

15. Biofísica

Estudio de la sobre-expresión y topología de BlaR1 y MecR1 de *Staphylococcus aureus*

Mihovilcevic, Damila; Llarrull, Leticia

damilamihovilcevic@hotmail.com; llarrull@ibr-conicet.gov.ar

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Resumen

Las proteínas de membrana sensoras/transductoras BlaR1 y MecR1, están involucradas en la inducción de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). La función de estas proteínas está relacionada con la detección del antibiótico presente en el medio y la transmisión de una señal hacia el interior celular desencadenando la manifestación de resistencia. El diseño de inhibidores que permitan bloquear la activación de MecR1 y BlaR1, permitiendo revertir el fenotipo resistente, se ha visto dificultado principalmente por la imposibilidad de sobre-expresar y purificar a estas proteínas para un posterior estudio estructural que permita elucidar el mecanismo de la transducción de señal.

Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluó la sobre-expresión de diferentes versiones de BlaR1 y MecR1. Se logró sobre-expresar la proteína BlaR1JH1, una versión trunca de la proteína BlaR1, presente en la cepa de *S. aureus* JH1 resistente a β -lactámicos, como fusión a la proteína Mystic. Se verificó su localización en membrana y se puso a punto la solubilización y purificación de la misma. Además, pudo demostrarse la localización extracelular del dominio sensor en esferoplastos de *E. coli* BL21Star™ (DE3). Podríamos decir, que se ha logrado por primera vez en diez años de trabajo, sobre-expresar en membrana una de las versiones más largas reportadas de la proteína BlaR1 y demostrar que posee un dominio sensor funcional. También, se ha logrado sobre-expresar el dominio gluzincina de la metaloproteasa MecR1 (aminoácidos R147-Y304). Este dominio contiene el sitio activo de la misma y se probó que se localiza en membrana al ser expresado en *E. coli*. Además el mismo pudo ser solubilizado y purificado.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, antibióticos β -lactámicos, proteínas sensoras/transductoras, topología.

Introducción

Staphylococcus aureus es la principal causa de infecciones intra- y extra-hospitalarias en el mundo¹. En la actualidad existe gran preocupación por la creciente prevalencia de infecciones causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a la acción de los antibióticos β -lactámicos (*S. aureus* meticilino-resistente; SAMR)². *S. aureus* posee dos mecanismos primarios de resistencia: la expresión de la β -lactamasa (PC1), expresada a partir de la inducción del operón *bla*, capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico, inactivándolo, y la adquisición del gen que codifica para una PBP (PBP2a), expresada a partir de la inducción del operón *mec*, que presenta menor afinidad por estos compuestos y que por lo tanto, no es inhibida por concentraciones clínicas de los mismos³. Ambos operones están compuestos por tres genes. El operón *bla* está constituido por el gen *blaZ*, que codifica para la β -lactamasa PC1, y los genes *blaR1* y *blaI* que codifican para las proteínas reguladoras BlaR1 y Blal, respectivamente. El operón *mec* está compuesto por el gen *mecA*, que codifica para PBP2a, y los genes *mecR1* y *mecI* que codifican para las proteínas reguladoras MecR1 y Mecl, respectivamente (Figura 1⁴). Las proteínas Blal y Mecl son proteínas de unión a ADN que reprimen la transcripción de los genes de los operones mediante unión a las regiones operadoras⁵. BlaR1 y

MecR1 son proteínas de membrana, se ha propuesto que presentan un dominio extracelular sensor que detecta al antibiótico β -lactámico presente en el medio⁶. Estas proteínas transmitirían una señal al citoplasma que resultaría en la transcripción de los genes de resistencia.

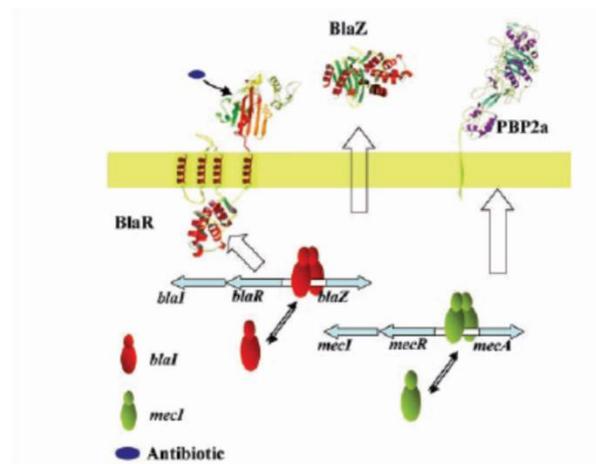


Figura 1 Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos de MRSA

Por lo tanto, La expresión de los determinantes de resistencia a β -lactámicos en SAMR está regulada por las proteínas de membrana sensoras/transductoras MecR1 y BlaR1. Hasta el momento es muy poco lo que se conoce sobre los eventos intramoleculares que llevarían a la activación de estas dos proteínas. Además únicamente se encuentra reportada la estructura cristalográfica del dominio sensor de BlaR1, ya que al tratarse de proteínas de membrana su sobre-expresión, solubilización y purificación es una tarea muy laboriosa.

Objetivos

El objetivo general de este proyecto es identificar los determinantes estructurales que dan lugar a la transducción de la señal en las proteínas MecR1 y BlaR1 de *Staphylococcus aureus*, produciéndose la manifestación de resistencia. Para ello planteamos distintos objetivos particulares como: expresar, solubilizar y purificar a BlaR1 de *S. aureus* JH1 (salvaje) y a MecR1^{MP₁₄₇₋₃₀₄} (dominio gluzincina de MecR1); evaluar la localización y topología de las mismas en *E. coli*.

Materiales y Métodos

Expresión y purificación de proteínas

Para evaluar la expresión de las proteínas de interés, se partió de un cultivo de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/pET41_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1 o pET24_MecR1^{MP₁₄₇₋₃₀₄}-H6X. El cultivo se creció a 37 °C hasta una DO_{600nm} de 0,65 y se indujo con IPTG (1 mM) a 20 °C durante 16 horas. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se realizó la ruptura del cultivo por presión. Este lisado celular fue centrifugado para poder separar el pellet que contenía posibles células sin romper, fragmentos grandes de membrana o cuerpos de inclusión, del sobrenadante que fue sometido a ultracentrifugación para obtener la fracción de proteínas de membrana. Luego, se procedió a solubilizar la proteína de interés utilizando el detergente ASB-14 (2% P/V) y NaCl

320 mM durante 16 h a 4 °C con agitación suave. A continuación, se centrifugaron las muestras para poder continuar trabajando con las proteínas solubilizadas.

Para la purificación de la proteína de interés, se usó una columna de Ni-sefarosa y para favorecer la unión de las proteínas a la resina la concentración de detergente fue diluida al medio. La muestra se incubó con la resina durante 1,5 h, con agitación suave a 4 °C. La elución de la proteína de interés se realizó empleando soluciones con concentraciones crecientes de Imidazol. Al finalizar, se procedió a realizar la diálisis de las muestras que contenían la proteína de interés durante 16 h a 4 °C contra un buffer compuesto por PBS 1X suplementado con NaCl 320 mM. Todas las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

Ensayos de topología

Inicialmente se preparó una muestra de esferoplastos de *E. coli* BL21 StarTM (DE3)/pET41_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1 a partir de la cual se realizó un ensayo de susceptibilidad a Proteinasa K incubando distintas muestras a temperatura ambiente por 5 min con diferentes concentraciones de Proteinasa K (0, 100, 500, 1000 µg/mL). La reacción se frenó mediante el agregado de PMSF (5 mM).

Además se realizó un ensayo de unión al antibiótico Bocilina-FL incubando preparaciones de esferoplastos de *E. coli*

BL21 Star™ (DE3)/pET41_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1 a temperatura ambiente por 5 minutos en diferentes condiciones: en ausencia de Bocilina-FL; con Bocilina-FL en una concentración final de 10 µM, pero una de las muestras fue incubada con agitación para producir la ruptura de los esferoplastos. Todas las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE. Las proteínas unidas al antibiótico fluorescente fueron visualizadas mediante escaneo del gel sin teñir en el equipo Typhoon-FLA 7000.

Resultados y Discusión

Purificación de Mystic-BlaR1JH1

La proteína BlaR1JH1 es una versión trunca de la proteína BlaR1 presente en la cepa de *S. aureus* JH1 resistente a β-lactámicos. Durante este trabajo hemos logrado poner a punto las condiciones para la sobre-expresión de la proteína BlaR1JH1 como fusión a Mystic en *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Además se pudo verificar que la misma se localiza en membrana de *E. coli* (**Figura 2**, calle 4). También, se logró la solubilización de la proteína Mystic-BlaR1JH1 a partir de preparaciones de membrana, utilizando el detergente ASB-14 (2% P/V). Como se observa en la **Figura 2**, la solubilización de la proteína de interés fue completa ya que no se observa la banda correspondiente a esta proteína en la calle donde se sembró la muestra de proteínas no solubilizadas (NS, calle 5). Además, la proteína pudo purificarse utilizando

soluciones con concentraciones finales de Imidazol de 50 y 100 mM (E1 y E2, calles 10 y 11, respectivamente). Sin embargo, parte de la proteína fue perdida durante los primeros dos lavados, utilizando una concentración final de imidazol de 20 mM (L1 y L2, calles 8 y 9, respectivamente). Las fracciones en las cuales se obtuvo la proteína en mayor proporción fueron dializadas contra un buffer compuesto por PBS 1X suplementado con NaCl 320 mM para poder remover el Imidazol de las muestras. El rendimiento obtenido fue de 0,8 mg/L de cultivo.

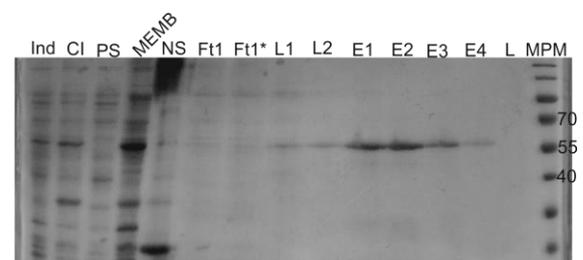


Figura 2 SDS-PAGE al 12%; tinción con Azul de Coomassie. (Ft: flow-through; L1 y L2: lavado con 20 mM imidazol; E1, 2, 3, 4: eluciones utilizando 50, 100, 250 y 500 mM de imidazol respectivamente; L: lavado final sin detergente). Mystic-BlaR1JH1: 62,9 KDa.

Estudios de topología de Mystic-BlaR1JH1

Mistic es una proteína integral de membrana inusual de *Bacillus Subtilis* que se pliega autónomamente en la membrana, sin necesidad de la maquinaria celular de translocación y puede asociarse estrechamente con la membrana bacteriana cuando se expresa de manera recombinante en *E. coli*. Está compuesta por 4 hélices transmembrana, con su extremo C-terminal extracelular.

Esto nos llevó a preguntarnos si al fusionar a Mistic la proteína BlaR1JH1, compuesta por el dominio citoplasmático, una hélice transmembrana y el dominio sensor, quedaría orientada de forma correcta o no en la membrana. Con el fin de evaluar si la fusión de la proteína Mistic a la proteína BlaR1JH1 modifica su orientación en la membrana bacteriana, se procedió a realizar un ensayo de susceptibilidad a Proteinasa K. La Proteinasa K es una serin-proteasa de amplio espectro, cuyo sitio predominante de escisión es el enlace peptídico adyacente al grupo carboxilo de aminoácidos alifáticos y aromáticos con grupos alfa-amino bloqueados. Al tratar esferoplastos de células *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformadas con el plásmido pET41a(+)_H6X-mistic-TEV-blaR1JH1 que expresan la proteína de interés en membrana con Proteinasa K, si se emplea para la detección el anticuerpo primario específico para el dominio sensor de BlaR1 y el mismo posee localización extracelular, la intensidad de la banda correspondiente a Mistic-BlaR1JH1 debería disminuir gradualmente a medida que se aumenta la concentración de proteasa.

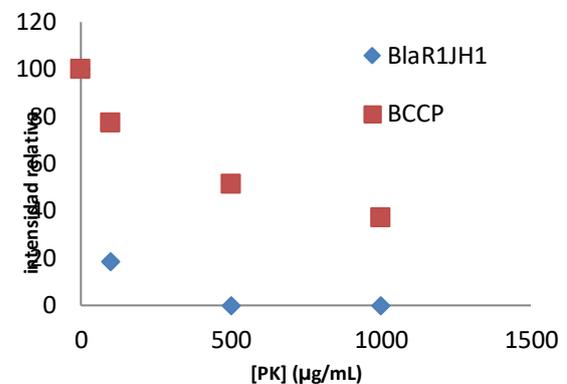
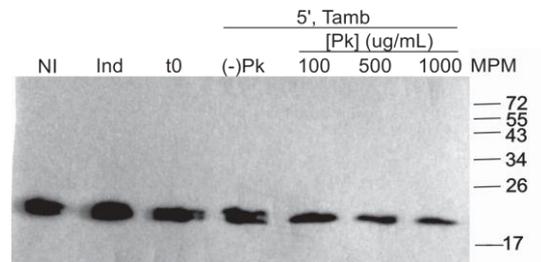
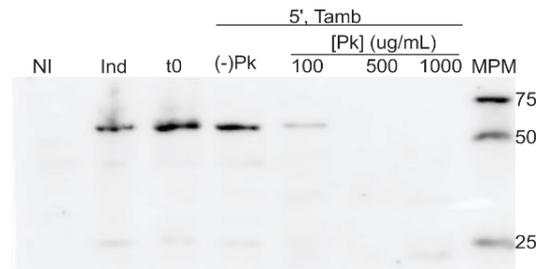


Figura 3 Determinación de la orientación del dominio sensor de la proteína BlaR1JH1 mediante ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K utilizando esferoplastos. A. Western Blot utilizando como anticuerpo primario Anti-BlaR^s y anticuerpo secundario Goat-anti-rabbit-Cy3. Mistic-BlaR1JH1: 62,9 KDa. **B.** Western Blot utilizando Streptactin-HRP. BCCP: 22 KDa. **C.** Cuantificación de los Western Blot anteriores utilizando el programa ImageJ

Como se observa en la **Figura 3**, a concentraciones crecientes de Proteinasa K disminuye la intensidad de banda correspondiente a Mistic-BlaR1JH1 (**Figura 3 A**). Dado que BCCP es una proteína de localización citoplasmática, se empleó como control de integridad de esferoplastos (**Figura 3 B**). Las bandas correspondientes a Mistic-BlaR1JH1 y

BCCP en los esferoplastos incubados a temperatura ambiente por 5 minutos, se cuantificaron utilizando el programa ImageJ (**Figura 3 C**). Para cada proteína se estableció como 100% la intensidad de la banda de los esferoplastos incubados 5 minutos a temperatura ambiente sin Proteinasa K, y como puede observarse en la **Figura 3 C**, las intensidades de las bandas correspondientes a Mistic-BlaR1JH1 disminuyen hasta un 0 % cuando aumenta la concentración de Proteinasa K, mientras que la intensidad de la banda correspondiente a BCCP disminuye hasta un 40-60 %. Si bien la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a BCCP muestra que algunos de los esferoplastos no se mantuvieron intactos durante el tiempo de incubación, la desaparición más rápida y completa (a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Proteinasa K) de Mistic-BlaR1JH1 indica que el dominio sensor se encuentra expuesto en esferoplastos, confirmando la correcta orientación de la proteína, es decir, con el dominio sensor ubicado del lado extracelular en esferoplastos de *E. coli*.

Además se realizaron ensayos de unión al antibiótico fluorescente Bocilina-FL en esferoplastos de *E. coli*. Este antibiótico, es capaz de unirse al dominio sensor de BlaR1JH1 (BlaR^S) si el mismo se encuentra correctamente plegado y expuesto al espacio extracelular, ya que se cree que no es capaz de difundir dentro de la membrana celular.

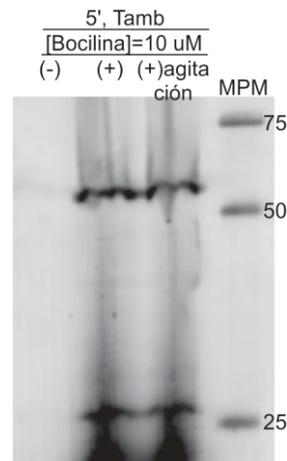


Figura 4 Unión al antibiótico Bocilina-FL utilizando esferoplastos de *E. coli* BL21 Star™ (DE3). SDS-PAGE al 12%, revelado en el equipo Typhoon FLA 7000. ((-) sin Bocilina-FL (+) con Bocilina-FL; ((+)agitación) con bocilina y agitación).

Como se observa en la **Figura 4** pudimos determinar que al agregar el antibiótico Bocilina-FL a la preparación de esferoplastos, el mismo se une al dominio sensor de la proteína Mistic-BlaR1JH1, lo cual nos indicó que este dominio se encuentra correctamente plegado y expuesto al espacio extracelular, en concordancia con la función que cumple en la estructura de la proteína BlaR1. Los resultados obtenidos por este ensayo fueron complementarios a los ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K.

Purificación de MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄

La proteína MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄ corresponde al dominio gluzincina de la metaloproteasa MecR1. Este dominio contiene el sitio activo de la misma. Durante el desarrollo de este trabajo, se han logrado poner a punto las condiciones para la sobre-expresión de la proteína MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄ en *E. coli* BL21 Star™

(DE3) y además se ha probado que la misma se localiza en membrana de *E. coli* (**Figura 5**, calle 4). Además, como se observa en la **Figura 5** la proteína MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄ obtenida a partir de preparaciones de membrana y solubilizada utilizando el detergente ASB-14 (2% P/V) pudo purificarse utilizando soluciones de elución con concentraciones finales de Imidazol de 250 y 500 mM (E3 y E4, calles 5 y 6, respectivamente). Estas fracciones fueron dializadas contra un buffer compuesto por PBS 1X suplementado con NaCl 320 mM para poder remover el Imidazol de las muestras (E3 y E4, calles 7 y 8, respectivamente). El rendimiento obtenido fue de 10 mg/L de cultivo.

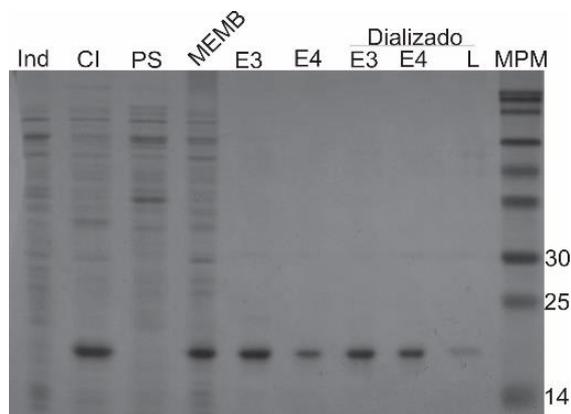


Figura 6 SDS-PAGE al 12%. (E3, 4: eluciones utilizando 250 y 500 mM de imidazol respectivamente; L: lavado final sin detergente). MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄: 19,8 KDa.

Además, a partir de las fracciones de proteínas dializadas, se decidió realizar un espectro de dicroísmo circular de la proteína MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄ para poder

determinar el contenido de estructura secundaria.

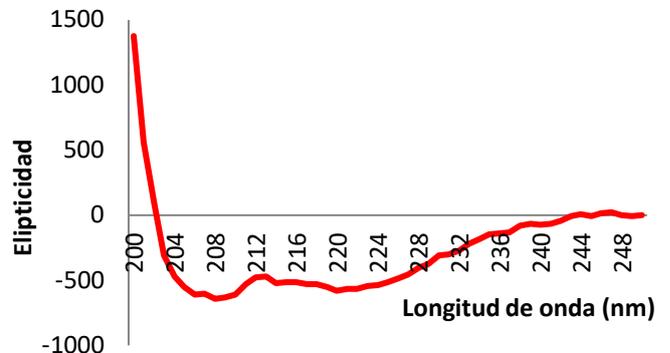


Figura 5 Espectro de dicroísmo circular de la proteína MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄.

A partir del espectro obtenido (**Figura 6**) y utilizando el método Neural Network, pudo determinarse que el contenido de estructura secundaria es: 5 % de alfa hélice, 48 % de lámina beta y 48 % de random coil.

Conclusiones

Se logró la sobreexpresión de las proteínas Mystic-BlaR1JH1 (versión trunca de BlaR1) y MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄ (dominio gluzincina de la metaloproteasa MecR1) en membrana de *E. coli* BL21 StarTM (DE3), su solubilización utilizando el detergente ASB14 (2% P/V) y posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

Empleando ensayos de susceptibilidad a Proteinasa K se pudo determinar que la fusión a la proteína Mystic no modifica la orientación de la proteína BlaR1JH1 en la membrana, ya que su dominio sensor se ubica en el espacio extracelular al igual que lo

planteado en el modelo molecular de esta proteína. Mediante ensayos con el antibiótico fluorescente Bocilina-FL demostramos que el dominio sensor de BlaR1JH1 en esta fusión es funcional.

Utilizando la técnica de dicroísmo circular pudo estimarse el contenido de estructura secundaria de la proteína MecR1^{MP}₁₄₇₋₃₀₄ siendo los mismos 5 % de alfa hélice, 48 % de lámina beta y 48 % de random coil. Sin embargo, nuestra proyección a futuro es realizar nuevos ajustes utilizando una menor concentración de detergente que podría llegar a estar afectando las mediciones.

Estos resultados amplían enormemente el panorama de técnicas que podremos explorar en el futuro para caracterizar estructural y funcionalmente a estas proteínas sensoras, blancos claves para el diseño de nuevos compuestos que puedan dar una alternativa al tratamiento de infecciones causadas por MRSA.

Bibliografía

1. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009. doi:10.1086/595011
2. Chambers HF. Pathogenesis of Staphylococcal Infection: A Manner of Expression. *J Infect Dis*. 2009;199(3):291-293. doi:10.1086/595983
3. Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(22):2617-2633. doi:10.1007/s00018-005-5148-6
4. Golemi-Kotra D, Cha JY, Meroueh SO, Vakulenko SB, Mobashery S. Resistance to ??-lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2003;278(20):18419-18425. doi:10.1074/jbc.M300611200
5. Clarke SR, Dyke KG. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus* beta-lactamase operon are inducible. *Microbiology*. 2001;147(May):803-810. doi:10.1099/00221287-147-4-803
6. Cha J, Vakulenko SB, Mobashery S. Characterization of the β -Lactam Antibiotic Sensor Domain of the MecR1 Signal Sensor/Transducer Protein from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*. 2007;46(26):7822-7831. doi:10.1021/bi7005459

Financiamiento

PICT-2015-2521 (ANPCyT); Damila Mihovilcevic es becaria doctoral de

CONICET; Leticia, I. Larrull es investigadora de CONICET.

Agradecimientos

ANPCyT, UNR (Beca CIN 2017),
CONICET (beca doctoral 2018)