

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



**Las islas de patogenicidad dirigen la
evolución de los fagos de *Staphylococcus
aureus***

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Belén Frígols Garrido

Dirigida por: Dr. José R. Penadés Casanova

VALENCIA

2014

Índice



ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Virus satélites	1
Bacteriófagos	4
Estudios evolutivos	7
Mecanismos de resistencia bacteriana a la infección fágica	9
Islas de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	16

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

Objetivos	23
------------------------	----

CAPÍTULO III: RESULTADOS

I. Las islas de patogenicidad dirigen la evolución de los fagos en bacterias Gram-positivas	25
Los inductores fágicos de las SaPIs están bajo selección purificadora	27
La interacción del fago 80 α con diferentes SaPIs selecciona fagos mutantes en los inductores.....	33
Los fagos mutantes evolucionados no inducen el ciclo de las SaPIs.....	39
Las variantes alélicas evolucionadas <i>in vitro</i> pierden su pluriactividad.....	43
Las variantes alélicas de los inductores presentan diferente capacidad para inducir el ciclo de las islas.....	45
Las SaPIs dirigen la evolución de los fagos <i>in vivo</i>	50
La isla EfsCIV583 dirige la evolución de los fagos de <i>Enterococcus faecalis</i>	55
II. Nuevos mecanismos moleculares por los que los fagos de <i>S. aureus</i> evitan la inducción de las SaPIs	59
Cambios en la zona de unión al ribosoma del ARNm.....	61
Cambios transcripcionales o post-transcripcionales.....	67

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Carrera armamentística entre fagos y otras criaturas subcelulares.....	73
Coevolución competitiva fago auxiliar-fago satélite.....	74
Hipótesis: Proteínas multifuncionales y "mimetismo molecular".....	77
Bacteriófagos satélites-virus satélites.....	79

CAPÍTULO V: MATERIAL Y MÉTODOS

Metodología general.....	81
Bacterias, plásmidos y medios utilizados en estos estudios	81
Manipulaciones del ADN.....	81
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	82
Secuenciación del ADN.....	82
Clonación de fragmentos obtenidos por PCR.....	82
Ligación.....	82
Análisis computacional.....	83
Ensayos enzimáticos.....	83
Ensayo de la actividad enzimática de la dUTPasa en <i>E.coli</i>	83
Metodología utilizada en los estudios de inducción de SaPIs y fagos	84
Inducción de profagos.....	84
Titulación de fagos	85
Resuspensión de calvas.....	85
Cepas lisogénicas a partir de calvas.....	85
Transducción.....	86
Precipitación de fagos con PEG y extracción del ADN de las cápsides de fagos.....	86
Extracción del DNA para el estudio de replicación de fagos y SaPIs	87
Southern blot.....	88
Metodología utilizada para obtener los distintos mutantes.....	88

Obtención de mutantes por delección	88
Obtención de mutantes por inserción del 3xflag.....	91
Metodología para la clonación de fragmentos con 3xflag en plásmidos de expresión.....	91
Métodos bioquímicos.....	93
SDS-PAGE, Western blot y tinción coomassie.....	93
Tabla de cepas utilizadas en estos estudios	94
Tabla de plásmidos utilizados en estos estudios	101
Tabla de cebadores utilizados en estos estudios	104
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	
Conclusiones	113
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía	115