

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



Las Duts fágicas controlan la transferencia de genes de virulencia mediante un mecanismo similar al de las proteínas G proto-oncogénicas.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

María García Caballer

Dirigida por:

Dr. José R. Penadés Casanova

Dra. M^a Ángeles Tormo Mas

VALENCIA

2015

Índice



Índice

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Elementos genéticos móviles	21
Elementos genéticos móviles en <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Islas de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	23
Movilización de SaPIs; replicación, encapsidación y transferencia	24
Las proteínas dUTPasas	
Las proteínas Dut “pluriempleadas”	29
Tipos de dUTPasas según su estructura	30
La Duts fágicas controlan la transferencia de las SaPIs	32

CAPÍTULO II: OBJETIVOS 39

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Las Duts fágicas son moléculas señalizadoras con un mecanismo molecular similar al de las proteínas G proto-oncogénicas

Las Duts fágicas tienen dos conformaciones que difieren en su capacidad de inducción de las SaPIs	45
La Dut del fago 80 α unida al dUTP induce el ciclo de las SaPIs	47
La ordenación del motivo V en la Dut influye en la interacción Dut-Stl	53
La actividad dUTPasa ordena y estabiliza el motivo V, pero no es necesaria para la inducción de SaPI _{bov1}	59
Las proteínas Dut mutantes difieren en su afinidad hacia el represor Stl de las SaPIs	61
El mecanismo de encendido/apagado previene la replicación incontrolada de las SaPIs	62

Evolución de las Duts fágicas

El motivo VI de las Duts fágicas presenta una zona de conformación característica implicada en la inducción de las SaPIs	67
¿Por qué las Duts tienen diferentes secuencias en la zona de conformación idéntica del motivo VI?	73
El dominio VI está optimizado en cada Dut para disminuir su afinidad por el represor StI	75

Función señalizadora de las Duts diméricas

Las Duts diméricas son proteínas señalizadoras.....	87
Interacción proteína-proteína en las Duts diméricas.....	89
Implicación de la zona central divergente de las Duts diméricas en la inducción de las SaPIs	90
La unión al dUTP es necesaria para la inducción de las SaPIs en las Duts diméricas	95
Función señalizadora en Duts diméricas no fágicas.....	96

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Las Duts tienen función señalizadora.....	101
Las Duts víricas controlan el sistema inmune	101
Dut señalizadoras en células procariotas	103
Función señalizadora de la proteína Dut en células eucariotas.....	104
Función señalizadora de las Duts diméricas	106
Un mecanismo similar al de las proteínas g proto-oncogénicas controla la función de señalización en las proteínas Duts fágicas.....	107
Función y evolución de las Duts fágicas	109
Convergencia evolutiva de las Duts.....	112
El mecanismo de señalización de las Duts fágicas es un mecanismo general.....	113

CAPÍTULO V: MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas, plásmidos, cebadores y medios utilizados en este estudio	119
Metodología general	
Manipulación del ADN.....	119
Metodología utilizada para obtener los distintos mutantes	
Construcción de plásmidos	119
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	120
Ligación	120
Transformación en <i>E. coli</i>	120
Electroporación de <i>S. aureus</i>	121
Obtención de los mutantes cromosómico en las Duts fágicas	122
Metodología utilizada en los estudios de inducción de SaPIs y fagos	
Inducción de profagos.....	123
Titulación de fagos	123
Experimentos de protección de SaPIbov1 frente a fagos inductores.....	124
Transducción.....	125
Extracción del ADN para el estudio de replicación de fagos y SaPIs	125
Análisis de Southern blot	126
Análisis de western blot	126
Ensayos enzimáticos	
Ensayo enzimático para la cuantificación de la actividad β -lactamasa en los plásmidos de fusión transcripcional	127
Copurificación de proteínas y electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)..	127
Ensayo de actividad enzimática dUTPasa en <i>E. coli</i>	127
Titulación de microcalorimetría isotérmica (ITC)	128
Cristalización, recopilación de datos, y construcción de modelos	129

Tabla de cepas utilizadas en estos estudios	130
Tabla de plásmidos utilizados en estos estudios	133
Tabla de cebadores utilizados en estos estudios.....	136
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	147
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	151
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	
ANEXO I	163
ANEXO II	164
ANEXO III	165
ANEXO IV.....	166