and differentially represses translation. *Nucleic Acids Research*, 44(10), 4881-4893.
- Basu, A., & Yap, M.-N. F. (2017). Disassembly of the *Staphylococcus aureus* hibernating 100S ribosome by an evolutionarily conserved GTPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(39), E8165-E8173.
- Battesti, A., & Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1048-1063.
- Besier, S., Smaczny, C., Von Mallinckrodt, C., Krahl, A., Ackermann, H., Brade, V., & Wichelhaus, T. A. (2007). Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 168-172. Scopus.
- Beyer, P., & Paulin, S. (2020). Priority pathogens and the antibiotic pipeline: An update. *Bulletin of the World Health Organization*, 98(3), 151-151.
- BioinfoGP SNPer v0.8.* (2021, septiembre 21). SNPerBioinfoGPCNB-CSIC2020.
- Blanchard, A. C., & Waters, V. J. (2019). Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 40(6), 727-736.
- Böttger, E. C., Springer, B., Prammananan, T., Kidan, Y., & Sander, P. (2001). Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO Reports*, 2(4), 318-323.
- Boucher, H. W., & Corey, G. R. (2008). Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 46(S5), S344-S349.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Breaker, R. R. (2012). Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2), a003566-a003566.
- Brochado, A. R., Telzerow, A., Bobonis, J., Banzhaf, M., Mateus, A., Selkrig, J., Huth, E., Bassler, S., Zamarreño Beas, J., Zietek, M., Ng, N., Foerster, S., Ezraty, B., Py, B., Barras, F., Savitski, M. M., Bork, P., Göttig, S., & Typas, A. (2018). Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature*, 559(7713), 259-263.
- Bustin, S. A., & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 109(4), 365-379.
- Calder, R. B., Williams, R. S., Ramaswamy, G., Rock, C. O., Campbell, E., Unkles, S. E., Kinghorn, J. R., & Jackowski, S. (1999). Cloning and characterization of a eukaryotic pantothenate kinase gene (panK) from *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2014-2020.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 27(1), 44-52.

Camus, L., Briaud, P., Vandenesch, F., & Moreau, K. (2021). How Bacterial Adaptation to Cystic Fibrosis Environment Shapes Interactions Between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 411.

Carreras, C. W., & Santi, D. V. (1995). The Catalytic Mechanism and Structure of Thymidylate Synthase. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 721-762.

Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., ... Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 56-66.

Chancey, S. T., Bai, X., Kumar, N., Drabek, E. F., Daugherty, S. C., Colon, T., Ott, S., Sengamalay, N., Sadzewicz, L., Tallon, L. J., Fraser, C. M., Tettelin, H., & Stephens, D. S. (2015). Transcriptional Attenuation Controls Macrolide Inducible Efflux and Resistance in *Streptococcus pneumoniae* and in Other Gram-Positive Bacteria Containing *mef/mel(msr(D))* Elements. *PLOS ONE*, 10(2), e0116254.

Charpentier, E., Anton, A. I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., & Novick, R. P. (2004). Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6076-6085.

Chatterjee, I., Kriegeskorte, A., Fischer, A., Deiwick, S., Theimann, N., Proctor, R. A., Peters, G., Herrmann, M., & Kahl, B. C. (2008). In Vivo Mutations of Thymidylate Synthase (Encoded by *thyA*) Are Responsible for Thymidine Dependency in Clinical Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 834-842.

Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.

CLSI. (2018). Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard. *CLSI document M100-28*, 28th Edition.

Cokol, M., Chua, H. N., Tasan, M., Mutlu, B., Weinstein, Z. B., Suzuki, Y., Nergiz, M. E., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Giaever, G., Nislow, C., Myers, C. L., Andrews, B. J., Boone, C., & Roth, F. P. (2011). *Systematic exploration of synergistic drug pairs*. *Molecular Systems Biology*, 7, 544. h

Collignon, P. (2013). The importance of a One Health approach to preventing the development and spread of antibiotic resistance. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 366, 19-36.

Connolly, J., Boldock, E., Prince, L. R., Renshaw, S. A., Whyte, M. K., & Foster, S. J. (2017). Identification of *Staphylococcus aureus* Factors Required for Pathogenicity and Growth in Human Blood. *Infection and Immunity*, 85(11), Article 11.

Costi, M. P., Tondi, D., Rinaldi, M., Barlocco, D., Pecorari, P., Soragni, F., Venturelli, A., & Stroud, R. M. (2002). Structure-based studies on species-specific inhibition of thymidylate synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1587(2-3), 206-214.

Dar, D., Shamir, M., Mellin, J. R., Koutero, M., Stern-Ginossar, N., Cossart, P., & Sorek, R. (2016). Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria. *Science*, 352(6282), aad9822.

Dar, D., & Sorek, R. (2017). Regulation of antibiotic-resistance by non-coding RNAs in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 111-117.

D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B., & Pesci, E. C. (2002). Autolysis and Autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* Colony Morphology Mutants. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6481-6489.

- Davies, J. (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(7), 496-499.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- De Angelis, G., Cipriani, M., Cauda, R., & Tacconelli, E. (2011). Treatment of skin and soft tissue infections due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe: The role of trimethoprim-sulfamethoxazole 0010. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(12), 1471-1472; author reply 1472.
- Dean, M. A., Olsen, R. J., Long, S. W., Rosato, A. E., & Musser, J. M. (2014). Identification of Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Strains That Produce Small-Colony Variants Auxotrophic for Menadione. *Infection and Immunity*, 82(4), 1600-1605.
- Dellit, T. H., Owens, R. C., McGowan, J. E., Gerding, D. N., Weinstein, R. A., Burke, J. P., Huskins, W. C., Paterson, D. L., Fishman, N. O., Carpenter, C. F., Brennan, P. J., Billeter, M., & Hooton, T. M. (2007). Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. *Clinical Infectious Diseases*, 44(2), 159-177.
- Dersch, P., Khan, M. A., Mühlen, S., & Görke, B. (2017). Roles of Regulatory RNAs for Antibiotic Resistance in Bacteria and Their Potential Value as Novel Drug Targets. *Frontiers in Microbiology*, 8, 803.
- Dever, L. L., Smith, S. M., Handwerger, S., & Eng, R. H. (1995). Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(10), 2770-2773.
- Dörries, K., Schlueter, R., & Lalk, M. (2014). Impact of Antibiotics with Various Target Sites on the Metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7151-7163.
- Douthwaite, S., & Champney, W. S. (2001). Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_2), 1-8.
- Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S., & Cate, J. H. D. (2010). Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17152-17157.
- Duval, M., Dar, D., Carvalho, F., Rocha, E. P. C., Sorek, R., & Cossart, P. (2018). HflXr, a homolog of a ribosome-splitting factor, mediates antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(52), 13359-13364.
- Eliopoulos, G. M., & Huovinen, P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1608-1614.
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 90-11.
- Farrell, D. J., Sader, H. S., Rhomberg, P. R., Scangarella-Oman, N. E., & Flamm, R. K. (2017). *In Vitro* Activity of Gepotidacin (GSK2140944) against *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), Article 3.
- Farzam, K., Nessel, T. A., & Quick, J. (2021). Erythromycin. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Fey, P. D., Endres, J. L., Yajjala, V. K., Widhelm, T. J., Boissy, R. J., Bose, J. L., & Bayles, K. W. (2013). A Genetic Resource for Rapid and Comprehensive Phenotype Screening of Nonessential *Staphylococcus aureus* Genes. *mBio*, 4(1), e00537-12.
- Finer-Moore, J. S., Anderson, A. C., O'Neil, R. H., Costi, M. P., Ferrari, S., Krucinski, J., & Stroud, R. M. (2005). The structure of *Cryptococcus neoformans* thymidylate synthase suggests strategies for using target dynamics for

species-specific inhibition. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 61(Pt 10), 1320-1334.

Finland, M. (1955). Emergence of antibiotic-resistant bacteria. *The New England Journal of Medicine*, 253(23), 1019-1027.

Fraser, C. M., & Fleischmann, R. D. (1997). Strategies for whole microbial genome sequencing and analysis. *Electrophoresis*, 18(8), 1207-1216.

Fyfe, C., Grossman, T. H., Kerstein, K., & Sutcliffe, J. (2016). Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a025395.

Gao, W., Chua, K., Davies, J. K., Newton, H. J., Seemann, T., Harrison, P. F., Holmes, N. E., Rhee, H.-W., Hong, J.-I., Hartland, E. L., Stinear, T. P., & Howden, B. P. (2010). Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000944.

Garst, A. D., Edwards, A. L., & Batey, R. T. (2011). Riboswitches: Structures and Mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), a003533-a003533.

Garza-Ramos, G., Xiong, L., Zhong, P., & Mankin, A. (2001). Binding Site of Macrolide Antibiotics on the Ribosome: New Resistance Mutation Identifies a Specific Interaction of Ketolides with rRNA. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6898-6907.

Geiger, T., Goerke, C., Fritz, M., Schäfer, T., Ohlsen, K., Liebeke, M., Lalk, M., & Wolz, C. (2010). Role of the (p)ppGpp Synthase RSH, a RelA/SpoT Homolog, in Stringent Response and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 78(5), 1873-1883.

Geiger, T., Kästle, B., Gratani, F. L., Goerke, C., & Wolz, C. (2014). Two Small (p)ppGpp Synthases in *Staphylococcus aureus* Mediate Tolerance against Cell Envelope Stress Conditions. *Journal of Bacteriology*, 196(4), 894-902.

Gómez-González, C., Acosta, J., Villa, J., Barrado, L., Sanz, F., Orellana, M. Á., Otero, J. R., & Chaves, F. (2010). Clinical and Molecular Characteristics of Infections with CO₂-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2878-2884.

Graham, J. E., & Wilkinson, B. J. (1992). *Staphylococcus aureus* osmoregulation: Roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. *Journal of Bacteriology*, 174(8), 2711-2716.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition). Cold Spring Harbor Press.

Haltiner, R. C., Migneault, P. C., & Robertson, R. G. (1980). Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton agar with low thymidine content. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(3), 365-368.

Häußler, S., Ziegler, I., Löttel, A., Götz, F. v., Rohde, M., Wehmhöhner, D., Saravanamuthu, S., Tümmler, B., & Steinmetz, I. (2003). Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Journal of Medical Microbiology*, 52(4), 295-301.

Highlander, S. K., Hultén, K. G., Qin, X., Jiang, H., Yerrapragada, S., Mason, E. O., Shang, Y., Williams, T. M., Fortunov, R. M., Liu, Y., Igboeli, O., Petrosino, J., Tirumalai, M., Uzman, A., Fox, G. E., Cardenas, A. M., Muzny, D. M., Hemphill, L., Ding, Y., ... Weinstock, G. M. (2007). Subtle genetic changes enhance virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 7, 99.

Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M., & Hilgenfeld, R. (2004). Conformational Antagonism between Opposing Active Sites in a Bifunctional RelA/SpoT Homolog Modulates (p)ppGpp Metabolism during the Stringent Response. *Cell*, 117(1), 57-68.

Hove-Jensen, B., Andersen, K. R., Kilstrup, M., Martinussen, J., Switzer, R. L., & Willemoës, M. (2017). Phosphoribosyl Diphosphate (PRPP): Biosynthesis, Enzymology, Utilization, and Metabolic

Significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(1), Article 1.

Iandolo, J. J., Worrell, V., Groicher, K. H., Qian, Y., Tian, R., Kenton, S., Dorman, A., Ji, H., Lin, S., Loh, P., Qi, S., Zhu, H., & Roe, B. A. (2002). Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages ϕ 11, ϕ 12 and ϕ 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene*, 289(1), 109-118.

Islam, Z., Gurevic, I., Strutzenberg, T. S., Ghosh, A. K., Iqbal, T., & Kohen, A. (2018). Bacterial versus human thymidylate synthase: Kinetics and functionality. *PLOS ONE*, 13(5), e0196506.

Jevons, M. P. (1961). "Celbenin"—Resistant *Staphylococci*. *British Medical Journal*, 1(5219), 124-125.

Jia, X., Zhang, J., Sun, W., He, W., Jiang, H., Chen, D., & Murchie, A. I. H. (2013). Riboswitch Control of Aminoglycoside Antibiotic Resistance. *Cell*, 152(1-2), 68-81.

Johns, B. E., Purdy, K. J., Tucker, N. P., & Maddocks, S. E. (2015). Phenotypic and Genotypic Characteristics of Small Colony Variants and Their Role in Chronic Infection. *Microbiology Insights*, 8, 15-23.

Kadlec, K., & Schwarz, S. (2009). Identification of a Novel Trimethoprim Resistance Gene, *df*rK, in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Strain and Its Physical Linkage to the Tetracycline Resistance Gene *tet* (L). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 776-778.

Kahl, B. C. (2014). Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*—A bacterial survival strategy. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 21, 515-522.

Kahl, B. C., Becker, K., & Löffler, B. (2016). Clinical Significance and Pathogenesis of *Staphylococcal* Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(2), 401-427.

Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec* ,

Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1549-1555.

Kreiswirth, B. N., Löfdahl, S., Betley, M. J., O'Reilly, M., Schlievert, P. M., Bergdoll, M. S., & Novick, R. P. (1983). The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 305(5936), 709-712.

Kriegeskorte, A., Block, D., Drescher, M., Windmüller, N., Mellmann, A., Baum, C., Neumann, C., Lorè, N. I., Bragonzi, A., Liebau, E., Hertel, P., Seggewiss, J., Becker, K., Proctor, R. A., Peters, G., & Kahl, B. C. (2014). Inactivation of *thyA* in *Staphylococcus aureus* attenuates virulence and has a strong impact on metabolism and virulence gene expression. *MBio*, 5(4), e01447-01414.

Kriegeskorte, A., Grubmüller, S., Huber, C., Kahl, B. C., von Eiff, C., Proctor, R. A., Peters, G., Eisenreich, W., & Becker, K. (2014). *Staphylococcus aureus* small colony variants show common metabolic features in central metabolism irrespective of the underlying auxotrophism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4.

Kriegeskorte, A., Lorè, N. I., Bragonzi, A., Riva, C., Kelkenberg, M., Becker, K., Proctor, R. A., Peters, G., & Kahl, B. C. (2015). Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Induced by Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT) and Have Increased Fitness during SXT Challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7265-7272.

Kwon, J. H., & Powderly, W. G. (2021). The post-antibiotic era is here. *Science*, 373(6554), 471-471.

La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. (2017, 27 febrero). Organización Mundial de la Salud. Recuperado 16 de febrero de 2022, de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Lannergård, J., von Eiff, C., Sander, G., Cordes, T., Seggewiß, J., Peters, G., Proctor, R. A., Becker, K., & Hughes, D. (2008).

- Identification of the Genetic Basis for Clinical Menadione-Auxotrophic Small-Colony Variant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 4017-4022.
- Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., & Sperling-Petersen, H. U. (2005). Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 101-123.
- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(4), 482-492.
- Leclercq, R., & Courvalin, P. (2002). Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2727-2734.
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18033.
- Li, C., Wu, Y., Riehle, A., Ma, J., Kamler, M., Gulbins, E., & Grassmé, H. (2017). *Staphylococcus aureus* Survives in Cystic Fibrosis Macrophages, Forming a Reservoir for Chronic Pneumonia. *Infection and Immunity*, 85(5), Article 5.
- Li, W., Atkinson, G. C., Thakor, N. S., Allas, Ü., Lu, C., Chan, K.-Y., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K. S., Haurlyuk, V., & Frank, J. (2013). Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications*, 4(1), 1477.
- Liese, J., Rooijackers, S. H. M., van Strijp, J. A. G., Novick, R. P., & Dustin, M. L. (2013). Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of *Staphylococcus aureus* skin abscess formation. *Cellular Microbiology*, 15(6), 891-909.
- Lin, J. T., Connelly, M. B., Amolo, C., Otani, S., & Yaver, D. S. (2005). Global Transcriptional Response of *Bacillus subtilis* to Treatment with Subinhibitory Concentrations of Antibiotics That Inhibit Protein Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1915-1926.
- Liu, M., Novotny, G. W., & Douthwaite, S. (2004). Methylation of 23S rRNA nucleotide G745 is a secondary function of the RlmAI methyltransferase. *RNA*, 10(11), 1713-1720.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408.
- Locke, J. B., Hilgers, M., & Shaw, K. J. (2009). Novel Ribosomal Mutations in *Staphylococcus aureus* Strains Identified through Selection with the Oxazolidinones Linezolid and Torezolid (TR-700). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5265-5274.
- López, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R., & Kolter, R. (2009). Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1), 280-285.
- López-Collazo, E., Jurado, T., de Dios Caballero, J., Pérez-Vázquez, M., Vindel, A., Hernández-Jiménez, E., Tamames, J., Cubillos-Zapata, C., Manrique, M., Tobes, R., Máiz, L., Cantón, R., Baquero, F., & del Campo, R. (2015). In vivo attenuation and genetic evolution of a ST247-SCCmecI MRSA clone after 13 years of pathogenic bronchopulmonary colonization in a patient with cystic fibrosis: Implications of the innate immune response. *Mucosal Immunology*, 8(2), 362-371.
- López-Hernández, I., Delgado Valverde, M., Batista Díaz, N., & Pascual, A. (2015). First report of linezolid dependence in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(7), 650.e1-650.e4.
- Loss, G., Simões, P. M., Valour, F., Cortês, M. F., Gonzaga, L., Bergot, M., Trouillet-Assant, S., Josse, J., Diot, A., Ricci, E., Vasconcelos, A. T., & Laurent, F. (2019). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint

Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 0.

Lovett, P. S. (1996). Translation attenuation regulation of chloramphenicol resistance in bacteria—A review. *Gene*, 179(1), 157-162.

Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265-1273.

Luyt, C.-E., Bréchet, N., Trouillet, J.-L., & Chastre, J. (2014). Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Critical Care*, 18(5), 480.

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.

Matsumoto, T., Hashimoto, M., Teng, C.-H., Hsu, P.-C., Ota, Y., Takamizawa, M., Kato, R., & Negishi, T. (2020). Molecular characterization of a carbon dioxide-dependent *Escherichia coli* small-colony variant isolated from blood cultures. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(5), 151431.

Mayford, M., & Weisblum, B. (1990). The *ermC* leader peptide: Amino acid alterations leading to differential efficiency of induction by macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3772-3779.

McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 6.2.10.

McNamara, P. J., & Proctor, R. A. (2000). *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(2), 117-122.

Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., &

Yusupov, M. (2012). One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 560-567.

MIC Test Strip. (s. f.). Liofilchem. Recuperado 16 de febrero de 2022, de <https://www.liofilchem.com/featured-products/mic-test-strip.html>

Miller, C. P., & Bohnhoff, M. (1947). Development of Streptomycin-Resistant Variants of Meningococcus. *Science, New Series*, 105(2737), 620-621.

Monier, J.-M., Demanèche, S., Delmont, T. O., Mathieu, A., Vogel, T. M., & Simonet, P. (2011). Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 229-235.

Monk, I. R., Tree, J. J., Howden, B. P., Stinear, T. P., & Foster, T. J. (2015). Complete Bypass of Restriction Systems for Major *Staphylococcus aureus* Lineages. *mBio*, 6(3), e00308-15.

Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 30(4), 619-635.

Müller, I. B., Bergmann, B., Groves, M. R., Couto, I., Amaral, L., Begley, T. P., Walter, R. D., & Wrenger, C. (2009). The Vitamin B1 Metabolism of *Staphylococcus aureus* Is Controlled at Enzymatic and Transcriptional Levels. *PLOS ONE*, 4(11), e7656.

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.

Navarra, C., Caufin, S., Monti, D., Danieli, B., & Riva, S. (2010). Laccase-Catalyzed Oxidation of Phenolic Derivatives. *Journal of Biotechnology*, 150, 410-410.

Nebraska Transposon Mutant Library | CSR | University of Nebraska Medical Center. (s.f.). University of Nebraska Medical Center. Recuperado 22 de febrero de 2022, de <https://www.unmc.edu/pathology/csr/research/library.html>

Nguyen, H. A., Denis, O., Vergison, A., Theunis, A., Tulkens, P. M., Struelens, M. J., & Van Bambeke, F. (2009). Intracellular Activity of Antibiotics in a Model of Human THP-1 Macrophages Infected by a *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variant Strain Isolated from a Cystic Fibrosis Patient: Pharmacodynamic Evaluation and Comparison with Isogenic Normal-Phenotype and Revertant Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1434-1442.

Norström, T., Lannergård, J., & Hughes, D. (2007). Genetic and Phenotypic Identification of Fusidic Acid-Resistant Mutants with the Small-Colony-Variant Phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4438-4446.

O'Connor, M., Lee, W.-C. M., Mankad, A., Squires, C., & Dahlberg, A. (2001). Mutagenesis of the peptidyltransferase center of 23S rRNA: The invariant U2449 is dispensable. *Nucleic acids research*, 29, 710-715.

Ogston, A. (1882). Micrococcus Poisoning. *Journal of Anatomy and Physiology*, 17(Pt 1), 24-58.

Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., Ambroa, A., López, M., Bou, G., Cantón, R., Garcia-Contreras, R., Wood, T. K., & Tomás, M. (2020). (p)ppGpp and Its Role in Bacterial Persistence: New Challenges. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Paine, T. F., & Finland, M. (1948). Streptomycin-sensitive, -dependent, and -resistant Bacteria. *Science*, 107(2771), 143-144.

Panchal, V., & Brenk, R. (2021). Riboswitches as Drug Targets for Antibiotics. *Antibiotics*, 10(1), 45.

Penewit K., & Salipante S.J. (2020) Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Conditional Recombineering and CRISPR/Cas9-Mediated Counterselection. In: Li S., Chang L., Teissie J. (eds) Electroporation

Protocols. *Methods in Molecular Biology*, vol 2050. Humana, New York, NY.

Périchon, B., & Courvalin, P. (2009). VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4580-4587.

Petinaki, E., & Papagiannitsis, C. (2018). Resistance of Staphylococci to Macrolides-Lincosamides-Streptogramins B (MLSB): Epidemiology and Mechanisms of Resistance. En *Staphylococcus Aureus*. IntechOpen.

Piddock, L. J. V. (2012). The crisis of no new antibiotics—What is the way forward? *The Lancet. Infectious Diseases*, 12(3), 249-253.

Pillai, S. K., Sakoulas, G., Wennersten, C., Eliopoulos, G. M., Moellering, Jr., R. C., Ferraro, M. J., & Gold, H. S. (2002). Linezolid Resistance in *Staphylococcus aureus*: Characterization and Stability of Resistant Phenotype. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(11), 1603-1607.

Pinto, A., & Merlino, J. (2011). CO₂-dependent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), 676-677.

Poehlsgaard, J., & Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 870-881.

Pournaras, S., Ntokou, E., Zarkotou, O., Ranellou, K., Themeli-Digalaki, K., Stathopoulos, C., & Tsakris, A. (2013). Linezolid Dependence in *Staphylococcus epidermidis* Bloodstream Isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 129-132.

Proctor, R. A. (2008). Role of Folate Antagonists in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46(4), 584-593.

Proctor, R. A., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., & Peters, G. (2014). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): A road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 99.

Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., &

- Peters, G. (2006). Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, 4(4), 295-305.
- Prunier, A.-L., Malbruny, B., Tandé, D., Picard, B., & Leclercq, R. (2002). Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* with Ribosomal Mutations Conferring Resistance to Macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 3054-3056.
- Ramakrishnan, V., & Moore, P. B. (2001). Atomic structures at last: The ribosome in 2000. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(2), 144-154.
- Rammelkamp, C. H., & Maxon, T. (1942). Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 51(3), 386-389.
- Rhee, H.-W., Lee, C.-R., Cho, S.-H., Song, M.-R., Cashel, M., Choy, H. E., Seok, Y.-J., & Hong, J.-I. (2008). Selective fluorescent chemosensor for the bacterial alarmone (p)ppGpp. *Journal of the American Chemical Society*, 130(3), 784-785.
- Robinson, J. T. (2011). Integrative genomics viewer. *Correspondence*, 29(1), 3.
- Rocchetti, T. T., Martins, K. B., Martins, P. Y. F., Oliveira, R. A. de, Mondelli, A. L., Fortaleza, C. M. C. B., & Cunha, M. de L. R. de S. da. (2018). Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 22(2), 99-105.
- Rodríguez Carranza, R. (2015). Clindamicina: Antimicrobianos. En *Vademécum Académico de Medicamentos* (Vol. 1-Book, Section). McGraw-Hill Education.
- Rodnina, M. V. (2018). Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9), a032664.
- Roggenkamp, A., Hoffmann, H., & Hornef, M. W. (2004). Growth Control of Small-Colony Variants by Genetic Regulation of the Hemin Uptake System. *Infection and Immunity*, 72(4), 2254-2262.
- Ruhen, R. W. (1976). Tetracycline Dependence in A Strain of *Staphylococcus Epidermidis*. *Pathology*, 8(2), 105-108.
- Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020* (Eleventh ESVAC report; Número Eleventh ESVAC report, p. 130). (2021). European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption.
- Sapienza, P. J., Falk, B. T., & Lee, A. L. (2015). Bacterial Thymidylate Synthase Binds Two Molecules of Substrate and Cofactor without Cooperativity. *Journal of the American Chemical Society*, 137(45), 14260-14263.
- Schiøtt, C. R., & Stenderup, A. (1953). Terramycin-, Aureomycin- and Chloromycetin-Dependent Bacteria isolated from patients. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 34(4), 410-416.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., & Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413(6858), 814-821.
- Schmitz, F.-J., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Köhrer, K., Verhoef, J., & Fluit, A. C. (2000). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 891-894.
- Schneider, Y. K. (2021). Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. *Antibiotics*, 10(7), 842.
- Schober, A. F., Mathis, A. D., Ingle, C., Park, J. O., Chen, L., Rabinowitz, J. D., Junier, I., Rivoire, O., & Reynolds, K. A. (2019). A Two-Enzyme Adaptive Unit within Bacterial Folate Metabolism. *Cell Reports*, 27(11), 3359-3370.e7.

- Serganov, A., & Nudler, E. (2013). A Decade of Riboswitches. *Cell*, 152(1), 17-24.
- Shanson, D. C. (1981). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 2, 11-36.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., & Römling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, 53(4), 1123-1134.
- Simpson, L. J., Tzima, E., & Reader, J. S. (2020). Mechanical Forces and Their Effect on the Ribosome and Protein Translation Machinery. *Cells*, 9(3), 650.
- Skinner, D., & Keefer, C. S. (1941). Significance of bacteremia caused by *staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Archives of Internal Medicine*, 68(5), 851-875.
- Souza, D. C., Cogo, L. L., Palmeiro, J. K., Dalla-Costa, L. M., Oliveira Tomaz, A. P., Riedi, C. A., & Rosario Filho, N. A. (2020). Thymidine-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant bacteremia in a patient with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 55(6), 1388-1393.
- Spedding, G. (1990). *Ribosomes and protein synthesis: A practical approach*. Oxford University Press.
- Spížek, J., & Řezanka, T. (2004). Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 455-464.
- Steinchen, W., Zegarra, V., & Bange, G. (2020). (p)ppGpp: Magic Modulators of Bacterial Physiology and Metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2072.
- Stick Model Image of Optimized Clindamycin Structure. (s. f.)*. Mol-Instincts. Recuperado 17 de enero de 2022, de <https://www.molinstincts.com/image/clindamycin-img-CT1002182453.html>
- Suwanarat, N., Rubin, M., Bryan, L., Tekle, T., Boyle, M. P., Carroll, K. C., & Jennings, M. T. (2018). Frequency of small-colony variants and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(4), 296-299.
- Svetlov, M. S., Syroegin, E. A., Aleksandrova, E. V., Atkinson, G. C., Gregory, S. T., Mankin, A. S., & Polikanov, Y. S. (2021). Structure of Erm-modified 70S ribosome reveals the mechanism of macrolide resistance. *Nature Chemical Biology*, 17(4), 412-420.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., & Koonin, E. V. (2000). The COG database: A tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 33-36.
- Thomas, M. E. M., & Cowlard, J. H. (1955). Studies on a CO₂-dependent *Staphylococcus*. *Journal of Clinical Pathology*, 8(4), 288-291.
- Torres, C., & Cercenado, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(8), 541-553.
- Tuchscher, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., Peters, G., Becker, K., & Löffler, B. (2010). *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(7), 1031-1040.
- Tuchscher, L., Medina, E., Hussain, M., Völker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R. A., Becker, K., Peters, G., & Löffler, B. (2011). *Staphylococcus aureus* phenotype switching: An effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine*, 3(3), 129-141.
- Ueta, M., Wada, C., & Wada, A. (2010). Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF. *Genes to Cells*, 15(1), 43-58.
- Vaughn, V. M., Hersh, A. L., & Spivak, E. S. (2021). Antibiotic Overuse and Stewardship at Hospital Discharge: The Reducing Overuse of Antibiotics at Discharge Home Framework. *Clinical Infectious Diseases*, ciab842.

- Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S. (2018). How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(9), 668-684.
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- Vester, B., & Douthwaite, S. (2001). Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 1-12.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., & D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*: Iron starvation and ppGpp synthesis. *Molecular Microbiology*, 56(4), 958-970.
- Viswanathan, V. (2014). Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*, 5(1), 3-4.
- von Eiff, C., Peters, G., & Becker, K. (2006). The small colony variant (SCV) concept—The role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*, 37 Suppl 2, S26-33.
- Voorhees, R. M., & Ramakrishnan, V. (2013). Structural basis of the translational elongation cycle. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 203-236.
- Wahba, A. J., & Friedkin, M. (1962). The Enzymatic Synthesis of Thymidylate. *Journal of Biological Chemistry*, 237(12), 3794-3801.
- Waksman, S. A. (1947). What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*, 39(5), 565-569.
- Washington, J. A., & Wilson, W. R. (1985). Erythromycin: A Microbial and Clinical Perspective After 30 Years of Clinical Use (Second of Two Parts). *Mayo Clinic Proceedings*, 60(4), 271-278.
- Watkins, R. R., David, M. Z., & Salata, R. A. (2012). Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 9), 1179-1193.
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 577-585.
- Wilson, D. N. (2009). The A–Z of bacterial translation inhibitors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(6), 393-433.
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35-48.
- Winkler, W., Nahvi, A., & Breaker, R. R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910), 952-956.
- Winstanley, T. G., & Spencer, R. C. (1987). Antibiotic dependence in a strain of *Neisseria pharyngis*. *The Journal of hospital infection*, 10(1), 87-90.
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451-1470.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5980-5990.
- Xiong, W., Wang, Y., Sun, Y., Ma, L., Zeng, Q., Jiang, X., Li, A., Zeng, Z., & Zhang, T. (2018). Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*, 6(1), 34.
- Yeh, P., Tschumi, A. I., & Kishony, R. (2006). Functional classification of drugs by properties of their pairwise interactions. *Nature Genetics*, 38(4), 489-494.
- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, 285, 117402.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Código letra	Categoría funcional
C	Producción y conversión de energía
D	División celular y fraccionamiento cromosómico
E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
F	Transporte y metabolismo de nucleótidos
G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
H	Metabolismo de las coenzimas
I	Metabolismo de lípidos
J	Traducción, incluyendo biogénesis del ribosoma
K	Transcripción
L	Replicación, recombinación y reparación
M	Biogénesis y estructura de la pared celular y membrana externa
N	Secreción, movilidad y quimiotaxis
O	Chaperonas moleculares y funciones relacionadas
P	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos
R	Predicción de función general
S	Sin predicción funcional

Tabla 1S. Clasificación funcional basaba en COGs (*Database of Clusters of Orthologous Genes*) (Tatusov *et al.*, 2000).

Porcentaje de SNPs pertenecientes a cada grupo funcional COGs

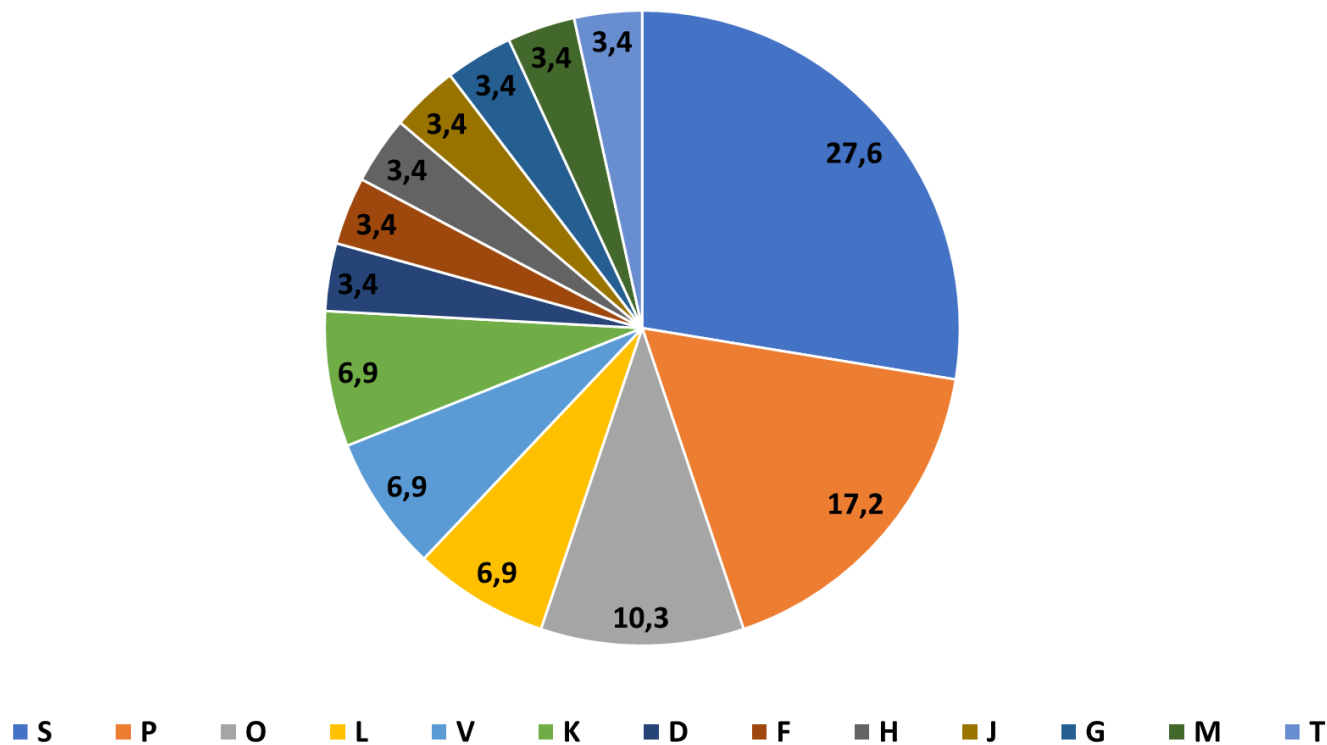


Figura 1S. Porcentaje de SNPs encontrados entre FQ-96 y FQ-97 perteneciente a cada grupo funcional.

Gen	Producto	Péptido dominio RLR/K
<i>sodM</i>	Superóxido dismutasa [Mn/Fe]	MLYFRKLRLRRKGNFLLKNGSCL
<i>manR</i>	Regulador transcripcional ManR	MYVKNASKKHKTQKYMQKFQLLYFKRLKSQKI
	Proteína hipotética	MERLRNSLNLNFNFKNKS
<i>nuoL</i>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad L	MCMGARLKRRTLQQGISTYRDAVSS
<i>treP</i>	Componente EIIBC específico del sistema PTS trehalosa	MINIVFRRNTQVRLKGSVLKTDGRGLTARGGSPSSSAINIYIKFYI
<i>ftsH</i>	Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP, FtsH	MRLRNNSVDSKI
<i>galK</i>	Galactoquinasa	MFYVLNRLRIGYI
<i>ywiB</i>	Proteína hipotética barril beta, YwiB	MLRLR
	Proteína hipotética	MLIFKKRLKICLI
<i>suhB</i>	Inositol-1-monofosfatasa	MFYQLRLKTLSLKLVFSFLS
<i>rsgA</i>	GTPasa de biogénesis de la subunidad pequeña del ribosoma, RsgA	MLRLR
	Proteína hipotética	MFIKIKVNMKMTNRLRNAIHFV
<i>acnA</i>	Aconitato hidratasa	MTLKKILKFGAIIFFLLNEIIRLKIELNHSRN
<i>yhhQ</i>	Transportador del precursor de queuosina	MMRLRFPL
	Proteína hipotética	MNTYCNQCPKTRLRKLEGKTKAHHFCINECSIGKEIKQLGNELO
	GTP ciclohidrolasa de tipo 2	MNKRLFIFRLRFNLSEVGTLLNNVQPLFS
<i>entA</i>	Enterotoxina tipo A	MSVIHNQNCRLKGVGQK
	Proteína hipotética	MRLKECGLILGIDLLDHIIGDNRFTSLVEAGYFDEND
<i>acuA</i>	Proteína de utilización de la acetoina, AcuA	MNLIQSRRLRS
	Proteína hipotética	MVKLLRKHKALLRLKQQLVI
<i>cls</i>	Cardiolipina sintetasa	MIQLIRYTTRLRFSGMGGF
<i>fbA</i>	Fructosa-bifosfato aldolasa	MQRLKLYKNVYVCI
	Proteína hipotética	MRLKSQ
<i>hylB</i>	Liasa de hialuronato	MFGRLK
<i>map_5</i>	Proteína map	MQKVCFKLYETCYTNSVISYNPKRRLR
	Proteína hipotética	MILIRLR
<i>moaA</i>	GTP 3',8-ciclasa	MQRLKLPFQHRFCQL
	EIICB	MRLKRMYYKYNDVIYKVVKKFSLEYEKII
<i>malP</i>	Componente de sistema específico de maltosa PTS	MRLKCKLINYKSLHLE
	Proteína hipotética	MAIRLK
<i>yhdG</i>	Permeasa putativa de aminoácidos, YhdG	MRLKVLHFHFAAIFISFMLL
<i>fda</i>	Fructosa-bifosfato aldolasa de clase I	MYCITKRYEIFDFLYVNIITCKRLKIVYTLNEFKDKRRK
<i>arcA</i>	Arginina desaminasa	

Tabla 2S. Lista de genes susceptible de riboregulación por eritromicina y clindamicina por poseer en sus regiones 5' UTR dominios de reconocimiento RL(R/K).