



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Programa de Doctorado en Fisiología

Departamento de Fisiología

**Bases moleculares de la señalización
mediada por dUTPasas triméricas de
bacteriófagos**

Christian Alite Hernández

Tesis Doctoral

Junio 2021

Director: Dr. Alberto Marina Moreno

Tutor: Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla



MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES



INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC

D. **Alberto Marina Moreno**, Profesor de Investigación de OPS del Dpto. de Genómica y Proteómica del Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC)

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada "**Bases moleculares de la señalización mediada por dUTPasas triméricas de bacteriófagos**", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **Christian Alite Hernández**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 19 de Mayo de 2021.

member:	Firmado digitalmente
081CA448-0119-44	por member:
64-	081CA448-0119-4464-
A74E-83EA40D8923	A74E-83EA40D89230
0 6A33753B-	6A33753B-A174-4492-
A174-4492-AAA1-	AAA1-CF818F5B5590
CF818F5B5590	Fecha: 2021.05.20
	11:11:36 +02'00'

Fdo. **Alberto Marina Moreno**

Dr Alberto Marina Moreno
Unidad de Cristalografía de Macromoléculas
Departamento de Genómica y Proteómica
Instituto de Biomedicina de Valencia

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

C/ Jaume Roig, 11
46010 Valencia, España
Telf. +34 96 339 17 60
Fax.: +34 96 3690800

correo-e: amarina@ibv.csic.es

LISTA DE ABREVIATURAS

φ: fago

Å: Amstrong

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ANOVA: Análisis de la varianza.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATP: adenosina trifosfato.

BER: ruta reparadora por escisión de base (*Base Excision Repair*).

BLI: interferometría de biocapa.

BovI-StI: represor de isla de patogenicidad SaPIbovI

CAPS: Ácido N-cyclohexil-3-aminopropanesulfónico.

CCC: Circular covalentemente cerrado.

CTP: citosina trifosfato.

Cu-P: Cobre-Fenantrolina

dATP: 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato.

DCD-DUT: dCTP deaminasa-dUTPpasa

dCMP: 2'-desoxicitosina 5'-monofosfato.

dCTP: 2'-desoxicitosina 5'-trifosfato.

DTT: ditioteitrol.

dTMP: 2'-desoxitimina 5'-monofosfato.

dTTP: 2'-desoxitimina 5'-trifosfato.

dUDP: 2'-desoxiuridina 5'-difosfato.

dUMP: 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato.

dUMpNpp (dUMpNHpp, dUPNPP, dUpNHpp): α,β -imido-dUTP, análogo no hidrolizable del dUTP.

Dut: dUTPasa, dUTP pirofosfatasas, EC 3.6.1.23.

Dut:BovI-Stl: Complejo entre una dUTPasa y el represor Stl de SaPIbovI

Dut ϕ 11: dUTPasa codificada por el fago ϕ 11.

Dut ϕ 71bel: dUTPasa codificada por el fago ϕ 71bel.

Dut ϕ 85: dUTPasa codificada por el fago ϕ 85.

Dut80 α : dUTPasa codificada por el fago ϕ 80 α .

Dut ϕ DI: dUTPasa codificada por el fago ϕ DI.

Dut ϕ O11: dUTPasa codificada por el fago ϕ O11.

Dut ϕ NM1: dUTPasa codificada por el fago ϕ NM1.

dUTP: 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato.

EBV: *Epstein-Barr virus*.

EGM(s): elemento(s) genético(s) móvil(es).

EMSA: *Electrophoretic mobility shift assay*

ERE: Escisión replicación y empaquetamiento.

FIV: virus como el de la inmunodeficiencia felina.

GADPH: glicerolaldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GTP: guanosin trifosfato.

HSV-1: *herpes simplex virus type 1*.

HSV-2: *herpes simplex virus type 2*.

IG: Islas genómicas.

IP(s): isla(s) de patogenicidad.

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

ITC: microcalorimetría isotérmica de titulación.

kb: kilo bases.

K_{cat}: Constante catalítica

K_D: Constante de disociación

K_M: Constante de Michaelis-Menten

LB: medio de crecimiento Luria-Bertani.

LIC: *Ligation-Independent Cloning*.

Mb: mega bases.

MPD: 2-metil-2,4-pentanodiol.

MST: *Microscale Thermophoresis*

ND: No detectada

Native-PAGE: Gel de poliacrilamida nativo.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*).

PDB: *Protein data base*

PEG: polietilén glicol.

PICI: Islas cromosómicas inducibles por fagos.

PMSF: fluoruro de fenilmetilosulfonilo.

PPAR α : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*.

Pi: fosfato inorgánico.

PPi: pirofosfato inorgánico.

RMSD: Raíz cuadrada de la media de los cuadrados de las desviaciones (Root Mean Square Deviation); para un conjunto de n puntos v y w

$$rmsd(v, w) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_i - w_i\|^2}$$

SaPI(s): Isla(s) de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus Pathogenicity Island(s)*).

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEC: *Size exclusion chromatography*

SST6: Sistema de secreción de tipo 6.

StI: represor global de isla de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*.

Tm: Temperatura a la cual la mitad de las moléculas se encuentran desnaturalizadas.

TTP: timidina trifosfato.

UFP: Unidad formadora de placas.

UND: Unión no detectada.

UTP: uridina trifosfato

UV: Ultravioleta.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Vmax: Velocidad máxima

WT: forma silvestre (*wild-type*).

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
I1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
I2 Bacteriófagos.....	5
I2.1 Ciclo de vida de los fagos.....	6
I2.2 Replicación de los fagos.....	10
I2.3 Genes de virulencia codificados por fagos y transferencia horizontal	11
I3 Islas de patogenicidad.....	14
I3.1 Ciclo biológico de las SaPIs	23
I3.2 Inducción y de-represión de las SaPIs	25
I4 dUTPasas: enzimas con funciones moonlighting.....	30
I4.1 dUTPasas: función enzimática.....	30
I4.2 Clasificación de las dUTPasas.....	35
I4.2.1. dUTPasas diméricas	36
I4.2.2. dUTPasas triméricas	40
I4.2.3. dUTPasas monoméricas.....	45
I4.3 dUTPasas como proteínas <i>moonlighting</i>	48
I4.3.1. Descripción y ejemplos de proteínas moonlighting	48
I4.3.2. Las dUTPasas y sus roles moonlighting.....	52
OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
CAPÍTULO I. Bases moleculares de la interacción BovI-Stl:Dut.....	85
1.1 Modelos previos de interacción BovI-Stl:Dut	89
1.2 Confirmación de los modelos propuestos. El papel del dUTP y de los motivos V y VI.....	91
1.3 El centro activo como zona de anclaje en la formación del complejo BovI-Stl:Dut trimérica.....	97
1.4 Encontrando el eslabón perdido. La implicación del motivo IV en la unión de BovI-Stl apoya un mecanismo de interacción generalizado.....	99
1.5 Caracterización in vitro de las Duts triméricas Dut80 α , Dut ϕ 11 Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel	103

CAPÍTULO II. Enlace entre la actividad enzimática e inductora	111
2.1 La actividad dUTPasa está ligada a la capacidad de unión a BovI-Stl en la Dut80 α	115
2.2 Capacidad de inducción de SaPIs del mutante Dut80 α ^{D95E}	116
2.3 Estructura del mutante Dut80 α ^{D95E}	120
2.4 Caracterización in vitro del mutante Dut80 α ^{D95E}	131
2.5 Análisis de la interacción BovI-Stl-Dut80 α ^{D95E}	135
CAPITULO III. Confirmación de la modularidad de BovI-Stl.....	137
3.1 Comparación estructural de Duts diméricas y triméricas	141
3.2 El represor Stl de SaPIbov1 es una proteína modular	144
3.3 Reconocimiento del ADN por BovI-Stl.....	153
3.4 La de-represión de SaPIbovI es inducida por la rotura del dímero BovI-Stl.	162
CAPITULO IV. Análisis estructural del complejo BovI-Stl:Dut	187
4.1 Estructura tridimensional del complejo entre BovI-StlN-ter y la Dut trimérica del fago ϕ 11.....	177
4.2 Los residuos del dominio intermedio de BovI-Stl median la unión a la Dut trimérica imitando al sustrato.....	184
4.3 Validación del modelo cristalográfico del complejo Dut ϕ 11:BovI-Stl ^{N-ter}	188
4.4 Co-cristalización del complejo BovI-Stl:Dut ϕ O11.....	196
4.5 Caracterización funcional del reconocimiento e interacción entre BovI-Stl:Dut dimérica	201
4.6 Cristalización del complejo Dut ϕ 85:BovI-Stl ^{N-ter}	208
4.7 Cristalización del complejo Dut80E112K:BovI-Stl ^{N-ter}	219
4.8 El efecto de la F165 en el complejo BovI-Stl:Dut80 α	230
4.9 No es PEG todo lo que reluce	234
DISCUSIÓN... ..	239
5.1 Revisión y propuesta de un nuevo modelo de interacción BovI-Stl:Dut.....	241

5.2. Efectos epistáticos y el ordenamiento del motivo V. La importancia de la sinergia en las Duts.....	252
5.3. Modulación de BovI-Stl. La evolución de las SaPIs.....	257
5.4. Reconocimiento del ADN y dimerización de BovI-Stl.....	262
5.5. Mimetismo. La elegante estrategia de BovI-Stl para interactuar con las Duts.	266
CONCLUSIONES.....	275
ANEXOS	281
Anexo I. Lista de cepas utilizadas.....	283
Anexo II. Lista de plásmidos creados.....	285
Anexo III. Lista de oligonucleótidos empleados.....	289
 BIBLIOGRAFÍA.....	 291

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN	1
Figura 0.1. Ciclo de vida de un bacteriófago	8
Figura 0.2. Escenarios de replicación de las SaPI.	17
Figura 0.3. Alineación genética de diferentes SaPIs	22
Figura 0.4. Módulo y control transcripcional de las SaPI.	25
Figura 0.5. Inducción de las SaPI por un fago auxiliar.	26
Figura 0.6. Alineamiento de secuencia de doce represores <i>Stl</i> procedentes de islas de patogenicidad estafilocócicas distintas.	28
Figura 0.7. Ilustración de la composición química del dTTP y dUTP	31
Figura 0.8. Representación esquemática de la ruta de reparación por escisión	32
Figura 0.9. Ilustración de la catalisis producida a por las dUTPasas.	34
Figura 0.10. El rol enzimático clásico de las dUTPasas.	34
Figura 0.11. Tipos de Dut y sus centros activos.	35
Figura 0.12. Alineamiento de secuencias y motivos consenso en Duts diméricas.	37
Figura 0.13. Representación estructural de de Duts diméricas de diferentes organismos.	38
Figura 0.14. Cambios conformacionales asociados a la acción catalítica	39
Figura 0.15. Alineamiento de secuencia de Duts triméricas de diferentes organismos.	41
Figura 0.16. Cambio conformacional del motivo V en ausencia o presencia de ligando ..	40
Figura 0.17. Representación de un monómero de la Dut homotrimérica de <i>E. coli</i>	42
Figura 0.18. Estructura de la Dut trimérica de <i>E. coli</i>	43
Figura 0.19. Participación de los motivos conservados de la Dut trimérica del fago 80 α en la hidrólisis	44
Figura 0.20. Estructura de la Dut del Epstein-Barr virus	47
Figura 0.21. Estrategias de regulación de las diferentes funciones en una proteína moonlighting	51
Figura 0.22. Posicionamiento del motivo VI en Duts de diferentes organismos	53
MATERIALES Y MÉTODOS	61
Figura M1. Pasos experimentales en un sensograma de BLI	72

CAPÍTULO I85

Figura 1.1. Modelos propuestos para la interacción BovI-Stl:Dut.....	90
Figura 1.2. Visualización espacial de zonas y residuos relevantes para la interacción BovI-Stl:Dut usando como ejemplo la estructura de Dut80 α WT.....	94
Figura 1.3. Conservación de secuencia entre Dut80 α ^{WT} y Dut ϕ 11 ^{WT}	95
Figura 1.4. Alineamiento de secuencia de Dut80 α y Dut ϕ 11 sin el motivo VI	100
Figura 1.5. Efecto de las mutaciones sobre el motivo IV de Duts triméricas en la replicación de la isla de SaPIbov1	103
Figura 1.6. Alineamiento de secuencia de las dUTPasas codificadas por bacteriófagos	104
Figura 1.7. Estructuras de Dut80 α , Dut ϕ 85, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11	105
Figura 1.8. Representación gráfica de las medidas de actividad de las Duts estudiadas .	108

CAPÍTULO II..... 111

Figura 2.1. Inducción de SaPIbov1 y SaPIbov5 por Dut80 α D95E.....	119
Figura 2.2. Estructuras del mutante Dut80 α ^{D95E} . Dut80 α ^{WT} y Dut80 α ^{D95E} forman trímeros similares	123
Figura 2.3. Reorganización del canal central inducida por la mutación D95E.	126
Figura 2.4. Localización de los residuos 95 en Dut80 α WT y el mutante D95E.....	127
Figura 2.5. Comparación estructural de las estructuras mutantes Dut80 α WT y D95E. .	129
Figura 2.6. Localización espacial del Motivo V en Dut80 α ^{WT} y Dut80 α ^{D95E} Tipo II.	130
Figura 2.7. La mutación Dut80 α D95E disminuye la actividad y la estabilidad de la proteína.	133

CAPITULO III..... 137

Figura 3.1. Diferencias estructurales entre Duts diméricas y triméricas de fagos de <i>S. aureus</i>	143
Figura 3.2. Diseño de modelos y construcciones de BovI-Stl.....	145
Figura 3.3. Stl de SaPIbov1 tiene diferentes regiones para interactuar con las Duts triméricas y diméricas	147
Figura 3.4. Estructura de los dominios Stl de SaPIbov1	149
Figura 3.5. Cromatografía de exclusión molecular	151
Figura 3.6. Comparación de la estructura de BovI-Stl con el controlador C.Esp1396I...	154
Figura 3.7. Análisis estructural del modelo de unión a ADN del dímero BovI-Stl.....	156
Figura 3.8. Análisis funcional del modelo de unión a ADN del dímero BovI-Stl	157

Figura 3.9. Impacto de las mutaciones puntuales de los residuos de BovI-Stl implicados en el reconocimiento del ADN en la oligomerización y la estabilidad ...	160
Figura 3.10. Los mutantes sobre el HTH de Stl interactúan con la Dut ϕ 11	161
Figura 3.11. Impacto de la mutación puntual R74A en BovI-Stl	164
Figura 3.12. Dimerización de BovI-Stl e interacción con la Dut.....	166
Figura 3.13. Análisis de la dimerización de BovI-Stl e interacción con la Dut	167
Figura 3.14. Estudio de los dímeros forzados de BovI-Stl.....	170

CAPITULO IV..... 173

Figura 4.1. Estructura cristalina del complejo Dut ϕ 11-BovI-Stl ^{N-ter}	180
Figura 4.2. Estructura de las interacciones del complejo Dut ϕ 11-BovI-Stl ^{N-ter}	181
Figura 4.3. Cambios conformacionales en BovI-Stl ^{N-ter} y Dut ϕ 11 inducido por la formación de complejos.....	183
Figura 4.4. Análisis <i>in vivo</i> del reconocimiento y unión de la Dut trimérica a BovI-Stl	191
Figura 4.5. Evaluación <i>in vivo</i> del reconocimiento y unión de la Dut trimérica a BovI-Stl.	192
Figura 4.6. Evaluación <i>in vitro</i> del reconocimiento y unión de la Dut trimérica a BovI-Stl.	193
Figura 4.7. Ensayo de detección de fagos por titulación.....	195
Figura 4.8. BovI-Stl ^{C-ter} imita al de Duts diméricas.....	197
Figura 4.9. Estructura cristalina del complejo BovI-Stl ^{C-ter} -Dut ϕ O11	198
Figura 4.10. BovI-Stl ^{C-ter} <i>latch</i> imita el sustrato dUTP-Mg	200
Figura 4.11. Evaluación <i>in vitro</i> del reconocimiento y la unión de las Duts diméricas a BovI-Stl.....	204
Figura 4.12. Evaluación <i>in vivo</i> del reconocimiento y la unión de las Duts diméricas a BovI-Stl.	205
Figura 4.13. Análisis <i>in vivo</i> del reconocimiento y la unión de las Duts diméricas a BovI-Stl.	206
Figura 4.14. Ensayo de detección de fagos.....	207
Figura 4.15. Estructura cristalina del complejo Dut ϕ 85-BovI-Stl ^{N-ter}	209
Figura 4.16. Cambios conformacionales en BovI-Stl ^{N-ter} y Dut ϕ 85 inducidos por la formación de complejos	213
Figura 4.17. Comparación del motivo VI de Dut ϕ 11 y Dut ϕ 85 en complejo con BovI-Stl ^{N-ter}	218

Figura 4.18. Superposición estructural de Dut ϕ 11 y Dut ϕ 85 en complejo con BovI-StlN-ter.....	218
Figura 4.19. Estructura cristalina del complejo Dut80 α -BovI-Stl ^{N-ter}	223
Figura 4.20. Cambios conformacionales en BovI-Stl ^{N-ter} y Dut80 α inducidos por la formación de complejos	224
Figura 4.21. Prueba de la capacidad de unión entre la Dut80 α y los mutantes puntuales de BovI-Stl.....	228
Figura 4.22. Cambios conformacionales en el motivo V de la Dut80 α	231
Figura 4.23. El motivo V se estabiliza mediante su unión a un <i>pocket</i> hidrofóbico de BovI-Stl.	233
Figura 4.24. Densidad electrónica del complejo Dut ϕ 11:BovI-Stl ^{N-ter}	235
Figura 4.25. Densidad electrónica del complejo Dut ϕ 85:BovI-Stl ^{N-ter}	236

DISCUSIÓN 239

Figura 5.1. Efecto en la replicación y transferencia de SaPI _{bov1} del mutante Δ stl.	243
Figura 5.2. Alineamiento de secuencia de las Duts del fago 80 α de <i>S. aureus</i> junto las Duts de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y de <i>Homo sapiens</i>	248
Figura 5.3. Modelo de interacción entre Duts de fagos de <i>S. aureus</i> con BovI-Stl.....	250
Figura 5.4. Alineamiento de secuencia de Duts codificadas por fagos	251
Figura 5.5. Estabilización del canal central en las Duts.....	254
Figura 5.6. Diferencia del motivo V entre DCD-DUTs y dUTPasas.....	255
Figura 5.7. Mapas genómicos para PIC1 y elementos relacionados.....	258
Figura 5.8. Alineamiento de secuencias homólogas a BovI-Stl codificadas por diferentes especies de <i>S. aureus</i>	260
Figura 5.9. Alineación Cluwstal de represores homólogos a BovI-Stl de PIC1s de diferentes especies	264
Figura 5.10. Alineación ClustalW de Duts de diferentes especies	270
Figura 5.11. Alineación ClustalW de BovI-Stl con represores homólogos a Stl de PIC1s de diferentes especies	271

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN	1
Tabla 0.1. Selección de toxinas y factores de virulencia codificados por fagos	13
Tabla 0.2. Listado de las SaPI y factores de virulencia codificados	18
Tabla 0.3. Efecto de mutaciones en el fago 80 α y Φ 11 sobre la movilidad de diferentes SaPIs.	29
Tabla 0.4. Ejemplos de proteínas moonlighting de diferentes organismos	48
MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
Tabla M1. Condiciones de cristalización de las diferentes estructuras obtenidas...	77
CAPÍTULO I	85
Tabla 1.1. Cambios en las cinéticas de interacción entre BovI-Stl y las Duts Dut80 α ^{WT} y Dut ϕ 11 ^{WT} en presencia o ausencia de nucleótidos.....	93
Tabla 1.2. Efecto de mutaciones sobre los motivos III y V de las Duts 80 α y ϕ 11 en la interacción con BovI-Stl.	98
Tabla 1.3. Cambios en las cinéticas de interacción entre BovI-Stl y los mutantes del motivo IV en las Duts de los fagos 80 α y ϕ 11 en presencia o ausencia de nucleótidos	102
Tabla 1.4. Medidas cuantitativas para la interacción entre las Duts estudiadas y BovI- Stl	107
Tabla 1.5. Resumen de los valores cinéticos de las Duts estudiadas	108
CAPÍTULO II.....	111
Tabla 2.1. Análisis de complementación de SaPI _{bov1} y SaPI _{bov5}	118
Tabla 2.2. Colección de datos y estadísticas de refinado	122
Tabla 2.3. Caracterización <i>in vitro</i> de Dut80 α WT y D95E.....	134
CAPITULO III	137
Tabla 3.1. Colección de datos cristalográficos y de refinamiento de BovI-Stl ^{N-ter}	152
Tabla 3.2. Afinidades de unión entre BovI-Stl ^{WT} y los mutantes de dimerización con Duts triméricas y diméricas	169
CAPITULO V.....	173
Tabla 4.1. Colección de datos cristalográficos y de refinamiento de Dut Φ 11-BovI- Stl ^{N-ter}	179
Tabla 4.2. Interacciones intermoleculares del complejo Dut ϕ 11:BovI-Stl ^{N-ter}	187

Tabla 4.3. Colección de datos cristalográficos y estadísticos de refinamiento de Dut Φ 85-BovI-Stl ^{N-ter}	210
Tabla 4.4. Interacciones intermoleculares del complejo Dut Φ 85:BovI-Stl ^{N-ter}	214
Tabla 4.5. Comparación de interacciones intermoleculares del complejo Dut Φ 85:BovI-Stl ^{N-ter} y Dut Φ 11:BovI-Stl ^{N-ter}	217
Tabla 4.6. Valores cinéticos obtenidos por interferometría en bicapa (BLI) de la interacción BovI-Stl:Dut80 α ^{E122K}	220
Tabla 4.7. Colección de datos cristalográficos y estadísticos de refinamiento de Dut80 α -BovI-Stl ^{N-ter}	225
Tabla 4.8. Interacciones intermoleculares del complejo Dut80 α ^{E112K} :BovI-Stl ^{N-ter}	226
Tabla 4.9. Interacciones intermoleculares del complejo Dut80 α ^{E112K} :BovI-Stl ^{N-ter} centrados en el motivo V	232
DISCUSIÓN	239
Tabla 5.1. Duts triméricas y diméricas inducen PICIs de diferentes especies estafilocócicas a través de su unión con represores homólogos a StI de SaPI _{bovI}	259
Tabla 5.2 Sustitución de residuos en el centro activo tras el mimetismo de StI ...	268

AGRADECIMIENTOS

“Los agradecimientos los escribiré rápido”, o eso pensaba yo. Por eso me los dejé para cuando tuviera la tesis hecha. Sin embargo, y echando la vista atrás, se me hace tremendamente complicado el resumir todos estos años con un simple “gracias”. Dicen que no valoras lo que tienes hasta que lo pierdes, y aunque lo valorara entonces, ahora se echan de menos muchísimas cosas de las que sabes que solo han podido dar en ese momento y en esas circunstancias.

Me encantaría poder ir uno por uno mencionando a todos los que habéis pasado tiempo conmigo, pero como he dicho, me he dejado los agradecimientos para el final y solo tengo dos hojas. No me quiero arriesgar a pasar a la siguiente y que se me muevan las figuras de sitio a estas alturas. “Menos es más”, estilo de vida que, si no lo llevaba incorporado de serie, lo hice mío durante el periodo de mi tesis para ser la otra cara de la moneda de mi nervioso compañero y amigo, el Dr. Ciges-Tomás. Según un estudio, uno de cada tres estudiantes predoctorales desarrollan secuelas psicológicas tras la tesis. Conozco tres casos y él es dos de ellos. Aun así, quiero dedicarle un agradecimiento especial por todo lo que hemos pasado juntos.

Es cierto que la etapa predoctoral no es un camino de rosas, pero se ha hecho mucho más ameno con vuestra compañía y los sabios consejos de la Dra. Gallego, defensora acérrima de los buñuelos falleros con chocolate, y del Dr. Donderis, predecesor de las Duts y modelo de vida al que todavía tengo que comprarle unas camisetas.

Agradecer también al resto del “*coffee break team*”, Carla y Anmol, por formar parte de esta experiencia y a los que les deseo lo mejor. Ahora mismo os quedáis de veteranos en el laboratorio. Aunque hemos dejado el listón alto, sé que no defraudaréis.

No me olvido de todos los que, como yo, hemos volado del nido. Algunos, como Cris, incluso demasiado lejos. Aunque esté más en contacto con Martín que contigo, mi mensaje es el mismo. Dra. Miguel y Dra. Casino, de nuevo os deseo lo mejor, aunque con lo currantes que sois no creo que haga falta.

Por supuesto, agradecer a mi director, el Dr. Alberto Marina, por la oportunidad que me concedió al entrar en su equipo, por todo el trabajo que hemos sacado adelante junto al Dr. Penadés y, sobre todo, por las comidas de navidad.

Siento si me dejo a alguien, pero ya sabéis, las figuras se mueven. Tanto a los mencionados como a los obviados, gracias por todo este tiempo que hemos pasado juntos y por hacerme sentir que el IBV era mi segunda casa; por placer y no por obligación.

Por último, y no por ello menos importante, agradecer a toda mi familia y a mi novia por creer en mí, por facilitarme esta etapa y por todo el apoyo que me han dado en forma de tapers.

Por esto, esta tesis va dedicada a todos vosotros.

Gracias.

Resum

StI és un repressor mestre codificat per illes de patogenicitat de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) que participa en la disseminació d'aquests elements genètics mòbils en el cromosoma bacterià. Després de la infecció o inducció d'un fag col·laborador resident, les SaPIs són de-reprimides per interaccions específiques de les proteïnes del fag amb el repressor StI i l'illa és capaç de replicar-se i introduir el seu material genètic en les càpsides del fag, aprofitant la seua maquinaria per a aconseguir una transferència horitzontal de gens quan les partícules víriques amb el material genètic de l'illa infecten altres cèl·lules.

Les SaPIs han desenvolupat un mecanisme fascinant per a assegurar la seua transferència promíscua dirigit-se a proteïnes estructuralment no relacionades que realitzen funcions idèntiques i conservades per al fag, les dUTPases dimèriques y trimèriques. Aquestes proteïnes actuarien de manera anàloga a les proteïnes G protooncogèniques, on la seua funció moonlighting i senyalitzadora estaria regulada pel dUTP, el qual actuaria de segon missatger permetent o impedit la unió del repressor i, per tant, la replicació i transferència dels gens de l'illa.

En aquesta tesi desxifrem el mecanisme molecular d'aquesta elegant estratègia mitjançant assajos mutacionals que, primerament, delimiten les àrees implicades en la interacció i, finalment, determinen i validen l'estructura del repressor StI de SaPIbov1 a soles i en complex amb dUTPases de diferents fags de *S. aureus*.

Sorprenentment, StI de SaPIbov1 es tracta d'una proteïna modular capaç d'interaccionar amb dUTPases dimèriques i trimèriques mitjançant dominis i mecanismes diferents. En el cas del complex de StI de SaPIbov1 amb dUTPases trimèriques, el domini intermedi del repressor intervé de manera clau a través del centre actiu de l'enzim emulant al substrat d'aquest, el dUTP, i interaccionant amb motius conservats de la dUTPasa.

D'altra banda, la formació del complex del repressor amb dUTPases dimèriques es genera a través del motiu C-terminal, el qual no sols interacciona amb el centre actiu de l'enzim sinó que, a més, emula la superfície de dimerització de la dUTPasa, formant un heterodimer amb aquesta.

L'adquisició de multiespecificitat a través del reclutament de dominis proposa a StI de SaPI_{bov1} com un nou tipus de repressor, el qual conserva el seu mecanisme d'interacció amb ADN però permet una evolució de la proteïna amb la finalitat d'una difusió àmplia de les SaPIs per la naturalesa.

INTRODUCCIÓN

II. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria Gram-positiva no móvil coagulasa y catalasa positiva, pero oxidasa negativa. Como miembro del filo de los *Firmicutes*, *S. aureus* crece con forma esférica y se encuentra en agrupaciones irregulares. *S. aureus* puede comportarse como una bacteria comensal y como un patógeno oportunista clínicamente relevante. Esta bacteria coloniza las fosas nasales, la piel y el perineo humano y ha sido aislada en diferentes especies de animales de granja como cerdo, gallina o vaca (Edwards *et al.*, 2012; Herron-Olson *et al.*, 2007; Lekkerkek *et al.*, 2015; Lowder *et al.*, 2009).

Aunque *S. aureus* puede colonizar huéspedes como un comensal estable, es un importante patógeno oportunista en la especie humana que también es de gran interés a nivel veterinario. Puede causar enfermedades infecciosas graves y la prevalencia de numerosas cepas resistentes a los medicamentos ha establecido a esta especie de bacteria como un importante problema médico y carga veterinaria.

S. aureus puede colonizar la mucosa de la nariz humana y persistir como una bacteria comensal, encontrándose acerca del 20-30% de la población como portadores asintomáticos (Peacock *et al.*, 2001; Kluytmans *et al.*, 1997; Gorwitz *et al.*, 2008). Estos portadores asintomáticos sufren un mayor riesgo de infección estafilocócica después de estancias u operaciones hospitalarias, así como después de una lesión cutánea o de la mucosa (Yu *et al.*, 1986; Rocha *et al.*, 2013; Wertheim *et al.*, 2005; von Eif *et al.*, 2001; Safdar and Bradley, 2008), donde el microorganismo puede penetrar en los tejidos subyacentes y provocar infecciones de la piel y tejidos blandos (Tattevin *et al.*, 2012; Hasty *et al.*, 2007). Además, *S. aureus* puede invadir la sangre, causar bacteriemia (Holland *et al.*, 2014; Frimodt-Møller *et al.*, 1997; Bishara *et al.*, 2012) y finalmente provocar infecciones graves de los órganos, como endocarditis (Nienaber *et al.*, 2011; Federspiel *et al.*, 2012), neumonía (Rocha *et al.*, 2013; Lina *et al.*, 1999), artritis

séptica (Switalski *et al.*, 1993; Frazee *et al.*, 2009), osteomielitis (Kalinka *et al.*, 2014; Inoue *et al.*, 2013) y sepsis grave (Salgado-Pabón *et al.*, 2013; Spaulding *et al.*, 2012) . Además, *S. aureus* puede causar una serie de enfermedades relacionadas con toxinas, incluida la intoxicación alimentaria (Argudín *et al.*, 2010), el síndrome de shock tóxico (Kreiswirth *et al.*, 1989; Lindsay *et al.*, 1998), las infecciones necróticas (Gillet *et al.*, 2002) y el síndrome de la piel escaldada (Handler *et al.*, 2014). *S. aureus* también causa enfermedades importantes en animales, como dermatitis en conejos (Hermans *et al.*, 2003), infecciones esqueléticas en aves de corral (Lowder *et al.*, 2009) y mastitis en rumiantes (Bergonier *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2010).

Las incidencias de infección por *S. aureus* tanto en el hospital como en la comunidad han aumentado en las últimas décadas (Holden *et al.*, 2013; Tong *et al.*, 2015). Acompañando a este aumento en la ocurrencia, esta bacteria también ha desarrollado nuevas variantes virulentas y resistentes a los medicamentos (Köck *et al.*, 2010; Chambers and Deleo, 2009). Los factores de virulencia permiten que las bacterias colonicen una mayor variedad de tejidos y hospedadores facilitando los mecanismos para las adaptaciones al hospedador (Lekkerkek *et al.*, 2015; Lowder *et al.*, 2009; Viana *et al.*, 2010; Planet *et al.*, 2013).

Uno de los mecanismos más habituales por el que *S. aureus* puede adaptarse y evolucionar es a través de la transferencia horizontal de ADN en la que intervienen entre otros diferentes elementos genéticos móviles (EGM) (Lindsay *et al.*, 2012; Alibayov *et al.*, 2014). Los EGM codifican genes que les permite promover su movilización entre genomas de hospedadores (Frost *et al.*, 2005), pero además también pueden codificar genes relacionados con la virulencia, supervivencia y resistencia a antibióticos del hospedador como toxinas, adhesinas e invasinas (Lindsay, 2014; Novick, 2003). Aproximadamente el 20-22% del genoma de *S. aureus* corresponde a EGM e islas genómicas no móviles, que incluyen bacteriófagos, islas de patogenicidad, plásmidos,

transposones y casetes cromosómicos estafilocócicos “mec” (Alibayov *et al.*, 2014; Novick, 2003; Argemi *et al.*, 2017; Fitzgerald *et al.*, 2001; Mašlaňová *et al.*, 2013). La capacidad de *S. aureus* para adquirir de forma horizontal los EGM que codifican factores de virulencia permite que esta bacteria se adapte a escenarios ambientales nuevos o cambiantes.

I2. Bacteriófagos

Los bacteriófagos, o fagos, son la forma más abundante de EGM. Son virus de bacterias que infectan y se replican dentro de las mismas. Se han encontrado fagos en todos los ambientes contenedores de bacterias, desde los ecosistemas marinos y del suelo hasta los microbiomas humanos y animales (Suttle, 2005; Wichels *et al.*, 1998; Marsh and Wellington, 1994; Mirzaei and Maurice, 2017; Clokie *et al.*, 2011; Ashelford *et al.*, 2003). Se predice que residen en el ambiente en un nivel de 1-2 órdenes de magnitud mayor en comparación con la cantidad encontrada de sus hospedadores bacterianos. De hecho, son la entidad biológica más abundante, con un número estimado de 10^{31} fagos caudovirales en la biosfera de la Tierra (Sulakvelidze, 2011).

Los fagos se pueden dividir en dos tipos, virulentos o temperados, en función de su ciclo de vida que será explicado con mayor detalle en el siguiente apartado. Brevemente, los fagos que producen el ciclo denominado lítico, donde tras reconocer su hospedador bacteriano, inyectan su genoma, se reproducen utilizando maquinaria molecular del hospedador y, finalmente, lisan a la célula hospedadora liberando al mismo tiempo su progenie. El segundo tipo de fagos tiene un estilo de vida diferente y tras infectar a su hospedador puede iniciar un ciclo lisogénico, donde el genoma del fago permanece latente como un profago, se replica junto con su hospedador, pudiendo de forma puntual comenzar un ciclo lítico bajo un disparador específico. Aquellos fagos que únicamente realizan el ciclo lítico son los llamados fagos virulentos, mientras que los que pueden realizar ambos tipos de ciclo son los denominados fagos temperados.

Como EGM, el impacto de los fagos en la evolución bacteriana y la patogenicidad mediante la transferencia de maquinaria y recursos, junto con el impacto más amplio en los ecosistemas circundantes, indica el importante papel que desempeñan los fagos en la ecología bacteriana y la colonización de nichos han facilitado el suministro directo de genes de virulencia a sus hospedadores bacterianos. Además, parecen haber sido utilizados por las bacterias para la adquisición de maquinaria beneficiosa similar a la utilizada por los fagos. Por ejemplo, las piocinas de tipo R y el sistema de secreción de tipo VI (SST6) podrían haber sido asimilados evolutivamente por las bacterias hospedadoras ya que ambos son similares estructuralmente a la cola de fago (Nakayama *et al.*, 2000) y aumentan la virulencia de las bacterias que los codifican. Por un lado, el sistema SST6 utiliza su estructura para transferir proteínas efectoras mediante inyección a través de la membrana externa de otras células (Coulthurst, 2013). Las piocinas de tipo R, por otro lado, utilizan esta estructura similar a la cola de los fagos para liberarse en la lisis celular, uniéndose y matando a otras bacterias (Scholl and Martin, 2008).

I2.1 Ciclo de vida de los fagos

Los fagos se pueden clasificar en dos grupos según los ciclos de vida a los que se someten, ya sea fagos estrictamente líticos o fagos temperados que también pueden llevar a cabo el ciclo lisogénico. En el ciclo lítico, la infección de un fago en una célula bacteriana receptora o la inducción de profagos en una cepa lisogénica lleva a la replicación del fago utilizando tanto su propia maquinaria como la del hospedador (Young, 1992). El ensamblaje de viriones maduros y la lisis de las células bacterianas liberan la progenie de los fagos en el medio ambiente donde pueden infectar a un nuevo receptor sensible. La clave de la infección por fagos es la adsorción del mismo a través de receptores específicos de la superficie celular bacteriana, seguido de la inyección de su ADN en el citoplasma de la célula receptora, donde se produce la transcripción y la replicación (Young, 1992). Las proteínas virales luego se sintetizan y se

ensamblan en cápsides (cabezas) y colas, antes de que se formen los viriones maduros. El ADN del fago se empaqueta en las cápsides. La proteína holina del fago forma poros en la membrana citoplasmática permitiendo que la endolisina codificada por el fago puede alcanzar e hidrolizar la capa de peptidoglicano de las células bacterianas, provocando la lisis celular (Fig. 0.1) (Young and Bläsi, 1995; Nelson *et al.*, 2012). Dentro del ciclo lítico, las diferentes etapas se controlan en un patrón temporal para garantizar la correcta y ordenada expresión de los genes asociados a cada etapa de este ciclo. Para ello, los genes se encuentran agrupados en módulos diferentes que se expresan secuencialmente, comenzando con genes involucrados en la replicación, seguido por los genes de empaquetamiento y finalizando por la expresión de los genes de lisis.

Los fagos temperados también pueden realizar el ciclo lítico, de la misma manera que los fagos estrictamente líticos. Pero además tienen la capacidad de seguir un ciclo vital no lítico, conocido como lisogénico (Brussow *et al.*, 2004; Feiner *et al.*, 2015; Knowles *et al.*, 2016). Después de la inyección de ADN en el citoplasma, un fago temperado inicia el ciclo lítico o puede integrar su ADN en el cromosoma bacteriano del hospedador para convertirse en un profago y siguiendo de este modo el ciclo lisogénico. Este profago expresa un represor específico (llamado CI en el fago λ) que inhibe la transcripción de la mayoría de los genes fágicos, incluidos aquellos genes que promueven el ciclo lítico, manteniendo al profago quiescente (Fig. 0.1). Después de la integración, el ADN de profago se replica de forma concomitante con el cromosoma bacteriano durante la división celular, por lo que el profago se transmite a través de generaciones de bacterias de manera indefinida (transferencia vertical) (Fortier and Sekulovic, 2013).

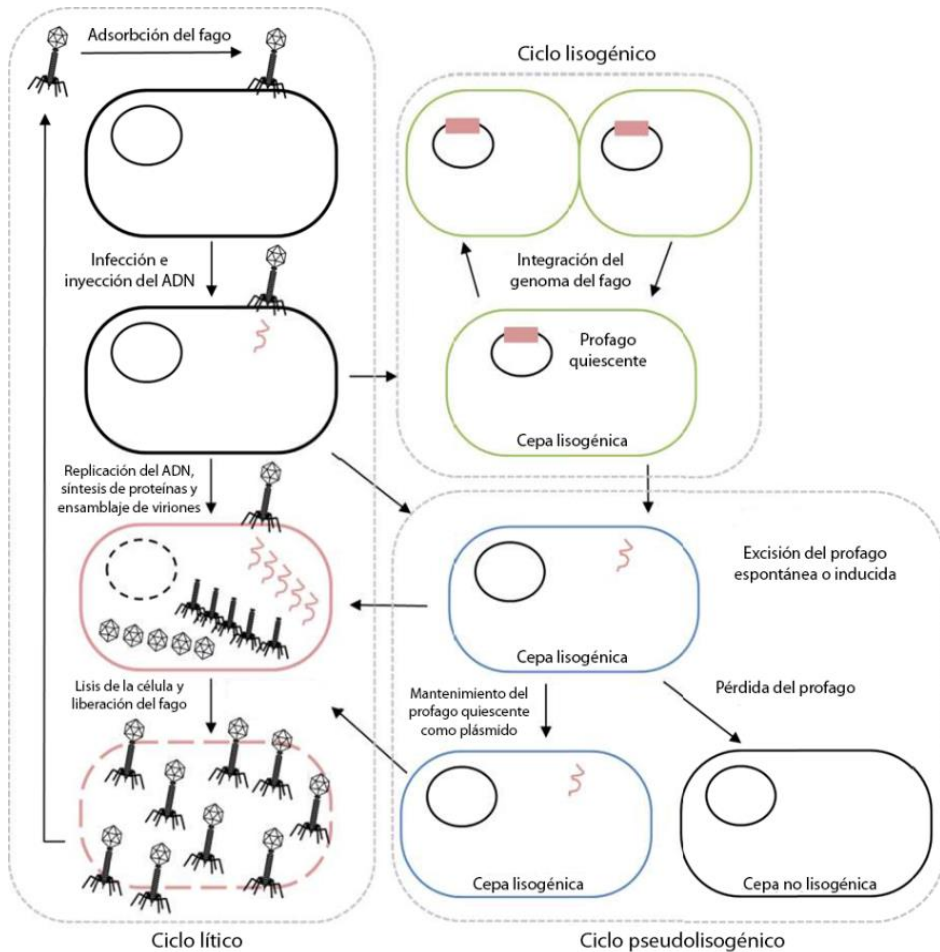


Figura 0.1. Ciclo de vida de un bacteriófago. El virión se une a un huésped específico y ocurre la adsorción e inyección fágica del ADN en la bacteria. Este ADN puede integrarse en el genoma bacteriano como un profago quiescente (ciclo lisogénico) u ocurrir el ciclo lítico. Los fagos quiescentes permanecen integrados en el genoma de la bacteria hasta que son inducidos y entran en el ciclo lítico. Durante el ciclo lítico, el genoma del fago se replica como un concatémero mientras que las proteínas morfogenéticas se sintetizan. El genoma viral es introducido en cápsidas completamente formadas creando así la partícula vírica madura. La célula bacteriana se lisa, diseminando nuevos viriones que infectarán a otras células. Adaptado de Fortier et al., 2013.

La salida del ciclo lisogénico se produce cuando el profago se escinde del cromosoma del hospedador. Esta escisión puede ser espontánea, pero normalmente es inducida por estrés en la célula hospedadora, como el daño al ADN por los antibióticos, la radiación UV o el estrés térmico (Zhang *et al.*, 2000; Maiques *et al.*, 2006; Úbeda *et al.*, 2005; Miller, 2004; Favre *et al.*, 1986; Phillips *et al.*, 1987). Estos factores de estrés activan la respuesta SOS bacteriana, lo que conlleva a la producción de proteínas relacionadas con esa vía, incluida la proteína de reparación de ADN RecA. Una vez activada RecA (RecA*) induce la autoescisión de CI, liberando de la represión a los genes líticos del profago e iniciando el ciclo lítico (Kim and Little, 1993). La inducción del ciclo lítico conduce a la escisión del fago del cromosoma huésped, su replicación y empaquetamiento, formándose los viriones maduros que se liberan e infectan a otras bacterias susceptibles (Fig. 0.1).

Los fagos también pueden experimentar un tercer ciclo de vida, llamado pseudolisogenia (Łoś and Węgrzyn, 2012). La pseudolisogenia es una etapa de desarrollo estancado donde el fago reside en el citoplasma del huésped bacteriano como un elemento circular o lineal similar a un plásmido; ni integrado como profago para el ciclo lisogénico, ni activo en el ciclo lítico. Normalmente, desencadenada por condiciones de crecimiento desfavorables para la célula huésped, la pseudolisogenia termina como una verdadera lisogenia a través de la integración del ADN del fago en el cromosoma huésped (Fig. 0.1) (Łoś and Węgrzyn, 2012).

I2.2 Replicación de los fagos

La integración del genoma del fago en el cromosoma del huésped es vital para la progresión del ciclo lisogénico. Después de la inyección de ADN de doble cadena, este se circulariza y se integra en el cromosoma del hospedador por el mecanismo de Campbell, con recombinación específica del sitio de unión del fago (attP) a un sitio de unión bacteriano específico (attC) (Weisberg & Landy, 1983). Esta integración de sitio específico es catalizada por una integrasa codificada por los fagos (Int) dentro del módulo integración/escisión del cual hablaremos más adelante. Una vez que se integra el genoma del fago, éste presenta sitios de unión híbridos en ambos extremos y reciben el nombre de sitios attL y attR. Estos sitios attL y attR actúan como sitios de reconocimiento para la escisión del genoma del fago. Después de la inducción, ya sea espontánea o mediada por la respuesta SOS, Int y la escisionasa codificada en el mismo módulo (Xis) actúan de manera coordinada para catalizar la escisión del ADN del fago y comenzar el proceso lisogénico (Schindler & Echols, 1981; Miller *et al.*, 1981). Tras la lisogenia, las proteínas implicadas en el ciclo lítico se descomponen rápidamente por proteasas del huésped, como ClpX, ClpP y otras (Koblier *et al.*, 2004).

Además, para algunos fagos, las proteínas codificadas por el hospedador también están implicadas en la integración de su material genético. En este proceso interviene la proteína homodimérica denominada factor de integración del hospedador (FIH) y la proteína Fis (Ball & Johnson, 1991; Craig & Nash, 2004).

I2.3 Genes de virulencia codificados por fagos y transferencia horizontal.

Los fagos codifican para diferentes tipos de genes de virulencia, desde toxinas hasta factores de invasión (Tabla 0.1) (Brussow *et al.*, 2004; Ross and Topp, 2015). Incluyen superantígenos, factores de adhesión, ADNasas, factores mitogénicos, factores de invasión y factores de invasión inmune. Ciertas enfermedades mediadas por toxinas (toxinosis) son causadas por toxinas codificadas por fagos, como por ejemplo el botulismo, cólera, difteria o la fiebre escarlata (Novick, 2003). Los genes de virulencia del fago de *S. aureus* incluyen la enterotoxina A estafilocócica (EAE) que causa intoxicación alimentaria, la toxina estafilocinasa (Sak) y la toxina leucocidina de Pantón-Valentine (Betley and Mekalanos, 1985; Coleman *et al.*, 1989; Narita *et al.*, 2001). En algunos casos, procesos como la expresión y liberación de toxinas, así como su movilización, están vinculados al ciclo lítico del fago. La relación de la expresión de la toxina con el ciclo lítico del fago puede tener implicaciones clínicas para el tratamiento de cepas de bacterias patógenas que portan profagos integrados en sus cromosomas. Esto se debe a que el tratamiento con algunos antibióticos puede desencadenar la respuesta SOS e iniciar el ciclo lítico del fago. La inducción del fago, a su vez, conduce a una regulación positiva de la expresión de la toxina, y la lisis celular mediada por el fago liberaría esas toxinas. Un ejemplo de expresión de toxina ligada a un ciclo lítico de fagos es la toxina Shiga (Stx) codificada por fagos de *E. coli*. El tratamiento de *E. coli* productora de toxina Shiga (ECTS) con antibióticos, como las fluoroquinolonas, que inducen el ciclo lítico de profagos residentes aumenta el riesgo de síndrome urémico hemolítico (SUH) (Zhang *et al.*, 2000). Además, las enterotoxinas de *S. aureus* SEA, SEG y SEK, así como Sak, se han vinculado a la expresión después de la inducción de fagos (Sumby *et al.*, 2003). De esta manera, los fagos lisogénicos no solo transfieren toxinas al

genoma bacteriano, sino que también pueden participar en la expresión de toxinas después de la inducción del ciclo lítico del fago.

Además de la alteración del genoma confiriendo nuevos genes que aumentan la virulencia bacteriana, los profagos protegen a las bacterias hospedadora contra la infección e integración de otros fagos líticos relacionados o de su misma especie (Susskind *et al.*, 1974; Kliem and Dreiseikelmann, 1989; Berngruber *et al.*, 2010; Seed, 2013). Por el contrario, las bacterias pueden utilizar la presencia de profagos competidores por un mismo nicho para matar a estas bacterias rivales produciendo sustancias que inducen el ciclo lítico de estos fagos (Selva *et al.*, 2009). Desde el punto de vista del hospedador humano y animal, es posible que los fagos puedan conferir protección contra las bacterias en ciertas situaciones. Un estudio reciente indicó que los fagos pueden adherirse a las superficies de la mucosa, lo que proporcionaba a los metazoos hospedadores de una protección contra la colonización bacteriana y la infección (Barr *et al.*, 2013). De esta manera, los fagos influyen tanto en sus hospedadores bacterianos como en el nicho circundante, lo que no solo pone de manifiesto su papel en la biología bacteriana sino que explica su divergencia y la evolución (Lindsay *et al.*, 2012; McCarthy *et al.*, 2012).

Tabla 0.1. Selección de toxinas y factores de virulencia codificados por fagos

Proteína	Gen	Fago	Bacteria
Toxina Difterica	<i>tox</i>	Fago B	<i>C. diphtheriae</i>
Neurotoxina	<i>C1</i>	Fago C1	<i>C. botulinum</i>
Toxinas Shiga	<i>stx1, stx2</i>	H-19B	<i>E. coli</i>
Enterohemolisina	<i>hly2</i>	φFC3208	<i>E. coli</i>
Citotoxina	<i>ctx</i>	φCTX	<i>P. aeruginosa</i>
Enterotoxinas	<i>see, sel</i>	NA	<i>S. aureus</i>
P	<i>sep</i>	φN315	<i>S. aureus</i>
A	<i>entA, sea</i>	φ13, φMu50A	<i>S. aureus</i>
Toxinas tipo A y C	<i>speA, speC</i>	T12, CS112	<i>S. pyogenes</i>
Toxina colérica	<i>ctxAB</i>	CTXφ	<i>V. cholerae</i>
Leucocidina	<i>pvl</i>	fPVL	<i>S. aureus</i>
Superantígenos	<i>speA1, speA3, speC, speI, spe H, speM, speL, speK, ssa</i>	8232.1	<i>S. pyogenes</i>
Toxina distensora citoletal	<i>cdt</i>	Sin nombre	<i>E. coli</i>
Efectores tipo III	<i>sopE, sseI, sspHI</i>	SopEΦ, GIFSY-2, GIFSY-	<i>S. enterica</i>
Superóxido dismutasa	<i>sodC</i>	Sp4, 10	<i>E. coli</i>
	<i>sodC-I, sodC-III</i>	GIFSY-2, Fels-1	<i>S. enterica</i>
	<i>mf2, mf3, mf4</i>	370.1, 370.3, 315.3	<i>S. pyogenes</i>
Factores mitogénicos	<i>toxA</i>	Sin nombre	<i>P. multocida</i>
	<i>Sin nombre</i>	Phisc 1	<i>S. canis</i>
OMP	<i>bor, eib</i>	λ, λ-like	<i>E. coli</i>
Acetilsas de antígeno O	<i>oac</i>	Sf6	<i>S. flexneri</i>

Recientemente se ha hecho evidente que los niveles de transferencia de genes mediados por fagos se han subestimado. Estudios han identificado y reportado la transferencia de cada vez más regiones genómicas bacterianas y fagomas (ADN encapsidado en partículas de fago), incluida la transferencia de genes de resistencia a antibióticos (Sano *et al.*, 2004; Kenzaka *et al.*, 2010). Un estudio encontró un vínculo entre el tratamiento con antibióticos de ratones y un aumento en los genes relacionados con la resistencia a los antibióticos en los fagos del microbioma intestinal (Modi *et al.*, 2013) De hecho, los análisis metagenómicos en el viroma humano encontraron una gran cantidad de genomas de fagos, que no solo contienen genes líticos y lisogénicos, sino también genes de resistencia a antibióticos y CRISPR (Minot *et al.*, 2011). Aunque el alcance de la transferencia de genes de resistencia a antibióticos mediada por fagos es todavía discutible, comprender el papel de los fagos en el intestino humano sigue siendo un desafío y requerirá esfuerzos integrados de microbiólogos, ingenieros,

médicos, ecólogos, bioinformáticos y bioestadísticos. Como la mayoría de los fagos intestinales no están identificados genéticamente y los estudios temporales sobre la microbiota intestinal siguen siendo raros, quedan muchas preguntas abiertas sobre las interacciones entre fagos, bacterias y el sistema inmunitario.

En general, los fagos están altamente involucrados en la transferencia de factores de virulencia a través de una variedad de mecanismos. Esto destaca a los fagos como un importante EGM bacteriano, que contribuye a la aparición de nuevas cepas patógenas en bacterias.

I3. Islas de patogenicidad

Los genomas de especies bacterianas pueden evolucionar a través de una variedad de procesos que incluyen mutaciones, reordenamientos o transferencias horizontales de genes. Información recopilada en los últimos años de un número cada vez mayor de genomas secuenciados han demostrado que los genomas bacterianos albergan un número variable de genes accesorios adquiridos por transferencia horizontal de genes que codifican rasgos adaptativos que podrían ser beneficiosa para las bacterias bajo cierto crecimiento o condiciones ambientales (Schmidt y Hensel, 2004). Muchos de los genes accesorios adquiridos por transferencia horizontal forman bloques sinténicos reconocidos como islas genómicas (IG). Las IG generalmente se reconocen como segmentos de ADN discretos de entre ~ 10 y 200 kb de longitud (Dobrindt *et al.*, 2004) que contribuyen a la diversificación y adaptación de microorganismos a través de un impacto significativo en la plasticidad y evolución del genoma, la diseminación de la resistencia a los antibióticos y los genes de virulencia y a la formación de vías catabólicas.

Estas IGs se encuentran en el genoma bacteriano, pero son significativamente diferentes de las regiones conservadas no móviles. Las diferencias en la composición de nucleótidos, el contenido de GC y el uso de codones sugieren que las IGs se adquirieron en el cromosoma bacteriano a través

de transferencia horizontal (Novick and Ram, 2016; Dobrindt *et al.*, 2004; Hacker and Carniel, 2001). En general, las IGs están flanqueadas por repeticiones de 16 a 20 pb, similares a las observadas en fagos y también denominadas sitios *attL* y *attR* (Fig. 0.2). Estos sitios actúan como sitios de reconocimiento para la escisión e integración mediada por enzimas específicas en el cromosoma del hospedador (Schmidt and Hensel, 2004). Las IG suelen incluir genes relacionados con la movilidad, como integrasas, factores de conjugación de plásmidos y genes relacionados con fagos. La presencia de genes de movilidad sugiere que las IG pueden ser EGM. Otros genes codificados por las IG proporcionan una ventaja selectiva a la bacteria hospedadora, promoviendo el mantenimiento de la IG dentro su cromosoma. Dependiendo de la ventaja que confieran estos genes codificados por IG, éstas pueden ser etiquetadas como islas patógenas, simbióticas, metabólicas, de defensa o de resistencia (Schmidt and Hensel, 2004), indicando la diversidad de estos elementos.

Uno de los tipos de IG mejor caracterizados son las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) (Novick *et al.*, 2010). Las SaPIs son satélites de fagos que están vinculados de manera innata a fagos temperados, conocidos como fagos auxiliares. Las IG utilizan a los fagos auxiliares para su inducción y transferencia a una nueva célula huésped bacteriana. Todas las SaPIs comparten un ciclo de vida común (Briani *et al.*, 2001). Los primeros estudios de movilización de SaPIs identificaron que estos IG residen de forma pasiva en el genoma bacteriano y su ciclo vital es inducido por ciertos fagos auxiliares que promueven su escisión del cromosoma bacteriano y su posterior circularización. La inducción de una SaPI residente en el genoma bacteriano por su fago auxiliar puede ocurrir después de uno de estos dos eventos; (i) este fago también se encuentra residente en el genoma de la misma bacteria como profago y su ciclo lítico se activa por la respuesta SOS bacteriana, o (ii) la bacteria portadora de la SaPI es infectada por un fago auxiliar que sigue un ciclo lítico (Maiques *et al.*, 2006; Ubeda *et al.*, 2005; Ubeda *et al.*, 2003; Międzybrodzki *et al.*, 2012). Las SaPIs inducidas por

fagos se escinden del cromosoma hospedador, se replican y se empaquetan en partículas víricas producidas a partir de proteínas fágicas. Después de la lisis celular mediada por el fago, estas partículas que contienen ADN de las SaPIs se transfieren de forma intra e intergenérica a otras bacterias (Chen *et al.*, 2014; Quiles-Puchalt *et al.*, 2014). Esta serie de eventos se ha denominado “ciclo de las SaPIs”, un ciclo de escisión-replicación-empaquetamiento (ERE) sobre el que se habla más en profundidad en el siguiente apartado (Maiques *et al.*, 2007) (Fig. 0.2).

Se han identificado una o más SaPIs en todas las cepas clínicamente relevantes de *S. aureus* secuenciadas. De hecho, la mayoría de las SaPIs son responsables del síndrome del shock tóxico, junto con dos o más superantígenos (Kreiwirth *et al.*, 1989; Lindsay *et al.*, 1998). Además de esto, algunas SaPIs codifican genes adicionales involucrados en la formación de *biofilms* (ej. las SaPI denominada SaPIbov2) (Cucarella *et al.*, 2001), resistencia a los antibióticos (SaPIfusB) (Chen *et al.*, 2013; O’Neil *et al.*, 2007), o adaptación del huésped (SaPIbov4, SaPIbov5, SaPIeq1 y SaPIov2) (Viana *et al.*, 2010). Como portadores de numerosos genes de virulencia y adaptación bacteriana, las SaPIs desempeñan un papel importante en la supervivencia y patogenicidad de *S. aureus* (Tabla 0.2).

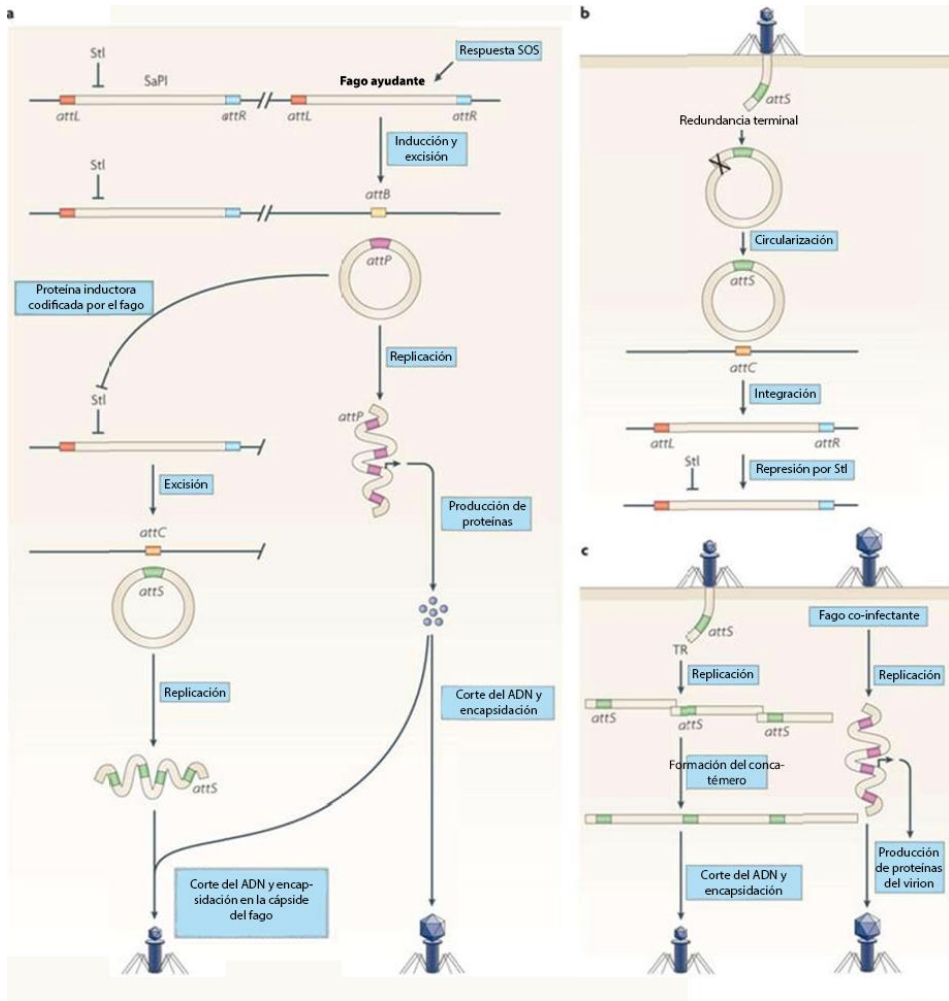


Figura 0.2. Escenarios de replicación de las SaPI. (A) Inducción por respuesta SOS. attp/atts y attb/attc son las secuencias de acople del fago y de la SaPI, respectivamente. Tras la inducción y escisión del fago auxiliar, se expresan proteínas fágicas inductoras que alivian la represión mediada por la proteína S_{ti} sobre la isla (B) Infección de una SaPI. La redundancia en sus extremos permite al DNA de la SaPI circular y, por lo tanto, integrarse en los sitios attc cromosomales (C) La co-infección de una SaPI y un fago auxiliar permite que el ADN de la SaPI pueda replicarse sin necesidad de estar integrado. La síntesis de las proteínas del fago lleva a la producción de cápsides, las cuales se usan para empaquetar el ADN replicado de la SaPI y produce partículas víricas con la cabeza pequeña. Adaptada de Novick et al., 2010.

Tabla 0.2. Listado de las SaPI y factores de virulencia codificados (adaptada de Novick *et al.*, 2010)

Elemento	Genoma de <i>estafilococo</i>	Gen	Producto	Tamaño (kb)	Fagos inductores
SaPbov1	<i>S. aureus</i> str. RF122	tst sec	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1) Enterotoxina C	15.08	φ11 and 80α
SaPbov2	<i>S. aureus</i> str. V329	sel	Enterotoxina L		
SaPfm4	<i>S. aureus</i> str. mu50	bap	Biofilm-associated protein (BAP)	27	80α
SaPfmw2	<i>S. aureus</i> str. mw2	fhfD	Ferrichrome ABC transporter homologue	14.04	Endogenous prophage
ScP11	<i>S. aureus</i> str. FR1909	sec sel	Enterotoxina C Enterotoxina L	9.09	Not known
SaP11	<i>S. aureus</i> str. RN4282	tst ear sek seq	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1) Penicillin-binding protein fragment Enterotoxina K Enterotoxina Q	15.02	80α and φ13
SaP13	<i>S. aureus</i> str. COL	seb ear sek sel	Enterotoxina B Penicillin-binding protein fragment Enterotoxina K Enterotoxina L	15.06	Not known
SaP15	<i>S. aureus</i> str. USA300	ear seq	Penicillin-binding protein fragment Enterotoxina Q	14.00	Not known
SaPml and SaPml	<i>S. aureus</i> str. n315 and <i>S. aureus</i> str. mu50, respectively	tst sec	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1) Enterotoxina C	15	80α
SaP12	<i>S. aureus</i> str. RN3984	tst	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1)	14.07	80 and 80α
SaRfusB	<i>S. aureus</i> European fusidic acid-resistant impetigo clone CS6	eta	Exfoliatin A		
SaP122	<i>S. aureus</i> str. RF122	fusB	FusB (Fusidic acid resistance)	20.07	Not known
SaP16A	<i>S. aureus</i> strains 8325, COL, USA300, MSSA476, Newman and mw2	mdr	Multidrug resistance protein	17.09	Endogenous prophage
SaP15305	<i>S. saprophyticus</i> str. 15305	actA aad fosB	Acetyl transfer protein Aminoglycoside adenylyl transferase/Glutathione thionyl phosphatase	3.14 16.07	Not known Not known

Las SaPIs provenientes de cepas de *S. aureus* que infectan a humanos (SaPI1 a SaPI4) o al ganado bovino (SaPIbov1, SaPIbov2 y SaPIbov5) son las más estudiadas debido a su interés práctico. Especialmente, SaPI1 (humana) y SaPIbov1 (bovina) serían las más utilizadas en investigación y, por lo tanto, usadas como modelo. Todas ellas tienen una estructura parecida, donde se identifica un *core* compuesto de 5 módulos conservados donde se encuentran los genes necesarios para regular el ciclo biológico de las islas (Fig. 0.3) (Novick, 2003; Novick *et al.*, 2010):

i) Módulo de integración/escisión: se encuentra a ambos lados de los módulos de regulación transcripcional. Este módulo está formado por una integrasa (*int*) y un gen que codifica una proteína con actividad escisionasa (*xis*). La tirosin-integrasa codificada por la SaPI cataliza la integración de fragmentos circularizados de la SaPI en el cromosoma bacteriano. Esta integración se produce mediante la recombinación entre sitios de unión específicos en el cromosoma bacteriano (*attC*) y la SaPI (*attS*), que es similar al sitio attP del fago. Este mecanismo crea regiones flanqueantes híbridas junto a la SaPI integrada, attL y attR (Fig. 0.2). La SaPI se asienta de forma estable en el cromosoma bacteriano hasta la inducción mediada por fagos auxiliares. Una vez que se ha inducido el ciclo de la SaPI, los promotores *stl* y *str* facilitan la expresión del módulo de integración-escisión. La expresión coordinada de *int* y *xis* permite la escisión correcta de los sitios attL y attR formando las formas intermedias de fragmentos de SaPIs circularizados.

ii) Módulo de regulación transcripcional: formado por los genes *stl* y *str*, que están codificados en una orientación divergente (Fig. 0.3). Estos dos genes trabajan juntos para regular la activación o represión transcripcional de los genes de la SaPI. La proteína Stl es el represor maestro de las SaPI, uniéndose a la región promotora situada entre los genes *stl* y *str* con el fin de inhibir la transcripción tanto de *str* como del resto de genes de la isla. Esta represión mediada por Stl bloquea la escisión y la replicación de las SaPI, manteniendo la integración de los elementos en un estado inactivo dentro del cromosoma bacteriano.

iii) Módulo de replicación: donde podemos encontrar fusionados los genes *pri* y *rep*. Mientras que el gen *pri* codifica para una primasa que aumenta replicación de la isla, el gen *rep* codifica para una proteína que ejercería como helicasa al unirse a las regiones ricas A-T del origen de replicación, similar a otros tipos de iniciadores específicos de replicon (Novick, 2010; Ubeda *et al.*, 2007a).

iv) Módulo de empaquetamiento: el cual codifica para proteínas que inhiben o reconducen el empaquetamiento del fago interviniendo en su ciclo biológico (Fig. 0.2; Fig. 0.3). Por ejemplo, la proteína Ppi, la cual bloquea la interacción de la subunidad pequeña de la terminasa (TerS) codificada por fagos sin afectar a la codificada por la SaPI (Baharoglu and Mazel, 2014; Ubeda *et al.*, 2007b). Además, otras proteínas como CpmA y CpmB redirigen el ensamblaje de las procápsides del fago auxiliar para producir cápsides más pequeñas que son biológicamente viables para almacenar el genoma de la SaPI de menor tamaño, pero no el del fago auxiliar (Figura 0.2) (Tallent *et al.*, 2007; Tormo *et al.*, 2008).

v) Módulo de patogenicidad o genes accesorios: Estos genes accesorios se pueden encontrar a ambos extremos del genoma de la isla. Muchos de estos genes no se han analizado y su función se ha asignado en base a la homología en secuencia o por su localización. El número y la variedad de este módulo varía entre SaPIs confiriéndoles ventajas adaptativas. Los genes de este módulo pueden tener funciones como la resistencia a antibióticos o a infecciones de ciertos bacteriófagos, producción de *biofilms*, transportadores de acetilo o de hierro dependientes de ATP. A pesar de que muchos de estos genes presentan ortólogos en otros genomas, otros, como el que codifican para el superantígeno responsable del síndrome de shock tóxico TSST-1, se encuentran solo en las SaPIs (Novick *et al.*, 2010).

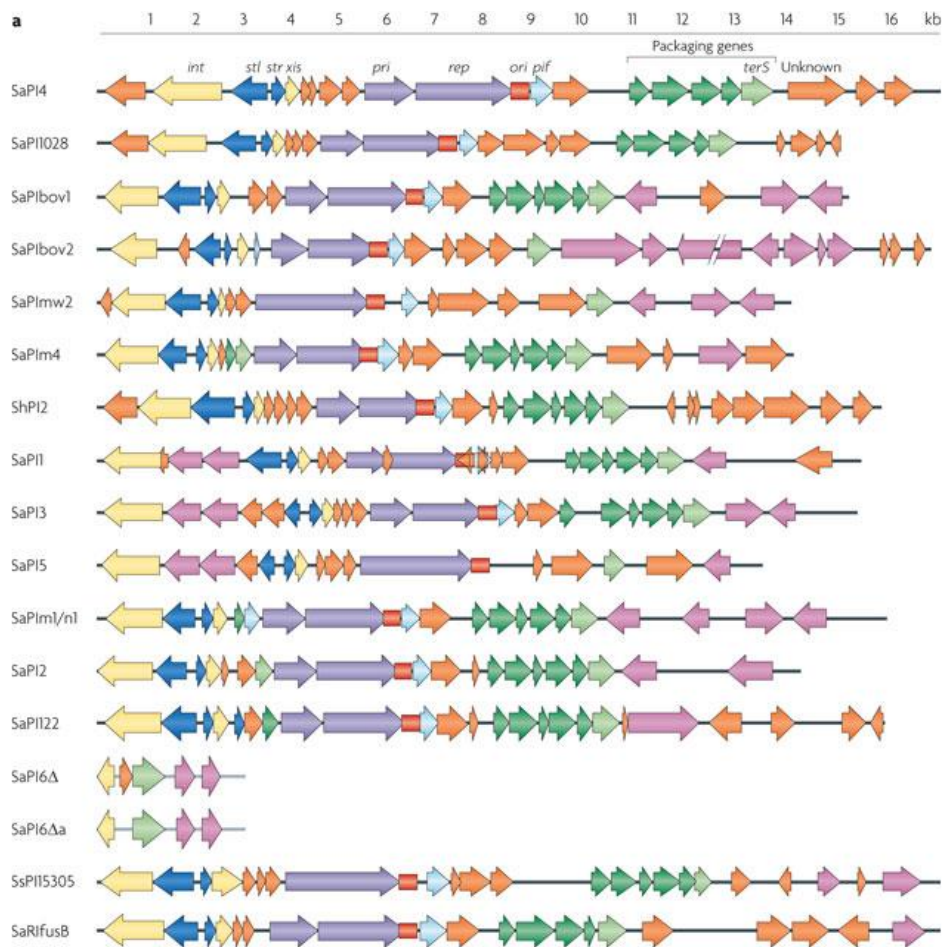


Figura 0.3. Alineación genética de diferentes SaPIs. La alineación presenta a los genes diferenciados por coloración en base a su secuencia y a la función de la proteína codificante: integrasas/escisionas (amarillo), reguladores de la transcripción (azul oscuro), pertenecientes al módulo de replicación (morado), secuencia ori (rojo), genes implicados en la encapsidación (verde), como *terS* (verde claro), genes del módulo de patogenicidad y genes accesorios (rosa) y genes codificantes para proteínas desconocidas (naranja) (tomada de Novick et al., 2010).

I3.1 Ciclo biológico de las SaPIs

Las SaPIs forman parte del genoma de la bacteria y se encuentran integradas de forma estable, comportándose de forma similar a los profagos. Para iniciar su ciclo biológico requiere de un fago auxiliar en ciclo lítico. El ciclo ERE de las SaPIs está regulado por la proteína StI, la cual, como se mencionó anteriormente, actúa como represor global de la replicación de la isla y está codificada en la misma por el gen *stI* mencionado.

Los represores presentes en los fagos lisogénicos son susceptibles a una respuesta SOS bacteriana para promover la de-represión e inducir el ciclo ERE, sin embargo, los represores StI requieren de una proteína inductora o de-represora codificada por el fago que, tras su unión con el represor, activa del ciclo de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2010). Esta unión se produciría de forma específica y provocaría la disociación del represor StI de su ADN diana en la isla, liberando la zona promotora de la misma y activando así la transcripción de los genes que actuarán en el ciclo ERE para la escisión, replicación y encapsidación de la isla (Tormo-Más *et al.*, 2010). No obstante, diferentes SaPI codifican diferentes represores StI con secuencias altamente divergentes (Fig. 0.6). Esto ha dado lugar a que los diferentes represores StI requieran diferentes proteínas inductoras codificadas por fagos. Como tal, dependiendo del StI codificado por la SaPI, se requieren diferentes proteínas inductoras para que se produzca la activación de la isla. Debido a que los diferentes fagos codifican varias proteínas que realizan la misma función, solo los fagos que codifican el inductor de SaPI apropiado para ese StI específico podrán activar la isla codificante. Este requerimiento de una proteína fágica para inducir el ciclo biológico de la SaPI hace que ambos ciclos, el de la isla y el ciclo lítico del fago, se sincronicen temporal y secuencialmente. Así pues, tras comenzar el ciclo lítico del fago y una vez se expresa la proteína inductora capaz de interactuar con el represor StI de la isla, se provoca el comienzo del ciclo ERE de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2010; Lindsay *et al.*, 1998). Sin este mecanismo la transferencia de las SaPIs se vería gravemente

afectada ya que éstas no expresan la totalidad de la maquinaria para su transferencia, utilizando proteínas codificadas por los fagos auxiliares para poder transducirse (Novick *et al.*, 2010).

Uno de los ejemplos en este parasitismo que ejerce la SaPI sobre la maquinaria del fago sería el uso de las proteínas encargadas en la encapsidación del ADN. Como se ha descrito en el módulo de empaquetamiento de las SaPIs, éstas no codifican proteínas estructurales para la formación de viriones, sino que utilizan las proteínas estructurales de los fagos auxiliares para formar cápsides para el empaquetamiento de los genomas de SaPI (Tormo *et al.*, 2008; Úbeda *et al.*, 2007a). Sin embargo, las islas de patogenicidad sí codifican dos grupos de proteínas para mediar en este proceso. El primer grupo codifica la proteína Ppi (interferencia de empaquetamiento de fagos). Ppi bloquea la interacción de la subunidad pequeña de la terminasa, TerS, codificada por fagos, pero no afecta la TerS codificada por la SaPI. Esto asegura un empaquetamiento que aventajaría a la SaPI priorizando el empaquetamiento de su ADN en lugar del del fago, lo que conduce a unas altas frecuencias de transferencia y, en última instancia, interfiere con el ciclo de vida del fago auxiliar (Ram *et al.*, 2012). Además, la mayoría de las SaPI también contienen un "operón I" que comprende genes morfogénicos y de interferencia relacionados con el empaquetamiento (Úbeda *et al.*, 2007b). El operón I está controlado por un promotor dependiente de LexA, que dirige la expresión de este grupo de genes (Úbeda *et al.*, 2007b). Dentro del operón I, las SaPIs codifican la subunidad pequeña de su terminasa (TerS). Esta proteína forma complejos con la subunidad grande codificada por el fago, TerL, para reconocer y escindir la secuencia *pac* específica codificada por la SaPI (Úbeda *et al.*, 2007). Las secuencias *pac* son regiones del ADN del fago las cuales, una vez escindidas, actúan como iniciadoras del empaquetamiento del material genético dentro de las cápsides mediante la formación de concatómeros. Además, el operón I también codifica las proteínas CpmA y CpmB, que redirigen el ensamblaje de las procápsides del fago auxiliar para producir cápsides más

pequeñas que solo son viables para los genomas de las SaPI (Figura 0.2) (Tormo *et al.*, 2008). Debido a que los genomas de las SaPIs son más pequeños que los de los fagos auxiliares, cualquier fago empaquetado en estas pequeñas cápsides carecería de genes esenciales y no sería funcional.

Por último, tras la lisis de la bacteria provocada por el fago, se liberan tanto a las cápsides contenedoras del material genético del fago como el de las SaPIs. Cuando estas partículas víricas infectan a una nueva célula, el material genético de la SaPI se inyecta al interior de la bacteria, lo que permite o bien entrar en un nuevo ciclo ERE si la bacteria es infectada al mismo tiempo por un fago auxiliar o, en caso contrario, integrarse en el genoma bacteriano (Novick *et al.*, 2010).

13.2 Inducción y de-represión de las SaPIs

Como se ha mencionado, las SaPIs residen de manera estable en el cromosoma bacteriano bajo el control del represor maestro, Stl. Mientras que Stl permanece unido a los promotores divergentes de *stl* y *str* en las regiones intergénicas de estos dos genes, la transcripción del genoma de SaPI se reprime (Fig. 0.4).

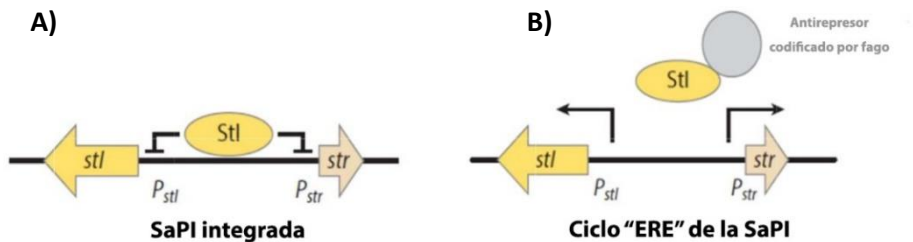


Figura 0.4. Módulo y control transcripcional de las SaPI. (A) La SaPI está integrada de manera estable y mantenida por el represor maestro Stl, el cual silencia la expresión de los genes de la isla. (B) Inducción del ciclo de la SaPI debido a la interacción de Stl con una de las proteínas anti-represoras del fago, liberando así los dos promotores (*P_{stl}* y *P_{str}*). Adaptado de Penadés y Christie, 2015.

A diferencia del represor de fagos que experimenta la autólisis una vez que se ha activado la respuesta SOS bacteriana, la SaPI con StI requiere de una interacción con una proteína inductora codificada por fagos para iniciar la de-represión de la isla (Tormo-Más *et al.*, 2010; Tormo-Más *et al.*, 2013; Leveles *et al.*, 2013). Estas moléculas inductoras son proteínas con funciones específicas para el fago, pero presentaría una actividad alternativa o *moonlighting* al funcionar como de-represores de la isla activando su ciclo. Estas proteínas fágicas se unen a StI formando un complejo que disocia al represor del ADN intergénico permitiendo, en este punto, que los genes de la SaPI se puedan expresar para el inicio del ciclo ERE (Fig. 0.4).

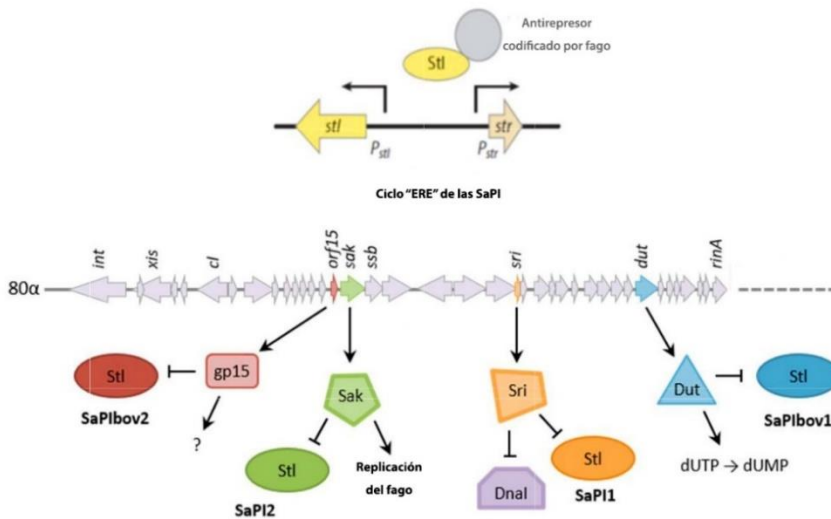


Figura 0.5 Inducción de las SaPI por un fago auxiliar. Un fago alberga en su genoma diferentes proteínas de-represoras. La interacción de una de ellas con los StI de las islas lleva a la de-represión de ambos promotores *PstI* y *Pstr*, iniciando el ciclo "ERE". Diferentes proteínas moonlighting actúan como anti-represores. Las localizaciones en el genoma de dichas proteínas anti-represoras están representadas en la figura. Cada una de estas proteínas tiene un represor StI diana distinto codificados por SaPIs distintas. Sus funciones conocidas están indicadas: *Gp15* (desconocida), *Sak* (recombinasa), *Sri* (proteína de unión a *DnaI*), *Dut* (*dUTP*asa). Adaptada de Penadés and Christie, 2015.

Si atendemos a los represores StI codificados por diferentes SaPIs podemos observar que presentan secuencias divergentes, lo que podría indicar que las proteínas fágicas que reconocen para formar el complejo de de-represión y la consiguiente la liberación del ADN es diferente. Elegantes análisis han confirmado este hecho (Fig. 0.4 y Fig. 0.5) (Tormo-Más *et al.*, 2010).

La variación en las proteínas fágicas inductoras de las SaPIs indica una presión evolutiva para escapar de su actividad *moonlighting* al activar el ciclo de la isla. La inducción de las SaPIs es dañina para el fago, ya que le obliga a generar niveles reducidos de transferencia al tener cápsides ocupadas por el material genético que ha replicado la isla (Ram *et al.*, 2012). Como tal, los fagos se han esforzado continuamente por escapar de la inducción de SaPI a través del intercambio o mutación de los inductores, con la selección de nuevas variaciones que presenten una baja afinidad hacia el represor StI, aunque manteniendo su actividad para el fago (Frígols *et al.*, 2015). De hecho, se ha descrito que los fagos reducen la expresión de los inductores de las SaPIs para evitar la interferencia perjudicial que supone la activación del ciclo de la isla (Tormo-Más *et al.*, 2010; Frígols *et al.*, 2015). De esta manera, la evolución de StI para unir estas proteínas fágicas con actividad *moonlighting* ha impulsado la evolución del propio fago estafilocócico para escapar de ella. Esto ha desafiado al StI a superar tales mecanismos de escape. La existencia de múltiples alelos de las proteínas inductoras apoya la alta tasa de mutación de la mismas para escapar de la presión que el represor de la isla ejerce. Sin embargo, los represores StI han evolucionado conjuntamente para poder reconocer todas estas variantes, seleccionando así el tipo de fago que más convenga a la isla. Esto explica de alguna manera la gran divergencia tanto en secuencia y tamaño observada entre los represores StI codificados por diferentes islas (Fig. 0.6). De esta manera, estos EGM están atrapados en una continua carrera de armamento co-evolutivo.

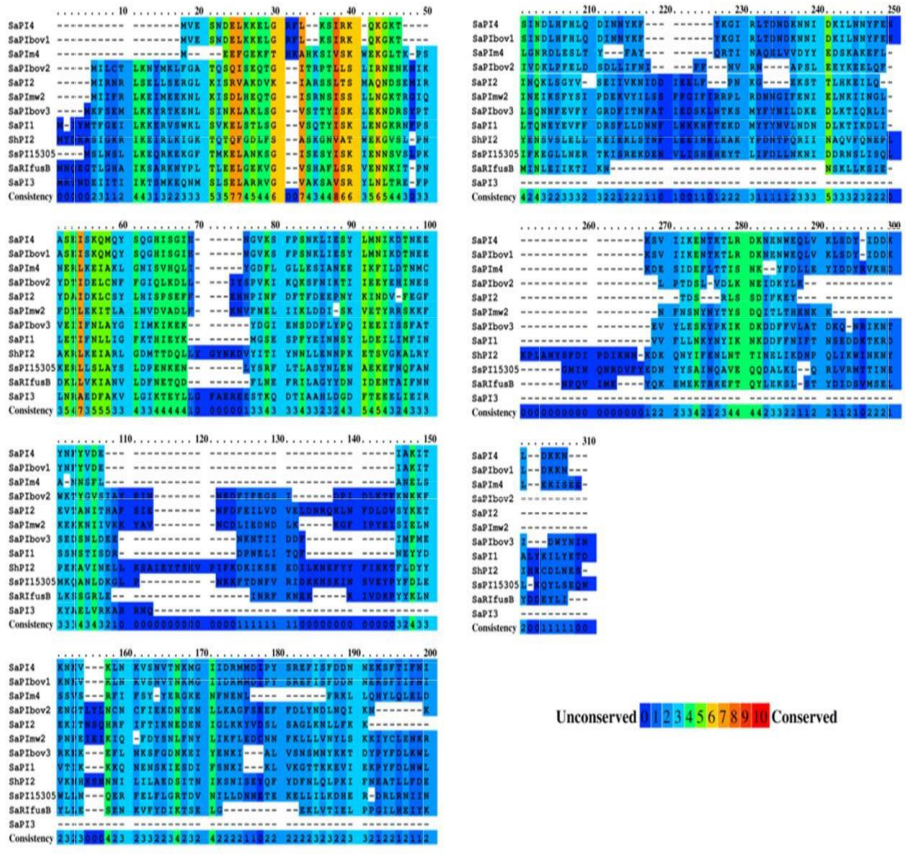


Figura 0.6. Alineamiento de secuencia de doce represores *Stl* procedentes de islas de patogenicidad estafilocócicas distintas. (*SaPI4*, *SaPIbov1*, *SaPIbov2*, *SaPIw2*, *SaPIbov3*, *SaPIw4*, *ShPI2*, *SaPI1*, *SaPI3*, *SaPI2*, *SsPI5305*, *SaRIfusB*). Los colores indican la conservación relativa de la secuencia por aminoácido, siendo el color rojo el indicador del más conservado y el azul el que menos. Figura adaptada del alineamiento realizado por PRALINE (Simossis y Heringa, 2003; 2005).

Por ello, un fago puede inducir a diferentes SaPIs, al codificar para múltiples inductores. Por el contrario, otros fagos no codifican ninguna proteína inductora y, por consiguiente, probablemente no son capaces de activar el ciclo de ninguna SaPI conocida. Por ejemplo, el fago $\phi 80\alpha$ induce SaPIbov1, SaPIbov2, SaPIbov5, SaPI11 y SaPI2, lo que indica que codifica múltiples inductores de SaPI (Chen *et al.*, 2014; Maiques *et al.*, 2007; Ruzin *et al.*, 2001; Christie *et al.*, 2010; Quiles-Puchalt *et al.*, 2014). Por otro lado, el fago $\phi 80$ solo induce SaPIbov1 y SaPI2 (Christie *et al.*, 2010).

Trabajos realizados con mutantes en el fago $\phi 80\alpha$ con diferentes inactivaciones genéticas han mostrado que este fago es capaz de activar el ciclo de diferentes SaPIs (SaPI11, SaPIbov1 y SaPIbov2) a través de tres proteínas fágica codificadas por el fago (la proteína Sri, una proteína desconocida codificada por el gen *orf15* y la *dUTPasa* codificada por el fago, respectivamente) (Tabla 0.3) (Tormo-Más *et al.*, 2010).

Tabla 0.3. Ensayos mutacionales sobre proteínas inductoras de la movilidad de diferentes SaPIs. Representados los valores de partículas víricas obtenidas en un ensayo de titulación a partir de lisados de cepas no lisogénica de *S. aureus* RN4220, portadoras de cada una de las SaPIs indicadas en la tabla. (adaptada de Tormo-Más *et al.*, 2010)

Fago	SaPIbov1		SaPIbov2		SaPI11	
	Título isla	Título Fago	Título isla	Título Fago	Título isla	Título Fago
$\phi 80$ wt	$4,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$6,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
$\phi 80 \Delta dut$	$8,3 \times 10^2$	$4,4 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^8$	$9,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
$\phi 80 \Delta sri$	$5,3 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	$3,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^{10}$
$\phi 80 \Delta orf15$	$3,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$5,4 \times 10^3$	$3,0 \times 10^9$	$4,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$
$\phi 11$ wt	$1,8 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$	ND	ND	ND	ND
$\phi 11 \Delta dut$	$9,2 \times 10^2$	$9,4 \times 10^8$	ND	ND	ND	ND

ND: no determinado

El hecho de que las dUTPasas sean enzimas ubicuas y que hayan sido comparadas con las proteínas G eucariotas debido a su mecanismo de utilizar el dUTP como un segundo mensajero llevó a la profundización del mecanismo molecular que se desarrolla en esta tesis.

14. dUTPasas. Enzimas con funciones *moonlighting*

Como se ha mencionado, diferentes represores StI de SaPIs requieren diferentes proteínas de fago específicas para la de-represión de la isla. En el caso del represor StI de SaPI_{bov1} y SaPI_{bov5}, siendo el mismo represor, esta proteína inductora se trata de una dUTPasa (Tormo-Más *et al.*, 2010). La definición clásica de las dUTPasas las clasifica como enzimas ubicuas que regulan los niveles celulares de dUTP para prevenir la incorporación errónea de uracilo en el ADN (Vértessy & Tóth, 2009). Sin embargo, más recientemente, las dUTPasas (Duts) se han implicado en una variedad de procesos celulares, incluida la regulación del sistema inmunológico y la apoptosis (Ariza *et al.*, 2009; Leang *et al.*, 2011; Madrid *et al.*, 2012; Ariza & Williams, 2011; Chu *et al.*, 1996). Además, como proteínas inductoras del ciclo de SaPIs, las Duts de fagos estafilocócicos controlan la transferencia de EGM (Tormo-Más *et al.*, 2013; Leveles *et al.*, 2013; Penadés *et al.*, 2013).

14.1 dUTPasas: función enzimática

Una de las principales diferencias químicas entre el ADN y el ARN es el intercambio de nucleótido de timina (ADN) a uracilo (ARN). La única diferencia entre el uracilo y la timina es un grupo 5-metilo encontrado en la timina (Figura 0.7). A pesar del intercambio de base nitrogenada, la región donde se encuentra este grupo 5-metilo no está involucrada en la interacción con la base complementaria, la adenina, por lo que el emparejamiento de bases de Watson-Crick ocurre de la misma manera tanto para el uracilo como para la timina.

La mayoría de las ADN polimerasas no distinguen entre uracilo y timina e incorporan indistintamente cualquiera de las bases en función de la proporción de nucleótidos disponibles dentro de la reserva celular.

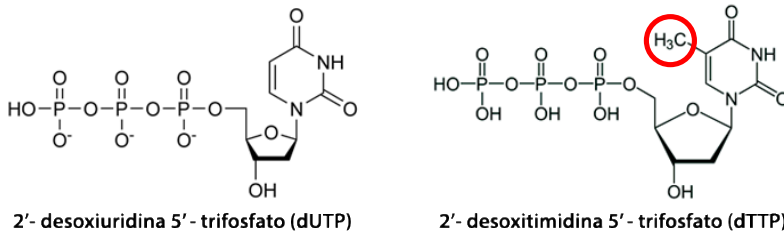


Figura 0.7. Ilustración de la composición química del dTTP y dUTP. Resaltado el grupo metilo (círculo rojo) presente en el carbono 5 de la base nitrogenada de la timidina que diferencia el dTTP del dUTP.

Además de la incorporación errónea de uracilo por timina, otro de los mecanismos que dan como resultado este tipo de desajuste mutagénico es la desaminación de la citosina, provocando el par U:G (Krokan & Slupphaug, 2002). De cualquiera de las maneras, la incorporación de uracilo puede llevar a una mutación. Por ello, las células incorporan un mecanismo con el fin de corregir la presencia del uracilo en el ADN conocido como la ruta reparadora por escisión de base (BER, *base excision repair*) que requiere el uso de una ADN polimerasa. (Fig. 0.8). No obstante, y a pesar de este mecanismo, si hay una alta relación dUTP/dTTP la enzima reincorporará el uracilo en el ADN durante el proceso de reparación por BER. Esto desencadena a un evento de BER hiperactivo que produce roturas en del ADN de doble cadena, la fragmentación del cromosoma y acaba en la muerte celular

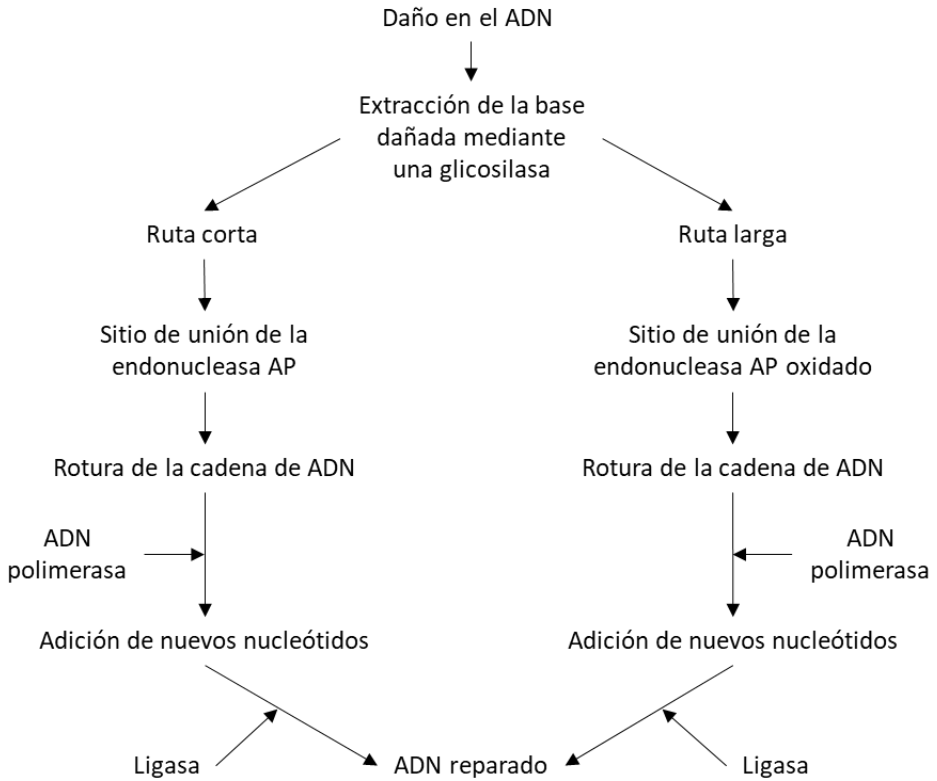


Figura 0.8. Representación esquemática del ciclo de reparación por escisión. Diagrama esquemático de la vía de reparación por escisión de bases (BER) para la reparación del ADN a lo largo del ciclo celular. El ciclo BER se inicia por el reconocimiento de basas específicas dañadas o inapropiadas dentro de la cadena de ADN por unas enzimas llamadas ADN glicosilasas (que en el caso de la inserción de uracilo intervendría la uracil-ADN glicosilasa). Estas enzimas forman sitios AP (abasicos) que son escindidos por una AP endonucleasa. La ruptura deja a la cadena de ADN con una sola hebra, la cual puede procesarse mediante el ciclo BER de ya sea por la ruta corta o larga.

Sin embargo, algunos estudios han cuestionado la suposición de que toda la incorporación de uracilo al ADN es negativa. Por ejemplo, en respuesta a un ataque, los linfocitos B periféricos pueden cambiar su afinidad e isotipo de anticuerpos mutando somáticamente su ADN genómico, manipulando las vías de reparación del ADN para que los desoxiuracilos no se reparen fielmente para favorecer la generación de diversos anticuerpos (Maul and Gearhart, 2010). En el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el ADN generado después de la infección de las células inmunitarias primarias está altamente uracilado para proteger el ADN viral de la autointegración suicida (Yan *et al.*, 2011). Además, la investigación sobre modelos de *Drosophila* encontró que este organismo puede tolerar la acumulación de uracilo en el ADN y tener un papel importante para su metamorfosis (Muha *et al.*, 2012). No obstante, todos los organismos han desarrollado una batería de enzimas que mantienen la reserva celular de dUTP bajo, donde destacan las dUTPasas. Éstas, en su papel clásico, catalizan la escisión de dUTP a dUMP (Fig. 0.9). Esto realiza dos funciones, previniendo la acumulación de dUTP en la célula y produciendo dUMP, que es el precursor de la síntesis de dTMP (Fig. 0.10) (Vértessy and Tóth, 2009). La creación de dUMP por las Duts es particularmente importante para *Enterobacteria*, *Mycobacteria* y *Plasmodia*, ya que las dCMP desaminasas no están presentes para proporcionar la entrada directa en la vía de síntesis de timidina como en otros organismos (Fig. 0.10) (Vértessy and Tóth, 2009; O'Donovan *et al.*, 1971; el-Hajj *et al.*, 1988). Las eliminaciones del gen de la dUTPasa son letales en *E. coli* y levadura, y se ha asumido que casi todos los organismos de vida libre y algunos virus tienen una Dut codificada en su genoma (el-Hajj *et al.*, 1988; Baldo and McClure, 1999).

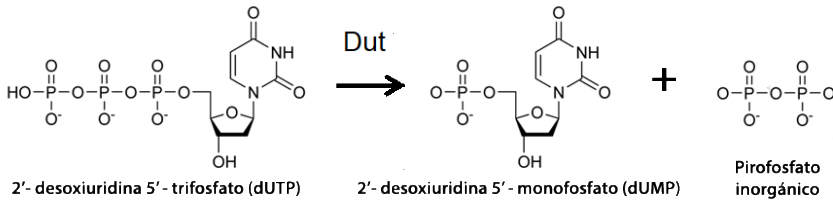


Figura 0.9. Ilustración de la catálisis producida por las dUTPasas. La reacción de catálisis descompone el dUTP en dUMP y pirofosfato (PPi) en un único paso.

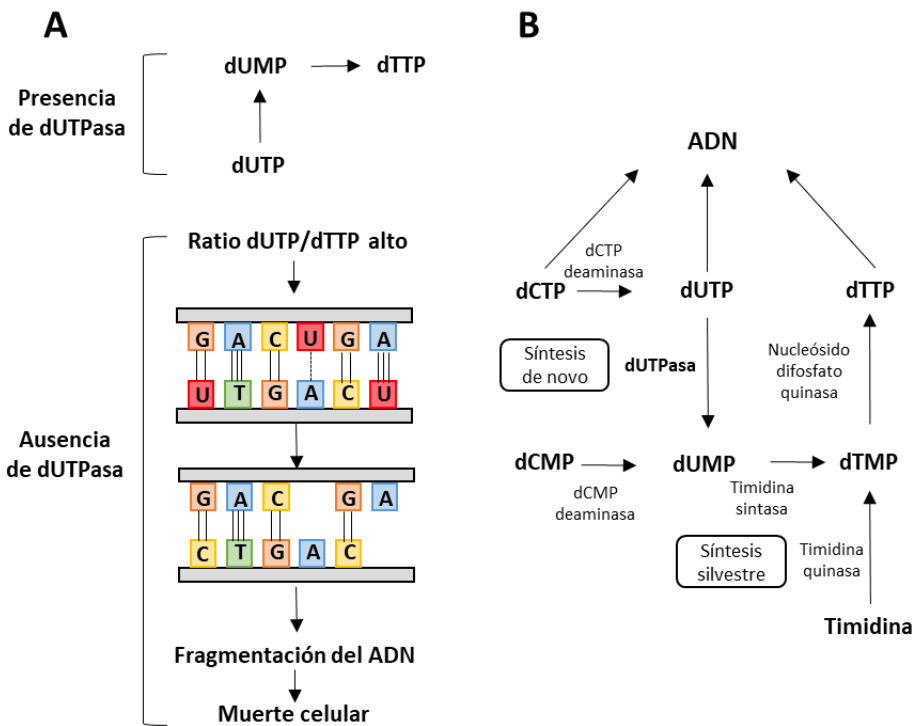


Figure 0.10. El rol enzimático clásico de las dUTPasas. (A) Rol de las dUTPasas. En ausencia de dUTPasa el ratio dUTP/dTTP es alto ya que el dUTP no se hidroliza y por lo tanto no proporciona el precursor del dTTP. Por lo tanto, durante el ciclo BER, el uracilo seguirá incorporándose en el ADN en lugar de la timina y provocando finalmente la muerte celular. En el caso de la citosina, la deaminación puede corregir este fallo. (B) Ruta de novo y silvestre para la biosíntesis del dTTP. Las enzimas dCMP deaminasa y timidina quinasa no están presentes en *Enterobacteria*, *Mycobacteria* y *Plasmodia*.

I4.2 Clasificación de las dUTPasas

Las Duts se pueden clasificar en tres familias o tipos diferentes en función de su estado de oligomerización. Como tales, las dUTPasas pueden ser enzimas monoméricas, homodiméricas u homotriméricas (Fig. 0.11). Dado el papel crítico de las dUTPasas en el metabolismo celular, no es sorprendente que su presencia sea esencial para la supervivencia tanto de células procariotas, como *Escherichia coli*, como de células eucariotas, como *Saccharomyces cerevisiae*. La enzima también se ha identificado en *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, tripanosoma y células humanas, así como en varios grupos de retrovirus e incluso algunos bacteriófagos.

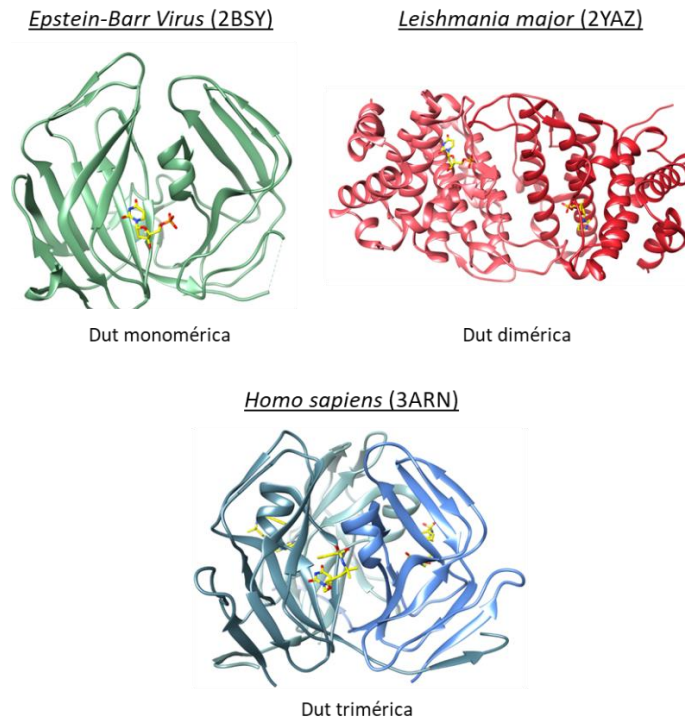


Figura 0.11 Tipos de Dut. Se muestra la representación de las estructuras de Duts monoméricas (*EBV*, 2BSY), diméricas (*L. major*) y triméricas (*H. sapiens*) junto al sustrato representado en “sticks” amarillos.

I4.2.1 dUTPasas diméricas

Estructuralmente, las Duts diméricas están formadas completamente por hélices α , las cuales se dividen en dos subunidades idénticas. El número hélices α en las Duts diméricas es variable, (12 en *T. cruzi*, 11 en *C. jejuni* y 10 en *L. major*) pero guardan un núcleo estructural conservado donde se ubican 5 motivos conservados que conforman el centro activo de la enzima (Fig. 0.12 y 0.13) (Harkiolaki *et al.*, 2004; Moroz *et al.*, 2004), aunque estos son totalmente diferentes a los que presentaban las Duts triméricas y monoméricas (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Para cada subunidad, las hélices α se distribuyen en un dominio rígido y un dominio móvil. El dominio rígido media la dimerización de las subunidades formando el núcleo del dímero. Este dominio, como su propio nombre indica, mantiene una posición invariante e independiente de la unión del ligando o la catálisis. Por otro lado, el dominio móvil sufre cambios conformacionales para acomodar el sustrato en el centro activo de manera correcta (Fig. 0.14) (Harkiolaki *et al.*, 2004).

En las Duts diméricas, cada centro activo está formado por residuos pertenecientes mayoritariamente a una subunidad, pero se complementa con residuos pertenecientes al lazo de la subunidad contigua del dímero. En estado *apo* la enzima presenta una conformación relajada o abierta en la que los dos centros activos están completamente expuestos al solvente y los dominios móviles del dímero se localizan en posiciones distales respecto al cuerpo del dímero (Fig. 0.14). En presencia de ligando la enzima presenta una conformación cerrada, más compacta, mediante cambios conformacionales que, como se ha comentado, involucran a las hélices α de los dominios móviles de cada uno de los monómeros, quienes sufren un desplazamiento de hasta 20 Å con el que se aproximan al dominio rígido acomodando al nucleótido (Fig. 0.14).

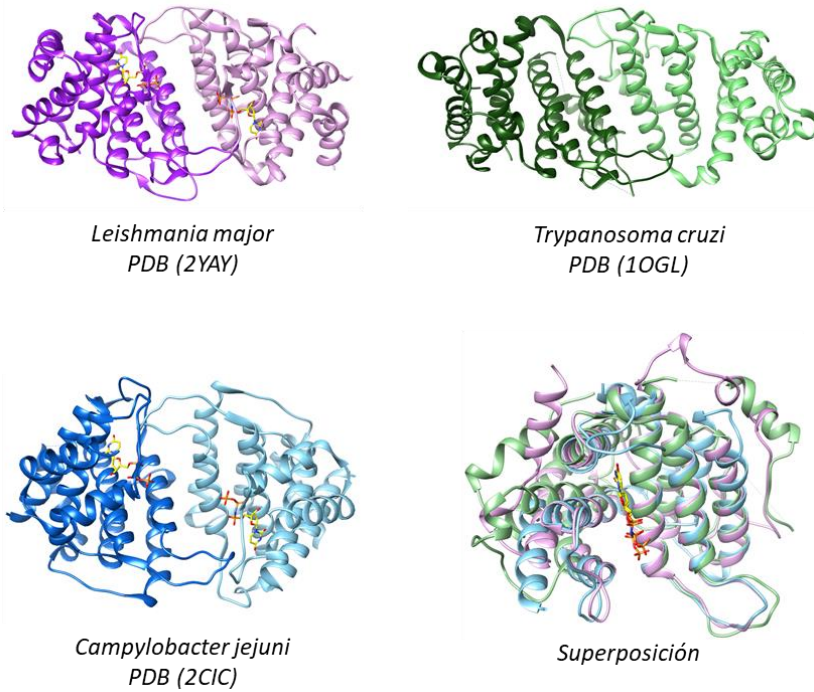


Figura 0.13. Representación estructural de de Duts diméricas de diferentes organismos. Se indica en la figura el organismo de procedencia de cada Dut así como el código de ascensión de la base de datos para cada una de ellas. Cada una de las proteínas está coloreada con un color diferente: *L. major* (tonos morados), *C. jejuni* (tonos azules) y *T. cruzi* (tonos verdes). Se muestra también una superposición de los monómeros de las tres Duts nombradas visto desde la superficie de dimerización donde se observa la conservación de su plegamiento.

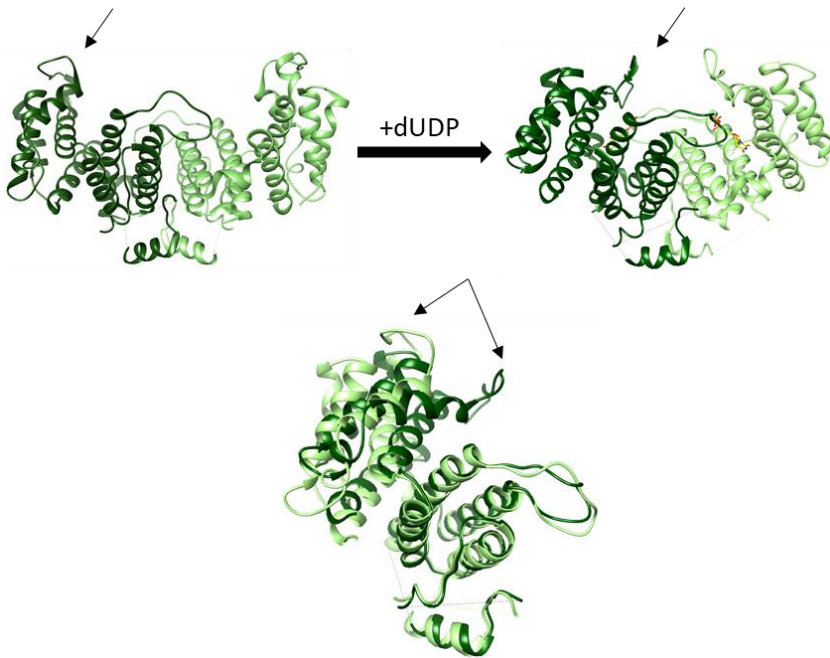


Figura 0.14. Cambios conformacionales asociados a la acción catalítica. En el panel superior está representado el cambio conformacional de la Dut de *Trypanosoma cruzi* (tonos verdes) pasando de la forma apo (PDB 1OGL) a la unida al ligando (PDB 1OGK). En el panel inferior, se muestra una superposición de los monómeros de cada una de ellas (apo; verde claro /con dUDP; verde oscuro). Observese el cambio conformacional que provoca la unión del dUDP en las hélices α de cada uno de los dominios móviles (señalado con flechas negras).

I4.2.2 dUTPasas triméricas

Al igual que las Duts diméricas, las Duts triméricas contienen cinco motivos conservados que constituyen el centro activo de la enzima. Estos motivos se distribuyen por toda la secuencia (Fig. 0.15). Los primeros cuatro motivos están situados en el *core* de la molécula en todas las estructuras conocidas (motivos I-IV), sin embargo, el motivo V conservado a menudo está desordenado y, a veces, solo se observa cuando un análogo no hidrolizable del dUTP está presente en el centro activo (Varga *et al.*, 2007; Vértessy *et al.*, 1998). El motivo V de las Duts triméricas comparte algunas características con los *P-loops* presentes en muchas familias de enzimas ATPasa y GTPasa, conocidas como *P-loop* NTPasas (Pecsi *et al.*, 2011). Este *P-loop* corresponde a la región C-terminal de cada uno de los protómeros de la molécula y es necesario para la discriminación del sustrato y la hidrólisis de dUTP, ya que el motivo V flexible sufre un cambio conformacional para cubrir el sitio activo después de la unión del ligando (Fig. 0.16) (Pecsi *et al.*, 2011; Freeman *et al.*, 2009).

Todas las Duts homotriméricas muestran una estructura terciaria muy conservada. Como su nombre indica, cada una de ellas está formada por tres monómeros idénticos. El cuerpo central de cada uno de los monómeros lo componen nueve hojas β que se asocian en dos láminas β formando una estructura similar a la de un barril. El cuerpo central se complementa con dos hojas β anti-paralelas que se sitúan separadas del barril, una sola hélice α compuesta por 4-7 aminoácidos, y un largo extremo C-terminal donde se encontraría el *P-loop* (Fig. 0.17) (Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1992).

<u>DutEcoli</u>	MMKKIDVKILDPRVGKEFPLPTATSGS AGLDL RACLNDAVELAPGDTTLVPTGLAIHIA	60
<u>DutHuman</u>	--MQLRFAR----LSEHATAFTRGSARA AGYDL YSA--YDYTIIPPMEKAVVKTDIQIALP	52
<u>Dut#11</u>	MTNTLQVRL----LSENARMPERNHKTD AGYDI FSA--ETVVLEPQEKAVIKTDVAVSIP	54
<u>Dut80α</u>	MTNTLQVKL----LSKNARMPERNHKTD AGYDI FSA--ETVVLEPQEKAVIKTDVAVSIP	54
	: . :.. * ** * : : : * : : : : * : : :	
<u>DutEcoli</u>	DPSLAAMML PRSG LGHKHGIVLGNLV GLIDSDYQ QLMISVWNRG-----	105
<u>DutHuman</u>	SG-CYGRVAP PRSG LAAKHFDVG-- AGVIDEDYRGN VGVVLFNFG-----	94
<u>Dut#11</u>	EG-YVGLLT SRSG VSSKTHLVIE-- TGKIDAGYHGN LGINIKND AIASNGY-ITPGVF DI	110
<u>Dut80α</u>	EG-YVGLLT SRSG VSSKTHLVIE-- TGKIDAGYHGN LGINIKND HEDDKMQTI FLRNIDN	111
	. : ***. * : : . * ** .* : : : * :	
<u>DutEcoli</u>	-----QDSFTIQPG ERIAQ MI FVPVVQAEFNLVEDFDA-TD RGGGGFGH SGRQ	152
<u>DutHuman</u>	-----KEKFEVKKG DRIAQ LICERIFYPEIEEVQALDD-TER GGGGFG STGKN	141
<u>Dut#11</u>	KGEIDLSDAIRQY GTYQINEG DKLAQ LVIIVPIWIPPELKQVEEFESVSE RGEKGF SSGV-	169
<u>Dut80α</u>	EKIFEKERHLYKL GSYRIEK ERIAQ LVIIVPIWIPPELKQVEEFESVSE RGEKGF SSGV-	170
	. : : : * : : : * : : : : : * : : * : : : * : : * : : * : :	

Figura 0.15. Alineamiento de secuencia de Duts triméricas de diferentes organismos. Alineamiento de las Duts de procariotas (*E.coli*), eucariotas (humana) y Duts fágicas ($\phi 80\alpha$ y $\phi 11$). Los motivos conservados entre ellas están coloreados (motivo I, verde; motivo II, naranja; motivo III, azul; motivo IV, amarillo; motivo V, morado). Se representa y señala en rojo el motivo no conservado y específico de *Dut*, el motivo VI.

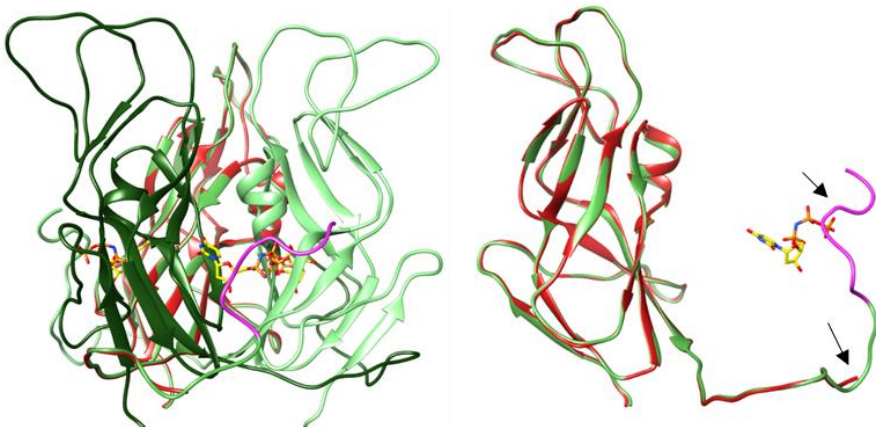


Figura 0.16. Cambio conformacional del motivo V en ausencia o presencia de ligando. (Izquierda) Se muestran las estructuras de la *Dut* trimérica del fago 80α en ausencia (monómero en rojo) o presencia (trímero en verde) del ligando, *dUTP*, representado en “sticks” (amarillo). El motivo V se encuentra desordenado en ausencia de ligando y no está presente en la estructura que carece del mismo, mientras que cuando el centro activo está ocupado el motivo V se posiciona sobre él (rosa). (Derecha) Representación monomérica del cambio conformacional del motivo V. Coloreado como en la figura izquierda.

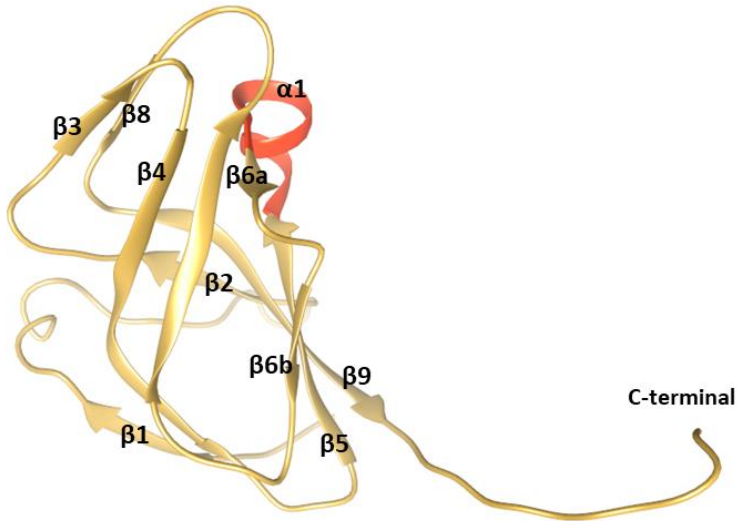


Figura 0.17. Representación de un monómero de la Dut homotrimérica de *E. coli*. (PDB 1EUW). (Izquierda) Estructura del monómero con los elementos estructurales resaltados en texto. Compuesto por nueve hojas β (amarillo) y una única hélice α (rojo) que forman el cuerpo central desde el que se proyecta el P-loop del extremo C-terminal. Se señala el extremo C-terminal de la molécula.

Estas tres subunidades se asocian a lo largo de un eje central de simetría tipo 3 para originar el trímero que presenta una forma piramidal. Esta estructura es altamente estable gracias a las interacciones entre las tres subunidades a tres niveles: (i) los contactos entre subunidades adyacentes en la parte externa de la molécula (ii) interacciones a lo largo del eje de simetría e (iii) interacciones producidas por el extremo C-terminal en la base del cuerpo del trímero (Fig. 0.18) (Persson *et al.*, 2001).

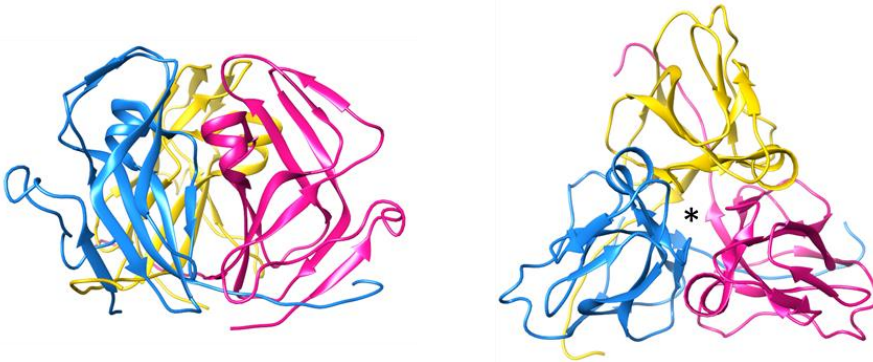


Figura 0.18. Estructura de la Dut trimérica de *E. coli*. Está formada por la interacción de tres monómeros idénticos (representados en amarillo, rosa y azul) que se agrupan formando un canal justo en el eje de simetría de la molécula (indicado con un asterisco negro). En la vista de la derecha se ha añadido transparencias a dos de los monómeros para la mejor visualización de los contactos a través de su recorrido por la base de la molécula.

A nivel de secuencia, las Duts triméricas contienen 5 motivos (I-V) altamente conservados donde se encuentran los residuos encargados del reconocimiento e hidrólisis del nucleótido (Figura 0.15) (McGeoch, 1990; Vértessy and Tóth, 2009). De estos 5 motivos, 4 son aportados por dos subunidades adyacentes: una subunidad aporta los motivos I, II y IV mientras que la segunda subunidad aporta el motivo III (Fig. 0.19). La tercera subunidad, que es la que se encuentra más distante del centro activo, aporta el motivo V que corresponde al *P-loop* del extremo C-terminal, el cual actúa a modo de tapadera cubriendo el centro activo (García-Nafría *et al.*, 2013; Vértessy *et al.*, 1998).

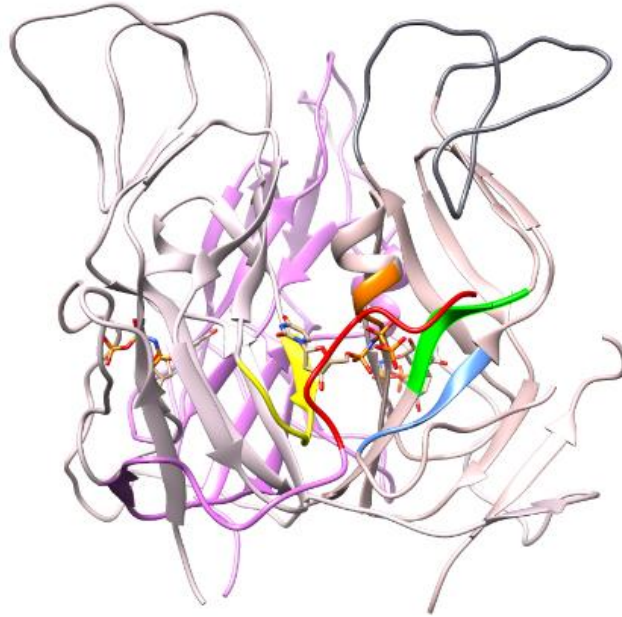


Figura 0.19. Participación de los motivos conservados de la Dnt trimérica del fago 80a en la hidrólisis. La estructura tridimensional muestra como los motivos I, II y IV (azul, naranja y verde, respectivamente) que intervienen en el centro activo provienen de uno de los monómeros del homotrímero, mientras que el motivo III (amarillo) y el motivo V (rojo) lo hacen de otros diferentes. El nucleótido situado en el centro activo se muestra en “sticks”.

Además, los aminoácidos que participan en la unión y en el proceso de hidrólisis del dUTP se encuentran altamente conservados entre especies (Barabás *et al.*, 2013; Vértessy and Tóth, 2009). La hidrólisis ocurre por un ataque nucleofílico de una molécula de agua coordinada por un aspártico conservado del motivo III y que se posiciona en línea al fosfato α del dUTP. Este aspártico catalítico actúa como base polarizando al agua que ataca al fosfato α (Barabás *et al.*, 2013; García-Nafriá *et al.*, 2013; Vértessy & Tóth, 2009). Durante la fase de unión del sustrato, el *P-loop* del extremo C-terminal se encuentra desordenado, permitiendo que el dUTP se acomode dentro del centro activo donde el ion magnesio le ayuda a disponer los fosfatos en una conformación catalíticamente competente. El cambio conformacional que presentaría esta enzima sería la correcta ordenación del motivo V, necesaria para el proceso de catálisis.

En este aspecto tanto las glicinas, ofreciendo flexibilidad, como la fenilalanina, o en su defecto una histidina, que queda situada sobre el anillo de uracilo presentes en este motivo, juegan un papel clave. Este motivo V, proveniente de un monómero diferente de la enzima, abrazaría el homotrímero y taparía el centro activo después de la unión del sustrato (García-Nafría *et al.*, 2013; Vértessy *et al.*, 1998; Vértessy & Tóth, 2009).

Además de los cinco motivos consenso, algunas Duts triméricas presentan un motivo extra, denominado motivo VI y del que hablaremos más adelante, el cual es variable tanto en secuencia, como en longitud y posicionamiento.

I4.2.3 dUTPasas monoméricas

Las Duts monoméricas se encuentran principalmente en los herpesvirus de aves y mamíferos (Ariza *et al.*, 2014). Estas Duts, al igual que las Duts triméricas con las que comparten cierta homología, contienen los cinco motivos consenso característicos que contribuyen a la formación del centro activo (Tarbouriech *et al.*, 2005). Sin embargo, y al contrario de las Duts triméricas, en las enzimas monoméricas los motivos se reorganizan y se extienden sobre un único polipéptido. Los pliegues estructurales de las Duts monoméricas imitan la estructura de una trimérica y, de hecho, el centro activo monomérico es casi idéntico al de la familia de las triméricas (Fig. 0.20). A pesar de que los dos primeros dominios adoptan una estructura muy similar al cuerpo central de los monómeros en Duts triméricas, el tercer dominio es completamente diferente y solamente existe una homología de secuencia en el extremo C-terminal con el motivo V de las Duts triméricas (Fig. 0.20) (Tarbouriech *et al.*, 2005). Por ello, la ubicación de los motivos consenso en la formación del centro activo es diferente a la observada en las Duts triméricas. En las Duts monoméricas, los motivos I, II y IV son aportados por uno de los dominios; el motivo III por el segundo dominio y el motivo V por el tercero de los dominios.

Todo esto puede indicar que las Duts monoméricas han evolucionado a partir de un gen que codifica una Dut trimérica como resultado del proceso de duplicación, reordenamiento y fusión de un gen progenitor que codificaba para una Dut trimérica (Baldo and McClure, 1999; Caradonna and Adamkiewicz, 1984; McGeehan *et al.*, 2001; McGeoch, 1990). De hecho, se ha identificado una nueva familia de Dut monoméricas que difiere de la de los herpesvirus. Las Duts monoméricas de *Drosophila virilis* y *Caenorhabditis elegans* se codifican mediante un gen *dut* que fusiona tres copias de una Dut monomérica en un solo polipéptido.

La existencia de estas diferentes formas de enzima Dut indica que están bajo presiones selectivas específicas de su entorno. Si su única función fuera el control de los niveles de dUTP, entonces esta divergencia en la estructura probablemente no sería necesaria. Esto se ve reforzado por la existencia de dominios adicionales en ciertos Duts que están involucrados en funciones no catalíticas.

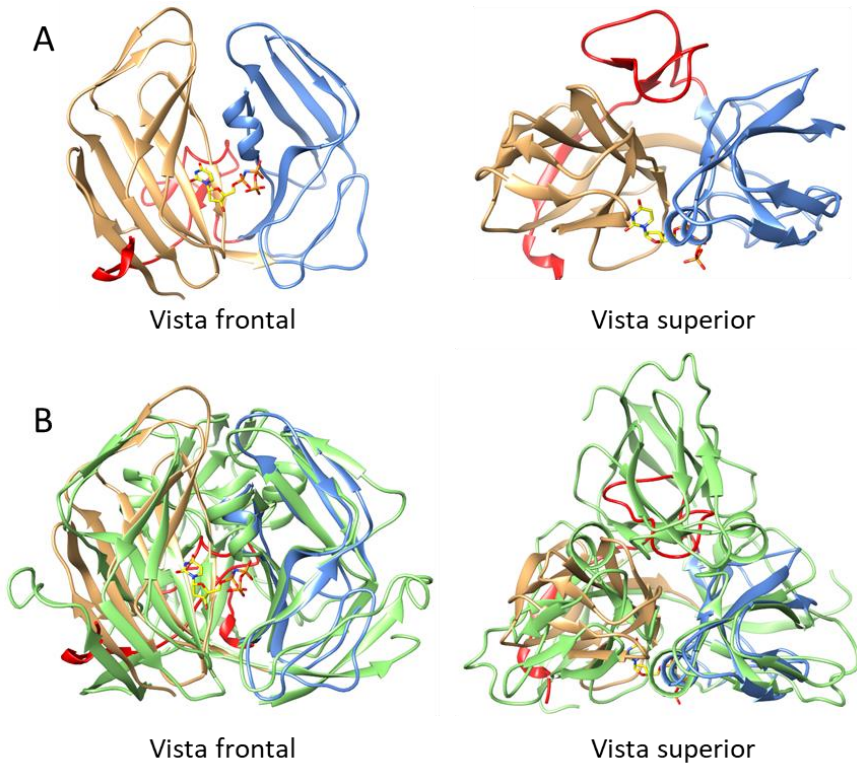


Figura 0.20. Estructura de la Dut del Epstein-Barr virus. (A) Vista frontal y superior de la Dut monomérica del Epstein-Barr virus (EBV) (PDB 2BT1) unida a dUPNPP (anillos en amarillo y fosfatos en naranja). La Dut del EBV está formada únicamente por un monómero (marrón claro) con un único centro activo compuesto por los tres dominios del monómero de la Dut del EBV (marrón claro, azul y rojo). Estos tres dominios emulan la estructura global de las Duts triméricas incluyendo los motivos que forman el único centro activo en esta familia de Duts. (B) Superposición de la Dut monomérica del EBV (colores anteriormente mencionados) y la Dut trimétrica de *E. coli* (PDB 1EUW) (verde). Nótese la impariedad de uno de los monómeros de la Dut de *E. coli* con uno de los motivos de la Dut del EBV (motivo señalado en rojo).

14.3 dUTPasas como proteínas *moonlighting*

14.3.1 Descripción y ejemplos de proteínas *moonlighting*

El *moonlighting* proteico es un fenómeno por el cual una proteína ancestral que poseía originalmente una única función, a través de la evolución ha adquirido funciones adicionales. Muchas de estas proteínas *moonlighting* son enzimas, receptores, canales iónicos o chaperonas. La función primaria más común de las proteínas *moonlighting* es la catálisis enzimática, pero estas enzimas han adquirido funciones secundarias no relacionadas. Algunos ejemplos de funciones secundarias a la catálisis incluyen la transducción de señales, la regulación transcripcional, la apoptosis, la motilidad y funciones estructurales. (Tabla 0.4).

Tabla 0.4. Ejemplos de proteínas moonlighting de diferentes organismos (adaptada de Huberts y van der Klei, 2010).

Reino	Proteína	Organismo	Función	
			Primaria	Secundaria
Animal	Aconitasa	<i>H. sapiens</i>	Ciclo TCA	Homeostasis del hierro
	ATF2	<i>H. sapiens</i>	Factor de transcripción	Respuesta a daños en ADN
	Claritina	<i>H. sapiens</i>	Tráfico de membrana	Estabilidad el huso mitótico
	Cristalinas	Varios	Estructural	Varias
	Citocromo c	Varios	Metabolismo energético	Apoptosis
	DLD	<i>H. sapiens</i>	Metabolismo energético	Proteasa
	ERK2	<i>H. sapiens</i>	MAP quinasa	Represor transcripcional
STAT3	<i>M. musculus</i>	Factor de transcripción	Cadena de transporte de electrones	
Planta	Hexoquinasa	<i>A. thaliana</i>	Metabolismo de glucosa	Control muerte celular
	Presenilina	<i>P. patens</i>	γ -secretasa	Citoesquelética
Hongos	Aconitasa	<i>S. cerevisiae</i>	Ciclo TCA	Estabilidad del ADNmt
	Aldolasa	<i>S. cerevisiae</i>	Glicólisis	Ensamblaje de V-ATPasas
	Enolasa	<i>S. cerevisiae</i>	Glicólisis	Importe de ARNt mitocondrial
	Galactoquinasa	<i>K. lactis</i>	Catabolismo de galactosa	Inductor de genes de galactosa
	Piruvato carboxilasa	<i>H. plumorpha</i>	Enzima anaplerótica	Ensamblaje de la alcohol oxidasa
Procariotas	Aconitasa	<i>M. tuberculosis</i>	Ciclo TCA	Proteina sensible al hierro
	Enolasa	<i>S. pneumoniae</i>	Glicólisis	Unión del plasminógeno
	Tiorredoxina	<i>E. coli</i>	Antioxidante	Subunidad de la T7 ADN polimerasa

Se han descrito ejemplos de proteínas *moonlighting* en todos los organismos desde plantas, levaduras, procariotas y animales (Tabla 0.4). Los primeros ejemplos de proteínas *moonlighting* se describieron a finales de la década de los 80, cuando Piatigorsky y Wistow (Piatigorsky and Wistow, 1989) reportaron que ciertas cristalinas, proteínas estructurales en la lente del ojo en vertebrados, eran en realidad enzimas previamente conocidas. Por ejemplo, la ϵ -cristalina de pato se trataba de la enzima lactato deshidrogenasa (Hendricks *et al.*, 1988), mientras que la τ -cristalina de tortuga era la enzima glucolítica α -enolasa (Wistow *et al.*, 1988). Otro ejemplo de proteína *moonlighting* es la proteína mitocondrial del espacio intermembrana, el citocromo c, que forma parte de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, tras su liberación en el citosol, la proteína juega un papel importante en la apoptosis. El citocromo c citosólico forma un complejo con el factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), generando el comienzo de una cascada de señalización que produce la muerte celular por apoptosis (Ow *et al.*, 2008). Las funciones redox y proapoptóticas del citocromo c son completamente independientes (Hao *et al.*, 2005; Kluck *et al.*, 2000). Es posible crear una variante del citocromo c mutante que funciona normalmente en la respiración, pero que no puede unirse a Apaf-1. Viceversa, el citocromo c no necesita tener una capacidad redox funcional para inducir una respuesta apoptótica. Por lo tanto, el citocromo c también tiene las características de una verdadera proteína *moonlighting*.

Un hecho que llama la atención en este sentido, es que muchas de las proteínas consideradas como *moonlighting* son enzimas ubicuas, es decir que están presentes en la mayoría de los organismos (Tabla 0.4) (Jeffery, 1999). Por lo tanto, es lógico pensar que esas funciones secundarias deberían haber surgido después de su su función más ancestral (su función primaria o canónica), la cual debería ser común en todos los organismos donde la proteína esté presente (Copley, 2012). A pesar de que la función canónica de una misma proteína en diferentes organismos esté conservada, las nuevas funciones *moonlighting* que

surgen a través de la evolución van a depender del organismo codificante y del entorno. Así pues, estas nuevas funciones serán características de especie, del tipo celular o del momento en el que se exprese, y estando por tanto sometidas a una mayor presión evolutiva.

La actividad *moonlighting* puede llevarse a cabo a través de las regiones o residuos responsables de la función principal o canónica de la proteína, pero también cabe la posibilidad de generarse a través de otras zonas de la proteína no relacionadas con la función principal.

A pesar de parecer algo ventajoso al sacar el doble de partido de una misma molécula, las funciones *moonlighting* son una espada de doble filo ya que se presenta una complejidad añadida al tener que regular no una sino varias funciones a diferentes niveles tanto en el espacio como en el tiempo, evitando que las nuevas funciones adquiridas interfieran con la función canónica de estas proteínas. Para ello, algunas de las estrategias que utilizan pueden ser (i) utilizar la proteína en diferentes localizaciones celulares (intra o extracelular, en orgánulos, ...); (ii) expresarla en diferentes tipos celulares (iii) el uso de ligandos o cofactores que puedan unirse a la proteína a través de un mismo o diferente sitio de unión o (iv) el estado oligomérico a través de la formación de homo o heterocomplejos (Fig. 0.22) (Jeffery, 1999). En la actualidad, se sugiere que la mayoría de las proteínas presentan un cierto potencial *moonlighting* y que dependiendo de modificaciones en zonas expuestas de su superficie o de la adquisición de motivos extras y del ambiente en el que se encuentre dicha proteína, estas nuevas funciones pueden quedarse fijadas (Huberts and van der Klei, 2010; Jeffery, 1999).

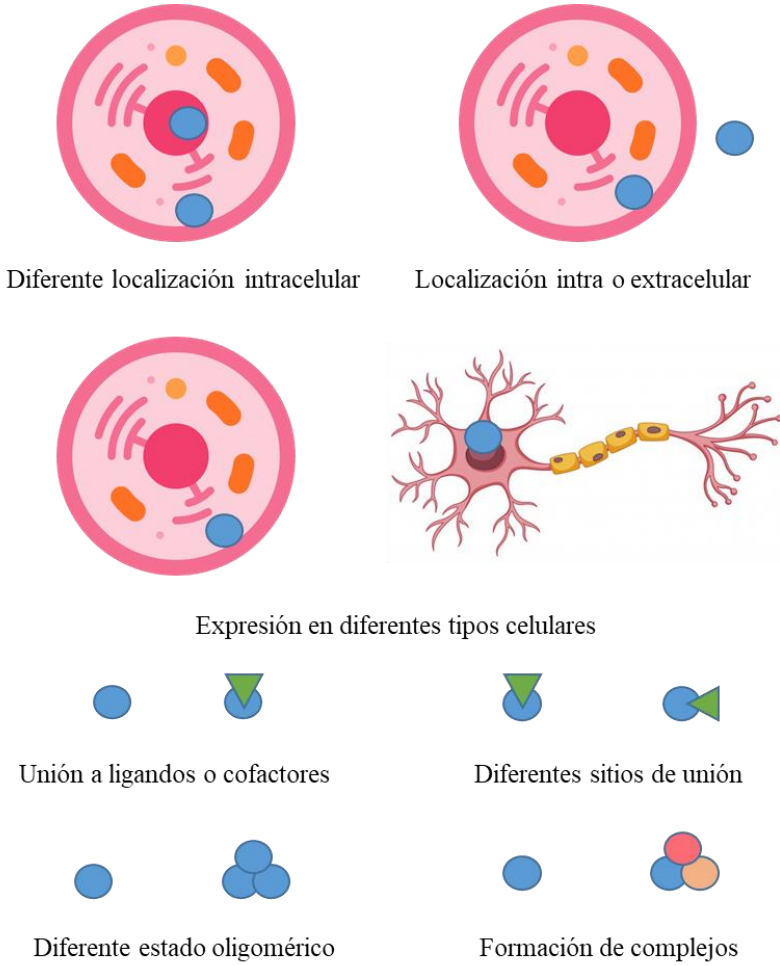


Figura 0.21. Estrategias de regulación de las diferentes funciones en una proteína moonlighting.

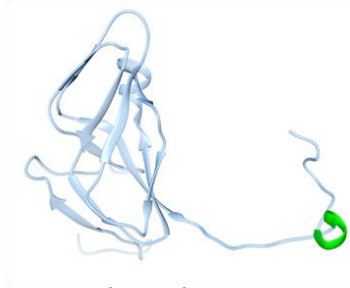
14.3.2 Las dUTPasas y sus roles *moonlighting*

Las diferencias entre la secuencia y el plegamiento de las dUTPasas indica que estas enzimas se encuentran bajo presiones selectivas específicas de su entorno. Si su única función fuera el control de los niveles de dUTP, esta divergencia probablemente no sería necesaria. Esto se ve reforzado por la existencia de dominios adicionales en ciertos Duts que están involucrados en funciones no catalíticas.

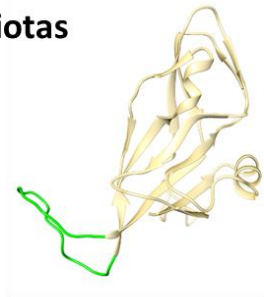
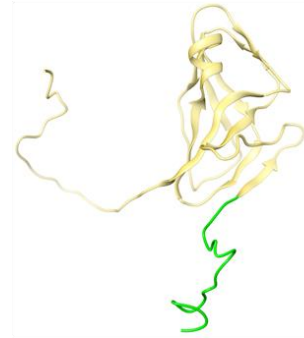
Como anticipábamos anteriormente, algunas Duts codifican un dominio adicional denominado motivo VI al estar fuera de los cinco dominios conservados necesarios para la función enzimática. Este motivo VI extra se encuentra en algunas Duts homotriméricas y su posición, longitud, secuencia y estructura varía en función del organismo que la expresa (Fig. 0.22). Por ejemplo, en la Dut de *Plasmodium falciparum* el motivo VI se encuentra en el extremo N-terminal, mientras que en *Mycobacterium tuberculosis* se encuentra en el C-terminal (Fig. 0.22) (Vértessy & Tóth, 2009; Chu *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2004). Por otro lado, en las Duts enterocócicas y las pertenecientes a fagos estafilocócicos se colocan en el centro (Fig. 0.22) (Tormo-Más *et al.*, 2013; Leveles *et al.*, 2013).

Estos dominios adicionales han sido implicados en funciones secundarias o adicionales a la canónica y han propuesto a las Duts como moléculas señalizadoras. Por ejemplo, se ha demostrado que la Dut de rata (*Rattus*), a través del motivo VI y su extremo C-terminal, interactúa con el factor transcripcional PPAR α para reprimir la activación transcripcional mediada por PPAR (Chu *et al.*, 1996). Así mismo, la Dut de *D. melanogaster* tiene un motivo VI codificado en el C-terminal (Békési *et al.*, 2004). Esta Dut ha sido implicada en el desarrollo temprano de la pupa, con mutantes deletoriales específicamente letales en esta etapa del desarrollo y no en otras (Muha *et al.*, 2012).

Procariotas

*M. tuberculosis**E. faecium*

Eucariotas

*P. falciparum**R. norvegicus*

Fagos

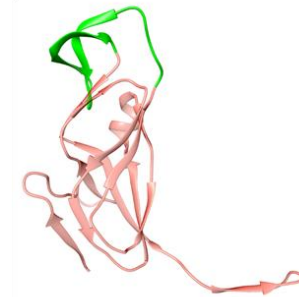
Fago $\phi 80\alpha$ Fago $\phi 11$

Figura 0.22. Posicionamiento del motivo VI en Duts de diferentes organismos. Representadas las Duts de *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium* (cedida por el Dr. Ciges-Tomás), *Rattus norvegicus* (modelo generado con I-TASSER), *Plasmodium falciparum* (modelo generado con SWISS-MODEL) y de los fagos estafilocócicos $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$ resaltando el motivo VI de cada una en verde. Las Duts se encuentran clasificadas según su taxonomía.

En el caso de la Dut codificada por *M. smegmatis*, el motivo VI está compuesto por cinco residuos localizados en la región C-terminal y que, a pesar de no estar asociados con la actividad catalítica de la enzima, son esenciales para la viabilidad bacteriana (Pecsi *et al.*, 2012). De hecho, cuando una cepa knock-out para el gen *dut* se complementaba con una Dut que era enzimáticamente funcional, pero carecía de este motivo VI de cinco residuos, el fenotipo de la misma no cambiaba. Esto sugiere una función reguladora de las Duts conferida, al menos en parte, por el motivo VI. De manera similar, los patógenos *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* también codifican Duts con un motivo VI, aunque hasta el momento no se ha encontrado ninguna función de señalización para estos Duts (Chan *et al.*, 2004; Monot *et al.*, 2009).

Como se ha comentado previamente, las Duts son enzimas ubicuas presentes en organismos de todo tipo, incluso en los virus. Este caso es especialmente interesante ya que, generalmente, las células huésped que infectan ya codificarán una Dut. ¿Qué sentido tendría entonces que un virus contenga un gen *dut* en su material genético? Ciertos estudios han indicado que algunas de las Duts virales pueden jugar un papel en la modulación del sistema inmunológico del huésped. Por ejemplo, la Dut del virus de Epstein-Barr (EBV) está involucrada en una de las dos vías que usa el virus para controlar las citocinas y así promover la infección de monocitos y macrófagos (Ariza *et al.*, 2009). La Dut del EBV interactuaría con el receptor Toll-like 2 del huésped (TLR2) con el fin de reclutar la molécula adaptadora MyD88, desencadenando la activación de la vía de NF- κ B. Esta vía conduce a la regulación positiva de la IL-10 y las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en los macrófagos del huésped.

De manera similar, la Dut del *Murid Gammaherpesvirus 68* (MuHV-68) bloquea la expresión de la ruta de señalización del interferón tipo I (Leang *et al.*, 2011). Por otro lado, la Dut codificada por el sarcoma de Kaposi, un tipo de cáncer provocado por la infección del virus del herpes humano 8 (VHH-8) se dirige a varios receptores de citocinas para regular negativamente la respuesta

inmune del huésped. Estos efectos mediados por el sarcoma de Kaposi no dependen de la función enzimática de la proteína. Además, la Dut del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) regula negativamente a NKp44L, uno de los ligandos expresados en las células infectadas por virus que los linfocitos asesinos naturales (NK) reconocen en las células diana para su destrucción (Madrid et al., 2012). Regulando negativamente la expresión de este ligando, la dut del KSHV previene la destrucción de las células infectadas por el virus. Como en otros ejemplos, este efecto no depende de la función enzimática de la Dut vírica. Esto sugiere que los Duts codificadas por los herpesvirus desempeñan un papel importante en la regulación inmunitaria.

Por último, y como leitmotiv de este trabajo de tesis, se ha demostrado que las Duts triméricas codificadas por bacteriófagos que infectan a *S. aureus* juegan un papel importante en la transferencia horizontal de los genes y/o factores de virulencia codificados por las SaPIs entre células huéspedes bacterianas. Como inductoras de las SaPIs, estas Duts de fagos activan el ciclo de la isla, iniciando el ciclo ERE de la misma (Tormo-Más *et al.*, 2010). Estas Duts triméricas también codifican el motivo VI presente en otras Duts con mecanismos señalizadores o reguladores. En este caso, el motivo VI se sitúa en la región central de la enzima y es requerido para la inducción de SaPI_{bov1} mediada por la Dut del fago $\phi 80\alpha$ (Dut80 α) (Tormo-Más et al., 2013). Debido a la importancia del papel señalizador que presentan estas Duts en la diseminación de genes virulentos entre bacterias presentes en los seres humanos, esta tesis se ha centrado en la elucidación de los mecanismos moleculares mediante los cuales las Duts de los fagos de *S. aureus* son capaces de promover la transferencia de genes virulentos entre bacterias.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo consiste en abordar desde el punto de vista funcional, molecular y estructural, el estudio de las dUTPasas triméricas codificadas por fagos de *Staphylococcus aureus* como moléculas señalizadoras con actividad *moonlighting* por su capacidad de inducir la movilidad de islas de patogenicidad de *S. aureus* por la interacción directa con el represor general de la isla, la proteína StI.

Este objetivo general se aborda a través de los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar de manera funcional y estructural las dUTPasas triméricas codificadas por fagos de *Staphylococcus aureus*. Indagar cuáles son los motivos implicados en el reconocimiento de la proteína StI de SaPIbovI y su contribución en la formación de complejo.
- Descifrar la relación entre la actividad enzimática y la capacidad de interacción con BovI-StI
- Estudiar la modularidad de BovI-StI como modelo de represor de ADN atípico y su relación con la capacidad de interaccionar con dUTPasas triméricas y diméricas, proteínas estructural y secuencialmente diferentes pero que presentan una misma función.
- Descifrar el mecanismo molecular de la interacción de las dUTPasas diméricas y triméricas mediante la obtención de las estructuras de los complejos Dut:BovI-StI y su posterior validación *in vivo* e *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se muestran en las tablas presentes en el Anexo I.

La clonación y comprobación de la secuencia en las cepas bacterianas de *S. aureus* utilizadas en los experimentos *in vivo* fue realizada por el grupo del Dr. Penadés en la Universidad de Glasgow. Los procedimientos para la preparación y el análisis de los lisados de fagos, además de la transducción y transformación de *S. aureus*, se realizaron como se encuentra previamente descrito (Ubeda *et al.*, 2008; 2007).

La clonación y comprobación de las secuencias correspondientes a las cepas bacterianas de *E. coli*, por otro lado, fueron realizadas como parte de este trabajo en el laboratorio del Dr. Marina. La viabilidad o utilidad de las cepas se comprobaba mediante pruebas de expresión y solubilidad una vez se obtenían colonias transformantes de un plásmido previamente secuenciado.

Construcción de plásmidos

Las construcciones de plásmidos para expresar las diferentes proteínas utilizadas en este trabajo (Anexo II) fueron descritas previamente o fueron preparadas mediante clonación de productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos listados en la tabla oligonucleótidos del Anexo III. Todos los clones fueron comprobados mediante secuenciación. Las proteínas Dut fueron expresadas en *S. aureus* bajo las condiciones inductoras del promotor *Pcad* en el vector de expresión pCN51, como se ha descrito previamente (Tormo-Más *et al.*, 2010).

Las Duts que fueron expresadas en *S. aureus* bajo las condiciones inductoras del promotor *Pcad* en el vector de expresión pCN51 se clonaron en el laboratorio del Dr. Penadés como se ha descrito previamente (Tormo-Más *et al.*, 2010).

Las cepas de *E. coli* que contenían las Duts para su sobreexpresión y posterior purificación también fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Penadés en el vector pET28a. De esta manera, el gen *dut* se encuentra fusionado a una etiqueta His6- codificada en posición N-terminal de Dut y bajo el control de un promotor T7 para su posterior sobreexpresión y purificación por cromatografía de afinidad. Adicionalmente, el plásmido pET28a proporciona resistencia a kanamicina para la selección de clones transformados con este vector. El promotor T7 permite la sobreexpresión del gen clonado *downstream* mediante la enzima T7 RNA polimerasa. Para ello los vectores son transformados en células DE3, las cuales contienen un lisógeno de fago λ DE3 que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control de un promotor lac, inducible por IPTG (isopropyl- β -D thiogalactopyranosido). El tratamiento de células DE3 con IPTG induce la expresión de la T7 RNA polimerasa y esta expresará los constructos codificados aguas debajo de un promotor T7.

El gen que codifica para StI de SaPIbov1 fue clonado en el vector de expresión pETNKI-hisSUMO3-LIC (facilitado por Patrick Celie, *NKI Protein facility*). Este vector contiene una etiqueta de 6 histidinas para purificar por afinidad y la proteína SUMO para incrementar la solubilidad. Esta etiqueta HisSUMO3 fue eliminada utilizando la enzima *SUMO Protease 2* (SEN2).

La clonación se realizó mediante la técnica LIC (*Ligation-Independent Cloning*) (Savitsky *et al.*, 2010). El vector resultante, pETNKI-StI, fue secuenciado para su verificación en el servicio de secuenciación del Instituto de Biomedicina de Valencia.

Mutagénesis dirigida

Los mutantes puntuales realizados en este trabajo se hicieron siguiendo el protocolo del kit de mutagénesis dirigida Q5 (*New England Biolabs*) y sus cebadores (Anexo III) fueron diseñados utilizando la herramienta *online NEBaseChanger* que la casa comercial facilita. Esta técnica se basa en una PCR

inversa desde el gen de interés con oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. El producto lineal de PCR con extremos romos es tratado con una mezcla de enzimas quinasa, ligasa y DpnI proporcionada con el kit. La quinasa fosforila los extremos 5', posteriormente la ligasa circulariza el ADN y la enzima DpnI digiere el plásmido molde de la amplificación, pues a diferencia del producto de PCR el molde es un ADN metilado. De este modo se obtiene como producto del tratamiento el plásmido que contiene el inserto con la mutación deseada. Posteriormente la mezcla es transformada en células *E. coli* DH5 α electrocompetentes de alta eficiencia proporcionadas con el kit.

Este trabajo utiliza muchas de las cepas creadas y cedidas por el grupo del Dr. Penadés en la Universidad de Glasgow. No obstante, ciertos constructos y mutantes puntuales fueron creados en nuestro laboratorio mediante mutagénesis dirigida por la adición de un codón de stop (TAA) y/o cambio del aminoácido codificante (Anexo III). Todos los mutantes sobre el represor StI fueron realizados por nuestros colaboradores y reclonados en nuestro centro mediante la amplificación de los genes con dos cebadores comunes para todas: StI_OFA_Fw y StI_OFA_Rv (Anexo III). Una vez amplificado por PCR utilizando la polimerasa KOD (*Merk*) los fragmentos resultantes fueron purificados siguiendo las instrucciones del kit de purificación de ADN (*Macherey-Nagel*). Tanto el fragmento de PCR como el vector de elección (pLICSGC1), previamente digerido con BseRI, eran tratados con la T4 polimerasa utilizando el sistema de clonaje LIC y transformados en células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes, donde colonias resultantes eran chequeadas por PCR (*DreamTaq* polimerasa (*Thermo Scientific*)), por electroforesis en gel de agarosa y secuenciadas (*Macrogen*). Las colonias positivas eran incubadas en 4 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB) durante 16h y recogidas para la extracción del plásmido mediante el kit *GeneJET Plasmid Miniprep* (*Thermo Scientific*) y posterior transformación en la cepa de expresión (BL21 / Rosseta 2).

Electroforesis de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se empleó para separar el ADN genómico y plasmídico, así como para la comprobación de colonias transformantes positivas. Las reacciones de PCR se verificaron utilizando diferentes porcentajes de agarosa (*Fisher Bioreagents*) en función del tamaño del material genético analizado. Los geles se prepararon con tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X y GelRed (*Thermo Scientific*).

Un tampón de carga 5X (50% v/v glicerol, 50% v/v 1X TAE, azul de bromofenol) se agregó a las muestras antes de cargarlas con una concentración final de 1X. Los geles se corrieron generalmente a 100V durante unos 40 minutos, o hasta que las bandas de la escalera de pesos moleculares (*Fisher Scientific*) se separaron y se visualizaron fácilmente. La visualización del ADN se logró utilizando un transiluminador UV ULTima 16si Plus (*Isogen Life Science*).

Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes

Se prepararon células de *E. coli* electrocompetentes (ambas cepas DH5 α y BL21 DE3) (*Novagen*) a partir de cultivos *overnight* incubados a 37°C a 120 rpm (*Innova43 incubator shaker series*). Se inocularon los mililitros necesarios del cultivo *overnight* para que la densidad óptica en un volumen final de 1L de cultivo fuera 0,05 a 600 nm de longitud de onda (λ). Se cultivaron a 37°C con 120 rpm en el mismo incubador a hasta una OD₆₀₀ de 0.4. El cultivo se dividió entre dos tubos de centrifuga de 500 mL previamente autoclavados y se colocaron en hielo durante 15 minutos para detener el crecimiento bacteriano. Los tubos se centrifugaron a 4°C a 4000 rpm (*Beckman Coulter J6-HC centrifuge*) durante 10 minutos, el sobrenadante resultante se descartó y las bacterias sedimentadas (pellet) se resuspendieron en 15 ml de una solución de agua destilada (dH₂O) estéril muy fría. Las bacterias se volvieron a sedimentar utilizando las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y los pellets se volvieron a suspender en

2 ml de la misma dH₂O. Por último, se les añadió glicerol estéril en una concentración final de 15-20% y se congelaron a -80°C.

Transformación de células de *E. coli* electrocompetentes

La transformación de los plásmidos en células *E. coli* electrocompetentes se realizó utilizando células competentes recién preparadas o alícuotas congeladas. Se añadieron entre 5-50 ng de ADN plasmídico purificado y se colocó en una cubeta de electroporación (VWR) con 1mm de paso óptico, la cual posteriormente se colocó en un electroporador *Electroporator 2510* (Eppendorf). Inmediatamente después, se procedió a darles el choque eléctrico a 1700 V, tras el cual se agregaron 900 µl de medio líquido LB y las muestras se incubaron a 37°C con 120 rpm de agitación durante 1 h. Las células transformadas se colocaron en placas de LB selectivas apropiadas para el plásmido, (100 µg / ml de ampicilina (pLIC-SGC1) o kanamicina (pET28a y pETNKI 1.10). Inicialmente, se colocaron en la placa 100 µl de mezcla de transformación; después de esto, el volumen restante se centrifugó a 4000 rpm (*microstar 12*, VWR) durante 2,5 minutos, se eliminaron 400 µl del sobrenadante y el pellet se resuspendió y se plaqueó. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h.

Expresión y purificación de las proteínas

La expresión de las Duts en sus formas silvestres (*wild-type*, WT) y sus mutantes, fusionadas a una etiqueta de histidinas, se realizó en células *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) transformadas con el correspondiente gen clonado en el plásmido de expresión pET-28a (Novagen). Las proteínas fueron sobreexpresadas creciendo las células en medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 33 µg/ml a 37°C hasta fase exponencial de crecimiento (densidad óptica 0.5-0.8 medida a $\lambda=600$ nm). Alcanzada la fase exponencial, la inducción de las proteínas se realizó mediante la adición de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una molaridad final de 1mM, tras

la cual las células se cultivaron 16 horas a 20°C. Al día siguiente, las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 g 20 min a 4°C. Los cultivos de células inducidos y crecidos eran utilizados el mismo día de su recolección para la purificación de las proteínas sobreexpresadas. En caso contrario, las células eran guardadas a -20°C. Todos los pasos descritos a continuación fueron realizados a 4 °C si no se menciona otra temperatura. Para la purificación, los pellets se resuspendieron en tampón A (75 mM HEPES pH 7,5, 400 mM NaCl y 5mM MgCl₂) suplementado con 1 mM de fluoruro de fenilmetilosulfonilo (PMSF) y la mezcla resultante fue lisada mediante sonicación a 20 W. El lisado fue centrifugado durante 30 min a 16500 g y la fracción soluble fue cargada en una columna *HiTrap FF Crude* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón A. La columna se lavó con el mismo tampón suplementado con 10 mM de imidazol tras el cual las proteínas fueron eluidas con tampón A suplementado con 500 mM de imidazol. Las proteínas eluidas fueron concentradas y cargadas en una columna de exclusión molecular *Superdex S200* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón B (75 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl y 5mM MgCl₂). Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE y aquellas fracciones de mayor pureza fueron seleccionadas, concentradas y guardadas a -80 °C.

Tanto para la expresión de BovI-Stl como para todas aquellas proteínas clonadas en el vector pETNKI 1.10 las transformaciones se realizaron en células competentes *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). Las proteínas fueron sobreexpresadas creciendo las células en medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 33 µg/ml a 37 °C hasta fase exponencial de crecimiento (densidad óptica 0.5-0.8 medida a $\lambda=600$ nm). Alcanzada la fase exponencial, la inducción de las proteínas se realizó mediante la adición de IPTG (0.1mM), tras la cual las células se incubaron durante 16 horas a 20°C. Tras su recogida mediante la centrifugación del cultivo, el pellet se resuspendió en tampón A suplementado con 1 mM de PMSF. Las células fueron lisadas

mediante sonicación a 20 W y el lisado fue centrifugado a 16500 g durante 30 minutos. La fracción soluble fue cargada en una columna de afinidad *HiTrap FF Crude* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón A. Tras un lavado con 10 volúmenes de columna con tampón A suplementado con 10 mM de imidazol, la proteína fue eluida con tampón A suplementado con 500 mM de imidazol. La proteína eluida fue digerida con SENP2 para eliminar la etiqueta 6xHis-SUMO con una relación molar de 1:50 (proteasa:proteína eluida) durante 16 horas aplicando una lenta agitación a 4°C. Tras la digestión, Stl wt fue concentrada y cargada en una columna de exclusión molecular *Superdex S200* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón B. En cambio, los mutantes truncados de Stl sin la región C-terminal eran pasados de nuevo por una columna de afinidad para eliminar las etiquetas cortadas, así como proteínas no digeridas. La pureza de las fracciones recogidas fue analizada mediante gel SDS-PAGE y las fracciones más puras y digeridas se juntaron, concentraron y guardaron a -80 °C.

Por último, los mutantes de Stl clonados en el vector pLIC-SGC1 fueron transformados en células electrocompetentes Rosetta 2 (DE3) (Novagen). Las proteínas fueron sobreexpresadas creciendo las células en medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml a 37°C hasta fase exponencial de crecimiento (densidad óptica 0.5-0.8 medida a $\lambda=600$ nm) donde se suplementaron con 0,5 mM de IPTG durante 16 horas a 20°C. La purificación de estos mutantes ocurría de la misma manera empleada para la purificación de las Duts y sus mutantes.

Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE

La técnica de electroforesis por SDS-PAGE se utilizó como método de comprobación a la hora de confirmar la sobreexpresión, la solubilidad y/o el estado de pureza de las muestras. Las proteínas fueron sometidas a un campo eléctrico de 200V en presencia de un detergente aniónico, asegurando la completa

desnaturalización de muestras previamente calentadas a 95°C. Para hacer los geles de acrilamida necesarios para la técnica se siguió la receta proporcionada por la casa comercial (*Bio-Rad*). Para visualizar el resultado de la electroforesis los geles de acrilamida eran teñidos con una solución de azul Coomassie G-250 al 0,008%.

Electroforesis no desnaturalizante Native-PAGE

La técnica de electroforesis por Native-PAGE se utilizó como método de comprobación a la hora de confirmar la formación de complejos. Las proteínas purificadas se mezclaron a una relación molar 1:1 a una concentración de 40 mM en el tampón B (volumen final 8 μ l) y se incubaron a 4°C durante la noche. Las muestras se cargaron en un gel al 8% de poliacrilamida y la electroforesis se realizó a 4°C con un campo eléctrico de 100V durante el tiempo requerido para la correcta separación de las bandas. Los geles de acrilamida necesarios para la técnica se realizaron siguiendo la receta proporcionada por la casa comercial (*Bio-Rad*). La visualización del resultado de la electroforesis, los geles de acrilamida eran teñidos con una solución de azul Coomassie G-250 al 0,008% y destiñidos con dH₂O.

Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la cantidad exacta de proteína que teníamos en solución se utilizaron dos métodos: (i) el método Bradford mediante el reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (*Bio-Rad*) y (ii) a partir del coeficiente de extinción molar mediante el uso del *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*).

Interferometría de biocapa (BLI)

La interferometría de biocapa (BLI) es una técnica óptica que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde dos superficies: una capa de proteína inmovilizada en la punta del biosensor y una capa de referencia interna (Fig. M1). Cualquier cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia. La unión entre la molécula inmovilizada en la superficie de la punta del biosensor y un analito en solución produce un aumento del grosor óptico en la capa de la punta del biosensor, lo que da como resultado un desplazamiento de longitud de onda. Las interacciones se miden en tiempo real, lo que brinda la capacidad de monitorear la especificidad de unión, las tasas de asociación y disociación o concentración con alta precisión y exactitud. Solo las moléculas que se unen o se disocian del biosensor pueden cambiar el patrón de interferencia y generar un perfil de respuesta. Aquellas moléculas que no se unen o bien al biosensor o a la molécula pegada a éste no afectan el patrón de interferencia. Esta es una característica única de la interferometría de biocapa y amplía su capacidad para funcionar en muestras crudas utilizadas en aplicaciones para interacciones proteína-proteína, cuantificación, afinidad, y cinética. Los parámetros cinéticos de la interacción, afinidad de la unión (K_D) y constantes de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}), entre las diferentes Duts y Stl se midieron mediante Interferometría de biocapa (*Biolayer Interferometry*, BLI) utilizando el sistema *BLITz* (FortéBio). La afinidad (K_D) se calcula dividiendo la constante de disociación (K_{off}), que mide cómo de rápido se disocia la unión, por la constante de asociación (K_{on}), que mide la rapidez de la formación del complejo. Para esta técnica, tanto la dilución de las proteínas como la línea base de los ensayos se llevaron a cabo en tampón B, siendo suplementado cuando era necesario con el nucleótido correspondiente a una concentración final de 0,5 mM de dUPNPP. Para cada interacción, la correspondiente Dut fusionada a una etiqueta de histidinas fue inmovilizada sobre un biosensor Ni-NTA (FortéBio) a una concentración de 1-3 μ M. Al menos

cinco diluciones diferentes de StI (desde 2 a 0,125 μM) fueron utilizadas en las etapas de asociación y disociación para cada interacción StI:Dut medida, ajustando la concentración más alta de StI hasta un orden de magnitud por encima el valor estimado de K_D . El cálculo de los valores cinéticos y el análisis de los datos se realizaron con el programa informático *BLItz Pro 1.2*. Para ajustar los datos se utilizó el modelo 1:1 de interacción y se usaron controles Dut:Buffer, Buffer:StI para contrarrestar el máximo ruido o contaminación de la técnica.

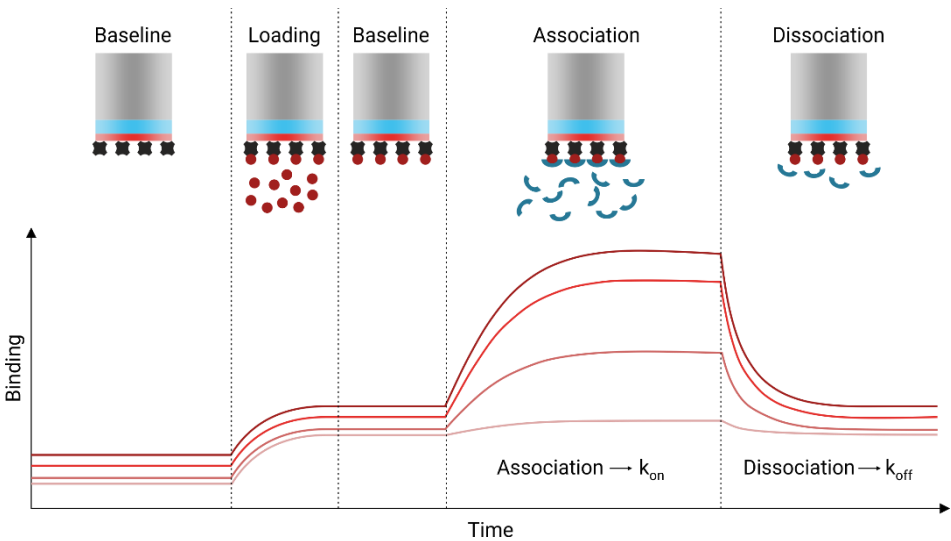


Figura M1. Pasos experimentales en un sensograma de BLI. (Baseline) Línea base con tampón de ensayo. (Loading) Unión de ligando al sensor. (Association) Exposición del analito al sensor. (Dissociation) Disociación de la interacción.

Ensayo de actividad de dUTPasa

La actividad enzimática de las dUTPasas fue medida mediante el ensayo de verde malaquita (*Malachite Green phosphate*) (Pegan *et al.*, 2010; Vardakou *et al.*, 2014). Este método cuantifica la actividad dUTPasa mediante la medición del fosfato inorgánico (Pi) liberado en 200 μl de volumen de ensayo con tampón de reacción (tampón B + 0,01 U de pirofosfatasa inorgánica (Thermo scientific)

y 0,1 μg de la correspondiente Dut) (Gonçalves *et al.*, 2011). Las reacciones fueron iniciadas mediante la adición de dUTP (concentración final de 400 μM) y diferentes muestras fueron tomadas a los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 min parando la reacción mediante la adición de 50 μl de solución para el revelado de verde malaquita. Después de incubar 10 min a temperatura ambiente, la producción de Pi fue calculada basada en la absorbancia de la muestra a 630 nm y frente una curva patrón previamente determinada para el Pi. Las reacciones mostraron una linealidad a lo largo del tiempo de reacción y la velocidad inicial fue calculada siguiendo este procedimiento utilizando el programa *SigmaPlot* (*Systat Software, San Jose, CA*).

Ensayo de termoestabilidad

El ensayo de termoestabilidad se utilizó como medio para comparar el estado o rigidez de plegamiento de diferentes proteínas frente a mutantes puntuales de la misma. Este ensayo se realizó en el Sistema de PCR a tiempo real 7500 Fast (*Applied Biosystems*). Se cargaron muestras de 20 μl que contenían 5 \times Sypro Orange (*Sigma*) y 20 μM de proteína en un tampón que contenía 75 mM HEPES a pH 7,5 y 250 mM NaCl en placas de PCR de 96 pocillos. Cuando se indica, la mezcla de muestra se complementó con 5mM de MgCl_2 o 1 mM de dUPNPP (*Jena Bioscience*). Las muestras se calentaron de 20 a 85 ° C con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La intensidad de la fluorescencia se normalizó y analizó con el software GraphPad Prism version 6 (*GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com*) a través de el análisis sigmoidal de Boltzmann.

EMSA

Con el fin de analizar la unión de SrtI y sus mutantes puntuales a la región 13730-13949 del genoma de SaPI_{bov1} que contiene el sitio de represión de StI que controla la expresión de *str* y *xis* (Mir-Sanchís *et al.*, 2012), ésta se amplificó

mediante PCR utilizando los cebadores Stl_ADN_BR1 y Stl_ADN_BR2 cuyas secuencias se encuentran en el Anexo III. Estos cebadores se modificaron con un fluoróforo en 5' IR700 (*Eurofins*) y se utilizaron sobre el ADN genómico de *S. aureus* 8325 como molde. El producto de la PCR incluye. El producto de la PCR purificado (10 ng/ μ l), el cual se encuentra marcado con el fluoróforo mencionado y la proteína Stl se mezclaron en tampón EMSA (50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 75 mM NaCl y 0,5 mM EDTA). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los geles de poliacrilamida al 8% se sometieron a electroforesis en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) a 100 V durante una hora de pre-corrido, seguido de la carga de las muestras y su electroforesis correspondiente de aproximadamente 150 minutos a 100 V a 4°C. Los geles fueron analizados por Odyssey Imaging System (LI-COR) por la excitación del fluoróforo a 700 nm.

Formación de enlaces di-sulfuro.

Los experimentos que incluyen a los mutantes sobre zonas de dimerización de BovI-Stl (H73C y H188C) se realizaron mediante la oxidación de la muestra, y por consiguiente la formación de los enlaces di-sulfuro, utilizando una concentración de 1mM cobre-fenantrolina (Cu-P). Las muestras con Cu-P se incubaron durante 5 minutos a 37°C para ser estudiadas posteriormente por SDS-PAGE no reductor. La Cu-P se preparó mezclando 60 mM de CuSO₄, 200 mM de O-fenantrolina y 50 mM de NaH₂PO₄ (Casino *et al.*, 2018).

Cromatografía de exclusión molecular (SEC) y SEC- Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS).

Los análisis de SEC se llevaron a cabo utilizando una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) conectada a un ÄKTA Pure (GE Healthcare) y equilibrada con 75 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl y 5 mM MgCl₂. Se inyectaban muestras que contenían 200 μ g de proteína en la columna y se eluyeron con el buffer de equilibrio a un flujo de 1ml/min. Los valores de

volumen y absorbancia (UV280nm) de los cromatogramas fueron exportados y graficados en el software GraphPad Prism para comparar el volumen de retención de cada muestra. En los experimentos de SEC-MALS el sistema de cromatografía incluía además un sistema Wyatt DAWN HELEOS-II MALS (detector para la caracterización de la masa molar y tamaño de macromoléculas y nanopartículas en solución) y un refractómetro diferencial Wyatt Optilab rEX (Wyatt). Para la recogida y el análisis de los datos se utilizó el software Astra 7.1.2.

Termoforesis a micro-escala (MST).

Debido a que las Duts diméricas interactúan con BovI-Stl rompiendo su homodímero para interactuar a través de la superficie de dimerización del represor formando un heterodímero, tuvimos que utilizar una técnica diferente a la interferometría de biocapa que permitiera la medición de las cinéticas de interacción en solución. Para ello, se llevó a cabo la termoforesis a micro-escala, una tecnología para el análisis de interacciones entre biomoléculas basada en la detección de cambios inducidos por temperatura en la fluorescencia de un reactivo de marcaje unido a un ligando no marcado. Tanto BovI-Stl como los mutantes a cisteína (H73C y H188C) fueron marcados fluorescentemente con el reactivo NT-647 amina del kit de marcaje proteico Monolith NT Protein Labeling kit RED-NHS (NanoTemper Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. A modo de resumen, la proteína fue mezclada con la solución de marcaje 3x y se incubó durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se purificó por gravedad mediante las columnas que provee el kit y se eluyeron con buffer 75 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl y 5 mM MgCl₂ para eliminar el exceso de reactivo de marcaje.

La proteína marcada se utilizó en los experimentos a una concentración de entre 150-300nM en función de su afinidad por las Duts. Previamente al experimento, se aseguró que las proteínas se encontraran en el mismo buffer. Para los ensayos con los mutantes con puentes disulfuro (H73C y H188C) en presencia

de agente reductor, la preparación de la muestra se realizó mediante la adición 2mM de DTT para una concentración final de 1mM al incubarlo con la Dut analizada. Se realizaron diluciones seriadas de la Dut estudiada (rango entre 10 to 0.3 μ M) y se añadió la proteína marcada, Stl, en una dilución con un ratio 1:1. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente las muestras se cargaban en capilares “Premium Coated Capillaries” (K005, NanoTemper Technologies) y se introducían en el sistema de MST “Monolith NT.115” (NanoTemper Technologies) en el canal rojo usando 20% de excitación LED y un 40% de MST. Los resultados fueron analizados mediante el software M.O. Affinity Analysis (NanoTemper Technologies).

Cristalización de proteínas y recogida de datos

Las proteínas fueron cristalizadas a concentraciones de entre 7-10 mg/mL mediante la técnica difusión de vapor en gota sentada. En el caso de la cristalización de complejos proteicos, la mezcla de ambas proteínas se realizó en un ratio molar 1:1. Después, las muestras fueron centrifugadas para eliminar el precipitado formado tras la adición y el sobrenadante fue incubado durante 16 horas a 4°C antes de añadirse a los diferentes screenings de cristalización (JCSG+, Molecular Dimensions; JBSI y JBSII, Jena Bioscience).

Para cada condición donde se encontraban cristales, éstos fueron directamente congelados en nitrógeno líquido con o sin necesidad de crioprotectores en función de las características de la solución madre de dicha condición. Las estructuras resueltas provenían de cristales crecidos en las siguientes condiciones (Tabla M1):

Tabla M1: Condiciones de cristalización de las diferentes estructuras obtenidas.

Estructura	Condiciones de cristalización
Dut80 α ^{D95E} Tipo I	32% de etanol, 2% de PEG 1000 y 0.1 M Citrato fosfato pH 4.2
Dut80 α ^{D95E} Tipo II	20% de Etanol, 10% Glicerol
BovI-Stl ^{N-ter}	0.2 M Sulfato de litio, 0.1M Bis-Tris 25% PEG3350 pH 5.5
Dut ϕ 11:BovI-Stl ^{N-ter}	24% PEG 1500, 20% Glicerol
Dut ϕ 85:BovI-Stl ^{N-ter}	24% PEG 1500, 20% Glicerol
Dut80 α :BovI-Stl ^{N-ter}	0.1M CAPS, 40% MPD pH 10.5

Los diferentes juegos de datos fueron recogidos para cada una de las proteínas a 100 K en las instalaciones de los sincrotrones de DLS (*Diamond Light Source*) (Oxford, UK) y ALBA (Barcelona, España).

Las estadísticas de la recogida de datos se muestran más adelante en el apartado de resultados cuando se exponen las diferentes estructuras.

Determinación y resolución de las estructuras tridimensionales

Tras la difracción de los cristales de proteína por rayos X y la obtención de las imágenes de difracción, éstas eran indexadas por iMosfilm (Powell *et al.*, 2013) mediante un procedimiento automatizado (autoindexación) que proporciona la orientación del cristal, una estimación inicial de las dimensiones de la celda unitaria con una idea de la simetría cristalográfica y un índice de cada *spot* o reflejo (Evans, 2011; Powell, 2017). El proceso de escalado y agrupación de los datos se realizó con el programa *Aimless* (Evans and Murshudov, 2013) del paquete CCP4 (Winn *et al.*, 2011).

Las estructuras fueron resueltas mediante reemplazo molecular utilizando el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007). Mediante el reemplazo molecular, las fases ya conocidas de una molécula similar se injertan en las intensidades de la molécula en cuestión. Estas fases se pueden obtener experimentalmente a partir de una molécula homóloga o si las fases son conocidas para la misma molécula, pero en un cristal diferente, simulando el empaquetamiento de la molécula en el cristal y obteniendo fases teóricas.

Basándonos en los resultados previos publicados (Tormo-Más *et al.*, 2013) para la resolución de las estructuras de las Duts se han excluido del modelo inicial de búsqueda las zonas de alta flexibilidad como el extremo N-terminal, el motivo V y el motivo VI no conservado presente en las Duts triméricas de fagos. Esta decisión se basa en que: (i) los motivos flexibles normalmente no son visibles en las estructuras obtenidas a partir de cristales y (ii) evitar imponer cualquier posible conformación estructural inicial en los motivos V y VI que pudiera sesgar el proceso de afinado de la estructura.

Una vez se obtienen las fases tras el reemplazo molecular, los datos y/o estructura resultante debe refinarse para lograr un acuerdo entre el modelo estructural (factores de estructura) y los datos experimentales (mapas de densidad electrónica). Los ciclos de refinado y construcción de modelo se realizaron utilizando el programa Coot (Emsley *et al.*, 2010) para ajustar la estructura a la densidad electrónica y el programa Refmac (Winn *et al.*, 2011) para analizar dicho refinamiento hasta obtener un buen balance entre los factores de estructura calculados a partir del modelo cristalográfico y los derivados de los datos de la difracción (R-factor).

Durante el presente trabajo de tesis, se han obtenido diferentes estructuras las cuales se han resuelto de la siguiente manera:

La estructura del mutante Dut80 α ^{D95E} fue resuelta mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y la estructura del trímero de Dut80 α (PDB 3ZEZ; Tormo-Más *et al.*, 2013) como modelo.

La estructura del complejo Dut ϕ 11-BovI-Stl^{Nter} se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y la estructura del trímero de Dut ϕ 11 (PDB 4GV8; Leveles *et al.*, 2013) como modelo.

La estructura BovI-Stl^{Nter} del complejo Dut ϕ 11-BovI-Stl^{Nter} se usó luego como modelo en el reemplazo molecular para el conjunto de datos recopilados de los cristales BovI-Stl^{Nter} solo.

Por último, los complejos Dut ϕ 85:BovI-Stl^{Nter} y Dut80 α :BovI-Stl^{Nter} se resolvieron mediante reemplazo molecular utilizando el trímero de la Dut ϕ 85 y Dut80 α ^{E122K}, respectivamente, y la estructura de Stl^{N-ter}.

Para prácticamente todos ellos, tras generar un primer modelo inicial con la ayuda de Phaser, el proceso de refinado se llevó a cabo como lo anteriormente descrito. No obstante, para el complejo Dut ϕ 11-BovI-Stl^{Nter} las fases iniciales obtenidas del reemplazo molecular se utilizaron para generar mapas de densidad electrónica de suficiente calidad para construir manualmente el modelo BovI-Stl^{Nter} en Coot (Emsley *et al.*, 2010).

Modelo estructural del complejo BovI-Stl:ADN

El modelo estructural de BovI-Stl^{Nter} en complejo con ADN se generó mediante una superposición de su dominio HTH (residuos 12-83) con la porción equivalente (residuos 7-72) de la proteína controladora del sistema restricción-modificación de Esp1396I (C.Esp1396I) en complejo con su ADN diana (PDB 3CLC) (Ball *et al.*, 2012). Para generar el dímero de BovI-Stl^{Nter} se superpuso el monómero sobre de la segunda subunidad del represor dimérico C. Esp1396I. El

modelaje se finalizó mediante la sustitución de la secuencia de ADN reconocida, siendo la de StI “TATCTCaatttGAGATA” (Leveles *et al.*, 2013) (la región palindrómica está marcada en mayúsculas). La minimización de energía del modelo se llevó a cabo mediante: i) el módulo de minimización de energía del software Chimera (Sagendorf *et al.*, 2017) y ii) el servidor de minimización de energía Yasara utilizando la fuerza Yasara y los valores de minimización por defecto. Ambos programas generaron modelos casi idénticos (RMSD de 0.4 Å en los carbonos alfa de ambos modelos) con un reconocimiento similar del ADN (analizado con DNAProDB) (Jared *et al.*, 2017). El análisis de contactos no mostró choques entre los dímeros (la distancia más corta fue de 2.65 Å). El modelo generado con Chimera fue el utilizado a la hora analizar los posibles residuos de BovI-StI que intervendrían en la unión al ADN además de utilizarse para realizar las figuras de este trabajo de tesis.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Contribución personal

Al inicio de mi incorporación para realizar este trabajo de tesis, el grupo de investigación de la Dra. Vertessy publicó un artículo que cuestionaba el modelo de la interacción Dut:BovI-Stl propuesto por el laboratorio del Dr. Marina. Sus resultados, basados en el estudio de la interacción de Stl de SaPIBov1 con la Dut del fago $\phi 11$, concluían que la unión del dUTP a la enzima inhibía la unión del represor y por lo tanto la formación de complejo con BovI-Stl. Esto ocurriría al competir ambos, represor y ligando, por el centro activo de la dUTPasa. Además, su modelo sostenía que el motivo V de las Duts, anteriormente propuesto como esencial por nuestro grupo, no se requería para la unión a BovI-Stl. Por otro lado, el mismo grupo a través de una publicación diferente concluía que el motivo VI adicional codificado por dUTPasas de fagos tampoco era necesario para la inducción de la isla ya que la dUTPasa de *Mycobacterium tuberculosis*, carente de motivo VI, era capaz de interactuar con BovI-Stl. Por ello, como parte de este trabajo tesis, llevamos a cabo diferentes experimentos para averiguar la clave de dichas discrepancias.

Así pues, este capítulo se divide en dos partes. La primera re-evalúa las conclusiones de la Dra. Vertessy utilizando otras Duts de fagos de *S. aureus* y, además, indaga en el mecanismo de interacción BovI-Stl:Dut trimérica poniendo en conjunto todos los datos obtenidos por ambos grupos de investigación. Para ello, mi contribución en este apartado del capítulo ha sido participar en la caracterización de la cinética de interacción entre el represor Bov-Stl y las diferentes variantes (wt y mutantes delecionales del motivo V y VI) de las Duts modelo de ambos grupos. Por otro lado, la segunda parte del capítulo se centra tanto en la inclusión de nuevos motivos participantes en el mecanismo molecular de interacción como en el estudio de otras Duts triméricas.

Parte de estos resultados publicados como artículo científico en la revista *Nucleic Acids Research*, y donde aparezco como co-autor, han sido previamente

expuestos en una tesis de nuestro grupo paralela a esta. No obstante, la obtención de los mismos no solo ha sido parte de mi etapa como investigador predoctoral, sino que pertenecen a un trabajo exclusivo de esta tesis. La inclusión y el estudio del motivo IV como parte del mecanismo fue gracias a la cristalización, difracción y resolución de las estructuras tridimensionales del complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11, propio de este trabajo y del que hablaremos en otro capítulo. Gracias a estos resultados fuimos capaces de unificar los diferentes mecanismos propuestos y fueron clave para la base sobre la que se ha asentado el objetivo general de esta tesis: descifrar el mecanismo molecular de la interacción de las Duts triméricas con el represor Stl de SaPI_{bov1}.

Para todo ello ha sido necesario mi implicación en la sobreexpresión de las proteínas; el uso de diferentes técnicas de purificación, que incluyen la cromatografía de afinidad y exclusión molecular, y el uso de la interferometría en biocapa (BLI) para la medición de la cinética de la unión entre las diferentes Duts por el represor de la SaPI. Además, la obtención de la estructura tridimensional del complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11 se obtuvo por técnicas de cristalografía y difracción de rayos X de monocristales difractados en diferentes sincrotrones (DLS en Oxford, UK; y ALBA en Barcelona, España).

Modelos previos de interacción BovI-Stl:Dut

Tanto los resultados previos de nuestro grupo de investigación como los de este trabajo de tesis sugieren que las Duts codificadas por bacteriófagos que infectan a *S. aureus* son las proteínas inductoras encargadas de la activación y transferencia de diferentes SaPIs. Esta acción se realiza por interacción directa con el represor Stl de SaPI_{bovI} (BovI-Stl), interfiriendo de este modo en su función de represor en la isla de patogenicidad. Inicialmente, la propuesta de nuestro grupo postulaba que esta interacción podría ser favorecida cuando la Dut se encuentra con el ligando en el centro activo. En este sentido el mecanismo recordaba a otros mecanismos de proteínas transductoras de señales como las proteínas G de eucariotas, donde la unión del nucleótido, dUTP en el caso de las Duts y GTP para proteína G, intervienen en el proceso de unión entre las proteínas (Tormo-Más *et al.*, 2013) (Fig. 1.1A). Por otro lado, las proteínas G sufren un cambio conformacional en una de sus subunidades que les permiten ejercer su función enzimática. Para el caso de las Duts triméricas, moléculas modelo para este mecanismo, la unión del nucleótido al centro activo de la enzima genera cambios conformacionales sobre uno de los motivos altamente conservados, el motivo V. Esta similitud fue lo que llevó al grupo a proponer que este elemento podría actuar como interruptor en el proceso, de forma análoga a las proteínas G. Además, y debido a la especificidad que presentan las Duts en la unión a la proteína diana, es probable que su motivo más variable y específico, el motivo VI, también participe en dicho mecanismo de unión molecular.

No obstante, Szabo y colaboradores, mediante el uso y análisis la Dut codificada por el fago $\phi 11$ (Dut $\phi 11$) propusieron un modelo diferente para la interacción entre la Dut y el represor Stl de SaPI_{bovI} (BovI-Stl). Para ello, estos autores usaron diferentes métodos biofísicos *in vitro* (Szabó *et al.*, 2014). En este modelo (Fig. 1.1) estos autores proponían al dUTP como inhibidor de la formación del complejo, mientras que la forma apo era la encargada de

interaccionar con BovI-Stl induciendo la isla. A pesar de las diferencias con nuestro modelo inicial, ambos modelos propuestos implicaban al dUTP como un segundo mensajero y pieza clave para los estados “on/off” del complejo. No obstante, el mecanismo molecular por el que el dUTP impide que ocurra la interacción entre la Dut y BovI-Stl era totalmente desconocido. Además, contrariando nuestro modelo donde el mutante delecional para el motivo V de la Dut80 α era suficiente para inhibir la interacción con BovI-Stl, este modelo, proponía que el motivo V no intervenía en el proceso de regulación (Szabó *et al.*, 2014). Además, los mismos autores propusieron que el motivo VI tampoco tendría un rol en la formación del complejo BovI-Stl:Dut o en la inhibición de la unión de BovI-Stl a su ADN diana. Esta propuesta se derivaba de estudios de la interacción entre BovI-Stl y la Dut de *M. tuberculosis*, la cual no contiene el motivo VI pero sí interacciona con el represor (Hirmondo *et al.*, 2015) (Fig. 1.1B).

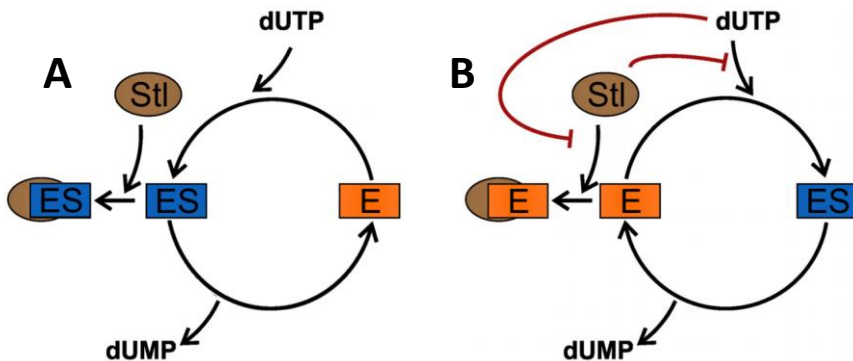


Figura 1.1. Modelos propuestos para la interacción BovI-Stl:Dut. Se muestran los diferentes modelos propuestos por (A) nuestro grupo de investigación (Tormo-Más *et al.*, 2013) y (B) el grupo al que pertenecen Szabo y colaboradores (Szabo *et al.*, 2014), representando los cambios del sistema enzima (E) y enzima-sustrato (ES) y su efecto sobre la interacción con el represor Stl.

Dada la controversia o contradicción que suponen los dos modelos de interacción propuestos, decidimos revisar nuestros resultados utilizando técnicas

de detección *in vitro* como la interferometría de biocapa (BLI), estudios estructurales y resultados biológicos *in vivo*.

Confirmación de los modelos propuestos. El papel de dUTP y de los motivos V y VI.

Como se ha comentado, existía ciertas diferencias en cuanto a la implicación del dUTP y de los motivos V y VI de la Dut trimérica en la formación del complejo con BovI-Stl. Al haberse derivado ambos modelos del estudio de Dut diferentes, la Dut80 α en nuestro caso y la Dut ϕ 11 en el caso Szabo y colaboradores, decidimos analizar ambos modelos en paralelo. Como primer punto estudiamos mediante la técnica de interferometría de biocapa (BLI) las cinéticas de interacción del complejo BovI-Stl:Dut trimérica en presencia o ausencia de dUPNPP, un análogo no hidrolizable del dUTP (Tabla 1.1). Para ello, nos servimos tanto de las formas silvestres Dut80 α^{WT} y Dut ϕ 11 $^{\text{WT}}$ como de mutantes delecionales para los motivos V y VI y que fueron realizados como parte de una tesis paralela a esta (Dut80 $\alpha^{\Delta\text{V}}$, Dut80 $\alpha^{\Delta\text{VI}}$, Dut ϕ 11 $^{\Delta\text{V}}$, Dut ϕ 11 $^{\Delta\text{VI}}$). En el caso de los mutantes delecionales para el motivo V, los mutantes se crearon mediante la inserción de un codón de STOP (TAA) tras la Ser158 (Dut80 α) y Ser157 (Dut ϕ 11). Por otro lado, para la construcción de los mutantes delecionales para el motivo VI (residuos 96-123 para 80 α y 96-124 para ϕ 11), éste se sustituyó por dos aminoácidos, Asn-Ser, los cuales conectarían las hojas β 8 and β 9 flanqueantes (Fig. 1.2).

Primeramente, se analizó si la presencia del dUTP era capaz de inhibir la formación de complejo. Como se observa en la tabla 1.1, y de acuerdo con el modelo alternativo propuesto por Szabo y colaboradores (Szabó et al., 2014), los resultados mostraron que la presencia del dUPNPP afectaba negativamente a la interacción entre BovI-Stl y las Duts analizadas (Tabla 1.1). Así pues, en presencia de dUPNPP, la afinidad de ambas Duts por el represor disminuyó,

aunque este efecto era mucho mayor para Dut ϕ 11 que para Dut80 α , ya que la primera presentaba una disminución en su afinidad de dos ordenes de magnitud (de $1,8 \times 10^{-9}$ a $3,0 \times 10^{-7}$ M) mientras que la segunda era solo de uno (de $4,0 \times 10^{-8}$ a $4,7 \times 10^{-7}$ M) (Tabla 1.1). El análisis de sus constantes reveló que la caída del valor de afinidad es efecto de una reducción de sus constantes de asociación (k_{on}), apoyando así el mecanismo propuesto por Szabo y colaboradores donde el represor BovI-Stl y el dUTP competirían por la unión de la enzima (Szabó *et al.*, 2014). Por lo tanto, y en concordancia con esta hipótesis, el hecho de que la presencia del dUPNPP afecte más a la Dut ϕ 11^{WT} se explicaría con las diferentes afinidades de las Duts en su forma apo por el represor ($4,0 \times 10^{-8}$ para Dut80 α ^{WT} y $1,8 \times 10^{-9}$ para Dut ϕ 11^{WT}).

Estos resultados además apoyan a los previamente demostrados en la bibliografía mediante ensayos *in vivo* de la inducción del ciclo de SaPIbov1 (Tormo-Más *et al.*, 2010). En este caso, si analizamos estas constantes más en detalle, podemos observar que la diferencia entre ambas afinidades se debe a los valores de k_{off} ($1,0 \times 10^{-3}$ para la Dut80 α ^{WT} y $9,2 \times 10^{-5}$ para la Dut ϕ 11^{WT}) (Tabla 1.1). Que el complejo BovI-Stl: Dut ϕ 11^{WT} se disocie de manera menos efectiva pone de manifiesto su estabilidad comparado con el formado con la Dut80 α ^{WT}.

Habiendo confirmado que el dUTP inhibe la formación del complejo de las Duts triméricas estudiadas con BovI-Stl, faltaba resolver la disputa de la implicación de los motivos V y VI en este mecanismo. Como se ha comentado previamente durante la introducción, las Duts presentan un motivo no conservado altamente variable en secuencia y longitud al que se le denominó motivo VI (Fig. 1.2, Fig. 1.3). La presencia de este motivo en una Dut trimérica se ha relacionado con funciones moonlighting en diferentes organismos (Chu *et al.*, 1996; Muha *et al.*, 2012; Pecsí *et al.*, 2012). Por ello, nuestro grupo de investigación junto al laboratorio del Dr. Penadés, propusieron que este motivo también sería clave para la formación del complejo BovI-Stl:Dut trimérica y, por lo tanto, de la función

moonlighting en la transferencia horizontal de genes (Tormo-Más *et al.*, 2010). Los resultados de afinidad de Dut80 α ($4,0 \times 10^{-8}$ M) y Dut ϕ 11 ($1,4 \times 10^{-9}$ M) obtenidos a través de la técnica BLI pusieron de manifiesto la superioridad de la estabilidad del complejo BovI-Stl: Dut ϕ 11 (Tabla 1.1). Por ello, es lógico pensar que, debido a la conservación de su secuencia y por lo tanto la similitud entre ellas, esta diferencia de afinidad vendría dada por residuos o zonas variables entre ambas, lo que centraría la atención sobre el motivo VI (Fig. 1.2, Fig. 1.3).

Tabla 1.1. Cambios en las cinéticas de interacción entre BovI-Stl y las Duts Dut80 α ^{WT} y Dut ϕ 11^{WT} en presencia o ausencia de nucleótidos a) Proteína marcada con etiqueta de histidinas. b) El dUPNPP se usó a una concentración final de 0.5 mM. Valores obtenidos mediante interferometría de biocapa (BLI).

Proteína ^a	Nucleótido ^b	K _D (K _{off} /K _{on}) (M)	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)
Dut80 α ^{WT}	-	$4,0 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^4 \pm 6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$
	dUPNPP	$4,7 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^3 \pm 2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$
Dut ϕ 11 ^{WT}	-	$1,8 \times 10^{-9}$	$5,4 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2$	$9,2 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-6}$
	dUPNPP	$3,0 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^3 \pm 1 \times 10^2$	$6,0 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
Dut80 α ^{AV}	-	$5,3 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^4 \pm 4 \times 10^2$	$9,0 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$
Dut ϕ 11 ^{AV}	-	$1,4 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$	$4,0 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$
Dut80 α ^{AVI}	-	UND ^c		
Dut ϕ 11 ^{AVI}	-	$1,1 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^4 \pm 1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-5}$
Dut ϕ 11 ^{AV-AVI}	-	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^4 \pm 1 \times 10^2$	$1,9 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-5}$

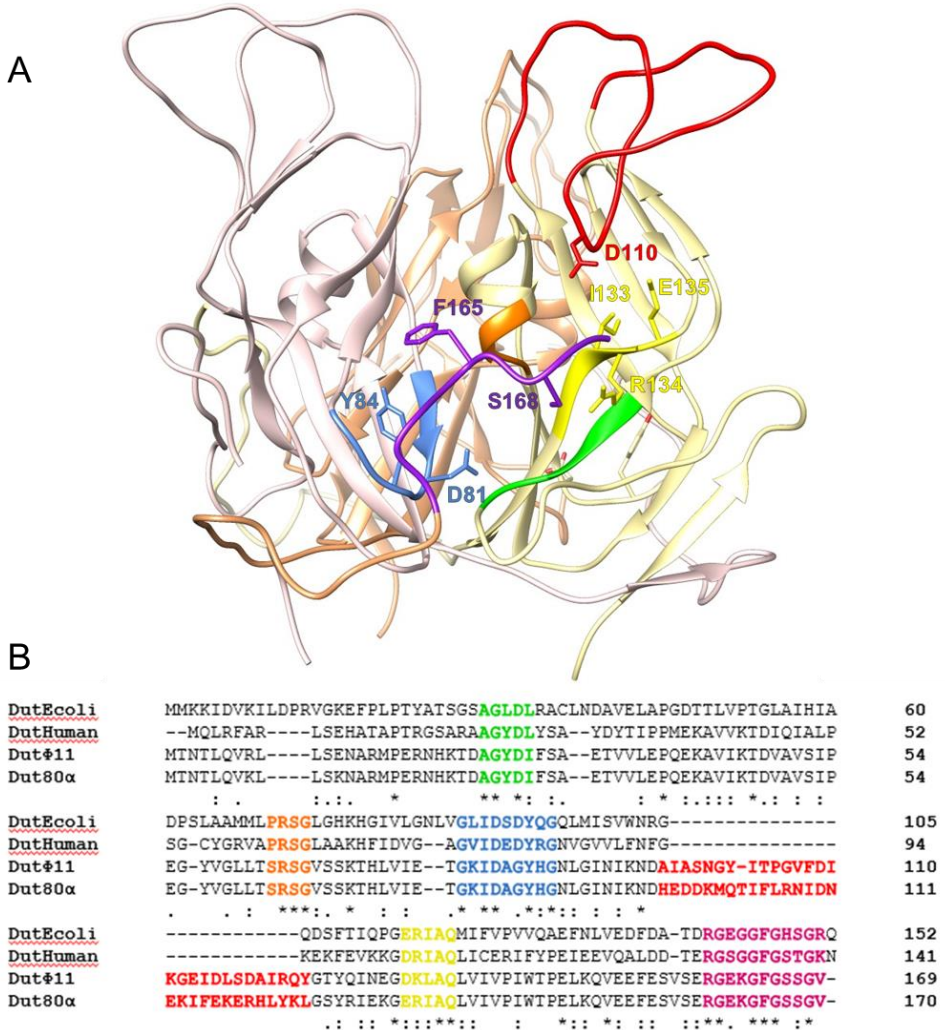


Figura 1.2. Visualización espacial de zonas y residuos relevantes para la interacción BovI-Sil:Dut usando como ejemplo la estructura de Dut80α^{WT}. (A) Estructura del homotrímero (monómeros en naranja, amarillo y rosa) de Dut80α^{WT} (PDB 3ZEZ), resaltando todos los motivos de la Dut (I, verde; II, naranja; III, azul; IV, amarillo; V, morado; VI, rojo) así como los aminoácidos intercambiados del motivo IV en los mutantes IV-11 y IV-80. Los residuos analizados se muestran etiquetados y en forma de sticks. (B) Alineamiento de las secuencias de las Duts fágicas Dut80α^{WT} y Dutϕ11^{WT} junto a Duts de procariontas (*E.coli*) y eucariotas (humana). Los motivos están coloreados de acuerdo a la figura del trímero.

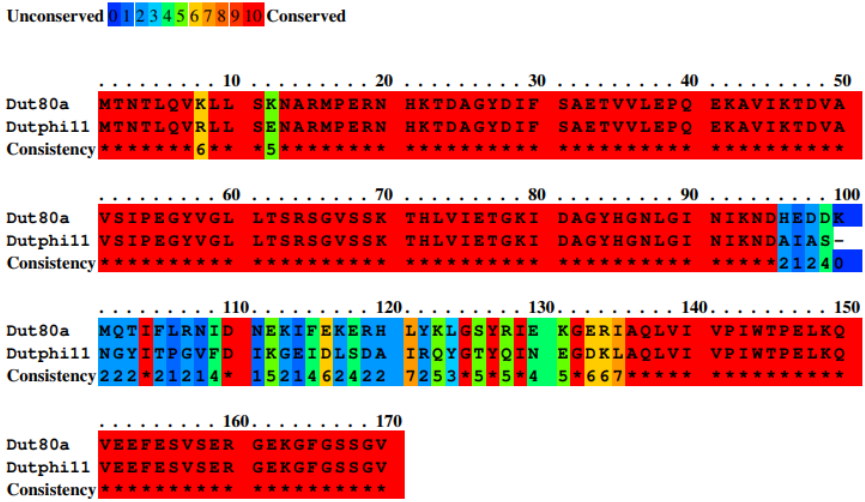


Figura 1.3. Conservación de secuencia entre *Dut80α^{WT}* y *Dutφ11^{WT}*. Los colores indican la conservación relativa de la secuencia en cada posición, siendo rojo muy conservado y azul muy poco conservado (modificación de alineamiento generado con PRALINE alignment).

La especificidad en la unión a BovI-Stl medida mediante ensayos de BLI en el caso del mutante a *Dut80α^{ΔVI}* resultó en una interacción indetectable por la técnica ($>1 \times 10^{-6}$ M). Por otro lado, los resultados con la *Dutφ11* mostraron una reducción de un orden de magnitud en comparación a la forma silvestre (de $1,8 \times 10^{-9}$ M a $1,1 \times 10^{-8}$ M). Con respecto a la implicación del motivo V, el análisis de sus constantes cinéticas mediante BLI mostraron resultados que, aunque contradictorios, planteaban un misterio muy interesante. En el caso de los mutantes delecionales para el motivo V, y como se observa en la Tabla 1.1, la afinidad del mutante *Dut80α^{ΔV}* por BovI-Stl disminuye en un orden de magnitud, mientras que la del mutante *Dutφ11^{ΔV}* se ve inalterada. Que estas mutaciones mostraran cambios tan dispares en su afinidad por BovI-Stl fue una sorpresa ya que la secuencia del motivo V para ambas es la misma. Por lo tanto, que la eliminación de una misma secuencia para dos proteínas prácticamente idénticas tenga resultados tan diferentes de nuevo solo se puede explicar a través de la contribución de zonas variables entre las mismas. Por ello, decidimos utilizar un

doble mutante delecional para el motivo V y VI (Dut ϕ 11 ^{Δ V- Δ VI}). Dos escenarios eran posibles con este mutante, o i) realmente el motivo V no está implicado en la formación del complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11 y la interacción presentaría valores similares a los mostrados previamente por el mutante delecional para el motivo VI o ii) se observaría una disminución en la afinidad para este mutante. Como era de esperar, la mutación Dut ϕ 11 ^{Δ V- Δ VI} obtuvo valores para la constante de disociación dos órdenes de magnitud inferiores a la proteína silvestre ($1,1 \times 10^{-7}$ M frente a $1,8 \times 10^{-9}$ M, respectivamente) y de un orden de magnitud comparado con el mutante Dut ϕ 11 ^{Δ VI} ($1,1 \times 10^{-8}$ M) (Tabla 1.1). Por lo tanto, estos resultados apoyan la implicación del motivo V en la interacción con BovI-Stl en ambas Duts.

Así pues, estos datos sugerían que ambos, motivo V y VI de las Duts triméricas, están implicados en la interacción con Stl y que el motivo VI, variable entre Duts, sería el que modularía la afinidad de las Duts triméricas por el represor. No obstante, esta hipótesis no encajaría con los datos obtenidos con los mutantes delecionales para el motivo VI (Tabla 1.1). Si este motivo modulase la interacción, su deleción debería traer como consecuencia valores de afinidad similares para todas las Duts desprovistas del mismo. Sin embargo, la Dut ϕ 11 es capaz de mantener una buena afinidad por el represor incluso desprovista de motivo VI, el cual parece ser clave para la Dut80 α . Con el fin de encontrar respuestas para este mecanismo de interacción molecular incompleto, y dados los resultados anteriores acerca de la inhibición de la formación de complejo en presencia de ligando, decidimos estudiar el centro activo junto a los residuos clave para la función enzimática de la Dut.

El centro activo como zona de anclaje en la formación de complejo BovI-Stl:Dut trimérica.

Inicialmente, nuestro grupo propuso que el motivo V estaría implicado en la formación del complejo una vez sufre el cambio conformacional y se sitúa sobre el centro activo tras su unión con el ligando (Tormo-Más *et al.*, 2013), pero el hecho de que tanto el dUTP como el represor compitan por el centro activo descarta la hipótesis. No obstante, y debido a la confirmación de la implicación de este motivo, pensamos en que la interacción del motivo V con el represor podría darse una vez BovI-Stl interactuase con un centro activo libre.

Como se ha comentado previamente durante la introducción, la unión del dUTP al centro activo de las Duts triméricas induce un cambio conformacional en el *P-loop* situado en el motivo V e interviene en la hidrólisis. En este correcto posicionamiento juega un papel clave un residuo (Phe o His) que interactúa con la base nitrogenada del ligando situándose sobre el anillo del uracilo y se ha propuesto que tiene un papel tanto en el posicionamiento de este motivo sobre el centro activo como en la actividad catalítica de las Duts (Mol *et al.*, 1996; Peci *et al.*, 2010) (Fig. 1.2; Fig. 1.3). Por ello, junto con el mutante delecional del motivo V, se generó el mutante F165A (Dut80 α ^{F165A}) para analizarlo por BLI. Datos de nuestro grupo y del grupo del Dr. Penadés publicados como parte de una tesis paralela a esta muestran que esta mutación genera una proteína catalíticamente inactiva y que es además incapaz de inducir la movilidad de la SaPI.

En análisis por BLI del mutante Dut80 α ^{F165A} muestra una afinidad un orden de magnitud menor que su forma silvestre por BovI-Stl, presentando así resultados muy similares a los obtenidos con el mutante Dut80 α ^{AV}. Que el cambio de un único residuo genere un impacto similar a la deleción de todo un motivo indica su importancia en la formación del complejo (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Efecto de mutaciones sobre los motivos III y V de las Duts 80 α y ϕ 11 en la interacción con BovI-Stl. a) Proteína marcada con etiqueta de histidinas. b) El dUPNPP se usó a una concentración final de 0.5 mM. Valores obtenidos mediante interferometría de biocapa (BLI). c) UND indica la ausencia de interacción bajo las condiciones experimentales ($K_D > 1 \times 10^{-6} M$). Valores obtenidos mediante interferometría de biocapa (BLI).

Proteína ^a	Nucleótido ^b	K_D (K_{off}/K_{on}) (M)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})
Dut80α^{WT}	-	$4,0 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^4 \pm 6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$
	dUPNPP	$4,7 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^3 \pm 2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$
Dut80α^{D81A}	-	$1,6 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^4 \pm 9 \times 10^2$	$4,2 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$
Dut80α^{Y84A}	-	UND ^c		
Dut80α^{F165A}	-	$5,8 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$	$1,6 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-4}$

A su vez, los resultados obtenidos mediante el uso de dos mutantes sobre la Dut80 α previamente caracterizados por el grupo y que pertenecen a una tesis paralela (Dut80 α ^{D81A} y Dut80 α ^{Y84I} sobre el motivo III) apoyan la idea de necesitar un centro activo libre para facilitar el complejo BovI-Stl (Tormo-Más *et al.*, 2013). Estos mutantes presentan cambios en los residuos del centro activo que participan en la hidrólisis o unión del nucleótido. La mutación Dut80 α ^{D81A} se da sobre un residuo ácido que activa la molécula agua para el ataque nucleofílico durante la hidrólisis del dUTP (Barabas *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2004). Por lo tanto, este mutante es capaz de unir el nucleótido, pero es deficiente en su hidrólisis. Como se ve reflejado en la Tabla 1.2, el mutante Dut80 α ^{D81A} presenta una afinidad algo menor por BovI-Stl respecto al WT (K_D de 161 nM para Dut80 α ^{D81A} frente 40 nM para Dut80 α ^{WT}). Esta disminución en la afinidad, aunque pequeña, parece tener grandes consecuencias a nivel de los ensayos *in vivo*, ya que este mutante no puede inducir el ciclo de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2013). En cambio, la mutación sobre la Y84 (Dut80 α ^{Y84I}), un residuo encargado

de la unión del ligando en el centro activo, muestra una afinidad aún mucho menor (por encima del límite de detección mediante BLI) por el represor StI de SaPIbovI (Tabla 1.2). Las afinidades para estos mutantes presentan una constante de asociación (K_{on}) igual a la de su variante silvestre, sin embargo, la constante de disociación (K_{off}) es más grande en el caso de los mutantes, indicando que dichos residuos no solo son importantes para su interacción, sino que pueden servir de puntos de anclaje que ayudarían a la estabilidad del complejo BovI-StI:Dut trimérica.

Estos resultados ponen de manifiesto no solo la necesidad de un centro activo libre sino también la capacidad de acomodar al nucleótido, indicando que los residuos encargados en su reconocimiento pueden ser probablemente los mismos implicados en la unión a BovI-StI. Al menos, los resultados obtenidos con Dut80 α^{WT} implican al motivo V a través de la F165 y al motivo III a través de los residuos D81 e Y84.

Encontrando el eslabón perdido. La implicación del motivo IV en la unión de BovI-StI apoya un mecanismo de interacción generalizado.

Como hemos comentado anteriormente, las secuencias de Duts triméricas codificadas por fagos que infectan a *S. aureus* están altamente conservadas a excepción del motivo VI (Fig. 1.3). Esto incita a pensar que existe un mecanismo general de interacción donde las Duts interaccionan con el represor StI de SaPIbovI a través de los mismos residuos o motivos donde el centro activo juega un papel muy importante. Por ello, y como se ha mostrado en este mismo capítulo, que dos Duts desprovistas de este único motivo variable tengan afinidades diferentes implicaban a uno o más factores que no habían sido detectados previamente. Por ello, se compararon las secuencias de ambas Duts eliminando los motivos VI y se concluyó que son básicamente idénticas a excepción de nueve residuos (Fig. 1.4). De estos nueve residuos, nuestra atención se centró en tres de ellos (Glu133/Arg134/Ile135 en Dut80 α , o

respectivamente) y consiguiendo valores similares a los presentados por la Dut ϕ 11^{WT}. Por lo tanto, los resultados apuntaban a que estos tres residuos eran capaces de modular la interacción con BovI-Stl junto al motivo VI. Para confirmar esta hipótesis, decidimos realizar la misma mutación en los mutantes delecionales del motivo VI, generando los mutantes Dut80 α^{Δ VI-IV-11 y Dut ϕ 11 ^{Δ VI-IV-80 α} . De esta manera podríamos conocer su contribución neta en la formación del complejo BovI-Stl:Dut trimérica. En concordancia con nuestra hipótesis, los resultados obtenidos sobre estos mutantes mostraron la importancia de los tres residuos señalados del motivo IV. En el caso de la Dut80 α , esta mutación no solo demostró tener una afinidad por BovI-Stl detectable por BLI, en contraposición del mutante Dut80 α^{Δ VI (Tabla 1.3), sino que además estos valores fueron superiores a los obtenidos con su versión silvestre, siendo éstos similares a los encontrados en Dut ϕ 11^{WT}. Por otro lado, en el caso de la Dut ϕ 11, el cambio de estos tres residuos provocó que la afinidad del mutante Dut ϕ 11 ^{Δ VI} pasara de $1,1 \times 10^{-8}$ M a ser indetectable por BLI ($>1 \times 10^{-6}$ M) (Tabla 1.3), lo que se relacionaría con los resultados obtenidos por el mutante Dut80 α^{Δ VI (Tabla 1.3).

Estos resultados se ven apoyados por los obtenidos *in vivo* por el grupo del Dr. Penadés en la Universidad de Gaslgow. Mientras el mutante Dut80 α^{Δ VI-IV-11 presenta bandas del ADN de la isla más intensas que su versión silvestre, el mutante Dut ϕ 11 ^{Δ VI-IV-80} no parece generar una expresión detectable por el *Southern blot*, confirmando que el cambio de los tres residuos del motivo IV provoca un gran cambio en su capacidad de inducción (Fig. 1.5). Se descartó que estos resultados fueran debidos a una diferencia de expresión de las Duts mediante la comprobación de los niveles de expresión proteica por *Western Blot* (Fig. 1.5).

Tabla 1.3. Cambios en las cinéticas de interacción entre BovI-Stl y los mutantes del motivo IV en las Duts de los fagos 80 α y ϕ 11 en presencia o ausencia de nucleótidos
a) Proteína marcada con etiqueta de histidinas. b) El dUPNPP se usó a una concentración final de 0.5. Valores obtenidos mediante interferometría de biocapa (BLI).
c) UND indica la ausencia de interacción bajo las condiciones experimentales ($K_D > 1 \times 10^{-6} M$). Valores obtenidos mediante interferometría de biocapa (BLI).

Proteína ^a	Nucleótido ^b	K_D (K_{off}/K_{on}) (M)	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})
Dut80α^{WT}	-	$4,0 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^4 \pm 6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$
	dUPNPP	$4,7 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^3 \pm 2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$
Dut80α^{AVI-IV-11}	-	$4,6 \times 10^{-9}$	$5,7 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2$	$2,6 \times 10^{-4} \pm 6 \times 10^{-6}$
Dut80α^{IV-11}	-	$3,1 \times 10^{-9}$	$6,7 \times 10^4 \pm 2 \times 10^1$	$2,1 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-5}$
Dutϕ11^{WT}	-	$1,8 \times 10^{-9}$	$5,4 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2$	$9,2 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-6}$
	dUPNPP	$3,0 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^3 \pm 1 \times 10^2$	$6,0 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$
Dutϕ11^{AVI-IV-80α}	-	UND ^c		
Dutϕ11^{IV-80α}	-	$3,3 \times 10^{-9}$	$7,5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$

Por lo tanto, nuestros resultados en conjunto con los obtenidos *in vivo* indican que solo el cambio de los residuos seleccionados del motivo IV hace que una Dut tenga el fenotipo o la capacidad de unión de otra Dut. Así pues, se relaciona indudablemente al motivo IV como una pieza clave del mecanismo de interacción con BovI-Stl que condiciona la estabilidad del complejo a través de la demanda de dominios adicionales, como el motivo III, V y VI, en una misma área donde todos deben proveer la superficie de interacción para la formación de complejo y consecuentemente, la inducción del ciclo de la SaPI.

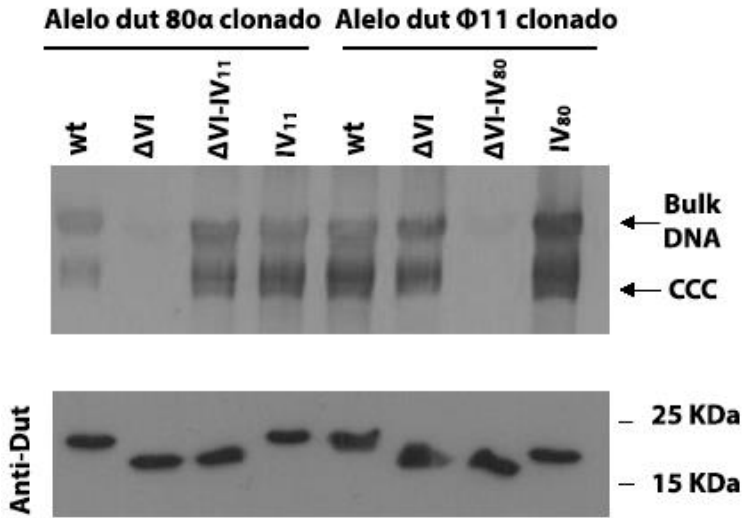


Figura 1.5. Efecto de las mutaciones sobre el motivo IV de Duts triméricas en la replicación de la isla de SaPIbovI. Escisión y replicación de SaPIbovI tras la inducción de los alelos dut de los fagos $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$. Una cepa no lisogénica derivada de la cepa RN4220 portadora de SaPIbovI se complementó con plásmidos derivados del pCN51 capaces de expresar las diferentes Duts etiquetadas con 3xFLAG. Se tomó un mililitro de cada uno de los cultivos ($OD_{540} = 0.2$) pasadas 2 horas tras el tratamiento con $2 \mu M$ CdCl₂ para obtener las muestras que fueron analizadas por gel de agarosa 0,7% y Southern blot.

Caracterización *in vitro* de las Duts triméricas Dut80α, Dutφ11 Dutφ85 y Dutφ71bel

Habiendo delimitado e identificado las zonas que utilizan las Duts de los fagos $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$ para interactuar con BovI-StI y habiendo propuesto un modelo de interacción generalizado en Duts triméricas para la formación del complejo con el represor de SaPIbovI, el siguiente paso de este trabajo fue estudiar otras Duts triméricas de fagos estafilocócicos. Previo a este trabajo de tesis, el grupo del Dr. Penadés en la Universidad de Glasgow ya se había explorado la posibilidad de que nuevas Duts de fagos de *S. aureus*, en concreto

las correspondientes a los fagos $\phi 85$ y Dut $\phi 71$ bel, pudieran ejercer la misma función *moonlighting*. Estas Duts, el igual que el resto de Duts triméricas, mantienen una secuencia muy conservada en los motivos implicados en el reconocimiento e interacción con BovI-Stl, pero son altamente variables en el motivo VI específico (Fig. 1.6).

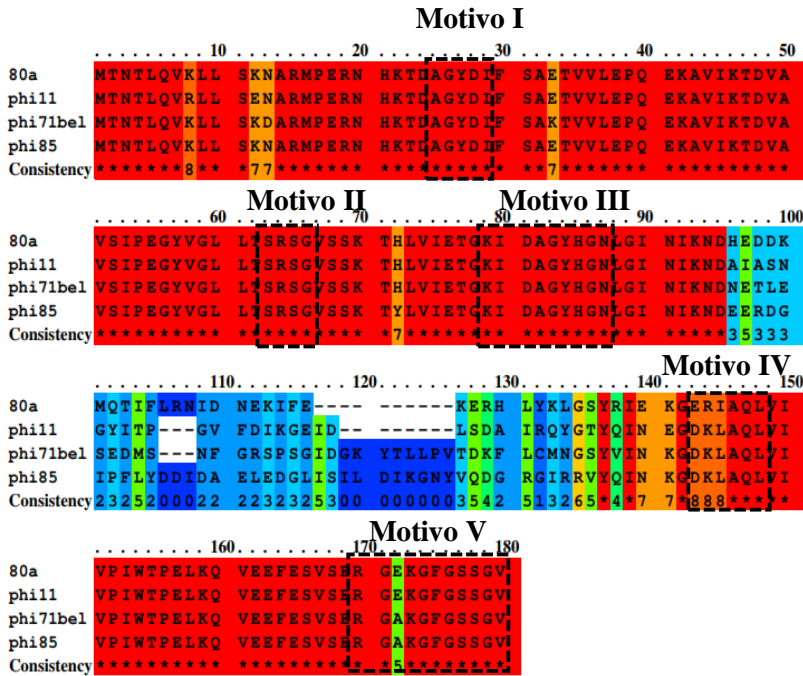


Figura 1.6. Alineamiento de secuencia de las dUTPasas codificadas por bacteriófagos. Los colores indican la conservación relativa de la secuencia en cada posición, siendo rojo muy conservado y azul muy poco conservado (modificación de alineamiento generado con PRALINE alignment). Los motivos del I-V, conservados entre Duts triméricas, se recuadran y etiquetan. El motivo VI muestra su alta variabilidad tanto en longitud como en secuencia, abarcando toda la secuencia con tonos azulados.

Además, también contábamos con la caracterización estructural realizada en un trabajo de tesis paralelo por el Dr. Jordi Donderis, donde se observó la conservación no solo de secuencia, sino que todas estas Duts presentan una estructura extremadamente similar para el cuerpo principal del enzima

correspondiente a la zona de secuencia conservada, guardando así la misma arquitectura entre ellas y con otras Duts triméricas (Fig. 1.7). En todas las estructuras las subunidades que componen el trímero para cada una de estas tres Duts presentan el plegamiento clásico de hebras β antiparalelas que definen un barril β compuesto por 9 hebras y que incluye una sola α -hélice. Las tres subunidades se organizan alrededor de un canal central que forma el eje del trímero haciéndole tomar una apariencia piramidal (Fig. 1.2, Fig. 1.7). Sin embargo, a pesar de tener resultados *in vivo* y estructurales y de haber sido propuestas como inductoras de SaPIBov1, las Duts de los fagos $\phi 85$ y $\phi 71\text{bel}$ carecían de una caracterización *in vitro*, la cual fue llevada a cabo en este trabajo.

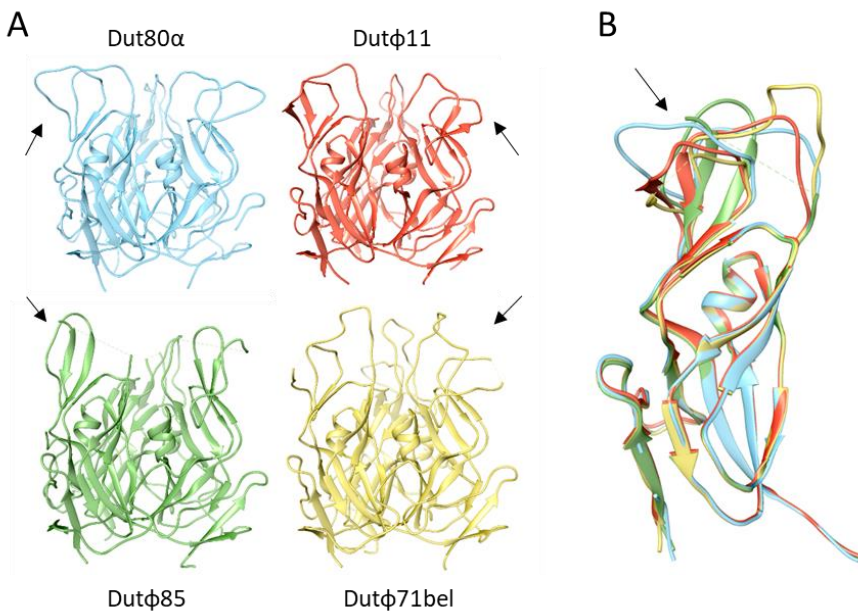


Figura 1.7. Estructuras de Duts80 α , Duts $\phi 85$, Duts $\phi 71\text{bel}$ y Duts $\phi 11$. Estructura de los homotrimeros de Duts80 α (PDB 3ZEZ) (tonalidades de azul), Duts $\phi 85$ (tonalidades de verde), Duts $\phi 71\text{bel}$ (tonalidades de amarillo) y Duts $\phi 11$ (tonalidades de rojo). El motivo VI (magenta) está señalizado en todas las estructuras mediante flechas de color negro. Las moléculas de ligando se encuentran representadas en sticks de color rojo (Duts80 α), morado (Duts $\phi 85$) magenta (Duts $\phi 71\text{bel}$) y verde (Duts $\phi 11$).

En el caso de las mediciones por interferometría de biocapa de la comparación de la interacción de las proteínas silvestres Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel con StI de SaPIbov1 mostraron que la Dut ϕ 85 presentaba la mayor afinidad por el represor, aunque sus constantes de disociación son muy similares entre sí ($1,03 \times 10^{-9}$ M y $4,54 \times 10^{-9}$ M para Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, respectivamente). Además, estas constantes fueron comparables con la calculada anteriormente para la Dut ϕ 11 ($1,84 \times 10^{-9}$ M) (Tabla 1.4). En ambos casos, los datos de afinidad de la Dut ϕ 71bel y la Dut ϕ 85 son un orden de magnitud superior a la que presentaba la Dut80 α ($4,01 \times 10^{-8}$ M).

Los datos presentados anteriormente en este trabajo incluyeron al motivo IV de las Duts en la ecuación de la interacción con BovI-StI, indicando que las diferencias de afinidad entre la Dut80 α y la Dut ϕ 11 eran debidas a la composición de los residuos de dicho motivo. Los presentes resultados apoyan esta propuesta dado que tanto la Dut ϕ 85 como la Dut ϕ 71bel presentan una secuencia idéntica de este motivo IV a la mostrada por la Dut ϕ 11 (Fig. 1.6). Además, cabe destacar que los mutantes delecionales para los motivos V y VI de la Dut ϕ 85, en términos de afinidad, se comportan del mismo modo que aquellos generados en la Dut ϕ 11, lo que destaca la importancia del motivo IV en la unión a BovI-StI (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Medidas cuantitativas para la interacción entre las Duts estudiadas y BovI-Stl. Estas medidas se han realizado mediante interferometría de biocapa (BLI). Las proteínas marcadas con etiqueta de histidina fueron las Duts y sus mutantes delecionales, enfrentados a BovI-Stl sin etiqueta. UND indica la ausencia de interacción bajo las condiciones experimentales ($K_D > 1 \times 10^{-6} M$).

Proteína	Forma	K_D (M)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
Dut80 α	WT	$4,01 \times 10^{-8}$	$2,50 \times 10^4 \pm 6,04 \times 10^2$	$1,02 \times 10^{-3} \pm 3,07 \times 10^{-5}$
	ΔV	$5,33 \times 10^{-7}$	$1,70 \times 10^4 \pm 4,01 \times 10^2$	$9,05 \times 10^{-4} \pm 2,04 \times 10^{-5}$
	ΔVI	UND		
Dut ϕ 11	WT	$1,84 \times 10^{-9}$	$5,01 \times 10^4 \pm 3,06 \times 10^2$	$9,19 \times 10^{-5} \pm 3,04 \times 10^{-6}$
	ΔV	$1,42 \times 10^{-9}$	$2,82 \times 10^4 \pm 2,03 \times 10^2$	$4,07 \times 10^{-5} \pm 2,03 \times 10^{-6}$
	ΔVI	$1,14 \times 10^{-8}$	$2,10 \times 10^4 \pm 1,01 \times 10^2$	$1,41 \times 10^{-4} \pm 2,02 \times 10^{-6}$
Dut ϕ 85	WT	$1,03 \times 10^{-9}$	$2,04 \times 10^4 \pm 1,31 \times 10^2$	$2,09 \times 10^{-5} \pm 1,04 \times 10^{-6}$
	ΔV	$2,64 \times 10^{-9}$	$2,69 \times 10^4 \pm 9,84 \times 10^1$	$7,10 \times 10^{-5} \pm 1,95 \times 10^{-6}$
	ΔVI	$6,04 \times 10^{-8}$	$1,25 \times 10^4 \pm 1,05 \times 10^2$	$7,56 \times 10^{-4} \pm 1,07 \times 10^{-5}$
Dut ϕ 71bel	WT	$4,54 \times 10^{-9}$	$2,99 \times 10^4 \pm 2,62 \times 10^2$	$1,36 \times 10^{-4} \pm 5,66 \times 10^{-6}$

El análisis *in vitro* de la actividad enzimática de estas Duts mostró ciertas diferencias (Fig. 1.8 y Tabla 1.5). Mientras que las Duts 80 α y ϕ 71bel presentan una velocidad máxima o actividad específica similar, la Dut ϕ 85 muestra una capacidad catalítica superior con un valor que dobla la V_{max} de ambas. Por otro lado, la Dut ϕ 11, aunque no tanto como la Dut ϕ 85, también es ligeramente superior catalíticamente a Duts 80 α y ϕ 71bel. No obstante, la K_M es muy similar para todas ellas (Tabla 1.5).

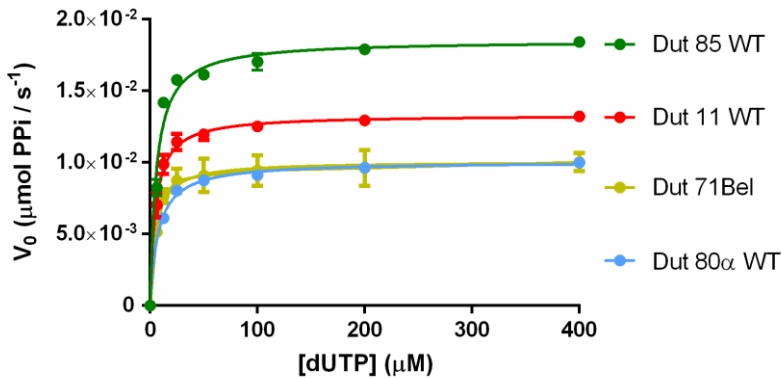


Figura 1.8. Representación gráfica de las medidas de actividad de las Duts estudiadas. Las mediciones fueron llevadas a cabo mediante la técnica de verde malaquita, una técnica colorimétrica donde se mide la producción de fosfato inorgánico y, posteriormente, se estudia mediante el análisis de Michaelis-Menten. Tanto el análisis como la representación gráfica ha sido realizada mediante el programa GraphPad Prism 6 y se muestra una leyenda colorada para identificar las curvas.

Tabla 1.5. Resumen de los valores cinéticos de las Duts estudiadas. En la tabla se muestran los valores de las constantes cinéticas enzimáticas para las Duts sometidas a estudio. Los cálculos han sido realizados por el programa GraphPad Prism 6.

Dut	80α	φ11	φ85	φ71bel
V _{max} (μmol/s ⁻¹)	0,010	0,013	0,019	0,01
K _M (μM)	7,50 ± 0,50	4,98 ± 0,42	5,73 ± 0,51	4,94 ± 0,89
K _{cat} (s ⁻¹)	2250	3569	5117	2710
K _{cat} /K _M (M ⁻¹ s ⁻¹)	30,0x10 ⁷	71,7x10 ⁷	89,3x10 ⁷	54,9x10 ⁷

A pesar de haber relacionado la actividad enzimática de las Duts con su capacidad inductora de SaPIbovI, los resultados obtenidos no muestran una relación lineal entre ambas variables. Aunque las Duts de los fagos φ85 y φ11 presenten velocidades máximas ligeramente superiores, el hecho de obtener valores con la Dutφ71bel iguales a los de la Dutφ80α no permite establecer dicha correlación.

CAPÍTULO II

Contribución personal

Anteriormente nuestros colaboradores pusieron de manifiesto que el mutante Dut80 α ^{D95E} no podía inducir el ciclo SaPIbovI (Tormo-Más, *et al.*, 2010), pero este mutante retenía la capacidad de hidrolizar el dUTP cuando se sobreexpresaba en *E. coli*. El poder separar la actividad enzimática de la dUTPasa de la capacidad inductora llevó a las Duts a ser consideradas proteínas *moonlighting*. Sin embargo, el resto de mutantes analizados mostraban una fuerte correlación entre la actividad catalítica, la unión a StI y capacidad de inducir la movilización de la isla. Descifrar la peculiaridad del mutante Dut80 α ^{D95E} ha sido una de las tareas de este trabajo de tesis que ha tenido como objetivo el conocer las bases moleculares sobre el mecanismo de interacción BovI-StI:Dut y la inducción de las SaPIs.

Mi contribución a este capítulo se trata tanto de la caracterización *in vitro* como estructural del mutante. Para ello, ha sido de nuevo necesaria la sobreexpresión de la proteína mutante como su forma silvestre; el uso de diferentes técnicas de purificación, que incluyen la cromatografía de afinidad y exclusión molecular; el uso de la interferometría en biocapa (BLI) para la medición de la cinética de la unión entre las diferentes Duts por el represor de la SaPI; el uso de la técnica de detección colorimétrica de verde malaquita para la medición de la actividad dUTPasa; el cálculo de las temperaturas de desnaturalización en el ensayo de termoestabilidad; así como la cristalización y resolución de las diferentes estructuras tridimensionales del mutante D95E por técnicas de difracción de rayos X de monocristales. Estas estructuras se resolvieron por reemplazo molecular a partir de datos de difracción recogidos en diferentes sincrotrones (DLS en Oxford, UK; y ALBA en Barcelona, España).

La actividad dUTPasa está ligada a la capacidad de unión a BovI-Stl en la Dut80 α .

Como se ha comentado anteriormente, las mutaciones sobre el centro activo o las deleciones del motivo V provocan cambios no solo en la actividad enzimática, sino que también disminuyen la afinidad de las Duts por BovI-Stl (Tabla 1.1). Así pues, los mutantes del motivo III D81A y Y84I o los mutantes del motivo V F165A, G164S y el propio mutante delecional (Dut80 $\alpha^{\Delta V}$) son defectivos en actividad dUTPasa (Tabla 1.2) y además disminuyen con un mínimo de un orden de magnitud su constante de afinidad por Stl (Tabla 1.1).

Esto es lógico sabiendo que i) en Dut80 α el motivo V es necesario para formar un complejo estable con BovI-Stl y que ii) la presencia de dUTP en el centro activo inhibe la formación de complejo BovI-Stl:Dut al, probablemente, estar utilizando los mismos residuos para su interacción y ser, por lo tanto, competidores. Sin embargo, un mutante puntual generado en el laboratorio de nuestros colaboradores de forma espontánea en la Dut80 α donde se cambia el Asp95 por un Glu (Dut80 α^{D95E}) planteó un reto interesante que nos obligó a replantearnos la afirmación de que la actividad dUTPasa está ligada a la capacidad de la enzima en interaccionar con el represor de la isla SaPIbovI, Stl.

Anteriormente nuestros colaboradores pusieron de manifiesto que el mutante Dut80 α^{D95E} no podía inducir el ciclo SaPIbovI (Tormo-Más, *et al.*, 2010), pero este mutante retenía la capacidad de hidrolizar el dUTP cuando se sobreexpresaba en *E. coli*. El poder separar la actividad enzimática de la dUTPasa de la capacidad inductora llevó a las Duts a ser consideradas proteínas *moonlighting*. Sin embargo, el

resto de mutantes analizados mostraban una fuerte correlación entre la actividad catalítica, la unión a StI y capacidad de inducir la movilización de la isla. Esta peculiaridad en el mutante Dut80 α ^{D95E} atrajo nuestra atención, ya que consideramos que conocer sus bases moleculares podría aportar información relevante sobre el mecanismo de interacción BovI-StI:Dut y la inducción de las SaPIs.

Capacidad de inducción de SaPIs del mutante Dut80 α ^{D95E}.

Para realizar un estudio detallado del mutante Dut80 α ^{D95E} comenzamos por analizar de forma detallada su capacidad de inducción de SaPIs. Para ello, el laboratorio del Dr. Penadés clonó en el vector de expresión pCN51 inducible por cadmio (Charpentier *et al.*, 2004) el gen que codifica la proteína Dut80 α ^{D95E}. En este plásmido, la versión expresada de la proteína porta una etiqueta N-terminal 3xFlag, consistente en 3 repeticiones de la secuencia (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) que nos permite seguir y cuantificar la proteína expresada en *S. aureus* utilizando anticuerpos específicos frente a dicha secuencia (anti-Flag). Estudios anteriores han demostrado que el indicador 3xFlag no afecta ni a las actividades inductoras ni a las actividades enzimáticas de las Duts (Tormo-Más *et al.*, 2013; Frigols *et al.*, 2015).

De acuerdo a los resultados del grupo del Dr. Penadés, la expresión del gen clonado en cepas que contienen SaPIbovI confirmó que el mutante Dut80 α ^{D95E} era incapaz de inducir el ciclo de la SaPI, incluso cuando se sobreexpresaba (Fig. 2.1A). La cuantificación con anti-Flag mostró que los niveles de Dut80 α ^{D95E} producido a partir de esta construcción eran comparables a los obtenidos cuando se utilizaba un plásmido que codificaba para la proteína en su versión silvestre (Fig.

2.1A), indicando que la mutación D95E no afecta la estabilidad o expresión de la Dut.

Además, para completar la caracterización de las capacidades de inducción *in vivo* del mutante Dut80 α ^{D95E}, se utilizó un plásmido que portaba un gen indicador de β -lactamasa fusionado a *xis*, *downstream* de *stl* que codifica para BovI-Stl (Fig. 2.1B). En condiciones normales, una cepa de *S. aureus* RN4220 que porta este plásmido, el gen reportero de la β -lactamasa no se expresa debido a la represión mediada por BovI-Stl que se expresa de forma constitutiva en el mismo plásmido. Esta cepa se transformó con los plásmidos pCN51 que expresan la Dut80 α ^{D95E} o su versión WT y se analizó la capacidad de estas Duts para inducir la expresión del gen reportero β -lactamasa en presencia o ausencia de una concentración inductiva de CdCl₂. Como era de esperar, la expresión de la forma WT inducía la expresión de β -lactamasa indicando que la unión de esta Dut a BovI-Stl es capaz de desreprimir el gen, sin embargo, en las mismas condiciones, el mutante Dut80 α ^{D95E} no mostró señal de β -lactamasa, confirmando que la mutación disminuye/impide la unión a BovI-Stl (Fig. 2.1C).

Finalmente, se introdujo la isla SaPI_{bov1} y SaPI_{bov5} en una cepa que contiene el mutante delecional para el gen *dut* del profago 80 α . Estas SaPIs transportan un marcador *tetM* insertado en el gen *tst*. Este marcador facilita los estudios de transferencia. Una vez que se generaron estas cepas, se transformaron las células con los plásmidos derivados de pCN51 que expresan las proteínas Dut80 α ^{WT} o Dut80 α ^{D95E}, junto con el plásmido pCN51 vacío como control. El ciclo del fago se indujo por respuesta SOS usando mitomicina C y se analizó la transferencia de las islas (Tabla 2.1). En este tipo de experimento, si

los genes *dut* clonados inducen el ciclo de SaPI, los fagos inducidos empaquetan y transfieren la SaPI generando un título de la isla significativamente mayor que para aquellas cepas donde no se produce inducción.

Tabla 2.1. Análisis de complementación de SaPIbov1 y SaPIbov5. a) número de transductores/ml de cultivo, utilizando RN4220 como la cepa receptora. b) Media de los resultados de tres experimentos independientes. La variación estuvo dentro del 5% en todos los casos.

SaPI	Dut expresada	Título SaPI ^{a,b}	
		Sin CdCl ₂	1 μM CdCl ₂
SaPIbov1	Dut80α ^{WT}	8,63x10 ⁵	9,43x10 ⁷
SaPIbov1	Dut80α ^{D95E}	8,07x10 ²	3,58x10 ³
SaPIbov1	-	9,57x10 ²	1,47x10 ³
SaPIbov5	Dut80α ^{WT}	7,19x10 ³	1,32x10 ⁶
SaPIbov5	Dut80α ^{D95E}	3,68x10 ³	4,88x10 ³
SaPIbov5	-	5,11x10 ³	5,09x10 ³

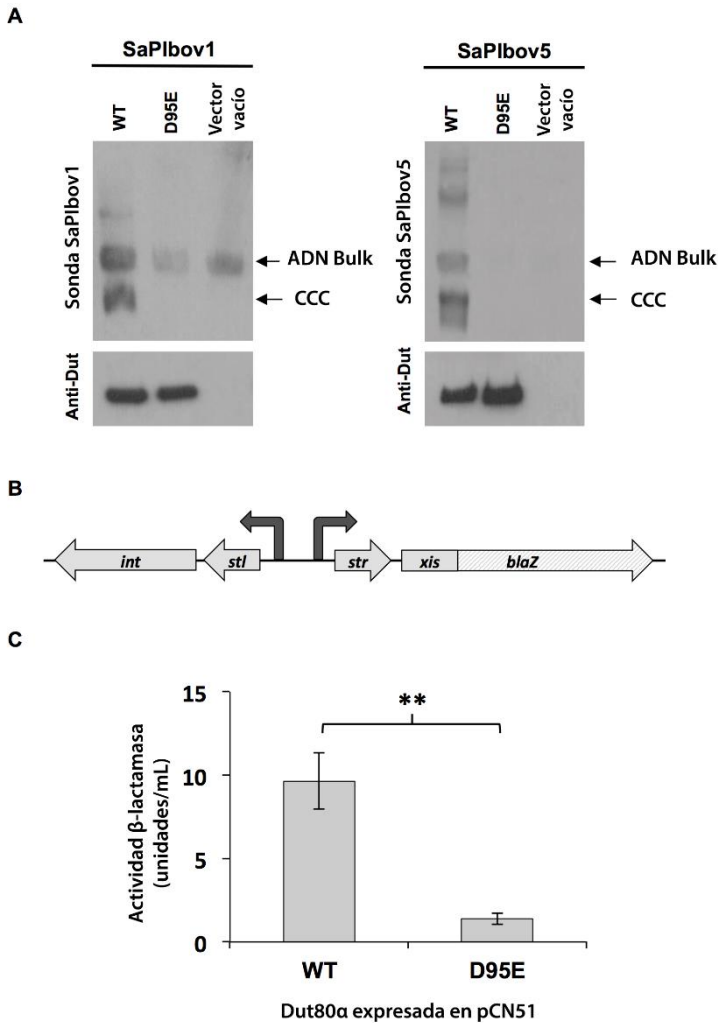


Figura 2.1. Inducción de SaPIbov1 y SaPIbov5 por Dut80 α D95E. (A) Un derivado no lisogénico de la cepa RN4220 portador de SaPIbov1 o SaPIbov5 se complementó con plásmidos que expresaban la 3xFLAG-Dut80 α (wt o D95E), o con el plásmido vacío pCN51. Se recogió 1 mL de cada cultivo (densidad óptica (OD₅₄₀) = 0,3) 3 h después del tratamiento con CdCl₂ 5 μ M y se usó para preparar lisados estándar, que se resolvieron en un gel de agarosa al 0,7%, Southern blot y se sondaron para ADN de SaPI. En ausencia de fagos auxiliares, el ADN de SaPI aparece como moléculas circulares cerradas covalentemente (CCC) en lugar de los monómeros lineales que se

observan después de la inducción y el empaquetamiento mediados por fagos auxiliares. El panel inferior es una transferencia Western como control al nivel de expresión de proteína. (B) Representación esquemática de la fusión transcripcional blaZ generada en el plásmido pJP674. (C) Las cepas que contienen plásmidos derivados pJP674 y pCN51 que expresan Dut80 α o Dut80 α D95E se analizaron para determinar la actividad β -lactamasa en ausencia de o 5 h después de la inducción con 5 μ M CdCl₂. Las muestras se normalizaron para la masa celular total. Los datos son de un experimento por triplicado. Las barras de error representan a la d.e. Los asteriscos denotan significación estadística en $p < 0.01$ usando un test t de Student no pareado.

De acuerdo con los resultados anteriores, cuando se sobreexpresó el mutante Dut80 α ^{D95E} no aumentó su título y, por lo tanto, la transferencia de las islas SaPI, lo que confirma su incapacidad para inducir el ciclo de la isla. Por el contrario, la forma silvestre experimentó un aumento en su título de al menos 2 órdenes de magnitud como es esperable cuando existe una inducción activa del ciclo de la SaPI (Tabla 2.1).

Estructura del mutante Dut80 α ^{D95E}.

Como se ha comentado anteriormente, el mutante Dut80 α ^{D95E} no podía inducir el ciclo SaPIbovI (Tormo-Más, *et al.*, 2010). No obstante, el hecho de conservar su actividad catalítica puso de manifiesto su validez como proteína *moonlighting* al poder realizar una de sus funciones sin necesidad de la otra. Sin embargo, esta divergencia no había sido estudiada en profundidad y planteó un reto para este trabajo.

La estructura tridimensional de Dut80 α había mostrado que el Asp95 es responsable de quelar un ion divalente en el canal central de la Dut (Fig. 2.2A) Dado que este residuo se localiza al comienzo del motivo VI (Fig. 2.2A) y que nuestros estudios previos demostraron que, aunque necesario para la inducción del ciclo de las SaPIs, este motivo

es prescindible para la actividad dUTPasa (Tormo-Más *et al.*, 2010; Tormo-Más *et al.*, 2013) se planteó la interesante posibilidad de que la mutación D95E afectara específicamente a conformación de este motivo VI. Para evaluar esta posibilidad abordamos la resolución de la estructura tridimensional del mutante Dut80 α ^{D95E} por difracción de rayos X, donde decidimos dos protocolos alternativos de purificación: el primero de ellos incluía MgCl₂ en el tampón de purificación, mientras que el segundo no, permitiéndonos evaluar el impacto a nivel estructural de este ion. Ambos protocolos de purificación resultaron en cristales de Dut80 α ^{D95E} en complejo con dUPNPP, obteniéndose en unas condiciones finales de cristalización muy similares. Para el mutante Dut80 α ^{D95E} purificado en ausencia de Mg²⁺ (Tipo I), la condición de cristalización consistía en 32% de etanol, 2% de PEG 1000 y 0.1 M de citrato de fosfato pH 4.2. En cuanto al mutante Dut80 α ^{D95E} purificado en presencia de Mg²⁺ (Tipo II) se obtuvieron cristales en condiciones que contenían 20% de etanol y 10% de glicerol. Además de la similitud entre las condiciones de cristalización, los cristales de ambos tipos, una vez difractados, mostraron un grupo espacial y unas dimensiones de celda casi idénticas tanto entre ellas como con los cristales previamente reportados de la proteína Dut80 α ^{WT} y otros mutantes de la misma (Fig. 2.2B y C, Tabla 2.2, PDB:33ZEE) (Tormo-Más *et al.*, 2013). A su vez, una vez procesadas las reflexiones, ambos cristales presentaron una sola molécula de Dut en la unidad asimétrica que era capaz de generar el trímero por simetría cristalográfica.

*Tabla 2.2 Colección de datos y estadísticas de refinado. *Los valores entre paréntesis pertenecen a la capa de mayor resolución.*

Colección de datos	Dut80α D95E	
	Cristal de tipo I	Cristal de tipo II
Línea del rayo	DLS-I04	ALBA-XALOC
Longitud de onda (Å)	0.97949	0.97921
Grupo espacial	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3
Dimensiones de la celda (Å)	a=b=c=87.19 α=β=γ=90	a=b=c=87.27 α=β=γ=90
Resolución (Å)	38.99-2.85 (3.00-2.85)	87.27-2.5 (2.6-2.5)
Reflexiones únicas	5130 (740)	7924 (882)
Complejitud (%)	96.1 (96.1%)	100 (100%)
Multiplicidad	2.2 (2.3)	18.0 (18.1)
I/σ(I)	5.2 (2.20)	15.4 (2.0)
R _{pim}	0.083 (0.320)	0.038 (0.573)
CC(1/2)	0.992 (0.803)	0.898 (0.658)
Refinado		
R _{work}	0.2283	0.2257
R _{free}	0.2775	0.2805
Número de átomos		
Proteína	1200	1300
Ligandos/iones	29	30
Aguas	21	14
Rmsd, uniones (Å)	0.0057	0.0059
Rmsd, ángulos (°)	1.04	1.14
Plano Ramachandran		
Preferidos (%)	98.04	95.71
Permitidos (%)	1.96	3.68

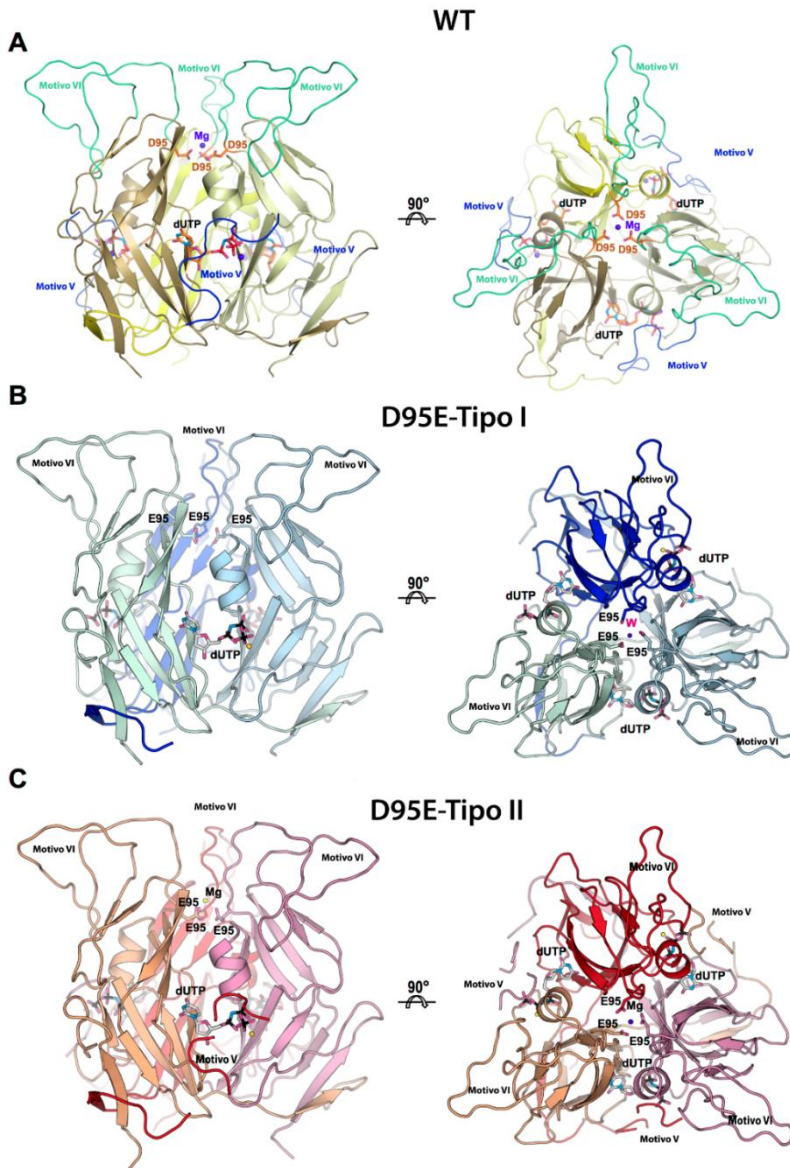


Figura 2.2. Estructuras del mutante $Dut80\alpha^{D95E}$. $Dut80\alpha^{WT}$ y $Dut80\alpha^{D95E}$ forman trímeros similares. (A) Estructura de $Dut80\alpha^{WT}$ (PDB: 3ZEZ13) y (B) $Dut80\alpha^{D95E}$ correspondientes a las purificaciones de Tipo I y (C) Tipo II. El Asp95 y Glu95 que ocupan la parte central del canal del trímero se representan como sticks en las estructuras wt y mutantes, respectivamente. El

ion Mg coordinado por el aspártico en la posición 95 se muestra como una esfera etiquetada (Mg). En la estructura del Dut80 α ^{WT} (monómeros individuales en diferentes tonalidades de amarillo), el motivo V (azul oscuro) y el motivo VI (cian) implicados en la interacción Sit se resaltan y se etiquetan. El Motivo VI también está etiquetado en el mutante D95E Tipo I (monómeros en diferentes tonos de azul) y Tipo II (monómeros en tonalidades rojas), pero el Motivo V solo está etiquetado en el Tipo II ya que solo es parcialmente visible en esta estructura. Los nucleótidos en el centro activo se muestran como sticks y etiquetados (dUTP).

Las similitudes entre los mutantes y las demás estructuras de la Dut80 α ya resueltas anticipaban una estructura y organización cuaternaria casi idéntica a la proteína silvestre. Sin embargo, la construcción de los modelos a partir de los datos obtenidos con los cristales producidos con proteína purificada en ausencia (Tipo I) o presencia (Tipo II) del ion de magnesio mostraron diferencias estructurales que, aunque pequeñas, conllevaban unas implicaciones mecanísticas relevantes. Como se muestra en la figura 2.2, la mutación D95E induce la reorientación de la nueva cadena lateral del Glu para evitar la repulsión electrostática entre los grupos carboxilato. Sin embargo, esto sucede de diferentes maneras en ambos tipos de cristales. En los cristales de Tipo I, en ausencia de ion Mg, se produce una rotación de la cadena lateral de alrededor de 80 grados sobre el átomo del carbono β que aleja los carboxilatos del Glu y los dispone en una posición donde son incapaces de coordinar el ion de magnesio y el canal central pasa a estar ocupado por una molécula de agua (Fig. 2.2 y Fig. 2.3). Sin embargo, en los cristales de tipo II la rotación es mucho menor. Esto se debe a que en los cristales de Tipo II, un ion Mg ocupa el canal central en una posición casi idéntica a la que se observó en la proteína WT, que ayuda a compensar las cargas de los glutámicos como ocurre con los aspárticos en la forma WT (Fig. 2.2 y Fig. 2.4).

Notablemente, el ion de Mg en los cristales de Tipo II mantiene una esfera de coordinación similar a la de la proteína WT, la cual se pierde en los cristales Tipo I (Fig. 2.3 y Fig. 2.4). El cálculo de su valor RMSD, indicador de la distancia espacial entre dos átomos que ocupan una misma posición al superponer dos estructuras (Maiorov and Crippen, 1994), indicó que el cambio en la coordinación del Mg^{2+} solo parece provocar movimientos leves en el *core* de la proteína afectando únicamente a cadenas laterales de residuos tanto vecinos como distantes. Además, la estructura de la cadena principal permanece inalterada (RMSD inferior a $0,3 \text{ \AA}^2$ para la superposición de todos los átomos de $C\alpha$ de ambos tipos de cristales con la proteína WT) (Fig. 2.5).

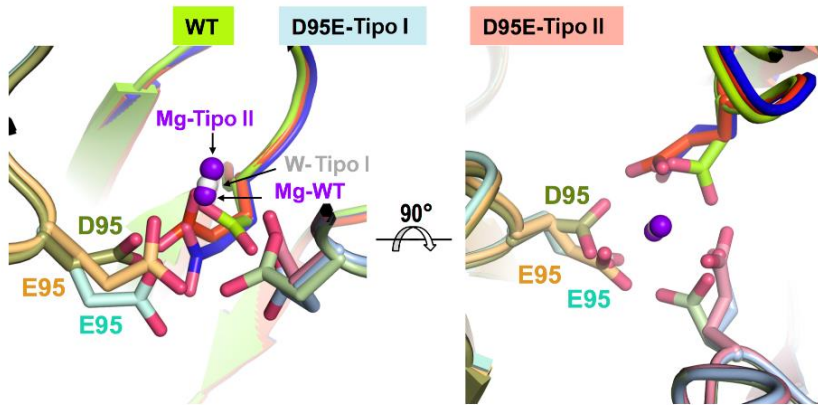


Figura 2.3. Reorganización del canal central inducida por la mutación D95E. La superposición estructural de las estructuras $Dut80\alpha^{WT}$ y $Dut80\alpha^{D95E}$ muestra que la mutación D95E induce pequeños cambios estructurales en el canal central del trímero restringidos a la reorientación de la cadena lateral del residuo 95. La disposición del Glu95 en el cristal del Tipo I afecta la coordinación del ion Mg en el canal central y esta posición está ocupada por una molécula de agua (esfera gris etiquetada como W-Tipo I). Sin embargo, en los cristales de Tipo II, las cadenas laterales del Glu95 adquieren una conformación alternativa que permite la coordinación del ion Mg (esfera magenta etiquetada como Mg-Tipo II) pero desplazada con respecto al ion Mg observado en la estructura WT (esfera magenta etiquetada como Mg-WT).

Contrariamente a nuestra hipótesis inicial, el motivo VI permaneció invariable, aunque la superposición de los modelos estructurales de las formas WT con los mutantes mostraron desplazamientos desde el residuo 114 hasta el 121 con un RMSD >0.5 Å, los cuales son mayores en esta región que el promedio del protómero (0.3 Å) (Fig. 2.5).

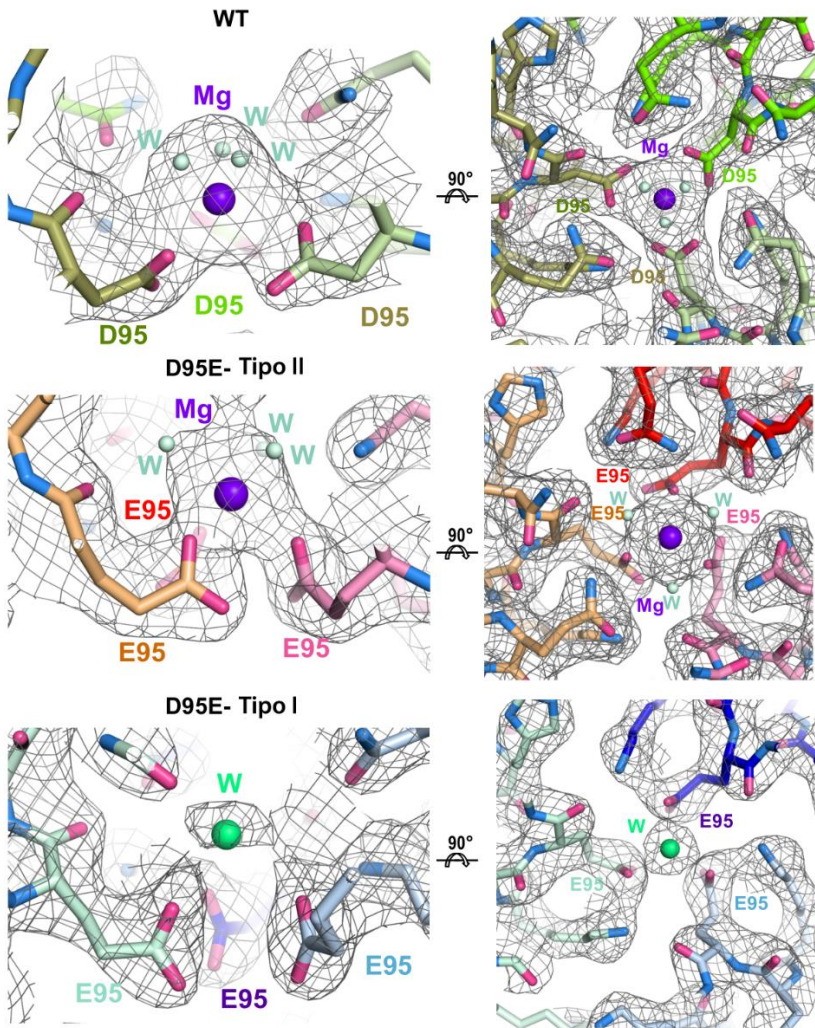


Figura. 2.4. Localización de los residuos 95 en *Dut80a* WT y en el mutante *D95E*. Vistas del canal central alrededor del residuo 95 en los cristales *Dut80a* WT (PDB: 3ZEE;) y *D95E* Tipo I y Tipo II que muestran los mapas $2F_o - F_c$ utilizados para modelar las estructuras (contorneadas a 1.0σ nivel). El ion de Mg y sus moléculas de agua coordinadas se pueden modelar en los mapas WT y *D95E* Tipo II. En el caso del cristal *D95E* Tipo I, solo una molécula de agua podría modelarse en esta posición.

Sorprendentemente, las principales diferencias estructurales se observan a distancia, lo que sugiere una acción epistática debido a la unión del ion Mg al canal central. En los cristales tipo I de Dut80 α ^{D95E} donde el ion Mg está ausente, el motivo conservado V estaba totalmente desordenado a pesar de encontrarse el nucleótido dentro del centro activo (Fig. 2.2 y Fig. 2.5). Por el contrario, en los cristales del Tipo II, que retienen el ion Mg, el motivo V era visible sobre el centro activo con una conformación idéntica a la observada en la proteína de tipo silvestre (Fig. 2.5), pero la densidad del mapa fue menor o incluso ausente para algunos residuos (Ser158, Gly164, Gly169 y Val170) (Fig. 2.6), indicando una estabilización más débil de este *P-loop* C-terminal. De acuerdo con resultados anteriores del grupo, los mutantes de la Dut80 α que se vieron afectados en su capacidad para ordenar el motivo V fueron incapaces de inducir el ciclo de la SaPI. Los resultados estructurales actuales confirman los problemas que la Dut80 α ^{D95E} tiene para organizar este motivo sobre el centro activo, aunque esté ocupado por el nucleótido. Este resultado refuerza la idea de que el motivo V desempeña un papel esencial en la depresión de SaPI mediada por la Dut del fago 80 α . Además, las estructuras del mutante Dut80 α ^{D95E} Tipo I y II confirman el efecto alostérico propuesto entre el canal central y el centro activo (Szabo *et al.*, 2016), mostrando la fina correlación entre la unión del ion Mg y la organización del motivo V.

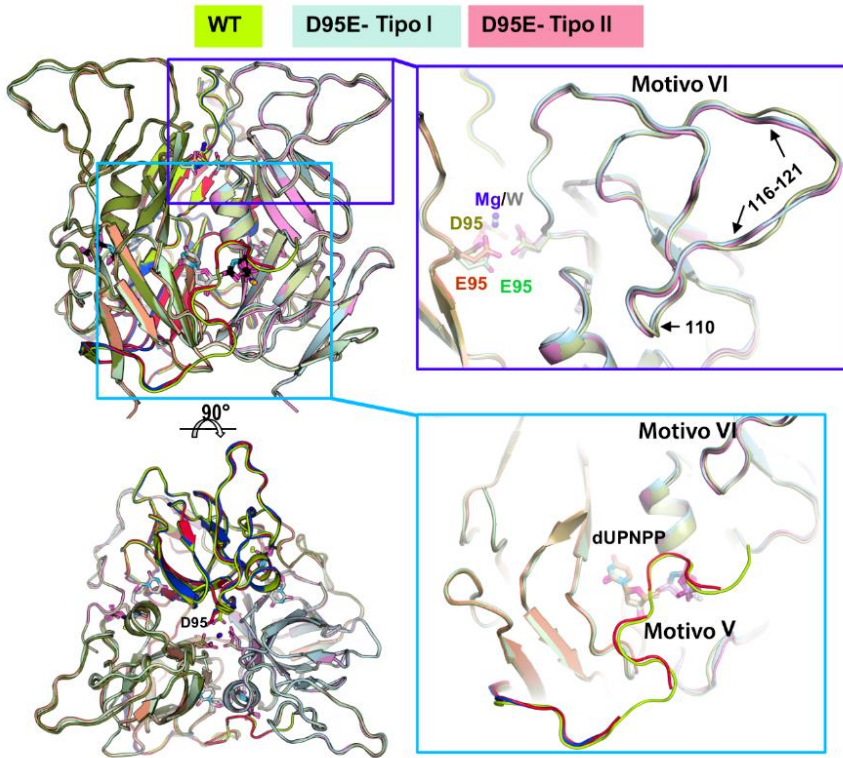


Figura. 2.5. Comparación estructural de las estructuras mutantes *Dut80α* WT y D95E. La superposición estructural de *Dut80α*^{WT} (tonalidades verdes) y los mutantes D95E Tipo I (tonalidades azules) y Tipo II (tonalidades rojas) se muestran en dos vistas ortogonales (izquierda). Las tres estructuras son prácticamente idénticas, excepto en la región del motivo VI (derecha) donde se observan pequeños desplazamientos, y en la región del Motivo V (parte inferior derecha) que adquiere movilidad en el mutante D95E, imposibilitando su parcial (Tipo II) o total (Tipo I) localización.

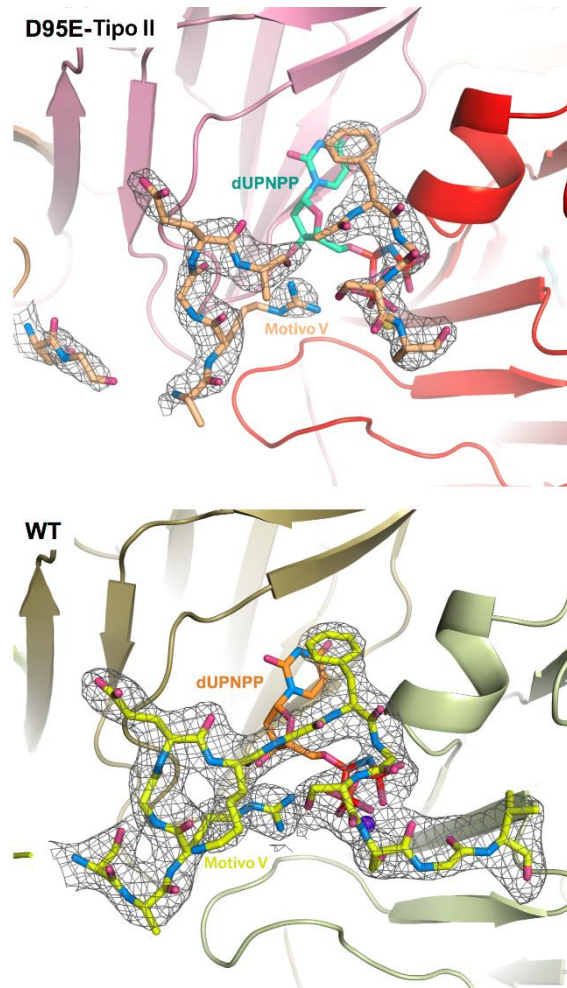


Figura 2.6. Localización espacial del Motivo V en $Dut80\alpha^{WT}$ y $Dut80\alpha^{D95E}$ Tipo II. Los mapas 2Fo-Fc (contorneados a 1.0 σ level) alrededor del motivo V C-terminal muestran la ausencia de densidad para varios residuos en el cristal D95E Tipo II (arriba), lo que indica que esta región presenta una gran flexibilidad. Al contrario, la estructura wt (PDB: 3ZEZ; parte inferior) mostró una densidad clara para la región completa (Tormo-Mas et al., 2013). Los nucleótidos cubiertos por el motivo V se muestran en cian y naranja y los iones Mg como esferas.

Como se espera para un efecto general, la acción epistática de la mutación D95E no se limita al motivo V, sino que también tiene un impacto en el motivo I y/o el motivo VI. Esto concuerda con las diferencias estructurales observadas entre Dut80 α ^{D95E} y el Dut80 α ^{WT} en la punta del motivo VI, justo en la región donde convergen los motivos IV, V y VI (Fig. 2.5), que hemos propuesto como el área donde se anclaría BovI-Stl. Cuando se comparan ambas estructuras, las diferencias del motivo VI son ligeramente más obvias en dos regiones que comprenden los residuos 116-121 y otra que se centra en el residuo 110 de este motivo, siendo este último el punto donde los motivos V y VI están más cerca en presencia de ligando (Fig. 2.5). Sin embargo, esto plantea la interesante cuestión de cómo puede ser posible que un mutante que tiene dificultades para ordenar el motivo conservado V retenga su actividad enzimática.

Caracterización *in vitro* del mutante Dut80 α ^{D95E}.

Estudios iniciales habían sugerido que la actividad enzimática no se vio afectada en el mutante Dut80 α ^{D95E} (Tormo-Más *et al.*, 2010) aunque nuestros estudios previos habían mostrado que sí ocurría para el resto los mutantes que eran incapaces de desreprimir SaPIs (Tormo-Más *et al.*, 2013, Frigols *et al.*, 2015). Además, nuestros resultados recientes sugieren que el motivo V juega un papel importante en la interacción BovI-Stl-Dut. Para resolver esta discordancia y armonizar estos resultados aparentemente contradictorios, caracterizamos en profundidad las constantes catalíticas del mutante Dut80 α ^{D95E}. Aunque este mutante es catalíticamente activo, como se ha mostrado anteriormente (Tormo-Más *et al.*, 2010), el análisis reveló que los parámetros cinéticos de velocidad máxima (Vmax) y afinidad por el

ligando (K_M) se ven afectados por la mutación (Fig. 2.7A). Como se muestra, Dut80 α^{D95E} es ligeramente menos competente en términos catalíticos que la proteína WT, con valores de V_{max} y K_{cat} alrededor de 2,5 veces inferiores a la del WT (Tabla 2.3). La afinidad por el dUTP es de aproximadamente 4 veces inferior en el mutante, siendo el K_M 7.5 μM en el WT y 32.2 μM en la Dut80 α^{D95E} . Esta reducción es similar a la observada en el mutante delecional del motivo V de la Dut80 α (Dut80 $\alpha^{\Delta V}$) (Tormo-Más *et al.*, 2013), que correlacionaba la estabilización del motivo V sobre el centro activo con la afinidad por el nucleótido. Además, confirmamos la alteración de la K_M por calorimetría de titulación isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC), obteniendo una reducción en la afinidad por el nucleótido de magnitud similar con unas K_D de 2.9 μM para el WT y 9.4 μM para el mutante (Tabla 2.3). Estos resultados indican que la mutación produce una inhibición alostérica con un fenotipo no competitivo con respecto al sustrato.

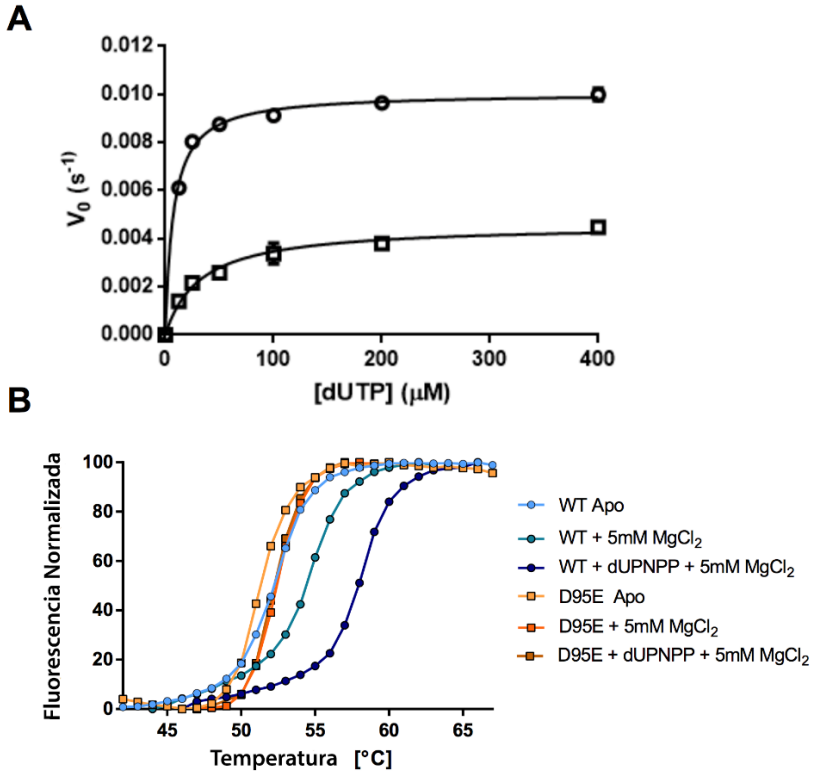


Figura 2.7. La mutación *Dut80α* D95E disminuye la actividad y la estabilidad de la proteína. (A) La actividad dUTPasa de *Dut80α* WT (círculos) y D95E mutante (cuadrados) se midió mediante ensayos de verde de malaquita. Las velocidades iniciales se calcularon a diferentes concentraciones de dUTP y los parámetros cinéticos (Tabla 3) se determinaron a partir de estas curvas utilizando el software GraphPad. Las curvas son el resultado de seis ensayos independientes. (B) Ensayos de cambio térmico. Perfiles representativos de la curva de desnaturación térmica de *Dut80α* wt y D95E mutante en sus estados apo y en presencia de MgCl₂ o dUPNPP-MgCl₂. La T_m calculada de al menos tres experimentos independientes se muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Caracterización in vitro de Dut80 α WT y D95E. UND: unión no detectada en las condiciones experimentales utilizadas. $K_D > 1 \mu\text{M}$.

	Proteína	Dut80 α ^{WT}	Dut80 α ^{D95E}
Cinéticas enzimáticas	Vmax ($\mu\text{mol/s}^{-1}$)	0,010	0,004
	K_M (μM)	7,50 \pm 0,50	32,20 \pm 4,24
	K_{cat} (s^{-1})	2250	968
	K_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	30 \times 10 ⁷	30 \times 10 ⁶
ITC	K_D (μM)	2,9	9,4
Despliegue térmico	Apo	52,10 \pm 0,12	51,50 \pm 0,02
	5 mM MgCl ₂	54,5 \pm 0,12	52,4 \pm 0,02
	dUPNPP	58 \pm 0,09	52,3 \pm 0,04
BLI K_D (μM)	Apo	0,04	0,44
	dUPNPP	UND	UND

En conjunto los datos estructurales y funcionales apoyan que la mutación produce un efecto general sobre la proteína que afecta de manera epistática al centro activo sin tener un fuerte impacto local en la arquitectura de la proteína. Para confirmar esta propuesta, analizamos la estabilidad térmica del mutante mediante un ensayo de termofluor. Tanto la forma silvestre como el mutante D95E mostraron curvas de desnaturalización térmica similares, lo que indica que la disociación del trímero y el despliegue del protómero están coordinados (Fig. 2.7B). De acuerdo con la desestabilización general propuesta inducida por la mutación, se observó una reducción pequeña pero constante en la temperatura de desnaturalización para el mutante Dut80 α D95E. Cabe destacar que la presencia del nucleótido trifosfato aumentó la temperatura de desnaturalización de la forma WT alrededor de seis grados (Tabla 2.3). Por su parte, el ion de magnesio produjo una

estabilización más modesta de solo dos grados (Fig. 2.7B; Tabla 2.3). A la inversa, ni la presencia del nucleótido ni el ion tuvieron un efecto similar sobre la temperatura de desnaturalización de la proteína mutante Dut80 α ^{D95E}, produciendo una estabilización inferior a un grado (Fig. 2.7B; Tabla 2.3) que se correlaciona estrechamente con los datos estructurales y funcionales descritos anteriormente. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la mutación D95E tiene un efecto desestabilizador sobre la proteína que se transfiere epistáticamente sobre el centro activo, perturba el estado conformacional del motivo V y restringe su capacidad para adoptar una conformación catalíticamente competente.

Análisis de la interacción BovI-Stl-Dut80 α ^{D95E}.

Finalmente, para completar la caracterización del mutante Dut80 α ^{D95E}, analizamos *in vitro* la interacción de este mutante con el represor BovI-Stl. Para ello utilizamos la técnica interferometría de biocapa (BLI) que hemos utilizado anteriormente para la caracterizar esta unión para Dut ϕ 11, Dut80 α y múltiples mutantes de las mismas. Los datos mostraron que la mutación D95E elimina, por debajo del límite de detección ($K_D > 1 \mu\text{M}$), la capacidad de la Dut80 α para interactuar con el represor, tanto en ausencia como en presencia del nucleótido (Tabla 2.3). Como se ha mostrado anteriormente (Fig. 2.1), esta reducción de la afinidad tiene consecuencias dramáticas *in vivo*, ya que el Dut80 α ^{D95E} no es capaz inducir el ciclo de la SaPI.

CAPÍTULO III

Contribución personal

A pesar de ser un trabajo de tesis centrado en el estudio de las Duts triméricas, el hecho de que el represor BovI-Stl sea también capaz de interactuar con Duts diméricas obliga a mencionarlas para poder tener una visión global del mecanismo de interacción Dut:BovI-Stl. Por ello, en este capítulo se introducen las diferencias estructurales de una Dut dimérica, obtenida previamente por el Dr. Jordi Donderis y que planteaba la posibilidad de la mencionada modularidad del represor. Esta modularidad confirmada separó en este punto el estudio del represor Stl de SaPIbovI en los constructos BovI-Stl^{N-ter} (que interactúa con Duts triméricas) y BovI-Stl^{C-ter} (que interactúa con Duts diméricas). En el caso de este trabajo de tesis, nos centramos en las Duts triméricas y, por lo tanto, en el constructo BovI-Stl^{N-ter}, el cual no solo interactúa con las Duts triméricas, sino que presenta un dominio HTH de unión a ADN. Por ello, mi contribución en este capítulo se basa en todo el análisis de BovI-Stl^{N-ter}. Esto implica tanto el diseño, clonación, expresión y purificación tanto del mutante delecional como del resto de mutantes utilizados en el capítulo. Además, también pertenece a este trabajo tanto la obtención de la estructura de la región N-terminal y dominio intermedio del represor, como el diseño mutacional y ejecución de la validación y caracterización *in vitro* de la unión al ADN y la dimerización de BovI-Stl a través del puente disulfuro mediante la mutación H73C. Para ello, ha sido necesaria la sobreexpresión de todas las proteínas incluidas en el capítulo y el uso de diferentes técnicas de purificación, que incluyen la cromatografía de afinidad y exclusión molecular; el uso tanto de la interferometría en biocapa (BLI) como de la termoforesis a microescala (MST) para la medición de la cinética de la unión entre el mutante

H73C de BovI-Stl con las diferentes Duts; el cálculo de las temperaturas de desnaturalización en el ensayo de termoestabilidad; el uso de distintas técnicas de electroforesis como Native-PAGE y EMSA; así como la cristalización y resolución de la estructura tridimensionales del mutante BovI-Stl^{N-ter} por técnicas de difracción de rayos X de monocristales.

Comparación estructural de Duts diméricas y triméricas

Se conoce que las Duts diméricas y triméricas presentan un plegamiento radicalmente diferente y no relacionado (Penadés *et al.*, 2013). Sin embargo, dado que ambas catalizan la misma actividad enzimática e interaccionan con el represor StI de SaPI_{bov1}, planteamos la hipótesis de que ambos tipos de Duts podrían haber conservado un dominio o motivo común entre ambas que fuera responsable de la interacción con BovI-StI. Como se ha indicado previamente en la introducción de este trabajo de tesis, las Duts diméricas presentan 5 motivos conservados (I-V) que divergen en secuencia con los motivos catalíticos de las Duts triméricas. Dado que ambas son dUTPasas y en las Duts triméricas los motivos implicados en la interacción con el ligando son esenciales para la interacción con el represor BovI-StI (Capítulos 1-2, Tormo-Más *et al.*, 2013), buscamos en la Dut dimérica del fago ϕ O11, cuya estructura pertenece a un trabajo de tesis paralelo, si sus motivos catalíticos muestran una topología similar a pesar de no presentar similitud de secuencia.

Como se adelantaba en la introducción de este trabajo de tesis, la estructura de las Duts diméricas y triméricas son completamente diferentes (Fig. 3.1). Además, y a pesar de realizar la misma función enzimática, la superposición de las estructuras tridimensionales puso de manifiesto que la forma de reconocimiento y unión del dUTP difería también entre ambos tipos Duts. Estas diferencias ya habían ido descritas previamente por otros investigadores (Harkiolaki *et al.*, 2004), y al igual que éstos, observamos que las principales diferencias se dan en la orientación del plano del uracilo y especialmente en la disposición de los fosfatos (Fig. 3.1). Además, los fosfatos β y γ difieren en su

disposición relativa, quelando un solo metal divalente en las Duts triméricas (esfera rosa, Fig. 3.1) que induce una conformación cerrada de los fosfatos, frente a dos iones en las diméricas (esferas verdes, Fig 3.1) que mantiene los fosfatos extendidos (Hemsworth *et al.*, 2013). Por lo tanto, que las estructuras tridimensionales de ambos tipos de Duts y la arquitectura de sus centros activos sean divergentes y, en consecuencia, también lo sea la disposición espacial de los residuos que rodean a los nucleótidos, sugieren firmemente que i) Duts diméricas y triméricas unen al represor StI de SaPIbov1 de diferente modo y por lo tanto BovI-StI debe tener diferentes dominios y/o formas de interacción para reconocer a las Duts triméricas y diméricas o ii) las Duts utilizan diferentes motivos estructurales para la formación del complejo BovI-StI:Dut.

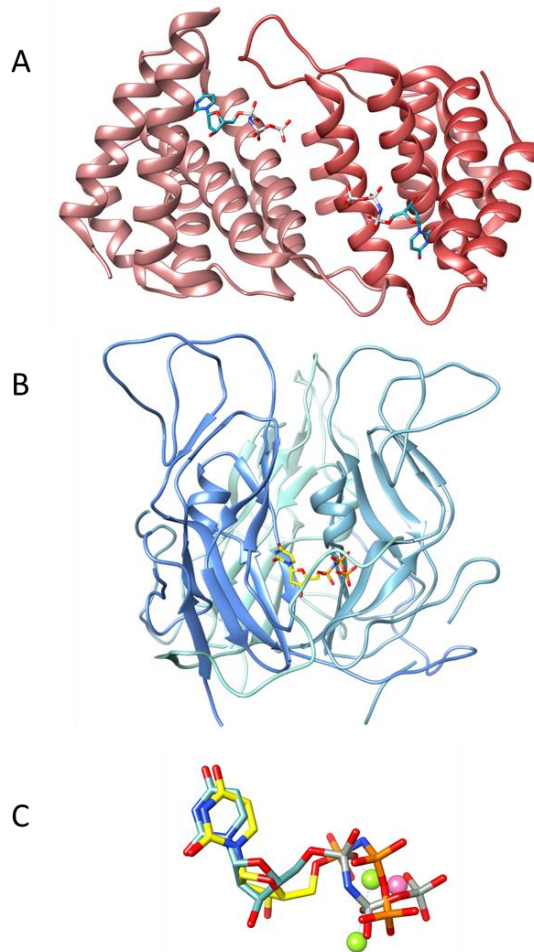


Figura 3.1. Diferencias estructurales entre Duts diméricas y triméricas de fagos de *S. aureus*. Representación de la (A) Dut dimérica Dut ϕ O11 (PDB 5MIL) y (B) la Dut trimérica Dut80 α (PDB 3ZEZ). Las moléculas de dUPNPP en los centros activos están representadas como sticks. (C) La superposición de las moléculas de dUPNPP en los centros activos de la Dut ϕ O11 (base nitrogenada y desoxirribosa en azul y fosfatos en gris claro) y Dut80 α (base nitrogenada y desoxirribosa en amarillo y fosfatos en naranja) muestra que las moléculas de nucleótido unidas adquieren diferentes conformaciones, incluido el número y la disposición de los iones Mg (esferas verdes y rosas para Dut ϕ O11 y Dut80 α respectivamente).

El represor StI de SaPI_{bov1} como una proteína modular

Para ir más lejos con estos análisis, generamos un conjunto de mutantes delecionales en el represor StI de SaPI_{bov1} con la idea de que algunos de estos mutantes afectarían selectivamente a la interacción del represor con cada uno de los tipos Duts estudiadas. El análisis de secuencia *in silico* mediante el servidor X-talPred (Slabinski *et al.*, 2007) indicó que BovI-StI sería principalmente una proteína helicoidal con un dominio HTH de unión de ADN en el extremo N-terminal (residuos 1-80) y un dominio C-terminal de función desconocida según reflejó el servidor Pfam (El-Gebali *et al.*, 2019) (Fig. 3.2). Mediante el modelado tridimensional de la estructura de BovI-StI se identificaron dos dominios en esta región C-terminal, uno intermedio entre ambos extremos (residuos 81-166) y otro en la región más C-terminal (residuos 176-267). Entre estos dominios C-terminales (residuos 167-175), la predicción de la estructura secundaria mediante X-talPred advirtió de una posible zona desordenada (Fig. 3.2). Estos resultados se vieron apoyados por el análisis de la secuencia mediante el programa predictor *GeneSilico MetaDisroder*, que identificó como problemática la misma zona (Fig. 3.2; Kozłowski *et al.*, 2012). En base a este estudio generamos dos variantes delecionales de BovI-StI: una que constaba solo del dominio C-terminal (BovI-StI^{C-ter}; residuos 176-267) y otra contenedora del dominio HTH de unión a ADN junto con el dominio intermedio de función desconocida (BovI-StI^{N-ter}; residuos 1-156). Desafortunadamente, estos mutantes no pudieron analizarse *in vivo*, ya que los represores mutantes generados por StI habían perdido la capacidad de unir al represor de la SaPI y bloquear su ciclo.

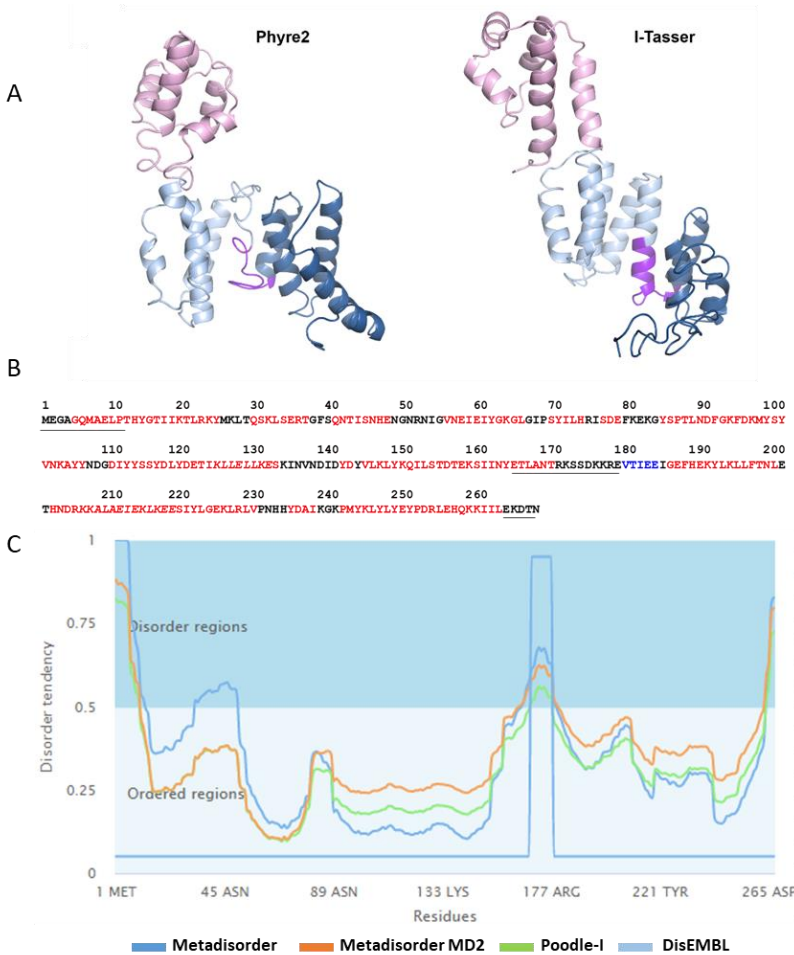


Figura 3.2. Diseño de modelos y construcciones de BovI-Stl. (A) Representación de los modelos de BovI-Stl producidos por los servidores Phyre2 e I-Tasser. La estructura se divide en un dominio HTH N-terminal (rosa) y una porción C-terminal (azul claro y oscuro) separados por una región de baja complejidad (morado). (B) Predicción de la estructura secundaria mediante el servidor online X-TalPred donde muestra la composición principal de hélices α (rojo) junto a las zonas desordenadas (subrayadas). (C) Predicción de zonas desordenadas mediante el servidor online GeneSilico MetaDisorder.

Para evaluar estos mutantes *in vitro*, dichos constructos fueron clonados y sobreexpresados en *E. coli* y fueron testados mediante la técnica de Native-PAGE. Curiosamente, BovI-Stl^{N-ter} perdía la interacción con la Dut trimérica del fago $\phi 11$, pero no con la dimérica Dut ϕ O11. A la inversa, la eliminación del subdominio C-terminal en la construcción BovI-Stl^{C-ter} disminuye la unión a la Dut dimérica, pero no a la trimérica (Fig. 3.3).

Además, y como ya se ha mostrado en trabajos anteriores, se confirmó que la interacción con la versión silvestre del represor BovI-Stl inhibe la actividad dUTPasa de las Duts tanto diméricas como triméricas (Fig. 3.3; Hill y Dokland, 2016; Szabó *et al.*, 2014). Sin embargo, quisimos analizar qué ocurría con los mutantes delecionales. Observamos que BovI-Stl^{C-ter} inhibe la actividad dUTPasa de las Duts diméricas, pero no de las triméricas, mientras que la construcción BovI-Stl^{N-ter} tiene la capacidad opuesta (Fig. 3.3), de acuerdo con los ensayos de interacción por Native-PAGE (Fig. 3.3).

El hecho de que SaPIbov1-Stl tenga regiones específicas para interactuar selectivamente con las Duts triméricas y diméricas plantea y apoya la idea de que la proteína ha podido desarrollarse o haber evolucionado a partir de un represor simple que incluye tan solo un dominio de unión a ADN como se observa en otros fagos (represores tipo *cI*) adquiriendo nuevos módulos/dominios para interactuar de distintas formas con las diferentes Duts.

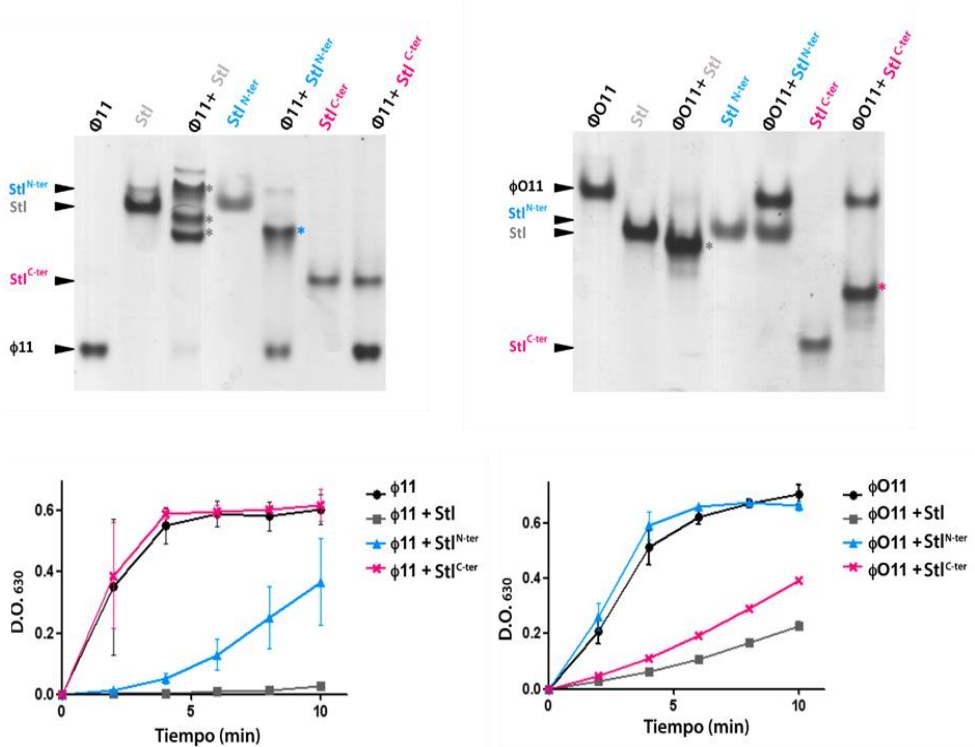


Figura 3.3. *Stl* de *SaPIbov1* tiene diferentes regiones para interactuar con las *Duts* triméricas y dimericas. (A) Se utilizaron ensayos de cambio de movilidad en gel nativo para probar la capacidad de unión de la *Dut* $\phi O11$ (dimerica) y *Dut* $\phi 11$ (trimérica) con versiones completas y truncadas de *Bov1-Stl*. La aparición de bandas con migración alternada con respecto a las proteínas individuales (marcadas con un asterisco) indica la formación de un complejo. (B) La actividad de la *dUTPasa* para la *Dut* $\phi O11$ y la *Dut* $\phi 11$ se midió mediante un ensayo de verde de malaquita en presencia y en ausencia de variantes de *Stl*. El curso del tiempo de la reacción se representa como el desarrollo de color verde (medido a 630 nm). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Nuestros intentos de obtener cristales de proteína de BovI-Stl nunca resultaron en la obtención de una estructura tridimensional. No obstante, atendiendo a la presencia de esta zona de baja complejidad anteriormente propuesta, se acometió la cristalización de las proteínas resultantes de los constructos previamente descritos como BovI-Stl^{N-ter} (residuos 1-156) y BovI-Stl^{C-ter} (residuos 176-267) (Fig. 3.4A). Estas construcciones que eliminaban la región predicha como deestructurada permitieron obtener cristales proteicos a partir de los cuales resolver con éxito sus estructuras tridimensionales (Fig. 3.4B y Fig. 3.4C).

A partir de este momento, y debido al gran reto que suponía, nuestro grupo de investigación definió dos líneas de trabajo que, aunque trabajando en paralelo, apuntaban a objetivos diferentes: el estudio de la interacción de BovI-Stl con Duts triméricas de fagos estafilocócicos a través de los dominios HTH y dominio intermedio y, en contraposición, el estudio de la interacción de BovI-Stl con las Duts diméricas de fagos estafilocócicos a través del dominio C-terminal. Así pues, y a partir de este capítulo, este trabajo de tesis se centra en las Duts triméricas y en su mecanismo molecular de interacción con el represor Stl de SaPIbovI. No obstante, y como medida para tener una imagen global del trabajo realizado en el laboratorio durante esta tesis y comparar las diferencias entre la interacción del represor con Duts triméricas y diméricas, se mencionará parte de los resultados obtenidos por otros miembros del laboratorio para la interacción Dut-BovI-Stl^{C-}

ter

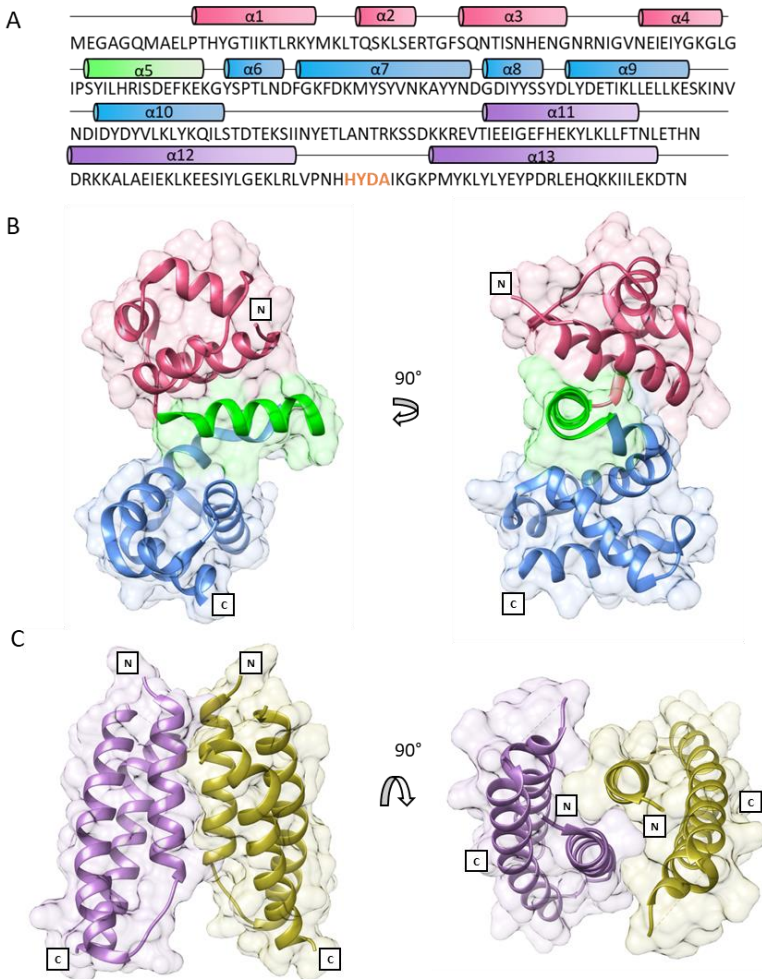


Figura 3.4. Estructura de los dominios Stl de SaPIbov1. (A) Secuencia de Bov1-Stl. Los elementos estructurales se muestran sobre la secuencia coloreada como (B) y (C). (B) Representación de Bov1-Stl^{N-ter}. Se muestran dos vistas ortogonales de la estructura y se etiquetan los extremos N-terminal y C-terminal. El dominio HTH está coloreado en magenta y el dominio intermedio en azul, con la hélice $\alpha 5$ de conexión en verde. (C) Estructura de Bov1-Stl^{C-ter}. Representación del dímero Bov1-Stl^{C-ter} con protómeros coloreados en morado y amarillo.

La estructura cristalina de BovI-Stl^{N-ter} se resolvió a una resolución de 1,8 Å y mostró una copia única de la proteína en la unidad asimétrica (Tabla 3.1). La densidad electrónica permitió trazar la totalidad de la proteína con la excepción de los siete residuos N-terminales y los dos C-terminales. BovI-Stl^{N-ter} presenta un plegamiento α helicoidal, tal como lo anticipó el modelado *in silico*, compuesto por 10 hélices α (α 1 residuos 13-24, α 2 29-33, α 3 40-48, α 4 57 -65, α 5 69-82, α 6 86-90, α 7 92-107, α 8 109-114, α 9 118-131 y α 10 141-152) (Fig. 3.4A y 3.4B). Las cuatro primeras hélices α (α 1 - α 4) corresponden al dominio de unión al ADN, presentando el plegamiento arquetipo de hélice-giro-hélice (HTH) (Fig. 3.4B) observado en múltiples represores, así como otras proteínas de unión al ADN (Wintjens y Rooman, 1996) (Fig. 4.8). La hélice α 5 conecta el dominio HTH con las cinco hélices restantes. Nombramos esta porción de la proteína como “dominio intermedio” debido a su localización en la secuencia de la proteína (Fig. 3.4A y 3.4B). Una búsqueda de proteínas que presentasen similitud estructural con BovI-Stl^{N-ter} utilizando el programa DALI (Holm y Laakso, 2016) identificó claramente las coincidencias para el dominio HTH, pero no reveló ninguna coincidencia significativa para el dominio intermedio. Asimismo, aunque no sea un resultado estrictamente propio de este trabajo de tesis, nuestro grupo resolvió la estructura de BovI-Stl^{C-ter} a una resolución de 2.2 Å. BovI-Stl^{C-ter} también es un dominio α -helicoidal que forma un haz de tres hélices antiparalelas (Fig. 3.4C). Hemos nombrado estas hélices como α 11 (residuos 181-196), α 12 (202-226) y α 13 (242-265) para seguir la numeración BovI-Stl^{N-ter} (Fig. 3.4A y 3.4C). Nueve residuos (230-238) que corresponden a un bucle que conecta α 11 - α 12 estaban desordenados, así como los tres residuos en los extremos N-

terminal y C-terminal de la molécula. La unidad asimétrica del cristal contiene una sola copia de BovI-Stl^{C-ter}, pero el análisis de posibles ensamblajes por el software PISA (Krissinel y Henrick, 2007) propuso una organización dimérica mediada por la interacción recíproca de la porción N-terminal de las hélices $\alpha 11$ y $\alpha 13$, expandiendo el paquete de tres a seis hélices (Fig. 3.4C), donde alrededor de 900 \AA^2 del área de superficie total se enterraría por monómero tras la dimerización de BovI-Stl^{C-ter}, lo que sugiere un dímero estable que se confirmó por análisis en cromatografía de exclusión de tamaño molecular (SEC) (Fig. 3.5).

	BovI-Stl ^{WT}	BovI-Stl ^{N-ter}	BovI-Stl ^{C-ter}
Peso molecular teórico	31.5	19	11
Peso molecular calculado	70	21	22

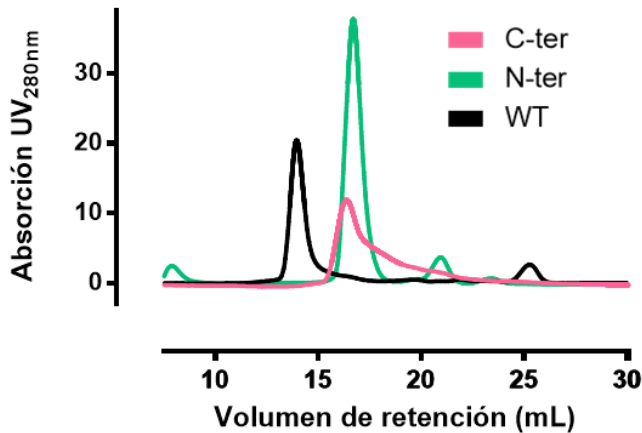


Figura 3.5. Cromatografía de exclusión molecular. BovI-Stl^{WT} (negro) BovI-Stl^{N-ter} (verde) y BovI-Stl^{C-ter} (rosa). El peso molecular se dedujo de los volúmenes de elución (tabla) y es compatible con una organización dimérica para BovI-Stl^{WT} y BovI-Stl^{C-ter} y monomérica para BovI-Stl^{N-ter}.

Tabla 3.1. Colección de datos cristalográficos y de refinamiento de BovI-Stl^{N-ter}

BovI-Stl^{N-ter}	
Colección de datos	
Línea del rayo	DLS I-03
Longitud de onda (Å)	0,97623
Grupo espacial	C2
Dimensiones de celda (Å)	a=132,54 b=34,55 c=36,99 $\alpha=\gamma=90$ $\beta=95.96$
Resolución (Å) ^a	33,64 - 1,8 (1,83 - 1,8)
Reflexiones totales	100090 (4685)
Reflexiones únicas	15780 (777)
Compleitud (%)	100 (99,4)
Multiplicidad	6,3 (6,0)
I/ σ (I)	12,4 (9,7)
R _{pim}	0,09 (0,574)
CC 1/2	0,985 (0,574)
Refinamiento	
R _{work}	0,172
R _{free}	0,216
Número de átomos	1303
Proteína	1208
Agua	85
Otros	10
Rmsd. Enlaces (Å)	0,0183
Rmsd. Ángulos (°)	1,782
Plano Ramachandran	
Preferido (%)	98,6
Permitido (%)	1,4

^a Los números entre paréntesis indican el valor de la celda con la más alta resolución

Reconocimiento del ADN por BovI-Stl

Según el servidor DALI (Holm y Laakso, 2016), el dominio HTH de BovI-Stl se superpone bien con los dominios correspondientes de diferentes proteínas de unión al ADN, mostrando RMSD entre 1.3-2.3 Å después de la superposición con proteínas relacionadas estructuralmente (Fig 3.6).

Varias de estas proteínas son miembros de la superfamilia HTH XRE (número de acceso SMART SM00530 o PFAM HTH_3), que incluye a los represores de la familia 434 Cro o las proteínas controladoras de los sistemas de restricción-modificación bacteriana (R-M), con las cuales el dominio HTH BovI-Stl se superpuso particularmente bien (Fig. 3.6). La superposición del dominio HTH de BovI-Stl^{N-ter} con la porción equivalente de la proteína controladora del sistema de modificación-restricción Esp1396I (C. Esp1396I) en complejo con ADN (PDB 3CLC) (McGeehan *et al.*, 2008) nos permitió generar un modelo del complejo BovI-Stl:ADN. Dado que Stl y C. Esp1396I reconocen operadores con similar arquitectura (dos sitios de reconocimiento pseudo-palindrómicos separados por un "espaciador" de 4-5 nucleótidos) (Ball *et al.*, 2012; Papp-Kadar *et al.*, 2016), la superposición de dos BovI-Stl^{N-ter} en los dominios HTH equivalentes de C.Esp1396I en su estructura unida a ADN nos permitió generar un modelo biológico plausible del dímero Stl de SaPIbovI unido al ADN (Fig. 3.6 y 3.7A). Este modelo reveló residuos que potencialmente deben participar en el reconocimiento e interacción con el ADN (Fig. 3.7B).

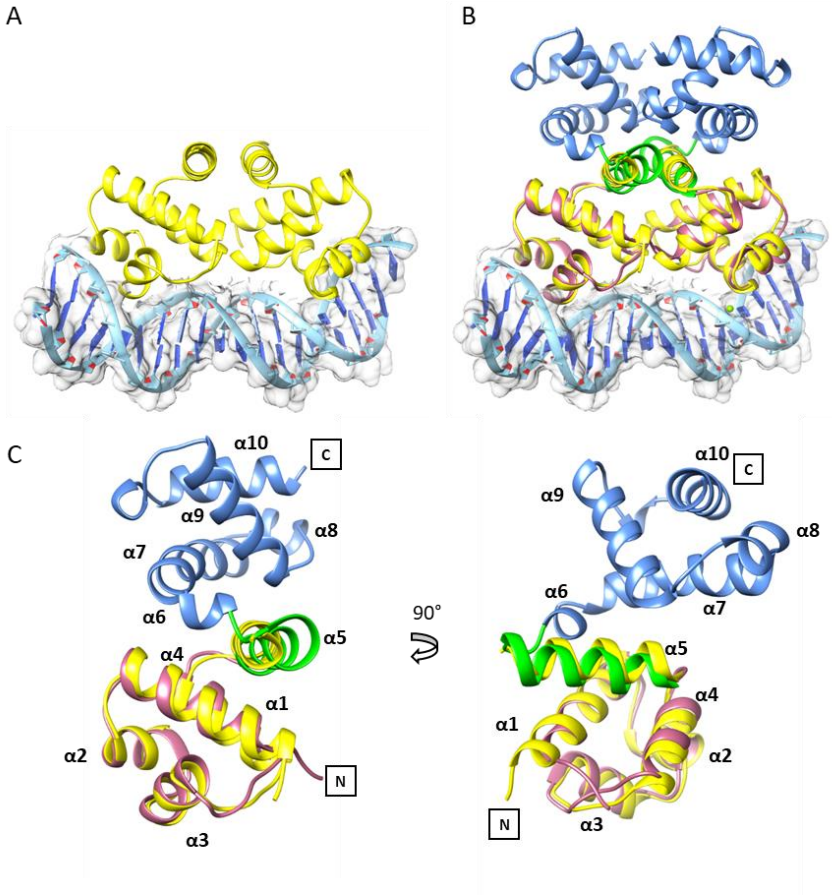


Figura 3.6. Comparación de la estructura de BovI-Stl con el controlador C.Esp1396I. A la izquierda, (A) la estructura del dímero de C.Esp1396I (protómeros en amarillo) unido a ADN. Esta estructura fue la utilizada para generar la mostrada a la derecha, superponiendo dos monómeros de BovI-Stl (B) coloreado como en figura 3.4. (C) Superposición de BovI-Stl^{N-ter} y C. Esp1396I (PDB 3CLC), donde se muestra la identidad estructural del dominio de HTH (magenta para BovI-Stl y amarillo para C. Esp1396I) y de la hélice $\alpha 5$ (verde), usada por BovI-Stl como nexo de unión entre HTH y dominio intermedio. Las hélices α están numeradas. Se muestran dos vistas ortogonales.

En este modelo, BovI-Stl reconoce el ADN insertando la hélice $\alpha 3$ del motivo HTH en el surco principal del ADN (Fig. 3.7A y 3.7B). En esta posición, los residuos Q40, N41 y N45 podrían posicionarse para leer la secuencia de nucleótidos (Fig. 3.7B). Además, la R51 desde la hélice $\alpha 4$ se proyecta hacia el surco mayor y se colocaría a la distancia correcta para el reconocimiento de ADN. Previamente se había mostrado que la doble mutación Q40A y N41A afectaba grave y negativamente a la unión de BovI-Stl a su promotor diana en base a los experimentos de EMSA (Nyíri *et al.*, 2015), lo que respalda nuestro modelo de reconocimiento de ADN. Además de los residuos ya indicados que podrían participar en la lectura directa del ADN, nuestro modelo propone que los residuos Q29, S44, N48 y R22 podrían desempeñar un papel importante en la lectura indirecta al interactuar con el esqueleto de ADN. Los primeros tres residuos coordinan un ion sulfato en la estructura BovI-Stl^{N-ter} que podría imitar a un fosfato de ADN, ya que la superposición con el complejo *C. Esp1396I*-ADN coloca a este sulfato en la posición de un fosfato del esqueleto del ADN (Fig. 3.7B).

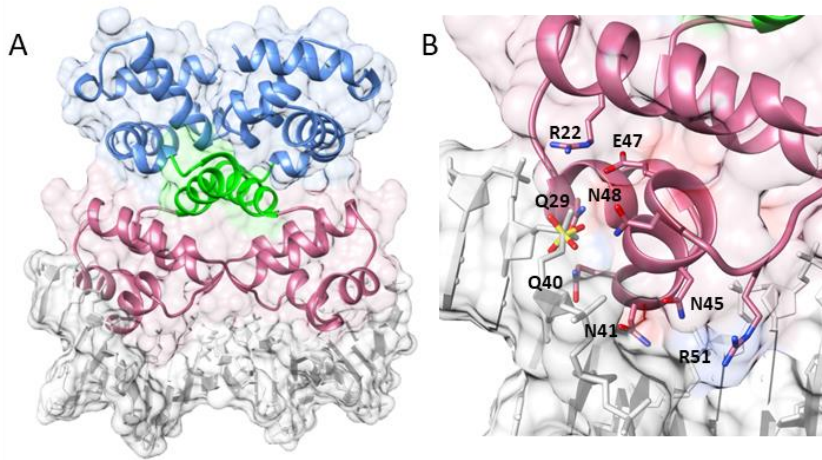


Figura 3.7. Análisis estructural del modelo de unión a ADN del dímero BovI-Stl. (A) Modelo propuesto del dímero de BovI-Stl unido al sitio de represión palindrómico de SaPIbovI. El dímero de BovI-Stl^{N-ter} se muestra con un protómero en magenta y el otro en verde, y el operador de ADN en gris y su superficie en blanco. La unión del dímero se basa en la superposición de protómeros de BovI-Stl^{N-ter} individuales con el complejo de *C. Esp1396I* y su operador de ADN palindrómico (PDB: 3CLC). Los elementos estructurales del dominio HTH de unión al ADN y la hélice conectora están etiquetados en orden desde el extremo N-terminal. (B) Vista cercana de la interacción modelada de HTH-ADN. Los residuos de proteína que interactuarían con el ADN en el modelo se resaltan como “sticks”, se colorean por tipo de átomo y se etiquetan. Se representa al fosfato presente en la estructura de BovI-Stl^{N-ter} como “sticks” amarillos.

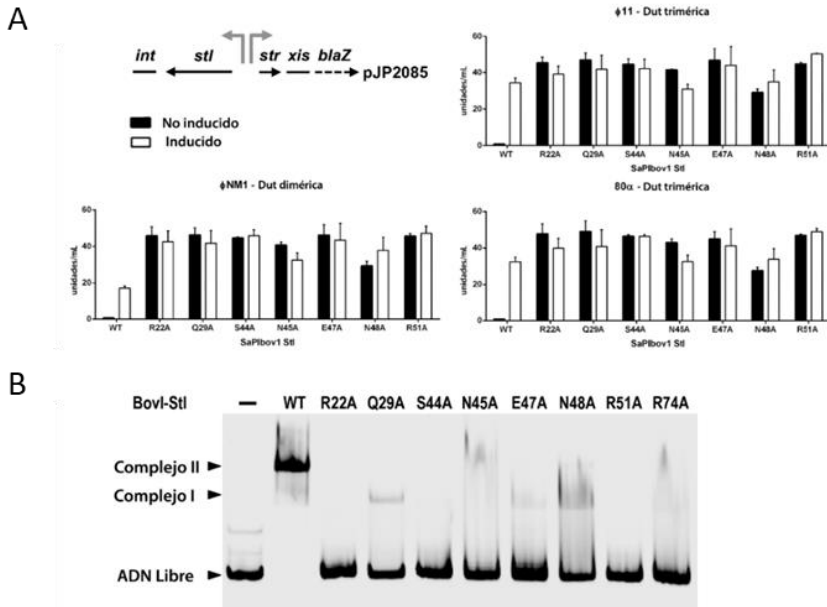


Figura 3.8. Análisis funcional del modelo de unión a ADN del dímero BovI-Stl. (A) Transcripción de *str* no regulada debido a mutaciones en el dominio de unión al ADN del represor BovI-Stl. El diagrama superior izquierdo muestra un esquema de una fusión transcripcional con el gen reportero *blaZ*. Los ensayos de β -lactamasa se realizaron en el laboratorio del Dr. Penadés en la Universidad de Glasgow con cepas lisogénicas codificantes para las Duts $\phi 11$, $\phi 80\alpha$ o $\phi NM1$ que contenían el represor BovI-Stl o derivados con las mutaciones puntuales. Se tomaron muestras después de 90 minutos en ausencia o después de la inducción de fagos con mitomicina C. (B) Evaluación *in vitro* de mutaciones en el dominio de unión al ADN de BovI-Stl. EMSA de BovI-Stl^{WT} y de los mutantes en los residuos predichos para interactuar con el ADN en el modelo de panel (B). En presencia de BovI-Stl^{WT}, la banda correspondiente a la región del operador de ADN *stl-str*, marcada como ADN libre, desaparece y se observan dos nuevas bandas correspondientes a complejos de ADN-Stl (marcadas como complejos I y II). Para los mutantes de BovI-Stl, las bandas correspondientes a los complejos de Stl-ADN desaparecen casi por completo, mientras que la mayor parte del ADN aparece en la posición inferior del gel como ADN libre.

Para confirmar experimentalmente nuestro modelo, generamos mutaciones puntuales de BovI-Stl cambiando los residuos descritos anteriormente por alanina generando los mutantes de BovI-Stl R22A (BovI-Stl^{R22A}), Q29A (BovI-Stl^{Q29A}), S44A (BovI-Stl^{S44A}), N45A (BovI-Stl^{N45A}), N48A (BovI-Stl^{N48A}) y R51A (BovI-Stl^{R51A}). Además, generamos el mutante E47A (BovI-Stl^{E47A}), ya que nuestro modelo mostraba que podía intervenir en la unión al ADN mediante la interacción con los residuos R22 y Q29. Para probar si estas mutaciones tuvieron un impacto en la unión al ADN y por lo tanto en la represión mediada por BovI-Stl en la isla de patogenicidad, el grupo del Dr. Penadés en la Universidad de Glasgow realizó experimentos *in vivo* infectando con diferentes fagos cepas de *S. aureus* que portaban plásmidos con el gen reportero de β -lactamasa mencionado en varias ocasiones durante esta tesis (Fig. 3.8A). Se generaron plásmidos individuales que codificaban para BovI-Stl y para los mutantes antes indicados. Como se esperaba para los residuos relevantes para el reconocimiento y la unión del ADN, todos los mutantes propuestos presentaron una expresión constante del gen reportero de β -lactamasa incluso en ausencia de inducción de fagos, al no poder unir ADN y, por lo tanto, reprimir su replicación (Fig. 3.8A). Adicionalmente, para confirmarlo *in vitro*, estos mutantes de BovI-Stl se sometieron a experimentos de EMSA usando la región promotora de *stl* y *str* de SaPIbov1 a la que se une el represor BovI-Stl (Fig. 3.8B). Todos los mutantes BovI-Stl presentaron una capacidad reducida o nula en la unión del ADN a la región promotora en comparación con la proteína silvestre, en estrecha correlación con los experimentos *in vivo* (Fig. 3.8B).

Para confirmar que el efecto mostrado en estos mutantes se debía exclusivamente a la mutación y no a una desestabilización de la estructura de la proteína, se realizaron experimentos de SEC y termofluor que confirmaron que estos mutantes forman dímeros en solución como la proteína WT y tienen un rango de temperatura de desnaturalización (T_m) similar, descartando que las deficiencias funcionales observadas se debieran a efectos secundarios estructurales inducidos por las mutaciones (Fig. 3.9). Estos resultados respaldan nuestro modelo de reconocimiento de ADN por BovI-Stl, identificando una serie de residuos dentro del dominio HTH de BovI-Stl que son esenciales para el reconocimiento de ADN y la represión de la isla.

Por otro lado, los ensayos de β -lactamasa no permitían discernir si la Duts eran capaces de reconocer a estos mutantes debido a la incapacidad éstos de unir el ADN de la isla, presentando así altos niveles del gen reportero incluso en ausencia de Duts (Fig. 3.8). Para responder a esta pregunta se analizó la interacción de las Duts triméricas del fago $\phi 11$ con estos represores mediante ensayos de Native SDS-PAGE (Fig. 3.10).

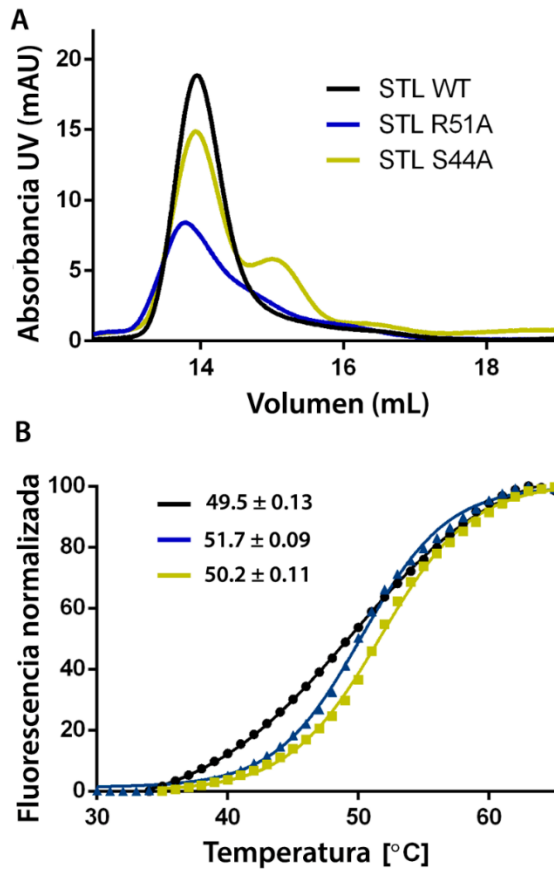


Figura 3.9. Impacto de las mutaciones puntuales de los residuos de BovI-Stl implicados en el reconocimiento del ADN en la oligomerización y la estabilidad. (A) Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de BovI-Stl^{WT} y dos mutantes representativos en la unión al ADN. (B) Curvas de despliegue térmico de BovI-Stl^{WT} y dos mutantes representativos de la batería realizada. Los valores de T_m de despliegue están calculados a partir de tres experimentos independientes.

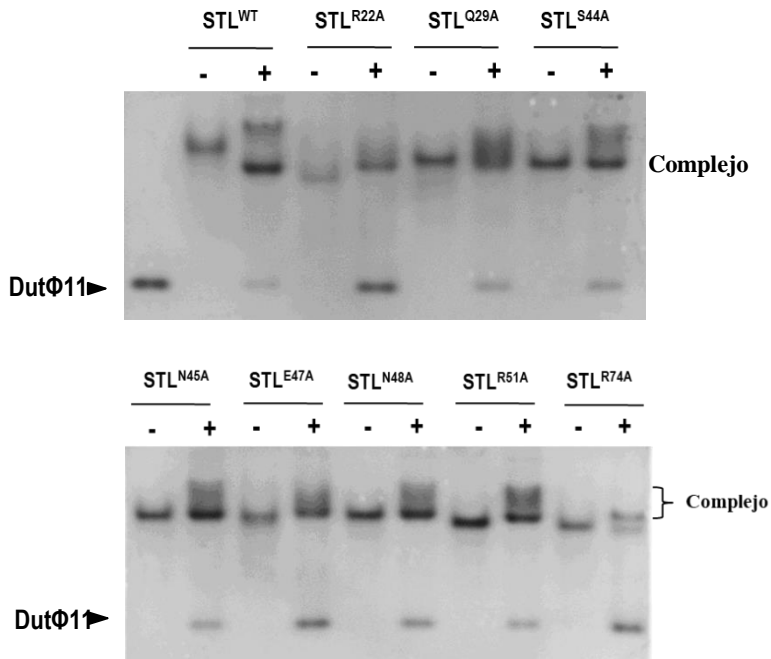


Figura 3.10. Los mutantes sobre el HTH de *Stl* interactúan con la *DutΦ11*. Ensayo de gel nativo usado para testar la interacción de la *DutΦ11* trimérica con los mutantes de *Stl* diseñados para romper la interacción con el ADN de la isla. Se usa *Stl* en su forma silvestre como control.

Como se observa en la figura, todos los mutantes generados para anular la interacción con el ADN son capaces de interactuar con *DutΦ11*, aunque se observa variaciones en las posiciones de las bandas que podrían indicar afinidades diferentes (Fig. 3.10). Al únicamente querer validar la integridad estructural de dichos mutantes y confirmar que mantienen la capacidad de interacción con las Duts no se ahondó más en la caracterización de estas diferencias.

La de-represión de SaPIbovI es inducida por la rotura del dímero BovI-Stl.

BovI-Stl es un dímero en solución como nuestro análisis SEC ha confirmado (Fig. 3.5). Sin embargo, el BovI-Stl^{N-ter} es monomérico en solución (Fig. 3.5), lo cual es sorprendente ya que los represores de la familia 434 Cro y los controladores RM suelen formar dímeros en solución principalmente a través de la interacción del dominio HTH y la hélice $\alpha 5$ que le sigue (Dubrava *et al.*, 2008). Para obtener más información sobre la relación entre la dimerización de BovI-Stl, la represión de la SaPI y la interacción con las Duts, analizamos nuestro modelo biológico propuesto del dímero de Stl de SaPIbovI, que parece ser compatible con el reconocimiento de la caja de BovI-Stl como se respalda en los resultados *in vivo* e *in vitro*. El modelo también parece ser compatible con una organización dimérica, ya que no se observan choques importantes entre los monómeros, y, lo que es más importante, la posible superficie de dimerización sería proporcionada principalmente por la hélice $\alpha 5$ como se observa en otros miembros de la superfamilia HTH_XRE (Fig. 3.6). Además, el bucle que conecta las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ ($L\alpha 3\alpha 4$) y el comienzo de la hélice $\alpha 8$ también contribuirían a la superficie de dimerización, lo que proporciona una superficie total en el modelo dimérico de alrededor de 2400 \AA^2 (calculado por PISA (Krissinel y Henrick, 2007) (Fig. 3.6). Todos los residuos proporcionados por la hélice $\alpha 5$ a esta superficie de dimerización son polares, incluido un puente salino doble producido por la interacción de Arg74 y Asp77 (Fig. 3.12A), lo que implica que la interacción es principalmente hidrófila. Sin embargo, el análisis PISA le da al dímero una puntuación de significancia de formación de

complejo de 0.0, lo que sugiere una nula probabilidad de formación. Dado el papel de la hélice $\alpha 5$ en la dimerización de la familia HTH_XRE, analizamos si este elemento también contribuye a la formación y estabilización del dímero BovI-Stl, como sugiere nuestro modelo. Primero mutamos Arg74, que participaría en un puente salino en la hélice $\alpha 5$, a alanina (BovI-Stl^{R74A}) y este mutante fue testado tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque el BovI-Stl^{R74A} presentó un comportamiento dimérico en la SEC (Fig. 3.11A), el análisis de su termoestabilidad mostró una temperatura de desnaturalización 7,5 grados inferior que la proteína WT, apoyando la idea de que R74 contribuye a la estabilización del dímero (Fig. 3.11B). Además, los ensayos de EMSA mostraron que BovI-Stl^{R74A} es altamente defectuoso en la unión al ADN (Fig. 3.8B) y los ensayos de β -lactamasa *in vivo* realizados como se ha descrito previamente confirmaron que este mutante había perdido la capacidad de represora (Fig. 3.11C).

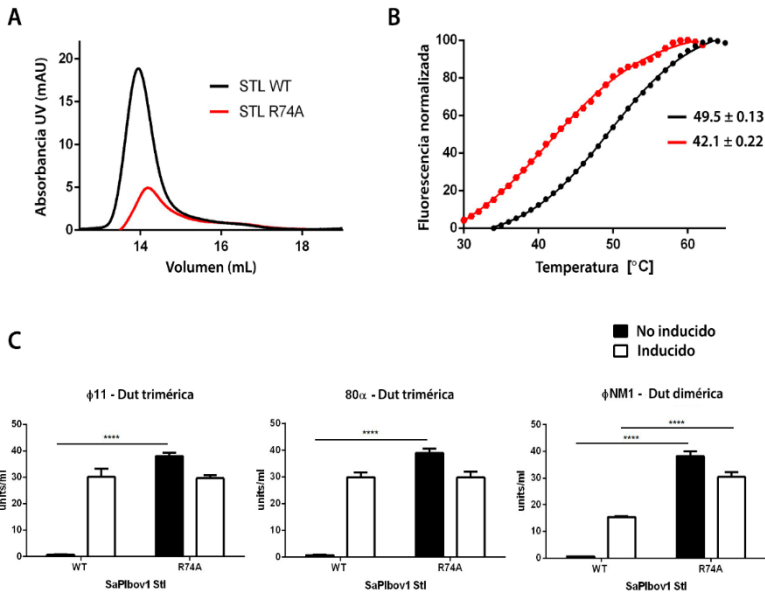


Figura 3.11. Impacto de la mutación puntual R74A en BovI-Stl. (A) Perfiles de cromatografía de exclusión molecular por tamaño de BovI-Stl^{WT} y BovI-Stl^{R74A} mutante. (B) Curvas de despliegue térmico de BovI-Stl^{WT} y BovI-Stl^{R74A} y la T_m de despliegue calculada a partir de tres experimentos independientes. (C) Los ensayos de β-lactamasa se realizaron con cepas que contenían la versión silvestre de SaPI_{BovI} o derivados con las mutaciones puntuales de BovI-Stl indicadas, además de incluir cepas lisogénicas de fagos codificantes de las Duts Φ11, 80α o ΦNM1, según se especifique. Se tomaron muestras después de 90 minutos en ausencia o después de la inducción de fagos con mitomicina C. Todos los datos son el resultado de tres experimentos independientes. Se realizó un ANOVA de 2 vías con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak para comparar las diferencias de medias entre el control BovI-Stl^{WT} y el mutante, dentro de las columnas. Los valores de p ajustados significativos para el ensayo Stl^{R74A} fueron los siguientes: Φ11 Stl^{R74A} no inducido = <0,0001 ****; 80α BovI-Stl^{R74A} no inducido = <0.0001 ****, ΦNM1 BovI-Stl^{R74A} no inducido = <0.0001 ****, BovI-Stl^{R74A} inducido = <0.0001 ****. Todos los demás valores de p no fueron significativos.

Para demostrar si la estabilización del dímero de BovI-Stl mejora su afinidad por el ADN, mutamos el residuo H73 de la hélice $\alpha 5$ a cisteína (BovI-Stl^{H73C}) ya que nuestro modelo de dímero en la región N-terminal de la proteína predecía que este residuo se ubicaba a una distancia adecuada para formar un enlace disulfuro con el residuo equivalente de la segunda subunidad del dímero (Fig. 3.12A). Paralelamente a este trabajo, también se hizo lo mismo con el residuo equivalente en la región C-terminal que mostraba una distancia adecuada para formar un enlace disulfuro basándonos en la estructura experimental de BovI-Stl^{C-ter} (Fig. 3.12A). Para ello, el residuo H188 de la hélice $\alpha 11$, se mutó a cisteína (BovI-Stl^{H188C}). El análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras confirma la presencia del dímero covalente para ambas mutaciones, BovI-Stl^{H73C} y BovI-Stl^{H188C}, cuya cantidad aumenta en presencia del agente oxidante cobre fenantrolina (Cu-P) (Fig. 3.14A). Cuando se introdujo la mutación H73C en la versión truncada de Stl que contiene la parte N-terminal, BovI-Stl^{N-terH73C} se generaban dímeros unidos covalentemente en presencia de Cu-P, a diferencia de su versión silvestre truncada, BovI-Stl^{N-ter}, que es monomérica en solución (Fig. 3.14B). Además, los ensayos de EMSA mostraron que los mutantes BovI-Stl^{H73C} y BovI-Stl^{H188C} siguen siendo capaces de unirse al ADN (Fig. 3.13). Por su lado, BovI-Stl^{N-terH73C} presenta una mayor afinidad por la unión al ADN apareciendo las bandas correspondientes al complejo BovI-Stl:ADN a concentraciones mucho más bajas de la proteína (Fig. 3.13 y 3.14C), presentando así una fuerte evidencia de la mayor eficacia del estado dímérico de Stl para unir a su promotor diana y validando de nuevo nuestro modelo.

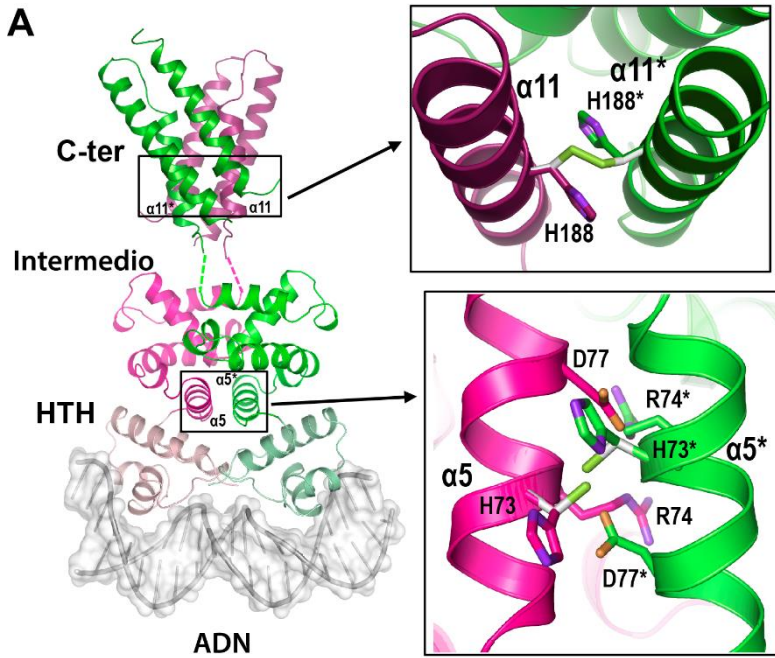


Figura 3.12. Dimerización de BovI-Stl e interacción con la Dut. Localización del puente disulfuro específico diseñado en base al modelo de dímero de BovI-Stl. (izquierda) Se generó un modelo de longitud completa de Stl dimérico unido a ADN a partir de las estructuras BovI-Stl^{N-ter} y BovI-Stl^{C-ter}, utilizando la estructura del complejo C. Esp1396I-DNA como plantilla (PDB: 3CLC). El modelo BovI-Stl está coloreado en diferentes tonos de magenta para un protómero y verde para el otro. Los tonos son claros, medios y oscuros para los dominios HTH, medio y C-terminal, respectivamente. El ADN está representado como superficie. Las cisteínas introducidas para inducir la unión covalente se muestran como “sticks” y están coloreadas, con carbonos en blanco y azufre en amarillo.

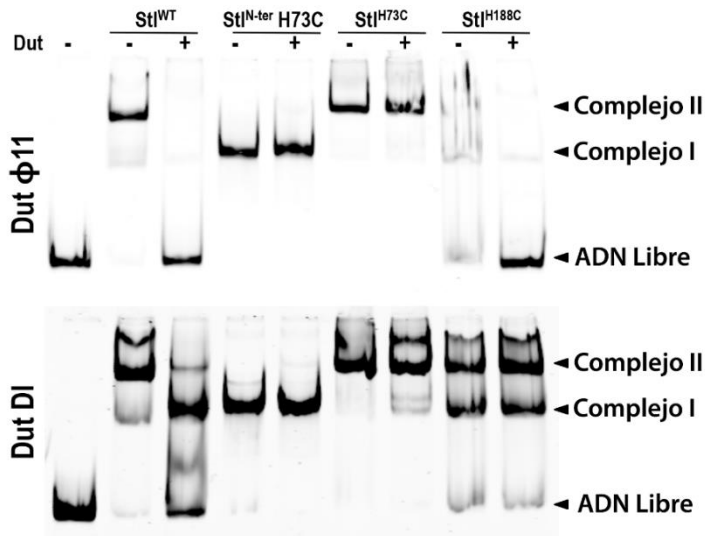


Figura 3.13. Análisis de la dimerización de BovI-Stl e interacción con la Dut. Los experimentos con EMSA muestran que los dímeros de Stl estabilizados por enlaces disulfuro H73C o H188C se unen al promotor Stl de SaPI_{bovI} de manera similar a la proteína de tipo silvestre. Sin embargo, estos dímeros covalentes, pero no la proteína de tipo silvestre, son resistentes a la disociación del ADN inducida por la Dut dimerica Dut ϕ DI, mientras que solo el dímero Stl mediado por los enlaces H73C es resistente a la disociación inducida por la Dut trimérica Dut ϕ 11.

Cuando Stl está reprimiendo la replicación del ADN mediante su unión al promotor de la isla lo hace en su forma de dímero, pero las Duts podrían inhibir esta represión uniéndose al dímero de Stl o por el contrario rompiendo este dímero y comprometiendo el estado oligomérico que es requerido para unirse al ADN. Por ello, analizamos la capacidad de unión de las Duts a BovI-Stl cuando éste se encuentra en su forma de dímero estable mediante los mutantes capaces de generar los puentes disulfuro. Además, cuantificamos la constante de afinidad de estos mutantes de BovI-Stl hacia Duts triméricas y dimericas

mediante diferentes aproximaciones. Así, se midió dicha constante del complejo BovI-Stl:Dut por interferometría de biocapa (BLI) para la Dut ϕ 11 como modelo de Dut trimérica y por termoforesis a microescala (MST) para la Dut ϕ O11 como modelo de Dut dimérica. Ambos mutantes a cisteína disminuyen la afinidad tanto por Duts diméricas como triméricas, aunque el efecto es mayor en BovI-Stl^{H73C} (Tabla 3.2). Sin embargo, la introducción de un agente reductor revierte este efecto y ambos mutantes recuperan una afinidad casi idéntica a la mostrada por la forma WT de las Duts correspondientes (Tabla 3.2), lo que indica que esta reducción de la afinidad se debe a la presencia de una cierta cantidad de dímeros de BovI-Stl unidos por *crosslinking* en la muestra, como se observa en SDS-PAGE (Fig. 3.14). Este hecho se confirma por la realización de ensayos en presencia de Cu-P donde se fuerza a la dimerización de toda la muestra y con ello a la pérdida total de interacción con ambos tipos de Duts (Tabla 3.2). Estos resultados confirman que las Duts interactúan con los monómeros de Stl y la consiguiente rotura del dímero impide la unión del represor Stl a sus promotores diana.

Los ensayos de EMSA mostraron que, a diferencia de BovI-Stl^{WT}, el mutante BovI-Stl^{H73C} unido covalentemente, tanto en su versión completa como en la versión truncada (BovI-Stl^{N-terH73C}), es insensible a la presencia de la Dut ϕ 11 (trimérica) y la Dut ϕ DI (dimérica), permaneciendo unido al ADN incluso cuando hay altas cantidades de ambas, demostrando que la rotura del dímero de BovI-Stl es necesaria para la formación del complejo BovI-Stl:Dut y la interferencia con la unión al ADN (Fig. 3.14). BovI-Stl^{N-ter} también es insensible a la Dut ϕ DI (dimérica) ya que carece del dominio C-terminal, requerido para interactuar con Duts diméricas.

Por otro lado, la Dutφ11 aún conservaba cierta capacidad de desplazar al mutante BovI-Stl^{H188C} del ADN diana, lo que indica cierta unión de BovI-Stl^{H188C}:Dutφ11 (Fig 3.14), aunque la afinidad debería reducirse considerablemente ya que mediante BLI no se podía concluir una interacción ($K_D > 1 \mu\text{M}$).

Tabla 3.2. Afinidades de unión entre BovI-Stl^{WT} y los mutantes de dimerización con Duts triméricas y diméricas. (a) Las interacciones de BovI-Stl:Dutφ11 se midieron mediante interferometría de biocapa. (b) Las interacciones de BovI-Stl:DutφDI se midieron termoforesis a microescala. (c) El ratio Señal/ruido se calculó dividiendo la amplitud de la respuesta por el ruido del run. (d) El DTT y la Cu-P se utilizaron a concentraciones de 1mM. (e) UND (unión no detectada) en condiciones experimentales siendo dicho límite de $K_D < 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ (BLI) y ratio señal/ruido < 5 (MST).

	Dutφ11 (BLI) ^a			DutφDI (MST) ^b	
	KD (M) (10-9)	Kon (M-1s- 1) (104)	Koff (s-1) (10-6)	KD (M) (10-10)	Signal/ noise
Stl^{WT}	1,73	2,14 ± 0,01	37 ± 6,94	3,0	10,5
Stl^{H73C}	10,30	2,45 ± 0,01	252 ± 5,29	148	48,8
Stl^{H188C}	2,57	2,19 ± 0,01	56,3 ± 5,01	63,9	15,6
Stl^{WT} + DTTd	6,72	4,18 ± 0,08	281 ± 22,7	8,6	14,8
Stl^{H73C} + DTTd	5,22	2,19 ± 0,02	114 ± 9,4	12,7	12,4
Stl^{H188C} + DTTd	5,10	1,54 ± 0,01	78,4 ± 4,35	61,3	15,1
Stl^{WT} + Cu-Pd	11,60	2,32 ± 0,01	270 ± 5,27	4,2	17,1
Stl^{H73C} + Cu-Pd		NBDe		NBDe	0,7
Stl^{H188C} + Cu-Pd		NBDe		NBDe	3,2

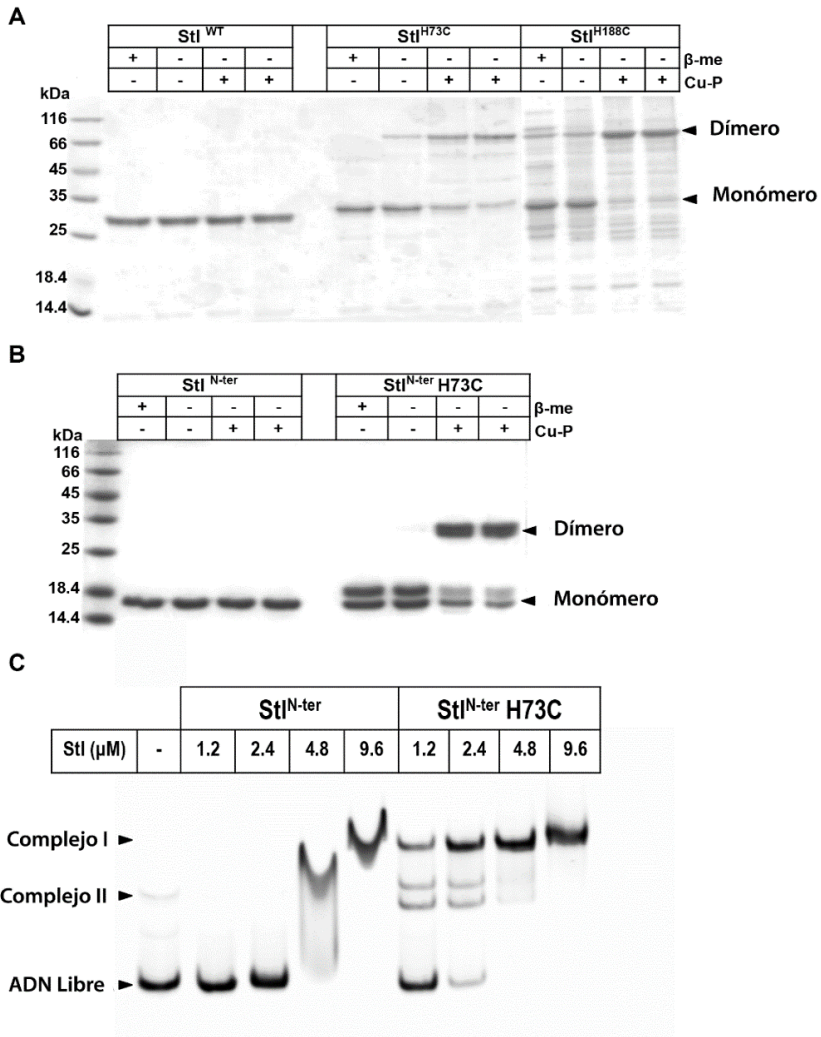


Figura 3.14. Estudio de los dímeros forzados de BovI-StI. His 73 y His 188 de BovI-StI se mutaron a cisteína para facilitar la producción de dímeros forzados mediante la formación de un puente disulfuro tanto en (A) la forma silvestre (StI^{H73C} y StI^{H188C} respectivamente) como en (B) el mutante delecional del motivo C-terminal (StI^{N-terH73C}) mediante la adición del reactivo oxidante cobre-fenantrolina (Cu-P) en dos concentraciones diferentes (0.5mM y 1mM) (C) Ensayos EMSA con BovI-StI^{N-ter} y el mutante BovI-StI^{N-terH73C}.

CAPÍTULO IV

Contribución personal

Descifrar del mecanismo molecular de la interacción Dut:BovI-Stl ha sido en gran parte gracias a la obtención de las estructuras de los complejos de este represor tanto con Dut triméricas como diméricas, mencionados en este capítulo. Como se hace eco a lo largo de la tesis, tanto en este capítulo como en el resto, los experimentos *in vivo* se realizaron en el laboratorio de nuestro colaborador, el Dr. Penadés. Además, y como se refleja en el apartado correspondiente, la resolución y caracterización del complejo Dut dimérica:BovI-Stl^{C-ter} pertenece a la tesis doctoral del Dr. Ciges-Tomás pero se introducen en esta tesis para aportar una visión más general de la represión modular de Stl. No obstante, mi contribución personal en este capítulo corresponde al resto de los resultados presentados, lo que incluye la resolución y análisis de las estructuras tridimensionales de los tres complejos Dut triméricas:BovI-Stl presentados (Dut ϕ 11:BovI-Stl^{N-ter}, Dut ϕ 85:BovI-Stl^{N-ter} y Dut80 α :BovI-Stl^{N-ter}) así como la validación de estas estructuras a través de ensayos mutacionales. Para ello, ha sido necesaria la clonación y la sobreexpresión todas las proteínas incluidas en el capítulo y el uso de diferentes técnicas de purificación, que incluyen la cromatografía de afinidad y exclusión molecular; el uso de técnicas de electroforesis como Native-PAGE; así como la cristalización y resolución de las estructuras tridimensionales de los complejos anteriormente mencionados por técnicas de difracción de rayos X de monocristales. Estas estructuras se resolvieron por reemplazo molecular a partir de datos de difracción recogidos en diferentes sincrotrones (DLS en Oxford, UK; y ALBA en Barcelona, España).

Estructura tridimensional del complejo entre BovI-Stl^{N-ter} y la Dut trimérica del fago ϕ 11

Delimitadas ya las zonas más importantes utilizadas por BovI-Stl para interactuar con las Duts triméricas de los fagos de *S. aureus* y viceversa, solo nos quedaba visualizar a nivel atómico los residuos exactos que la mediaban para de este modo comprender el mecanismo molecular de esta interacción. Para ello abordamos la resolución de la estructura tridimensional del complejo entre la Dut trimérica del fago ϕ 11 (Dut ϕ 11), una de las Duts que se han utilizado como prototipo para la caracterización de la interacción con Stl de SaPIBov1, y BovI-Stl^{N-ter}. El hecho de utilizar el fragmento N-terminal de BovI-Stl, definido en el capítulo anterior, en lugar de la proteína en su versión completa no fue algo arbitrario. Tanto durante este trabajo de tesis como anteriormente en el laboratorio se intentó cristalizar sin éxito el complejo BovI-Stl:Dut. Consideramos que este fracaso podría ser debido en parte a la estructura que BovI-Stl que presenta en una zona cuya predicción de estructura secundaria la asigna como desordenada. Esta zona conferiría una alta flexibilidad al represor que dificultaría la formación de cristales de proteína. Por ello, y tras diseñar un fragmento con menor complejidad y flexibilidad molecular el cual mantiene la afinidad por las Duts triméricas, se optó por invertir nuestros esfuerzos en conseguir dicho complejo utilizando el fragmento mencionado, BovI-Stl^{N-ter}. Todos los cristales reportados en esta tesis, incluidos los del complejo, se obtuvieron mediante la técnica difusión de vapor en gota sentada. En el caso de los complejos de proteínas, se incubaban ambas proteínas a un ratio molar 1:1 y una concentración final de 7-10 mg/mL. Este complejo generó cristales en gotas con condiciones de 24% PEG 1500 20% Glicerol, condiciones crioprotectoras a partir de la

cual se pudieron congelar los cristales sin necesidad de alterar la composición del medio. Posterior a su difracción, el complejo se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y la estructura del trímero de Dut ϕ 11 (PDB 4GV8; (Leveles *et al.*, 2013)) como modelo. Las fases iniciales obtenidas del reemplazo molecular se utilizaron para generar mapas de densidad electrónica de suficiente calidad para construir manualmente el modelo BovI-StI^{Nter} en Coot (Emsley *et al.*, 2010) y obtener finalmente la estructura del complejo a una resolución de 2.52 Å (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Colección de datos cristalográficos y de refinamiento de DutΦ11-BovI-Stl^{N-ter}

DutΦ11-BovI-Stl^{N-ter}	
Colección de datos	
Línea del rayo	DLS I-04
Longitud de onda (Å)	0,9282
Grupo espacial	P321
Dimensiones de celda (Å)	a=b=144,49 c=149 α= β=90 γ=120
Resolución (Å) ^a	95,93 - 2,52 (2,56 - 2,52)
Reflexiones totales	649186 (27668)
Reflexiones únicas	61269 (3036)
Compleitud (%)	100 (100)
Multiplicidad	10,6 (9,1)
I/σ(I)	12 (1,2)
R _{pim}	0,052 (0,745)
CC 1/2	0,999 (0,477)
Refinamiento	
R _{work}	0,197
R _{free}	0,24
Número de átomos	9321
Proteína	9072
Agua	193
Otros	56
Rmsd. Enlaces (Å)	0,0147
Rmsd. Ángulos (°)	1,734
Plano Ramachandran	
Preferido (%)	98,5
Permitido (%)	1,5

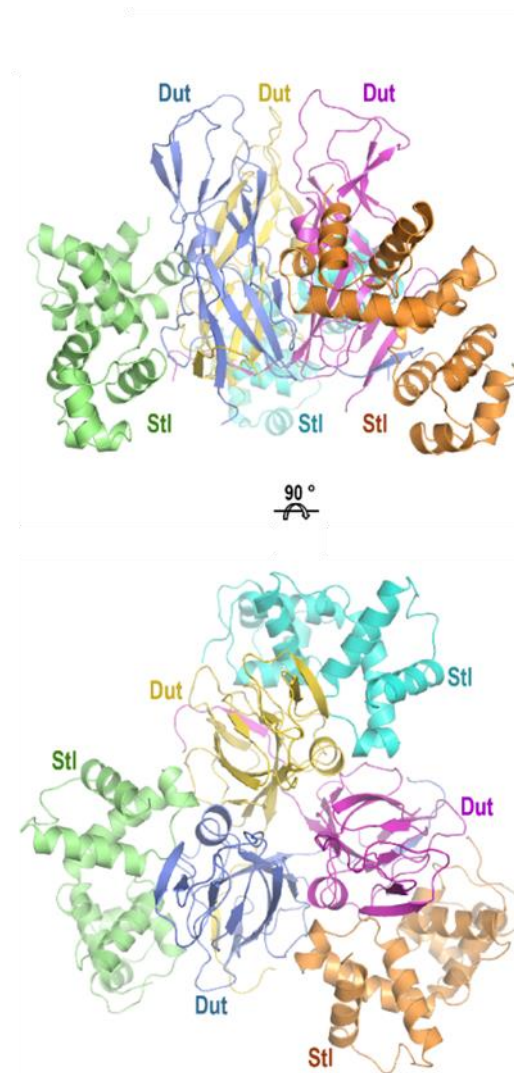


Figura 4.1. Estructura cristalina del complejo *Dut* $\phi 11$ -*BovI-Stl*^{N-ter}. Estructura del complejo entre el *Dut* trimérico del fago $\phi 11$ (protómeros coloreados en amarillo, azul y magenta) y tres moléculas de *BovI-StlN-ter* (protómeros coloreados en cian, verde y naranja). Se muestran dos vistas ortogonales.

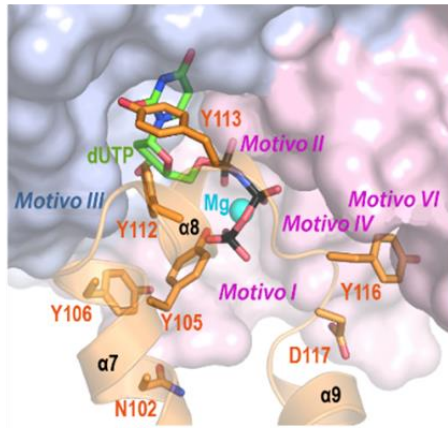
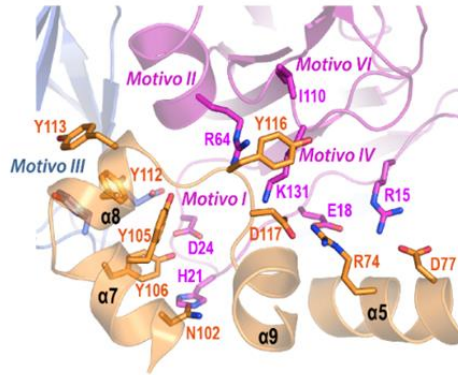


Figura 4.2. Estructura de las interacciones del complejo *Dutφ11-BovI-Stl^{N-ter}*. (A) Vista en primer plano de la interacción de un protómero de *BovI-Stl^{N-ter}* con el trímero *Dutφ11*. Solo dos de los tres protómeros de *Dutφ11* entran en contacto con una molécula de *BovI-Stl* (coloreada como en la figura 4.1). Los residuos involucrados en las interacciones se resaltan en barra, se marcan y se colorean por tipo de átomo con los carbonos en el mismo color que la molécula correspondiente. Para mayor claridad, solo se muestran y etiquetan los elementos estructurales de *BovI-Stl^{N-ter}* involucrados en la interacción. Los motivos catalíticos conservados de la *Dut* también están etiquetados. (B) El *dUTP* se colocó en el centro activo de la *Dutφ11* en complejo *BovI-Stl^{N-ter}* mediante la superposición con la estructura de *Dutφ11-dUTP* (PDB 4GV8) y se muestra en “sticks” con átomos de carbono en verde. El ion *Mg* quelado por el *dUTP* se muestra como una esfera cian. La *Dutφ11* se representa en superficie y *BovI-Stl^{N-ter}* se colorea como en la figura 4.1

La unidad asimétrica del cristal presentaba un trímero de Dut al que se asociaban tres monómeros de BovI-Stl^{N-ter}. Además, en la unidad asimétrica quedaba una copia libre de cada una de las proteínas, las cuales generaban por simetría cristalográfica un trímero de Dut al que se unían de nuevo tres BovI-Stl^{N-ter}. La estructura mostró que la Dut mantiene su arquitectura trimérica e interactúa con tres monómeros de BovI-Stl^{N-ter} independientes (Fig. 4.1), lo que confirma la estequiometría 1:1 propuesta previamente para el complejo de ambas proteínas (Szabo *et al.*, 2014). La comparación del complejo BovI-Stl^{N-ter}:Dut ϕ 11 con las estructuras de ambas proteínas por separado mostró que la formación del complejo tan solo induce cambios conformacionales mínimos en el represor, indicando que las estructuras de las proteínas en solución son competentes para la interacción (Fig. 4.3). Para la Dut ϕ 11, la estructura del trímero tanto libre (PDB 4GV8) (Leveles *et al.*, 2013) como unido a BovI-Stl son virtualmente idénticas (RMSD de 0.16 Å para la superposición de 161 residuos) (Fig. 4.3A). Por otro lado, la unión de BovI-Stl^{N-ter} a la Dut induce en el represor un pequeño movimiento de rotación (alrededor de 18 grados, calculado con DynDom 3D (Poornam *et al.*, 2009) entre los dominios HTH y el dominio intermedio, actuando la hélice α_6 como una bisagra (Fig. 4.3B), soportando la idea de que existe cierta independencia entre ambos dominios.

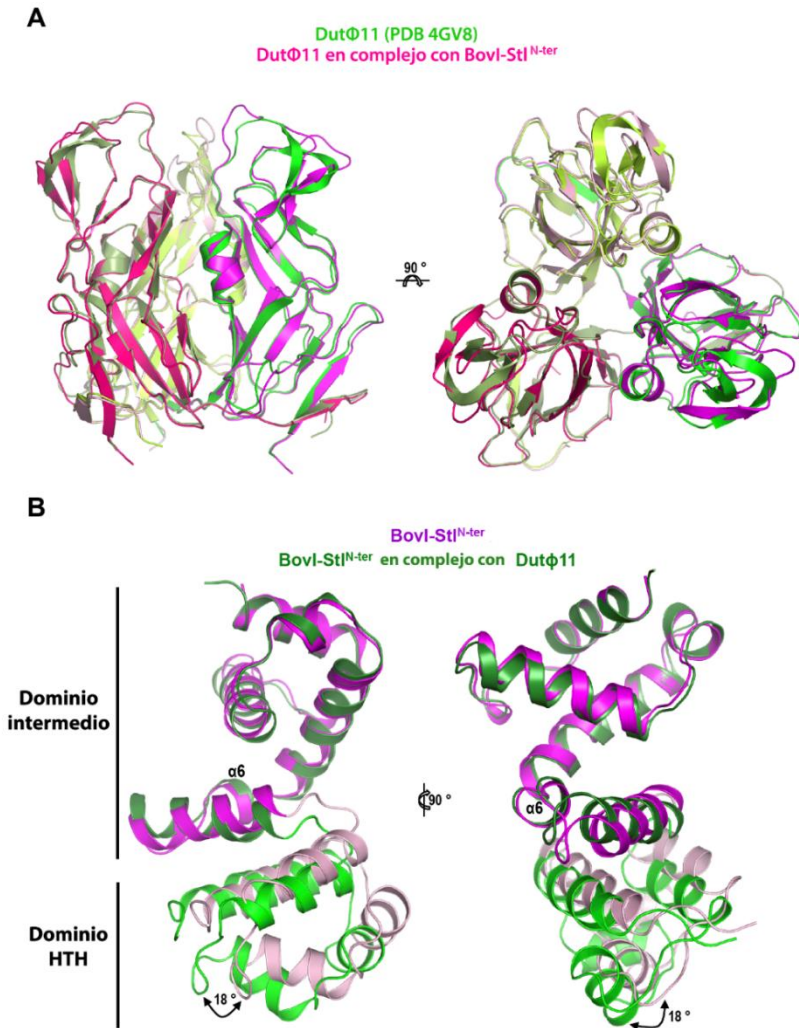


Figura 4.3. Cambios conformacionales en BovI-Stl^{N-ter} y DutΦ11 inducido por la formación de complejos. (A) Las estructuras cristalinas del trímero de DutΦ11, tanto en complejo con BovI-Stl^{N-ter} como en forma libre (PDB 4GV8); se superpusieron. se muestran dos vistas ortogonales, con los protómeros de la forma libre en diferentes tonos de verde y los protómeros de la Dut en complejo con BovI-Stl^{N-ter} en diferentes tonos de magenta. (B) Las estructuras de BovI-Stl^{N-ter} obtenidas en su forma libre (verde) o en complejo con DutΦ11 (morado) se superpusieron. El dominio HTH está coloreado en un tono más claro.

La comparación individual de cada uno de los dominios de BovI-Stl^{N-ter} en la estructura libre con la unida a la Dut mostró que en el complejo el dominio HTH (RMSD de 1.19 Å para 55 residuos) sufre un número mayor de reorganizaciones locales que el dominio intermedio (RMSD de 0.58 Å para 60 residuos), afectando principalmente a la hélice $\alpha 3$ de reconocimiento de ADN y al bucle siguiente que en ambas se encuentra parcialmente desordenado y que conecta a ésta con la hélice $\alpha 4$. Además, y como ya se observó en la estructura libre, los nueve residuos N-terminales y los dos C-terminales de BovI-Stl^{N-ter} también se encuentran desordenados, lo que indica que la formación del complejo no estabiliza esta parte de la proteína. Del mismo modo, los quince residuos C-terminales de Dut $\phi 11$, que corresponden al motivo V de las Duts que cubre el centro activo una vez unido el nucleótido, también se encontraba desordenados en el complejo.

Los residuos del dominio intermedio de BovI-Stl median la unión a la Dut trimérica imitando al sustrato

BovI-Stl^{N-ter} se une principalmente a Dut $\phi 11$ a través de interacciones con residuos que conforman el centro activo de la Dut, impidiendo la unión del nucleótido y el consiguiente posicionamiento del motivo V (Fig. 4.2). El complejo muestra que el represor inserta la hélice $\alpha 8$ y el bucle de conexión $\alpha 8$ - $\alpha 9$ ($L\alpha 8\alpha 9$) en el centro activo de la Dut $\phi 11$, imitando el nucleótido e interaccionando con residuos catalíticos de los motivos conservados de las Duts triméricas (Fig. 4.2). De este modo, los residuos de Stl Y112 e Y113 en la hélice $\alpha 8$ ocupan la posición del anillo de nucleótido ribosa y pirimidina, respectivamente, estando la Y112 interactuando con los residuos

catalíticos D81 e Y84 del motivo III de la Dut cuyas funciones, previamente mencionadas, son catalíticas y de especificidad por el ligando, respectivamente, y la Y113 con los residuos S65, G66 y S69 del motivo II (Fig. 4.2; Tabla 4.2). El residuo de BovI-Stl Y105 proyectándose desde la hélice $\alpha 7$ se coloca en la posición ocupada por el fosfato γ del dUTP, mientras que el residuo Y106 ubicado en la misma posición interacciona vía puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos H21 y D24 al comienzo del motivo I de la Dut (Fig. 4.2; Tabla 4.2). El residuo H21 de la Dut $\phi 11$ también interactúa con el residuo N102 de BovI-Stl. En la parte opuesta del centro activo, el residuo Y116 de BovI-Stl se proyecta desde el L $\alpha 8\alpha 9$ para insertarse entre los residuos del motivo IV de la Dut interaccionando con la K131. La Y116 de BovI-Stl también interacciona con la R64 de la Dut $\phi 11$, un residuo catalítico clave del motivo II (Fig. 4.2). El residuo D117 en el BovI-Stl, también en el L $\alpha 8\alpha 9$, forma un puente salino con el residuo K131 del motivo IV (Fig. 4.2; Tabla 4.2). Finalmente, Stl también interacciona con el motivo VI propio de las Dut de fagos de *S. aureus* al realizarse un contacto hidrofóbico entre el residuo I110 de ese motivo y la Y116 de BovI-Stl (Fig. 4.2; Tabla 4.2). En consecuencia, esta región corta de BovI-Stl ocupa el centro activo de la Dut y contacta con los residuos de todos los motivos catalíticos conservados con la excepción del motivo V, que permanece desordenado en el complejo Dut $\phi 11$ -Stl, además de con el motivo divergente, el motivo VI. Este modo de interacción explica i) la inhibición de la actividad dUTPasa de las Duts triméricas ya que BovI-Stl compite con el dUTP utilizando los residuos Y122 e Y113 para ocupar el centro activo, y ii) el bloqueo que hace el dUTP a la unión de BovI-Stl a la Dut al ocupar su sitio de unión (Fig. 4.5 capítulo IV; Szabo *et al.*, 2014).

Adicionalmente, los residuos R74 y D77 de la hélice $\alpha 5$ de BovI-StI que conecta el HTH y el dominio intermedio también participan en la formación de complejo, creando un área de interacción secundaria y de menor importancia. En esta área de interacción, los residuos R74 y D77 forman puentes salinos con residuos de la Dut ϕ 11 que preceden al motivo I, E18 y R15 respectivamente (Fig. 4.2).

Tabla 4.2. Interacciones intermoleculares del complejo *DutΦ11:BovI-Stt^N-ter*.

Stt ^N -ter			Dut Φ11			Distancia (Å)	
Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo	Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo		
α4	55 (VAL)	CB	β11	149 (GLU)	CD	3.89	
	56 (ASN)	OD1			N	2.85	
		ND2	O	2.85			
α5	70 (TYR)	OH	Lβ1β2	20 (ASN)	ND2	3.72	
		CB			CD	3.46	
	74 (ARG)	NH1		CG	3.78		
				OE1	2.41		
				OE2	3.39		
77 (ASP)	OD1	CD	3.27				
OD2	NH1	3.69					
α6	98 (TYR)	OH	Lβ1β2	15 (ARG)	NH2	3.04	
	102 (ASN)	OD1			20 (ASN)	OD1	3.11
		CE2		CE1		3.49	
	106 (TYR)	CZ		OH	21 (HIS)	ND1	3.66
						OD1	3.72
		OD2			ND1	3.70	
O		OD1	3.19				
α7	109 (GLY)	N	Lβ7β8	85 (HIS)	N	3.08	
	112 (TYR)	OH	β7	84 (TYR)	OH	3.62	
			Lβ7β8	81 (ASP)	O	3.50	
		N			3.11		
		CB		OD2	2.81		
		CG		CE1	3.37		
		CD1		CD1	3.27		
		CD2			3.36		
		CE2	3.51				
	CZ	3.47					
	113 (TYR)	O	α1	84 (TYR)	CG	3.57	
					CE2	3.73	
		CZ	β8		CB	3.71	
					OH	3.78	
114 (SER)	CB	α1	65 (SER)	O	3.49		
	O		66 (GLY)	N	3.55		
La7α8	116 (TYR)	O	α1	69 (SER)	OG	3.05	
				C	β8	89 (GLY)	N
		CD1	Lβ8β9				
				CE1	2.95		
		CE2	Lβ9β10	64 (ARG)	NH1	3.88	
		CZ				NH2	3.35
	117 (ASP)	OD1	α1	70 (TYR)	NH2	2.65	
						O	3.54
α9	152 (LEU)	O	α1	70 (TYR)	NZ	3.40	
						CE1	110 (ILE)
	CE2	Lβ8β9	111 (LYS)	CE	3.83		
	CZ	Lβ9β10	133 (LYS)	N	3.81		
	OD1			CB	3.96		
				NZ	2.76		

Validación del modelo cristalográfico del complejo Dut ϕ 11:BovI-Stl^{N-ter}

Anteriormente, hemos caracterizado varias mutaciones en Dut ϕ 80 α y Dut ϕ 11, mutaciones que involucran los residuos de los motivos catalíticos conservados y que afectan significativamente la interacción BovI-Stl:Dut. Éstas incluyeron la mutación de los residuos catalíticos D81 e Y84 a diferentes residuos que tanto *in vivo* como *in vitro* dificultan completamente o reducen fuertemente la inducción de la isla (Tabla 1.2 capítulo I; Tormo-Mas *et al.*, 2013). Además, mediante ensayos mutacionales, previamente demostramos *in vivo* e *in vitro* que tres residuos en el motivo IV modulan la afinidad de Dut: BovI-Stl (Tabla 1.3 capítulo I). El complejo que se muestra en este trabajo revela que la Dut ϕ 11 interactúa con BovI-Stl a través del residuo K113 (Fig. 4.2), que correspondería a la R134 de la Dut ϕ 80 α , lo que confirmaría por qué el cambio en este residuo contribuye a esta diferencia en la afinidad.

Los resultados anteriores validaban ciertas interacciones de este modelo a través del uso de mutantes en las Duts. No obstante, y debido a que proponíamos un modelo de interacción generalizado para las Duts triméricas, decidimos hacer la contrapartida y validar el modelo cristalográfico desde el lado del represor BovI-Stl, realizando mutaciones en aquellos residuos implicados en el reconocimiento y unión según la estructura. Así, estos mismos mutantes podrían utilizarse independientemente de la Dut que se estudiara.

A la hora de validar dichas interacciones, se utilizaron las Duts triméricas estudiadas como modelo en nuestro laboratorio, Dut ϕ 80 α , como aquella presente en nuestro complejo, y Dut ϕ 11, que había sido utilizada como modelo por el laboratorio de la Dra. Vetessy. También se utilizaron Duts diméricas (Dut ϕ NM1, Dut ϕ O11, Dut ϕ DI) a modo de control para asegurarnos que dichas mutaciones sobre BovI-Stl^{N-ter} solo afectaba a la unión específica a Duts triméricas.

Los residuos mutados en BovI-Stl fueron aquellos que, en la estructura, se posicionaban en el centro activo de la Dut e interaccionan con los distintos motivos de la misma. Dichas mutaciones fueron, al igual que de los mutantes generados para estudiar la interacción de BovI-Stl con el ADN (Capítulo III), una sustitución de su aminoácido por una alanina. Así pues, se generaron los mutantes Y106A (BovI-Stl^{Y106A}), Y112A (BovI-Stl^{Y112A}), Y113A (BovI-Stl^{Y113A}) e Y116A (BovI-Stl^{Y116A}). En la parte *in vivo*, analizada por el laboratorio del Dr. Penadés, los mutantes BovI-Stl^{Y106A}, BovI-Stl^{Y113A} y BovI-Stl^{Y116A} generaron unos resultados indistinguibles a los de la versión WT utilizando el sistema reportero de β -lactamasa descrito anteriormente (Fig. 4.4). Estos resultados muestran que dichos mutantes reprimen el sistema reportero y son de-reprimidos tanto por Duts triméricas como diméricas de forma similar al represor WT. Por el contrario, la mutación Y112A (BovI-Stl^{Y112A}) aunque mantenía la afinidad por las Duts diméricas, mostró una capacidad reducida de interaccionar con las Duts triméricas ya que cuando estas eran expresadas el sistema era incapaz de inducirse (Fig. 4.4). El doble mutante Y112 e Y113 a alanina (BovI-Stl^{YYAA}) exacerbó este efecto, produciendo una variante de BovI-Stl que mantenía su capacidad de ser inducida por Duts diméricas, pero perdía prácticamente por completo la capacidad de ser inducida por Duts

triméricas (Fig. 4.4). Para confirmar el efecto de estas mutaciones, el grupo del Dr. Penadés recombinó los mutantes BovI-Stl^{Y112A} y BovI-Stl^{YYAA} en cepas de *S. aureus* que contenían la isla SaPI_{bov1} junto a una Dut clonada en un plásmido inducible por CdCl₂. Así, cada cepa portaba su isla con la versión de BovI-Stl correspondiente (BovI-Stl^{WT}, BovI-Stl^{Y112A} y BovI-Stl^{YYAA}) y tras inducir la expresión de la Dut se analizaba si era capaz de inducir la transcripción de la SaPI. El ciclo ERP único de los SaPI genera moléculas circulares cerradas covalentemente (CCC) de ADN de la isla las cuales se pueden visualizar utilizando la técnica de Southern Blot (Fig. 4.5). Por lo tanto, una reducción o ausencia de la "banda CCC" indica una reducción o la no inducción de la replicación de la SaPI. Cuando se sobreexpresó la Dut ϕ 11 en pCN51 a través de la inducción con CdCl₂, en las cepas mutantes de BovI-Stl se redujo la inducción de SaPI_{bov1} en comparación con la versión WT (Fig. 4.5). Sin embargo, cuando las Duts diméricas Dut ϕ DI, Dut ϕ NM1 y Dut ϕ O11 se expresaron, la inducción de SaPI_{bov1} en las cepas mutantes fue equivalente a la del WT, indicando que las mutaciones BovI-Stl^{Y112A} y BovI-Stl^{YYAA} afectan la interacción de BovI-Stl con Duts triméricas, pero no con diméricas (Fig. 4.5). A modo de control, se realizó un ensayo de Western Blot donde se muestra que cada Dut se expresó de manera similar en presencia de los diferentes mutantes de BovI-Stl, indicando que las diferencias observadas se debieron a las mutaciones de BovI-Stl y no debido a la cantidad de Dut en el medio (Fig. 4.5).

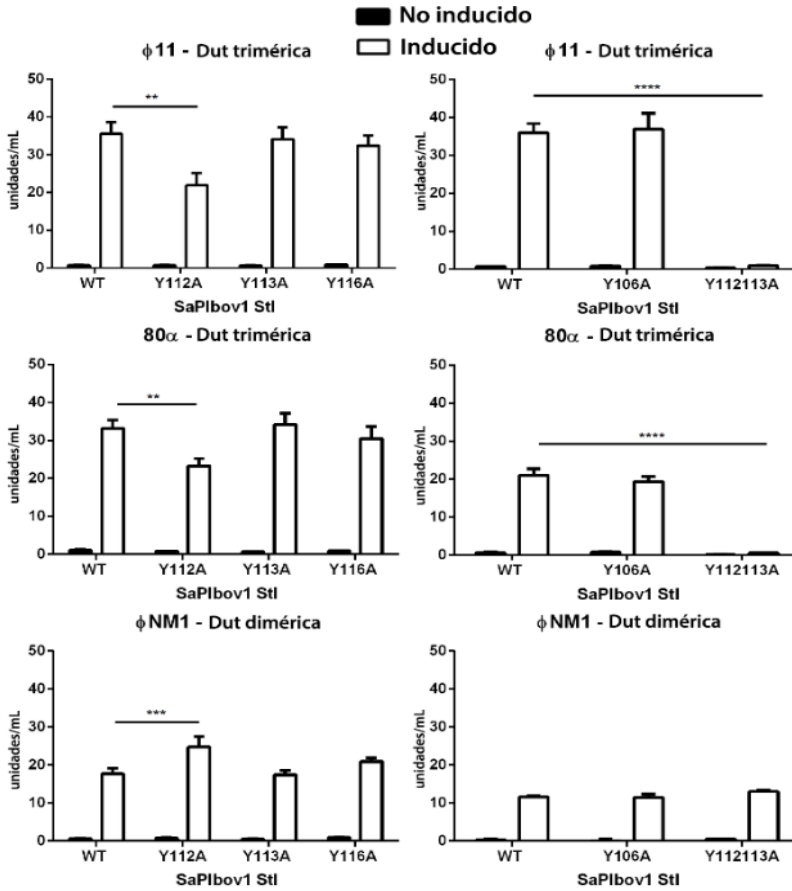


Figura 4.4. Análisis in vivo del reconocimiento y unión de la Dut trimérica a BovI-Stl. Las mutaciones *BovI-Stl*^{Y112A} y *BovI-Stl*^{Y106A} reducen o anulan la interacción de BovI-Stl con las Duts triméricas, pero no con las Duts diméricas. Todos los datos son el resultado de tres experimentos independientes. Se realizó un ANOVA de 2 vías con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak para comparar las diferencias de medias entre el control *BovI-Stl*^{WT} y los mutantes, dentro de las columnas. Los valores de *p* ajustados significativos fueron los siguientes: φ11 inducido *BovI-Stl*^{Y112A} = 0.0013 **, inducido *BovI-Stl*^{Y106A} = <0.0001 ****; φ80α inducido por *BovI-Stl*^{Y112A} = 0,0035 **, inducido por *Stl*^{Y112A, Y113A} = <0,0001 ****; φNM1 inducido por *BovI-Stl*^{Y112A} = 0.0008 ***, todos los demás valores no fueron significativos.

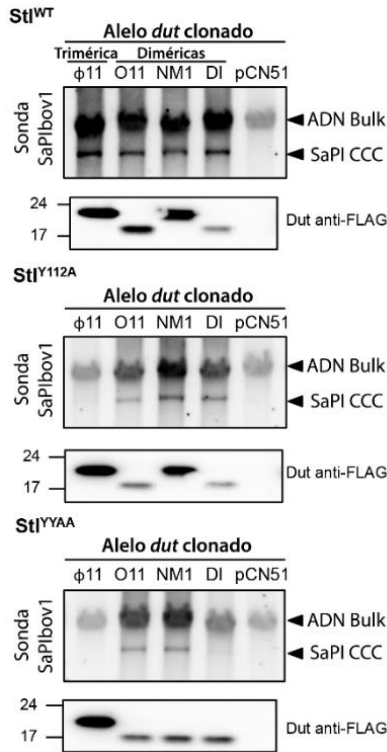


Figura 4.5. Evaluación in vivo del reconocimiento y unión de la Dut trimérica a BovI-Stl. Escisión y replicación de la isla SaPI_{BovI} después de la inducción de BovI-Stl^{WT}, BovI-Stl^{Y112A} y BovI-Stl^{YYAA}. Las cepas que contienen SaPI_{BovI} con BovI-Stl^{WT}, BovI-Stl^{Y112A} y BovI-Stl^{YYAA} se complementaron con plásmidos que expresan la Dut triméricos φ11 o las Duts diméricas φO11, φNM1 o φDI las cuales estaban etiquetadas con 3xFLAG. Las muestras se aislaron 3 h después de la inducción con 1 μM de CdCl₂ y se realizaron transferencias de Southern Blot usando una sonda de integrasa de SaPI_{BovI}. La banda superior es ADN "Bulk", que incluye SaPI cromosómico, fágico y replicante. CCC indica ADN de SaPI circular cerrado covalentemente. En estos experimentos no estaba presente ningún fago auxiliar, por lo que el ADN de SaPI extirpado y replicado aparece como parte del ADN "Bulk" o como moléculas CCC, no los monómeros lineales que se ven después de la inducción y el empaquetamiento mediados por el fago auxiliar. Los paneles inferiores debajo de cada Southern Blot son transferencias de Western Blot realizadas con un anticuerpo anti-FLAG para controlar la expresión de las Duts.

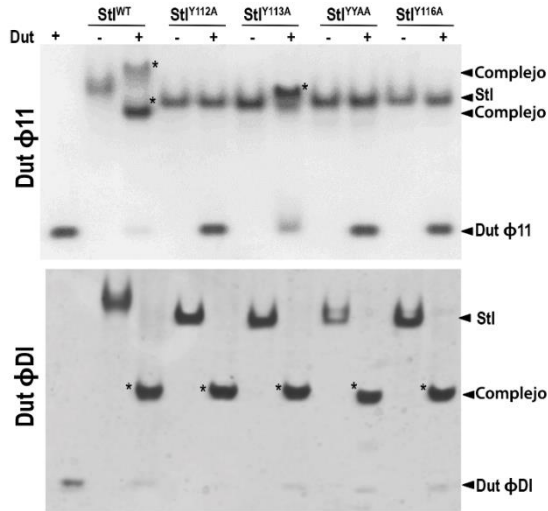


Figura 4.6. Evaluación *in vitro* del reconocimiento y unión de la Dut trimérica a BovI-Stl. Se utilizaron ensayos de cambio de movilidad en gel nativo para probar la capacidad de unión de las proteínas BovI-Stl de tipo silvestre y mutantes a la Dut ϕ 11 trimérica y Dut ϕ DI dimérica. La aparición de bandas con migración alternada con respecto a las proteínas individuales (marcadas con un asterisco) indica la formación del complejo BovI-Stl:Dut

Para definitivamente analizar la función de estos residuos en el ciclo biológico de la SaPI y su relación con el mismo se utilizaron ensayos de interferencia con diferentes cepas contenedoras de un profago que codificaba una de las Duts ϕ 11, ϕ 80 α (triméricas) o ϕ NM1 (dimérica) junto con el BovI-Stl WT o sus mutantes (BovI-Stl^{WT}, BovI-Stl^{Y112A} o BovI-Stl^{Y116A}). Cuando el profago es inducido, expresa la Dut codificada en su genoma y es capaz así de inducir el ciclo de la isla si tiene la habilidad de unirse al represor Stl. La isla se replica y es capaz de utilizar las cápsides del fago para empaquetar su propio ADN, haciendo que el número de partículas víricas disminuya. Utilizando SaPIBovI con BovI-Stl^{WT} como control, analizamos si las islas con los represores mutantes fueron inducidas por los diferentes fagos en

función de si se redujo o no el título de fagos. En concordancia con los experimentos anteriores (Fig. 4.4 y Fig. 4.5), las islas con BovI-Stl mutante (BovI-Stl^{Y112A} y BovI-Stl^{YY-AA}) no mostraron una reducción en el título de fagos cuando eran infectadas con los fagos que codifican Duts triméricas ($\phi 11$ y $\phi 80\alpha$), indicando que no existe interferencia debido a la falta de inducción de la SaPI (Fig. 4.7). Por el contrario, el fago que codificaba la Dut dimérica $\phi NM1$ mostró niveles de títulos de fagos reducidos tanto en los mutantes como en el WT, lo que indica la inducción y la interferencia de SaPI (Fig. 4.7). No se pudo analizar el título de fago de $\phi O11$ porque no produce placas visibles en la cepa receptora RN4220.

En paralelo, los experimentos *in vivo* realizados en el laboratorio del Dr. Penadés fueron contrastados *in vitro* en nuestro laboratorio. Para ello, los mutantes de BovI-Stl fueron clonados y transformados en cepas de expresión para su posterior purificación y análisis.

La caracterización *in vitro* de la formación del complejo Dut:BovI-Stl usando *Native-PAGE* confirmó que las mutaciones Y112A e YYAA reducen la capacidad para interactuar con la Dut $\phi 11$, como muestran los datos *in vivo*. Además, mostraron que la mutación Y116A produce en BovI-Stl un efecto similar. La mutación Y113A también afecta la interacción con Dut triméricas, aunque en menor medida (Fig. 4.6). Sin embargo, ninguna de estas mutaciones afectó la capacidad de BovI-Stl para formar complejos con la Dut dimérica ϕDI (Fig. 4.6). Estas dos Duts, Dut $\phi 11$ y Dut ϕDI , se seleccionaron como representantes de Duts triméricas y diméricas ya que sus complejos con BovI-Stl son fácilmente apreciables por *Native-PAGE*. Estos resultados confirman que BovI-Stl interactúa con las

Duts triméricas mediante múltiples residuos involucrados en los motivos catalíticos, pero, también, y como ya se había comentado en el capítulo anterior, que estos sitios de reconocimiento deben diferir de aquellos involucrados en la interacción con las Duts diméricas.

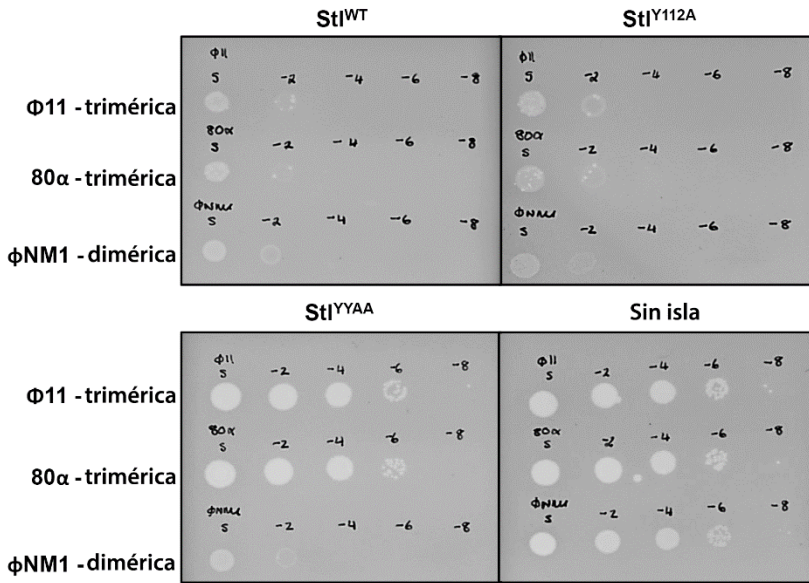


Figura 4.7. Ensayo de detección de fagos por titulación. Se utilizan las Dut triméricas codificadas por los fagos Φ11 y 80α y la Dut dimérica que codifica el fago ΦNM1 en céspedes bacterianos de cepas RN4220 sin SaPI, con SaPI_{bov1} BovI-StI^{WT}, o con SaPI_{bov1} con mutantes BovI-StI^{Y112A} o BovI-StI^{Y112A}. Los lisados diluidos en serie (10 veces) se vieron en el césped del *S. aureus* indicado. El título del fago en unidades formadoras de placas por mL (UFP/ mL) utilizado para cada punto se indica en la placa.

Co-cristalización del complejo BovI-Stl:DutφO11.

Gracias al estudio de BovI-Stl como proteína modular y al diseño de los mutantes truncados, nuestro grupo de investigación consiguió resolver la estructura tridimensional de una Dut dimérica, la Dut del fago φO11 (DutφO11), en complejo con la porción del represor Stl que interacciona con este tipo de Duts, el dominio C-terminal BovI-Stl^{C-ter} a 2,9 Å de resolución. Aunque este trabajo corresponde a una tesis paralela del Dr. Ciges-Tomás, se describe en esta tesis para un posterior análisis comparativo con los resultados presentados aquí. La estructura del complejo DutφO11- BovI-Stl^{C-ter} se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando las estructuras de cada componente individual previamente resuelto por nuestro grupo (Capítulo III). La unidad asimétrica del cristal presentaba una sola copia del heterocomplejo, con un monómero de DutφO11 y otro de BovI-Stl^{C-ter}, demostrando así una estequiometría 1:1 que ya había sido propuesta anteriormente tanto por nuestro grupo (Donderis *et al.*, 2017) como por otros investigadores (Hill & Dokland, 2016; Hill *et al.*, 2017). Tanto DutφO11 como BovI-Stl^{C-ter} son homodímeros en solución, pero para formar el heterocomplejo BovI-Stl^{C-ter}:DutφO11, ambas proteínas explotan su propia superficie de homodimerización de tal manera que cada proteína imita recíprocamente a la segunda subunidad del homodímero (Fig. 4.8). El represor BovI-Stl^{C-ter} proporciona la parte N-terminal de sus hélices de dimerización α11 y α13, mientras que la DutφO11 contribuye con las hélices de dimerización α2 y α5, generando una superficie de interacción de aproximadamente 1100 Å². (Fig. 4.8 y 4.9A). La superposición de BovI-Stl^{C-ter} del heterocomplejo BovI-Stl^{C-ter}:DutφO11 con el homodímero BovI-Stl^{C-ter} muestra que las hélices α11 y α13 en el homodímero BovI-Stl ocupan posiciones similares a

las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 5$ de la Dut Φ O11, que confirma tanto el mimetismo estructural como el mecanismo molecular utilizado por BovI-StI para interactuar con las Duts diméricas (Fig. 4.9B).

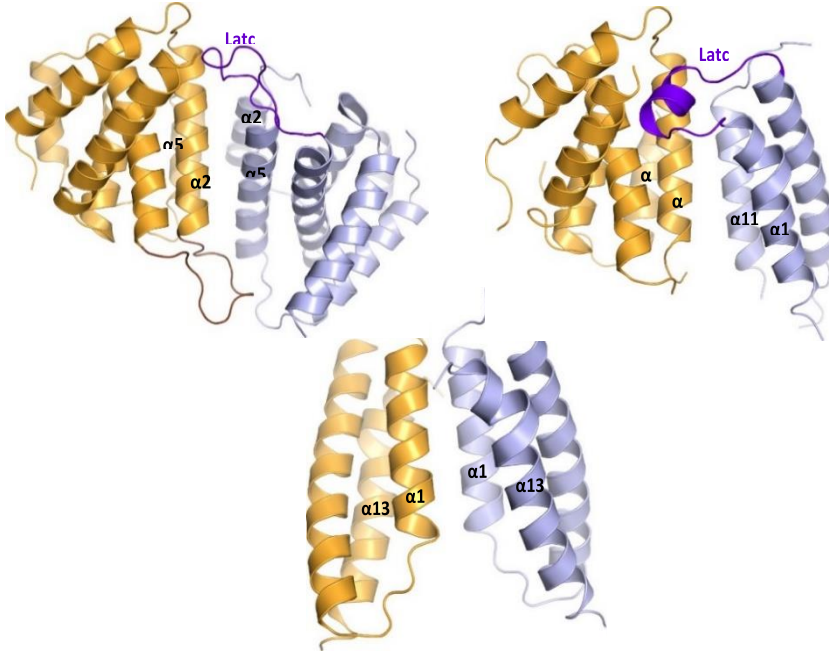


Figura 4.8. *BovI-StI^{C-ter} imita al de Duts diméricas.* Representación de las estructuras de los homodímeros Dut Φ O11 (PDB 5MIL, Donderis et al., 2017) (izquierda) y BovI-StI^{C-ter} (abajo) y un heterodímero BovI-StI^{C-ter}:Dut Φ O11 (derecha) en orientación idéntica por superposición de un protómero del homodímero en el componente correspondiente en la estructura del heterodímero. Obsérvese que para formar el heterodímero BovI-StI^{C-ter}:DutO11, el protómero BovI-StI^{C-ter} ocupa una posición idéntica al segundo protómero del homodímero Dut Φ O11, simulando la interacción de este protómero en la formación del complejo.

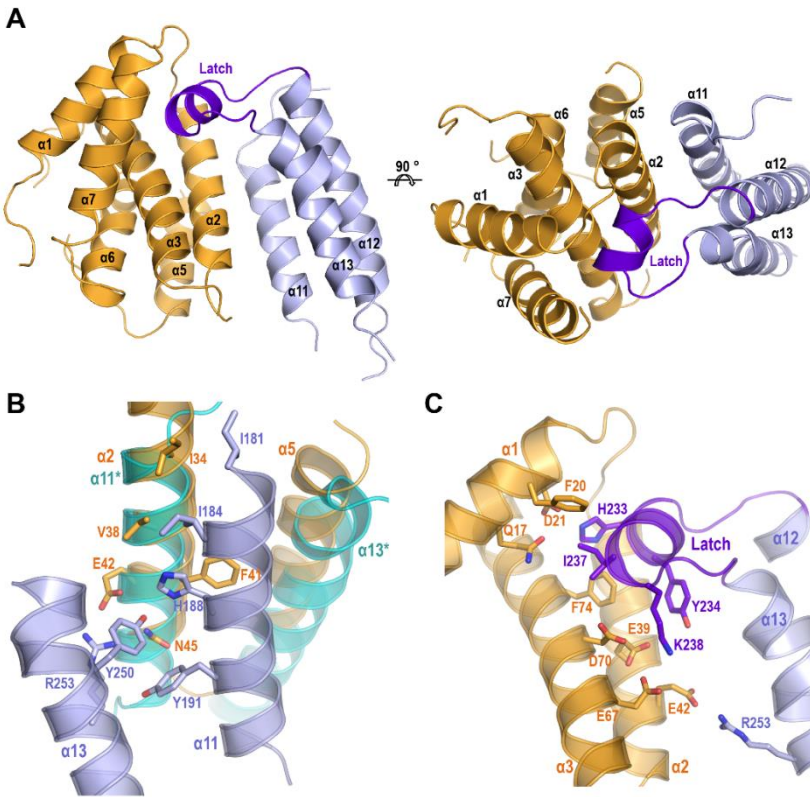


Figura 4.9. Estructura cristalina del complejo BovI-Stl^{C-ter}-Dut ϕ O11. (A) Representación de BovI-Stl^{C-ter} en complejo con la Dut dimérica del fago ϕ O11. Dut ϕ O11 está coloreado en naranja y BovI-Stl^{C-ter} en azul, con el "pestillo" que se proyecta sobre el centro activo Dut resaltado en púrpura. Los elementos estructurales de ambas proteínas están marcados. (B) El mimetismo de pareja por BovI-Stl. Vista detallada de las hélices de heterodimerización BovI-Stl^{C-ter}:Dut ϕ O11 coloreadas como (A) superpuestas al homodímero BovI-Stl^{C-ter} que muestran las hélices de dimerización del segundo protómero BovI-Stl^{C-ter} en cian. Los residuos que interactúan en el complejo BovI-Stl^{C-ter}:Dut ϕ O11 se muestran en barras y se colorean por tipo de átomo con los átomos de carbono en el color idéntico a la molécula correspondiente. (C) Vista detallada del pestillo BovI-Stl^{C-ter} que se proyecta sobre el centro activo Dut ϕ O11 (coloreado como en (A)). se muestran en palos y se etiquetan, al igual que sus contrapartes BovI-Stl^{C-ter}.

Además, BovI-Stl proyecta un *loop* largo que conecta las hélices $\alpha 12$ y $\alpha 13$ en el centro activo de la Dut ϕ O11 (Fig. 4.9A y 4.9C). Este *loop* (residuos 230-241), desordenado en la forma libre de BovI-Stl^{Cter} (Fig. 4.8), adquiere una conformación de hélice de un solo giro asemejándose al cierre o “*latch*” del centro activo que tiene la Dut ϕ O11 proveniente del otro monómero de Dut cuando ésta es un homodímero (Fig. 4.9C y 4.8).

Sin embargo, este *latch* presente en BovI-Stl se inserta en el centro activo de la Dut ϕ O11 y ocupa la posición del nucleótido, imitando varias de sus interacciones (Fig. 4.9C y 4.10). El mimetismo del dUTP producido por el *latch* de BovI-Stl explica por qué inhibe la actividad dUTPasa de las Duts diméricas y también por qué el sustrato dUTP es un inhibidor competitivo de la interacción BovI-Stl:Dut dimérica (Capítulo 4). En conjunto, la estructura apoya la idea de que el dominio C-terminal de BovI-Stl imita estructuralmente tanto al sustrato dUTP como a la superficie implicada en la formación del dímero en la Dut.

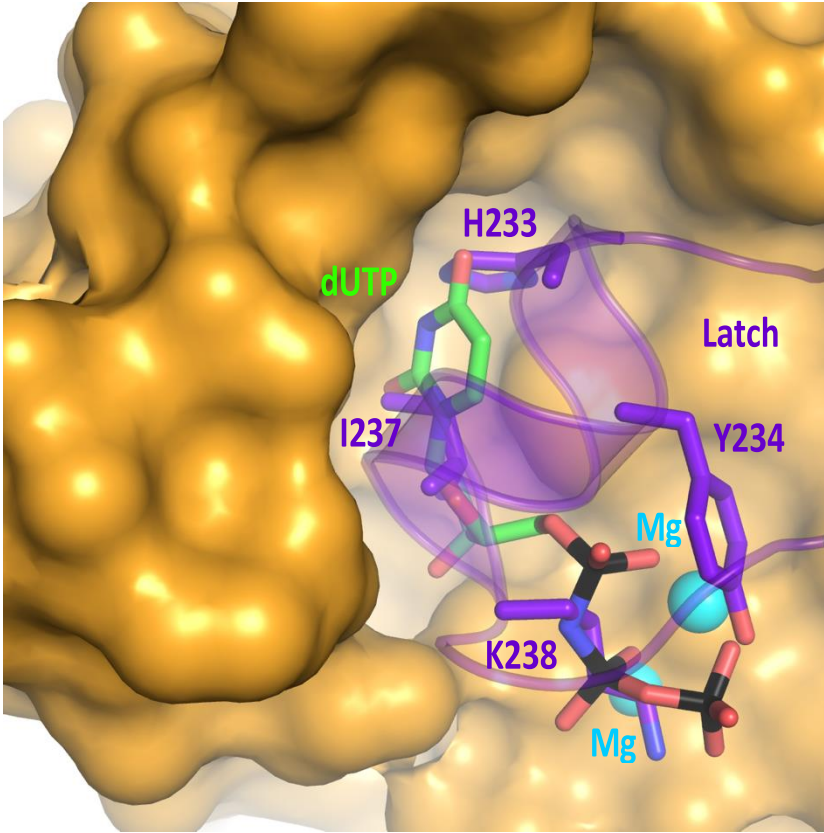


Figura 4.10. BovI-Stl^{C-ter} latch imita el sustrato dUTP-Mg. El sustrato dUTP-Mg se colocó en el centro activo de DutφO11 en complejo con BovI-Stl^{C-ter} mediante la superposición de la estructura de DutφO11-dUTP (PDB 5MIL) y se muestra en barras con átomos de carbono en verde. El ion Mg quelado por el dUTP se muestra como una esfera cian. DutφO11 está representado en superficie y BovI-Stl^{C-ter} pestillo en caricatura semitransparente y coloreado en púrpura. Los residuos BovI-Stl^{C-ter} que imitan las interacciones de sustratos se muestran en barras y se etiquetan.

Caracterización funcional del reconocimiento e interacción entre BovI-Stl:Dut dimérica

Como hemos visto anteriormente, los residuos de BovI-Stl identificados como contribuyentes al complejo BovI-Stl:Dut trimérica no tienen impacto en la interacción con Duts diméricas, lo que implica que en este complejo están involucrados un conjunto diferente de residuos. Gracias a la obtención del complejo BovI-Stl:Dut dímérica se probaron varias mutaciones sobre el represor BovI-Stl *in vivo* e *in vitro* para analizar la importancia de diferentes residuos en este complejo. Primero, analizamos el papel del *latch* mimético (residuos 231-NHHYDAIKGK-240) reemplazando este *loop* por una secuencia conectora “GGGS” (BovI-Stl^{GGGS}). El análisis *in vitro* utilizando Native-PAGE mostró que esta mutación eliminaba la interacción con la Dut dimérica DI (DutDI), mientras que los ensayos por EMSA confirmaron que mantiene la interacción con su promotor diana (Fig. 4.11A y 4.11B). Como se esperaba para un elemento estructural involucrado exclusivamente en el reconocimiento de las Duts diméricas, la eliminación del *latch* en el mutante BovI-Stl^{IGGGS} solo tiene un efecto menor en la interacción con la Dut ϕ 11 trimérica (Fig. 4.11A). Una mutación puntual doble más refinada y dirigida solo a los residuos H232 (a Asp) y Y234 (a Ala) del *latch*, los cuales median interacciones importantes con la Dut, para generar el mutante BovI-Stl^{HY-DA} fue suficiente para abolir la interacción con la Dut ϕ DI; de nuevo, este mutante mostró una capacidad de unir al ADN comparable a la del WT y era capaz de interactuar con la Dut ϕ 11 trimérica (Fig. 4.11A y 4.11B). Además, se observaron resultados idénticos eliminando únicamente la cadena lateral del residuo Y234 (BovI-Stl^{Y234A}) (Fig. 4.11A y 4.11B). El fuerte efecto de esta mutación puntual se puede

entender debido al hecho de que no solo media el contacto con la Dut, sino que también desempeña un papel estructural en el mantenimiento de la arquitectura del *latch*; El Y234 apila su anillo aromático entre las cadenas laterales de los residuos del *latch* K238 y M242 (Fig. 4.9C). Además, se confirmó por EMSA su papel en la de-represión *in vitro* mediante el análisis de la capacidad de las Duts para liberar estos mutantes de BovI-Stl del ADN de la isla. Como se observó para las formas WT de Dut ϕ 11 y BovI-Stl (Hill y Dokland, 2016; Szabo *et al.*, 2014), la formación del complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11 con las versiones mutantes BovI-Stl^{GGGS}, BovI-Stl^{HY-DA} o BovI-Stl^{Y234A} interfiere con la capacidad de unión al ADN y lo libera, confirmando una interacción entre los mutantes y la Dut trimérica (Fig. 4.11B). A la inversa, la capacidad de estos mutantes para unirse al ADN no se vio afectada por la presencia de la Dut ϕ DI (Fig. 4.11B), en consonancia con los resultados anteriores.

Como se hizo con el caso de las Duts triméricas, nuestros colaboradores analizaron *in vivo* el impacto de estas mutaciones en el represor BovI-Stl utilizando el sistema indicador de β -lactamasa descrito anteriormente (Fig. 4.13). En correlación con los resultados *in vitro*, las mutaciones BovI-Stl^{GGGS}, BovI-Stl^{HY-DA} y BovI-Stl^{Y234A} afectaron a la capacidad que presentaban los fagos con Duts diméricas para activar el sistema reportero, mientras que los fagos que codificaban Duts triméricas mostraron un fenotipo similar al WT.

Se utilizaron cepas que contenían profagos que codificaban Duts diméricas o triméricas (ϕ 11, ϕ 80 α o ϕ NM1) para observar los niveles del título de fago utilizando el ensayo de titulación de fagos, explicado anteriormente, en cepas receptoras que contenían BovI-Stl^{WT}, BovI-

Stl^{GGGS}, BovI-Stl^{HY-DA} o BovI-Stl^{Y234A} como represor de la SaPI. En la versión WT de BovI-Stl, la inducción de los fagos condujo a la desrepresión de la isla y, por lo tanto, a la interferencia que su expresión produce a los fagos, causando niveles reducidos de partículas víricas tanto para los fagos que codificaron Duts diméricas como triméricas (Fig. 5.13). Sin embargo, mientras que los fagos que codifican Dut triméricas ($\phi 11$ y $\phi 80\alpha$) mostraron títulos de fagos reducidos en presencia de los mutantes BovI-Stl^{GGGS}, BovI-Stl^{HY-DA} y BovI-Stl^{Y234A}, los que codificaban Duts diméricas presentaron un título elevado (Fig. 4.14).

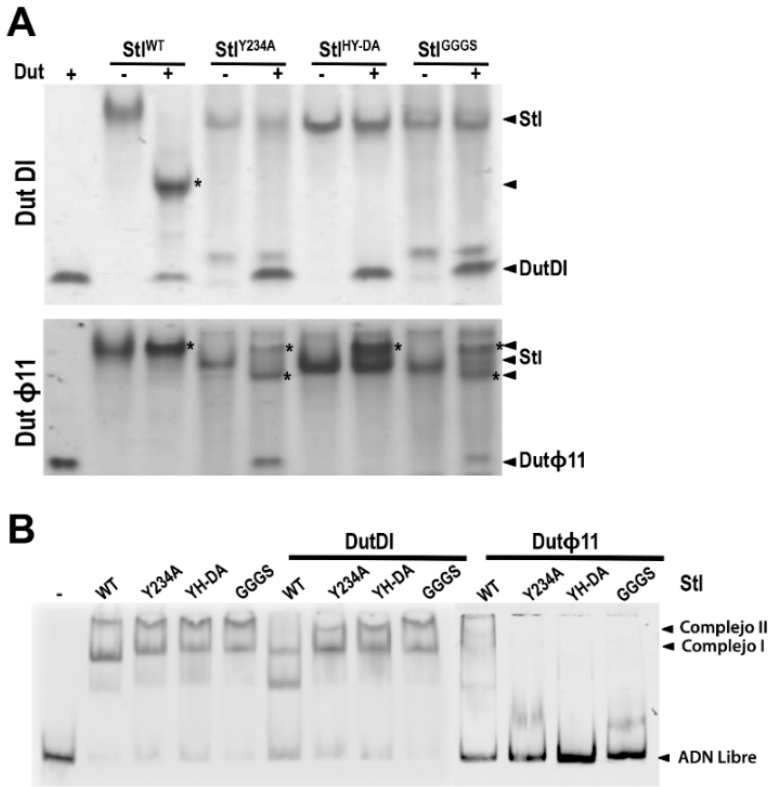


Figura 4.11. Evaluación in vitro del reconocimiento y la unión de las Duts diméricas a BovI-Stl. Las mutaciones *BovI-Stl*^{Y234A}, *BovI-Stl*^{HY-DA} y *BovI-Stl*^{GGGS} anulan la interacción de BovI-Stl con los Duts diméricos, pero no con los Duts triméricos. (A) Los ensayos de Native-Page muestran que los mutantes *BovI-Stl*^{Y234A}, *BovI-Stl*^{HY-DA} y *BovI-Stl*^{GGGS} han perdido su capacidad de formar complejos con la Dut dimérica Dut ϕ DI, pero conservan su capacidad de interactuar con la trimérica Dut ϕ 11. (B) La capacidad de unión al ADN de *BovI-Stl*, *BovI-Stl*^{Y234A}, *BovI-Stl*^{DA} y *BovI-Stl*^{GGGS} mutantes se ve interrumpida por la Dut ϕ 11 según lo verificado por los ensayos EMSA. Por el contrario, la Dut ϕ DI solo es capaz de interrumpir la capacidad de unión al ADN del *BovI-Stl*^{WT}, pero no de los mutantes, lo que permite que estas variantes de BovI-Stl sean incapaces de formar complejos con las Duts diméricas

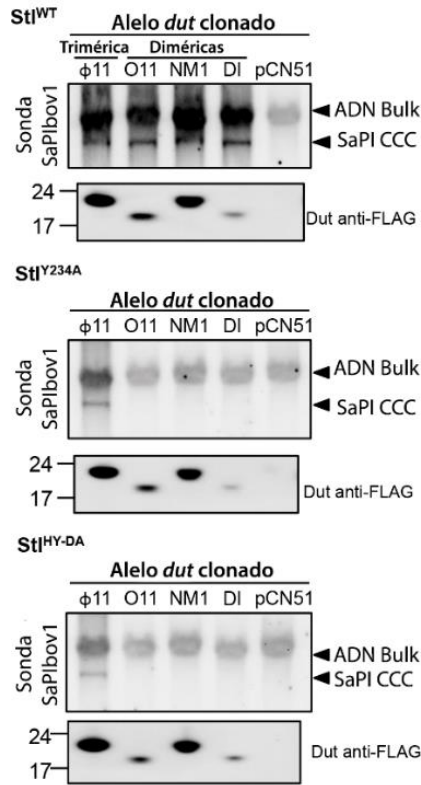


Figura 4.12. Evaluación in vivo del reconocimiento y la unión de las Duts diméricas a BovI-Stl. Escisión y replicación de BovI-Stl^{WT} y BovI-Stl^{Y234A} o BovI-Stl^{HY-DA} después de la inducción de las Duts clonados. Las cepas que contenían la forma silvestre de la isla SaPI_{BovI} y sus mutantes BovI-Stl^{Y234A} y BovI-Stl^{HY-DA} se complementaron con plásmidos que expresaban o la Dut trimérica φ11 etiquetada con 3xFLAG o alguna de las Duts diméricas DutφO11 y DutφNM1. Las muestras se aislaron 3 h después de la inducción con 1 μM de CdCl₂ y se realizaron transferencias de Southern usando una sonda de integrasa SaPI_{BovI}. La banda superior es ADN "en masa", que incluye SaPI cromosómico, fágico y replicante. CCC indica ADN de SaPI circular cerrado covalentemente. En estos experimentos no estaba presente ningún fago auxiliar, por lo que el ADN de SaPI extirpado y replicado aparece como parte del ADN en masa o como moléculas CCC, no los monómeros lineales que se ven después de la inducción y el empaquetamiento mediados por el fago auxiliar. Los paneles inferiores debajo de cada Southern son transferencias de Westernblot con un anticuerpo anti-3xFLAG a modo de control de expresión para la Dut.

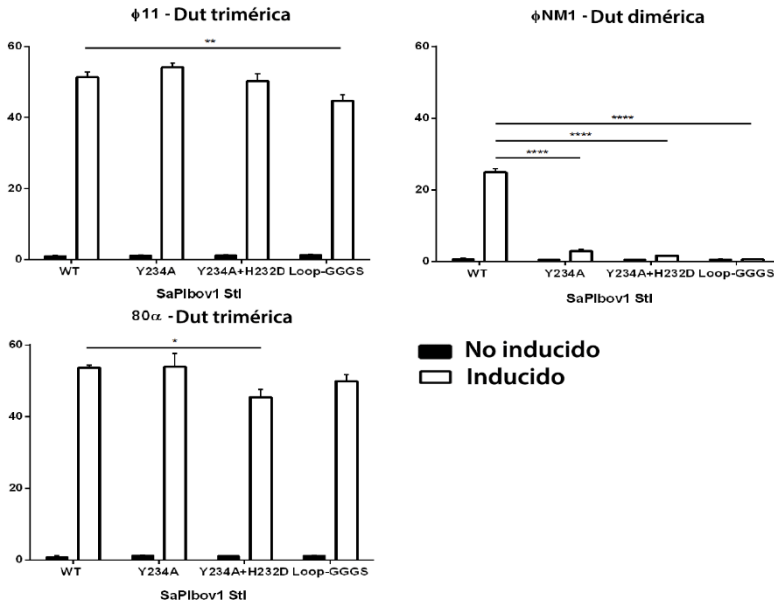


Figura 4.13. Análisis *in vivo* del reconocimiento y la unión de las Duts diméricas a *BovI-Stl*. Los ensayos de β -lactamasa se realizaron con cepas que contenían la isla de *SaPIbov1* en su forma silvestre o derivados con las mutaciones puntuales de *BovI-Stl* indicadas, además de ser cepas lisogénicas codificantes para las Duts $\phi 11$, $\phi 80\alpha$ o $\phi NM1$, según lo especificado. Se realizó un ANOVA de 2 vías con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak para comparar las diferencias de medias entre el control *BovI-Stl*^{WT} y los mutantes, dentro de las columnas. Los valores de *p* ajustados significativos fueron los siguientes: $\phi 11$ *BovI-Stl*^{GGGS} inducido = 0.0013 **; $\phi 80\alpha$ inducida por *BovI-Stl*^{HY-DA} = 0,0124 *; $\phi NM1$ inducido por *BovI-Stl*^{Y234A} = <0.0001 ****, inducido por *BovI-Stl*^{HY-DA} = <0.0001 ****, inducido por *BovI-Stl*^{GGGS} = <0.0001 ****, todos los demás valores no fueron significativos.

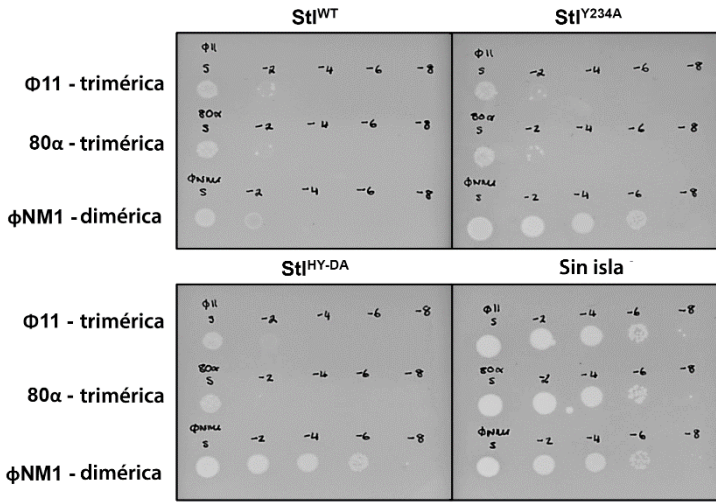


Figura 4.14. Ensayo de detección de fagos. En este ensayo se utilizaron los fagos $\Phi 11$ y 80α y $\phi NM1$ que codifican para sus respectivas Duts, triméricas o diméricas, en céspedes bacterianos de cepas RN4220. Se compara el efecto de la interferencia entre cepas con *BovI-Stl*^{WT}, con *SaPIbov1* mutantes *Stl*^{Y234A} o *Stl*^{HY-DA} o sin *SaPI*. El título del fago (UFP/ml) utilizado para cada punto se indica en la placa.

Cristalización del complejo Dut ϕ 85:BovI-Stl^{Nter}

Tras conseguir nuestra primera estructura tridimensional de un complejo BovI-Stl:Dut quisimos intentar reproducir este resultado utilizando otras Duts de fagos previamente analizadas por el grupo del Dr. Penadés en la Universidad de Glasgow y que, como se ha mostrado en capítulos anteriores, mantienen la capacidad de inducir el ciclo de SaPIbov1 a pesar de presentar diferentes afinidades por BovI-Stl (Tabla 1.4). Resultados anteriores han apoyado nuestra propuesta acerca de que el mecanismo de interacción entre las Duts es generalizado, sin embargo, hasta el día de hoy no se ha tenido una evidencia a nivel estructural. Por ello, y aprovechando la experiencia adquirida tras trabajar con las versiones truncadas de BovI-Stl (BovI-Stl^{Nter} y BovI-Stl^{Cter}), nuestros esfuerzos se focalizaron en conseguir más estructuras de complejos con otras Duts para i) reforzar la validación de las interacciones observadas en el complejo con la Dut ϕ 11, ii) validar nuestra hipótesis del mecanismo de interacción generalizado en el complejo BovI-Stl:Dut trimérica y iii) analizar a nivel molecular las diferencias observadas en las afinidades entre Dut y Stl.

Nuestra hipótesis, previa a la obtención de los resultados, postulaba que la cristalización de complejos BovI-Stl:Dut sería más factible si dicho complejo fuera más estable. Por ello, priorizamos la cristalización con Duts de fagos que presentaban mayor afinidad por BovI-Stl, como Dut ϕ 11 (Tabla 1.4). Una vez resuelto este complejo, abordamos la obtención del complejo con la Dut del fago ϕ 85 ya que presentaba constantes de afinidad muy similares y un motivo IV idéntico al de la Dut ϕ 11 (Tabla 1.4, Fig. 1.6), resultando en la

crystalización, seguida de su difracción y resolución de la estructura molecular tridimensional, del complejo BovI-Stl:Dut ϕ 85 (Fig. 4.15).

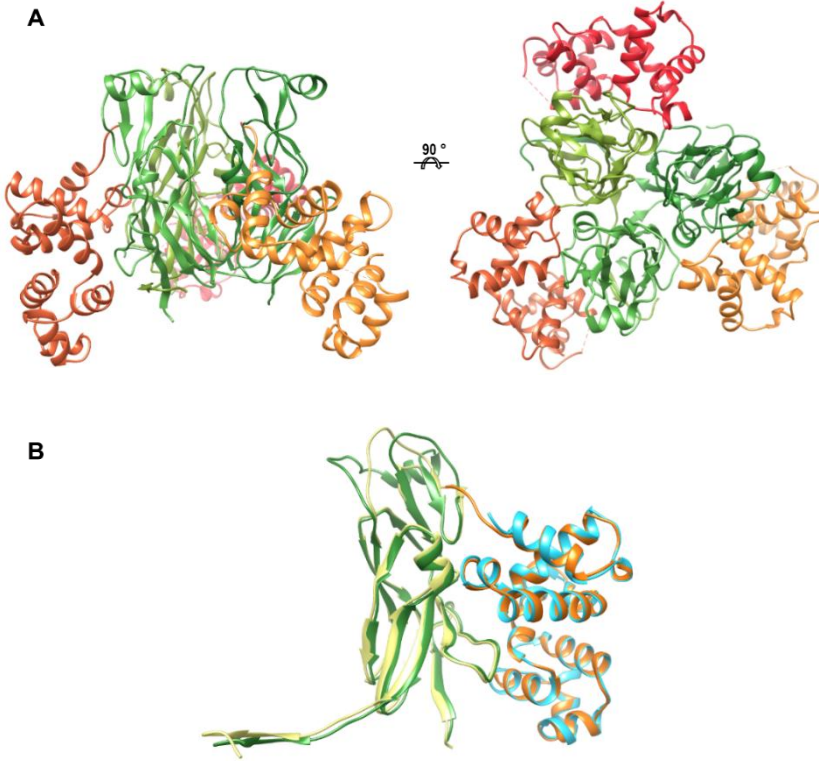


Figura 4.15. Estructura cristalina del complejo Dut ϕ 85-BovI-Stl^{N-ter}. (A) Estructura del complejo entre la Dut trimérica del fago ϕ 85 (protómeros coloreados en tonalidades de verde) y tres moléculas de BovI-Stl^{N-ter} (protómeros coloreados en rojo, amarillo y naranja). Se muestran dos vistas ortogonales. (B) Superposición de los monómeros de los complejos BovI-Stl^{N-ter}:Dut ϕ 85 (Dut verde y BovI-Stl^{N-ter} en naranja) y BovI-Stl^{N-ter}:Dut ϕ 11 (Dut en amarillo y BovI-Stl^{N-ter} en cian).

Tabla 4.3. Colección de datos cristalográficos y estadísticos de refinamiento de *DutΦ85-BovI-Stl^{N-ter}*

DutΦ85-BovI-Stl^{N-ter}	
Colección de datos	
Línea del rayo	ALBA-XALOC
Longitud de onda (Å)	1,03326
Grupo espacial	P6(3)22
Dimensiones de celda (Å)	a=b=84,15 c=191,96 $\alpha=\beta=90$ $\gamma=120$
Resolución (Å) ^a	95,98 - 2,60 (2,64 - 2,60)
Reflexiones totales	26176 (2542)
Reflexiones únicas	13088 (1271)
Complejidad (%)	100 (99,98)
Multiplicidad	2,0 (2,0)
I/ σ (I)	18,02 (2,08)
Rmerge	0,02355 (0,3123)
CC 1/2	1 (0,796)
Refinamiento	
R _{work}	0,2428
R _{free}	0,2967
Número de átomos	2400
Proteína	2321
Agua	51
Otros	28
Rmsd. Enlaces (Å)	0,07
Rmsd. Ángulos (°)	1,01
Plano Ramachandran	
Preferido (%)	96
Permitido (%)	4

^a Los número entre paréntesis indican el valor de la celda con la más alta resolución

Los cristales del complejo BovI-Stl^{N-ter}:Dut ϕ 85 se obtuvieron por equilibrio de vapor en gota sentada frente a una solución de 24% PEG1500 y 20% glicerol. Dicha condición se asemeja a la del del complejo con la Dut ϕ 11 ya que ambas cuentan con la presencia de alcoholes. Tras su difracción, la estructura fue resuelta por reemplazo molecular, utilizando las estructuras de sus componentes previamente resueltas por el grupo, a una resolución de 2.6 Å (Tabla 4.3), revelando una organización idéntica al del anterior complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11. La unidad asimétrica presenta un monómero de Dut ϕ 85 unido a un monómero de BovI-Stl^{N-ter}. Explotando la simetría cristalográfica, la Dut forma el trímero prototípico de esta familia de enzimas que une 3 monómeros independientes de de BovI-Stl^{N-ter}. Estos monómeros de BovI-Stl^{N-ter} ocupan cada centro activo del trímero de la Dut y median interacciones similares a las observadas en el complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11 para realizar esta unión. (Fig 4.15 y Tabla 4.4). De nuevo, la comparación de ambas proteínas que forman el complejo con sus formas libres solo reveló pequeños cambios, lo que confirma que las Duts triméricas presentan una conformación competente en solución para la formación del complejo BovI-Stl:Dut (Fig.4.15 y Fig. 4.16). Para la Dut ϕ 85, la estructura Apo como la unida a BovI-Stl son virtualmente idénticas (RMSD de 0.4329 Å) (Fig. 4.16). La comparación individual de cada dominio HTH de BovI-Stl^{N-ter}, el que se encuentra en la estructura libre y el unido a la Dut, mostró un RMSD de 0.726 Å para 55 residuos, en comparación al dominio intermedio con un RMSD de 0.606 Å para 60 residuos. Al igual que lo observado en la estructura libre, los primeros once residuos del BovI-Stl^{N-ter} se encontraban desordenados en el complejo, pero por el contrario la estructura del represor BovI-Stl^{N-ter} en complejo con la Dut ϕ 85

presentaba ordenada la región C-terminal en su totalidad, hasta el residuo T156. Esto indica que la formación del complejo, a pesar de no estabilizar el inicio de la proteína, puede estabilizar el final de ésta, lo que ese confirma posteriormente en el análisis de las interacciones (Tabla 4.4). De forma similar a lo que se observó en el complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11, los últimos quince residuos C-terminales de la Dut ϕ 85, que corresponden al motivo V de las Duts, también se encontraron desordenados.

La vista de este complejo recuerda extremadamente al obtenido anteriormente con la Dut ϕ 11. De hecho, la superposición de los complejos BovI-Stl^{Nter}:Dut ϕ 85 y BovI-Stl^{Nter}:Dut ϕ 11, donde las regiones de los motivos V y VI se eliminaron dejando el *core* altamente conservado de la molécula, muestra un alineamiento estructural prácticamente idéntico (Fig. 4.15B) con un valor de RMSD de 0.3191 Å para la superposición del monómero y 0.4812 Å para el trímero.

A pesar de su parecido estructural sin los motivos V y VI, sí aparecen ciertas diferencias cuando se compara la Dut ϕ 85 en su forma apo con la obtenida en el complejo con BovI-Stl^{Nter}. Primero, y algo que se hace evidente simplemente teniendo en cuenta el número de residuos visibles, es que no somos capaces de ver el motivo V en la estructura. Por otro lado, el motivo VI, ausente desde el residuo Arg98 (R98) al Ile117 (I117) en la forma libre del represor, se observa en su totalidad en el complejo, siendo capaz de organizar los residuos 108 a 114 en hélice α (α 2). A pesar de esta aparente organización en hélice cuando la proteína se encuentra en complejo, ninguno de los residuos que la componen están realizando contactos con el represor. Sin

embargo, otros residuos de este motivo sí lo hacen (Tabla 4.4), sugiriendo que esas interacciones estabilizan el motivo VI.

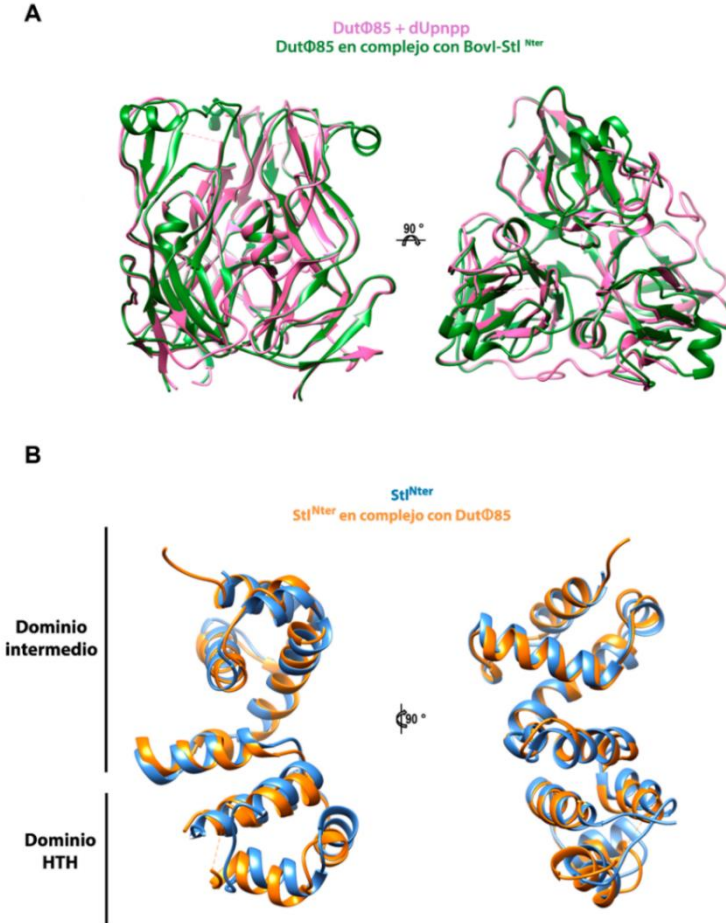


Figura 4.16. Cambios conformacionales en BovI-Stl^{N-ter} y Dut ϕ 85 inducidos por la formación de complejos. (A) Las estructuras cristalinas del trímero de Dut ϕ 85, tanto en complejo con BovI-Stl^{N-ter} como con dUpnpp; se superpusieron. Se muestran dos vistas ortogonales, con los protómeros de la forma en complejo en verde y los protómeros de la Dut con nucleótido en rosa. Se utilizó la forma con nucleótido para esta comparación ya que es la única estructura de esta Dut disponible. No se muestra el nucleótido, pero sí el motivo V ordenado. (B) Se superpusieron las estructuras de BovI-Stl^{N-ter} obtenidas en su forma libre (azul) o en complejo con Dut ϕ 85 (naranja).

Tabla 4.4. Interacciones intermoleculares del complejo Dut ϕ 85:BovI-Stl^{N-ter}

ter

Stl ^{N-ter}			Dut ϕ 85			
Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo	Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo	Distancia
$L\alpha 3\alpha 4$	56 (ASN)	OD1	$L\beta 5\beta 6$	160 (GLN)	N	2.74
		ND1			O	2.96
$\alpha 5$	70 (TYR)	OH	$L\beta 1\beta 2$	20 (ASN)	ND2	3.06
		CE1			CA	3.95
		CB			CD	3.76
					CB	3.84
					CG	3.77
	74 (ARG)	NH2		20 (ASN)	OE1	2.76
		NE			OE2	3.48
	77 (ASP)	OD2		15 (ARG)	NH1	3.12
					NH2	3.19
	$\alpha 7$	98 (TYR)		OH	20 (ASN)	ND2
102 (ASN)		OD1	NE2	3.48		
106 (TYR)		CE2	$L\beta 7\beta 8$	21 (HIS)	CE1	3.52
					ND1	3.24
		OH		24 (ASP)	OD1	2.73
		O			OD2	2.94
		CD1		85 (HIS)	N	2.84
83 (GLY)	C		3.83			
	84 (TYR)	CA	3.94			
109 (GLY)		N	$\beta 7$	79 (LYS)	OH	3.63
	OH	O			2.97	
$\alpha 8$	112 (TYR)	OH	$L\beta 7\beta 8$	81 (ASP)	N	2.99
					OD2	2.66
		CB		CZ	3.87	
				CD1	3.98	
				CE1	3.35	
		CG		CE1	3.29	
				CZ	3.76	
		CD1		CD1	3.47	
				CE1	3.50	
		CD2		CE1	3.81	
				CE1	3.79	
		CE2		CZ	3.57	
				CD1	3.77	
		CZ		CE2	3.79	
				CD2	3.98	
	CG	3.98				
	CD2	3.86				
	CG	3.84				
	CG	3.96				

$\alpha 8$	113 (TYR)	OH	$\beta 8$	89 (GLY)	N	2.86	
		O			O	3.39	
		CA			N	3.69	
	114 (SER)	OG	$\alpha 1$	66 (GLY)	CA	3.98	
		CB			70 (LYS)	CD	3.93
					NZ	3.06	
	CB	3.35					
	CD	3.35					
		64 (ARG)		NH2	2.53		
L α 8 α 9	116 (TYR)	O	$\beta 12$	144 (LYS)	NZ	3.61	
		CE1			CB	4.00	
		CZ				3.82	
		OH			N	2.64	
	CE1	L β 10 β 11 (Motivo VI)	122 (ILE)	CD	3.49		
	CB			CG1	3.98		
	CG		123 (LYS)	CG	3.87		
	CD2			CD	3.66		
					3.96		
				CG	3.76		
			CG	3.97			
$\alpha 9$	117 (ASP)	OD1	L β 10 β 11 (Motivo VI)	144(LYS)	NZ	2.71	
	120 (ASP)	NH1		131 (ARG)	OD1	3.52	
		NH2			OD2	3.13	
	124 (LYS)	CG			OD1	3.02	
	127 (GLU)	OE1			OD2	3.68	
	128 (LEU)	CD1			CZ	3.88	
	131(GLU)	CB			132 (GLY)	CA	3.66
		OE1		133 (ILE)	CG	3.70	
					N	2.98	
L α 9 α 10	133 (LYS)	CG	L β 8 α 2 (Motivo VI)	101 (ILE)	CG2	3.56	
		NZ		99 (ASP)	O	2.97	
$\alpha 10$	146 (LYS)	C	103 (PHE)		CZ	3.94	
		CB			CE2	3.96	
	147 (LEU)	CD2				3.83	
L α 10 α 11	154 (THR)	CE2	$\alpha 1$	70 (LYS)	CG	3.17	
	155 (ASP)	CB	L β 10 β 11 (Motivo VI)	126 (TYR)	CD2	3.56	

Como se puede deducir por la Tabla 4.4 y por su comparación con la tabla de contactos del complejo BovI-StI^{N^{ter}}:Dut ϕ 11 (Tabla 4.5), existen ciertas interacciones en un complejo que no se dan en el otro. Así, los residuos pertenecientes al mutante BovI-StI^{N^{ter}} (Asp 120, Lys 124, Glu127, Leu128, Glu 131, Lys133, Lys146, Leu147 y Asp155) están interaccionando con residuos del L β 10 β 11 y L β 8 α 2,

correspondiente al motivo VI de la Dut ϕ 85, lo que podría explicar por qué los residuos del extremo C-terminal de BovI-Stl^{N-ter} son visibles en la estructura del complejo, pero no en la estructura libre. Como se ha mostrado previamente en este trabajo, el motivo VI de la Dut ϕ 85 es el más extenso de todas las Duts estudiadas en este trabajo (Fig. 1.6, Fig. 1.7). Debido a esto, las numeraciones de los residuos de las Duts difieren a partir del inicio de este motivo VI. Además, este motivo no solo difiere en la longitud de su secuencia, sino en la propia composición de aminoácidos y en su conformación estructural con un valor de RMSD de 0.9103 Å en la superposición de los monómeros de las Duts en complejo (Fig.1.7, Fig. 4.17 y Fig. 4.18). Esto explica la diferencia de contactos entre estos dos complejos, ya que los residuos de la Dut ϕ 85 implicados son Asp99, Ile101, Phe103, Tyr126, Arg131, Gly132 e Ile133, todos ellos pertenecientes del motivo VI (Tabla 4.4). No obstante, el motivo VI de las Duts triméricas de *S. aureus* presentan un β -hairpin conservado que se posiciona de manera idéntica. En concreto, en este elemento existen un par de residuos conservados ubicados en la misma localización espacial cuando ambas estructuras son superpuestas (Fig. 4.18) y que en la Tabla 4.5 aparecen marcados en amarillo. La conservación secuencial y espacial de estos residuos que además se encuentran interaccionando con el represor en ambos complejos indica tanto su importancia como la del motivo VI en la interacción con el represor BovI-Stl.

Tabla 4.5. Comparación de interacciones intermoleculares del complejo Dutφ85:BovI-Stl^{N-ter} y Dutφ11:BovI-Stl^{N-ter}. Resaltadas en gris aquellas interacciones ausentes en comparación y en amarillo aquellos residuos que, aunque de numeración diferente, son equivalentes espacialmente al superponer ambas estructuras.

Stl ^{N-ter}		Dutφ11		Dutφ85	
Elemento estructural	Residuo	Elemento estructural	Residuo	Elemento estructural	Residuo
Lα3α4	55 (VAL)	β11	149 (GLU)		
	56 (ASN)			Lβ5β6	160 (GLN)
α5	70 (TYR)	Lβ1β2	20 (ASN)	Lβ1β2	20 (ASN)
	74 (ARG)		18 (GLU)		18 (GLU)
	77 (ASP)		15 (ARG)		15 (ARG)
α7	98 (TYR)	Lβ7β8	20 (ASN)	Lβ7β8	20 (ASN)
	102 (ASN)		21 (HIS)		21 (HIS)
	106 (TYR)		24 (ASP)		24 (ASP)
			85 (HIS)		85 (HIS)
α8	109 (GLY)	Lβ7β8	84 (TYR)	β7	84 (TYR)
	112 (TYR)		79 (LYS)		79 (LYS)
	113 (TYR)	β8	81 (ASP)	β8	81 (ASP)
			89 (GLY)		89 (GLY)
		114 (SER)	α1	66 (GLY)	α1
		65 (SER)			
		69 (SER)			
Lα8α9	116 (TYR)	Lβ9β10	133 (LYS)	β12	144 (LYS)
		Lβ8β9	110 (ILE)	Lβ10β11	122 (ILE)
			111 (LYS)		123 (LYS)
α9	117 (ASP)	Lβ9β10	133 (LYS)	β12	144 (LYS)
	120 (ASP)			Lβ10β11	131 (ARG)
	124 (LYS)				
	127 (GLU)				
	128 (LEU)				
131 (GLU)					
Lα9α10	133 (LYS)			Lβ8α2	101 (ILE)
α10	146 (LYS)				99 (ASP)
	147 (LEU)				103 (PHE)
α9	152 (LEU)	α1	70 (LYS)		
Lα10α11	154 (THR)			α1	70 (LYS)
	155 (ASP)			Lβ10β11	126 (TYR)

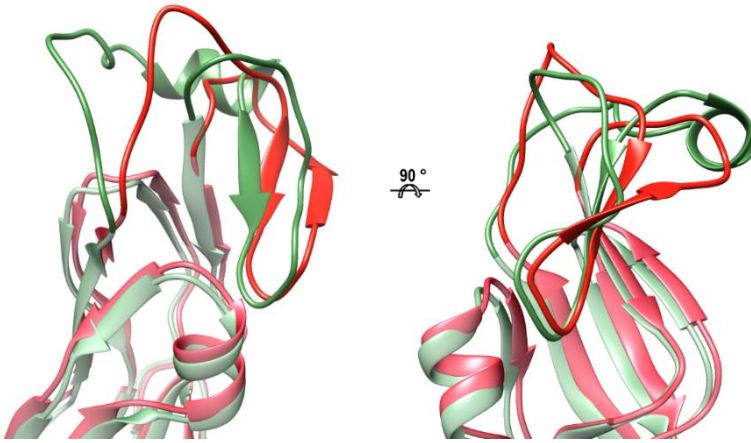


Figura 4.17. Comparación del motivo VI de *Dutφ11* y *Dutφ85* en complejo con *BovI-Stl^{N-ter}*. Se muestran las estructuras de la *Dutφ85* (verde) y *Dutφ11* (rojo) centradas en el motivo VI, resaltado del resto de la molécula con tonalidades más fuertes del mismo color.

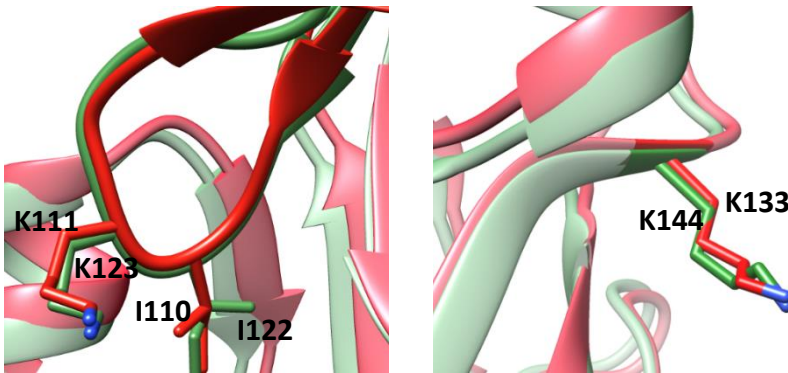


Figura 4.18. Superposición estructural de *Dutφ11* y *Dutφ85* en complejo con *BovI-Stl^{N-ter}*. Se muestran las estructuras de la *Dutφ85* (verde) y *Dutφ11* (rojo) centradas en el motivo VI. Los residuos a destacar se encuentran etiquetados, mostrando (A) los pertenecientes al motivo VI y (B) el motivo IV.

Cristalización del complejo Dut80^{E112K}:BovI-Stl^{Nter}

Tras la obtención de dos estructuras que muestran cómo está ocurriendo la formación del complejo BovI-Stl:Dut trimérica hemos podido validar que se trata de un modelo generalizado de interacción. Sin embargo, las estructuras tridimensionales obtenidas no mostraban una de las propuestas de nuestro modelo inicial, la contribución del motivo V a la formación de este complejo. Sin embargo, nuestros estudios *in vitro* e *in vivo* apoyaban que este motivo se encuentra modulando la interacción e incrementa de la afinidad por el represor. Esto es de especial relevancia para la Dut80 α , donde este motivo es crucial para que exista interacción ya que el mutante delecional para este motivo disminuye la afinidad por el represor al medirse por interferometría de biocapa de un orden de magnitud, pasando de $4,0 \times 10^{-8}$ a $5,3 \times 10^{-7}$ M y es incapaz de desreprimir *in vivo* a SaPIbov1 (Tabla 1.1, Fig. 1.3). Por el contrario, la deleción de este motivo en Dut ϕ 11 no genera un cambio tan significativo en su constante de afinidad (Tabla 1.1). Hipotetizamos que si para el complejo con la Dut80 α la interacción de este motivo con el represor es tan necesaria es posible que un cristal de dicho complejo contenga un motivo V ordenado, pese a la alta flexibilidad intrínseca observada para este motivo, y por lo tanto pudiésemos visibilizarlo y analizar su contribución en la formación del complejo. Sin embargo, el intento de cristalización de este complejo no obtuvo ningún resultado satisfactorio. Como hemos comentado, uno de los factores importantes a la hora de generar cristales de complejos proteicos depende de la afinidad de los componentes. Es posible que el hecho de tratarse de la Dut con la menor afinidad por BovI-Stl tenga un gran impacto en términos de cristalización.

Ensayos evolutivos de las Duts triméricas realizados por el laboratorio del Dr. Penadés en Glasgow reveló mutantes puntuales en la Dut80 α con una afinidad *in vivo* por el represor BovI-Stl alterada. Uno de estos mutantes que presentaba la mutación E112K (Dut80 α ^{E112K}) que se localizaba en el motivo VI mostraba una mayor capacidad de desreprimir la isla (datos no mostrado). Tras producir de forma recombinante dicho mutante se analizó *in vitro* la afinidad hacia el represor por interferometría de biocapa, donde se observó un cambio en la afinidad de un orden de magnitud frente a la proteína silvestre, mejorando de 4.0x10⁻⁸ M (Dut80 α ^{WT}) a 7.0x10⁻⁹ M (Dut80 α ^{E112K}) (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Valores cinéticos obtenidos por interferometría en bicapa (BLI) de la interacción BovI-Stl:Dut80 α ^{E112K}. (a) Proteína marcada con etiqueta de histidinas.

Proteína ^a		K _D (K _{off} /K _{on}) (M)	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)
Dut80 α	Dut80 α ^{WT}	4,0x10 ⁻⁸	2,5x10 ⁴ ± 6x10 ²	1,0x10 ⁻³ ± 3x10 ⁻⁵
	Dut80 α ^{E112K}	7,0x10 ⁻⁹	4,1x10 ⁴ ± 3x10 ²	2,9x10 ⁻³ ± 3,3x10 ⁻⁵

Dado el aumento en la afinidad, pensamos que este mutante podría ser un buen candidato para resolver la estructura tridimensional y se abordó su cristalización en complejo con BovI-Stl^{N-ter}. A la hora de realizar los ensayos de cristalización del complejo, se utilizaron dos aproximaciones diferentes. Una de ellas fue siguiendo la misma táctica que el resto de los complejos descritos anteriormente y que consistía en utilizar relaciones molares 1:1 la Dut con la construcción de BovI-Stl^{N-ter}. En la segunda, que a nivel experimental era idéntica, se utilizó un segundo constructo de BovI-Stl que hasta ahora no se ha descrito.

Previamente en el laboratorio, cuando se generó el mutante BovI-Stl^{N-ter}, que carecía del dominio C-terminal, importante para la dimerización del represor y su interacción con Duts diméricas, se realizaron dos variantes del mismo: una donde el codón del STOP insertado en la secuencia se encontraba después del aminoácido 156 y otra después del 176, abarcado la segunda construcción la totalidad de la región de baja complejidad descrita en el capítulo 4. Así, ambos constructos de BovI-Stl se utilizaron en los ensayos de cristalización con el mutante Dut80 α ^{E122K}, pero tan solo se obtuvieron cristales del complejo que incluía al constructo de BovI-Stl de mayor tamaño (1-176). No obstante, y aunque disten 20 aminoácidos de diferencia, seguiremos llamándolo BovI-Stl^{N-ter} en la memoria de la Tesis y se tratará de la misma forma que su variante más corta ya que solo se usa en esta estructura y como se describe a continuación, no existen diferencias notables ni en la estructura resultante ni en los contactos realizados en la misma.

El complejo BovI-Stl^{N-ter}:Dut80 α ^{E122K} generó cristales en condiciones de 0.1M CAPS pH 10.5 y 40% MPD, difractando a una resolución de 2.35 Å y cuya unidad asimétrica estaba compuesta por dos copias de BovI-Stl^{N-ter} y Dut80 α ^{E122K}, que formaban dos complejos Dut80 α ^{E122K}:BovI-Stl independientes. Los cristales pertenecían al grupo cristalográfico P3 y explotaban la simetría de este cristal para generar cada uno de los complejos, un trímero de Dut característico con 3 moléculas de BovI-Stl unidas, mostrando una organización cuaternaria con estequiometría 1:1 idéntica a los complejos BovI-Stl:Dut trimérica anteriores (Fig. 4.19). Cada monómero de BovI-Stl^{N-ter} ocupa un centro activo de la Dut trimérica y media las mismas interacciones en el *core* de la molécula que el resto de complejos, siendo

los residuos Y112 e Y113 de BovI-Stl^{N^{ter}} los encargados de mimetizar las interacciones que tendría con el nucleótido (Fig. 4.19 y Tabla 4.8). Al igual que en los anteriores casos, la comparación de ambas proteínas que forman el complejo con sus formas libres solo reveló pequeños cambios (Fig. 4.20). Para la Dut80 α , la estructura tanto libre como la unida a BovI-Stl son virtualmente idénticas (RMSD de 0.48 Å). La comparación individual de cada dominio HTH de BovI-Stl^{N^{ter}}, el que se encuentra en la estructura libre y el unido a la Dut, mostró un RMSD de 0.454 Å para 55 residuos, en comparación al dominio intermedio con un RMSD de 0.684 Å para 60 residuos. En cuanto a la porción extra que presentaba este constructo de BovI-Stl^{N^{ter}} (residuos 157-176) tan solo en uno de los monómeros pudo observarse, y de forma parcial, hasta la Leu166, mientras que en la otra molécula tan solo se observó densidad electrónica hasta el residuo Thr154.

De acuerdo con nuestra hipótesis, el motivo V se encontraba presente en la estructura, aportando de este modo información sobre la contribución del *P-loop* en complejo con BovI-Stl y el del papel que jugaba en la interacción con el mismo. Sin embargo, a pesar de poder observar por primera vez el motivo V en un complejo, su densidad electrónica era débil para ciertas partes de dicho *loop*, apoyando su naturaleza altamente flexible, siendo además diferente en cada una de las subunidades de la unidad asimétrica. Para la cadena A, el extremo C-terminal de la Dut80 α ^{E112K} deja de ser visible a partir del residuo E155 para volver a estar presente a partir de la Lys163 (K163) y hasta la Gly166 (G166) (Fig. 4.19A). Sin embargo, la cadena B, a excepción de la Val157 (V157), el motivo V está presente casi en su totalidad, siendo visible hasta el residuo G166 (Fig. 4.19B). Por otro lado, y al contrario también que el trímero generado con la cadena A, el motivo

VI del trímero generado con la cadena B se encuentra desordenando desde la Ile114 (I114) hasta la Ala119 (A119) (Fig 4.19B).

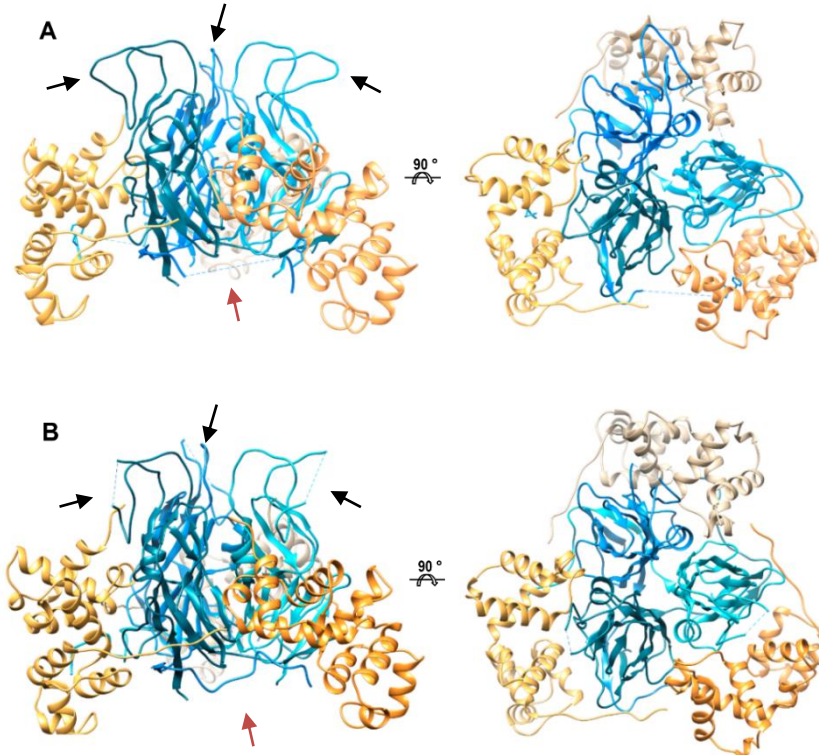


Figura 4.19. Estructura cristalina del complejo Dut80 α -BovI-Stl^{N-ter}. (A) Dos vistas ortogonales de la estructura del complejo entre la Dut trimérica del fago 80 α (protómeros coloreados en tonalidades de azul) con tres moléculas de BovI-Stl^{N-ter} (protómeros coloreados en beige, amarillo y naranja). Este trímero se ha creado mediante simetría cristalográfica utilizando la cadena A. Se señalan con flechas los motivos V (flecha roja) y VI (flechas negras). En este caso, el motivo V no se puede ver en su totalidad, pero sí el motivo VI. (B) Se muestran dos vistas ortogonales de la misma estructura, pero creada mediante simetría cristalográfica utilizando la cadena B. Se señalan con flechas los motivos V (flecha roja) y VI (flechas negras). En este caso ocurre lo contrario, sí podemos ver el motivo V, pero parte del motivo VI está desordenado.

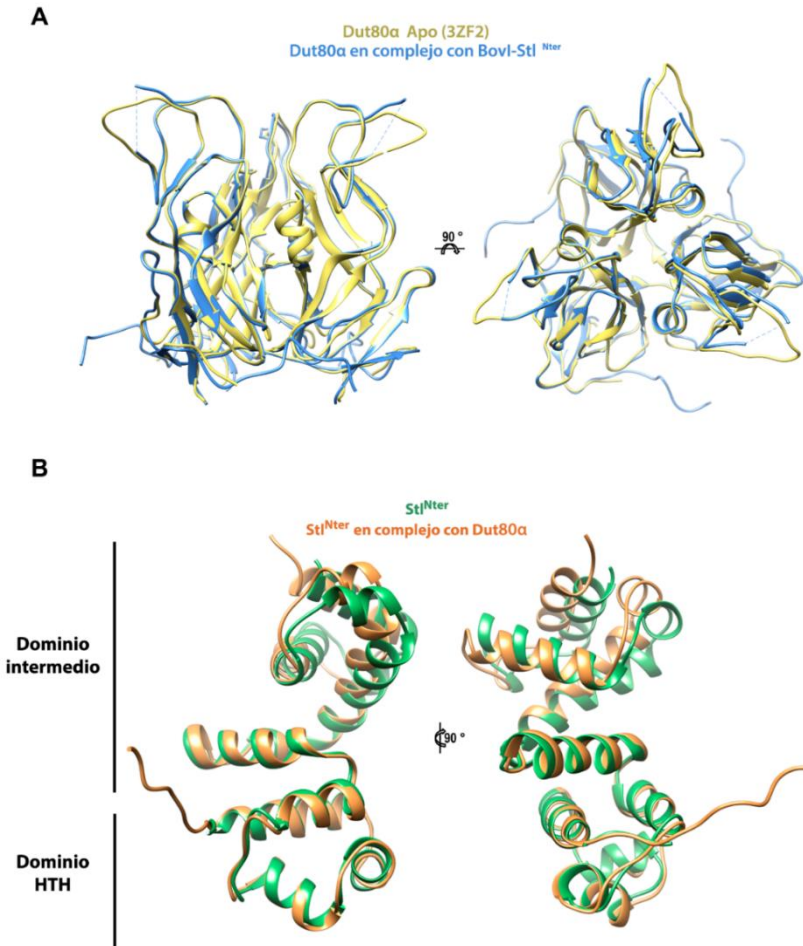


Figura 4.20. Cambios conformacionales en BovI-Stl^{N-ter} y Dut80a inducidos por la formación de complejos. (A) Las estructuras cristalinas del trímero de Dut80a, tanto en complejo con BovI-Stl^{N-ter} como con su forma libre se superpusieron. Se muestran dos vistas ortogonales con los protómeros de la forma en complejo en azul y los protómeros de la Dut en su forma libre en amarillo (3ZF2). No se muestra el nucleótido, pero sí el motivo V ordenado. (B) Se superpusieron las estructuras de BovI-Stl^{N-ter} obtenidas en su forma libre (verde) o en complejo con Dut80a (naranja).

Tabla 4.7. Colección de datos cristalográficos y estadísticos de refinamiento de Dut80 α -BovI-Stl^{N-ter}

Dut80α-BovI-Stl^{N-ter}	
Colección de datos	
Línea del rayo	DLS I-04
Longitud de onda (Å)	0,9282
Grupo espacial	P3
Dimensiones de celda (Å)	a=b=89,74 c=94,073 $\alpha=\beta=90$ $\gamma=120$
Resolución (Å) ^a	77,79 - 2,50 (2,87 - 2,80)
Reflexiones totales	220455 (15971)
Reflexiones únicas	20833 (1513)
Completitud (%)	99,8 (98,1)
Multiplicidad	10,6 (10,6)
I/ σ (I)	14,2 (2,7)
Rmerge	0,152 (0,867)
CC 1/2	0,997 (0,793)
Refinamiento	
R _{work}	0,2196
R _{free}	0,2559
Número de átomos	5043
Proteína	4935
Agua	32
Otros	76
Rmsd. Enlaces (Å)	0,01
Rmsd. Ángulos (°)	1,11
Plano Ramachandran	
Preferido (%)	97,77
Permitido (%)	2,23

^a Los número entre paréntesis indican el valor de la celda con la más alta resolución

Tabla 4.8. Interacciones intermoleculares del complejo: BovI-Stl^{N-ter}: Dut80α^{E112K}

Stl ^{N-ter}			Dut 80α				
Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo	Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo	Distancia	
Lα3α4	55 (VAL)	CG2	Lβ10	150 (GLN)	CD	3.65	
	56 (ASN)	OD1			N	3.13	
α5	70 (TYR)	OH	Lβ1β2	20 (ASN)	ND2	3.67	
		CB		18 (GLU)	CD	3.98	
		OD2		15 (ARG)	NH2	3.01	
α7	102 (ASN)	OD1	Lβ1β2	21 (HIS)	NE2	2.85	
	106 (TYR)	CE			CD2	3.66	
		CZ				3.86	
		OH	24 (ASP)	OD1	2.74		
		O		OD2	3.14		
	Lβ7β8	CA	85 (HIS)	84 (TYR)	N	2.89	
		C			CD1	3.97	
α8	109 (GLY)	N	β7	79 (LYS)	OH	3.49	
	112 (TYR)	OH				Lβ7β8	84 (TYR)
		CB	81 (ASP)	N	3.07		
		CG		OD2	3.08		
		CD1	84 (TYR)	CZ	3.88		
		CD2		CD1	3.95		
		CE1	3.32				
		CE2	3.28				
		CZ	3.85				
		CD1	3.43				
		CE1	3.43				
		CE1	3.77				
		CE1	3.61				
	CZ	3.72					
	CD1	3.76					
	CE2	3.98					
	CD	3.78					
	CE1	3.99					
	CE2	3.99					
	CZ	3.90					
CB	3.98						
113 (TYR)	CE2	β8	89 (GLY)	N	3.39		
	CZ				3.47		
	OH	α1			65 (SER)	O	3.10
						3.66	
	O	70 (LYS)			NZ	OG	3.41
						2.79	
			N	3.74			
114 (SER)	O				3.11		

L α 8 α 9	116 (TYR)	O	α 1	64 (ARG)	NH2	2.69	
		CE1	L β 8 β 9 (Motivo VI)	109 (ILE)	NH1	3.07	
		CZ			CD1	3.36	
		OH					3.87
	117 (ASP)	OD1	β 10	134 (ARG)	N	3.09	
α 9	128 (LEU)	CD2	L β 8 β 9 (Motivo VI)	120 (HIS)	NH2	3.22	
		C			C	3.74	
		OE2			CA	3.77	
	131 (GLU)	OE1			120 (HIS)	CD2	3.99
						ND1	3.21
					121 (LEU)	N	3.64
α 10	147 (LEU)	CD2					3.17
		C				CG2	3.76
		CB				CD1	3.84
		CD					3.81
		OE1				CG1	3.78
		NE2				N	3.91
	151 (ILE)	O		104 (ILE)		3.42	
					OG1	2.96	
L α 10 α 11	153 (SER)	O		103 (THR)	NE2	3.39	
	154 (THR)	C		119 (ARG)	NH2	3.44	
				115 (PHE)	CE2	3.05	
						3.73	

Con el fin de validar la estructura de este nuevo complejo, y debido a que i) este complejo presentaba nuevas variables y ii) la Dut80 α no muestra la misma afinidad por BovI-Stl que las otras Duts analizadas en este trabajo, quisimos comprobar si las mutaciones sobre BovI-Stl utilizadas para validar el complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11 tenían el mismo efecto sobre la interacción BovI-Stl:Dut80 α o, por el contrario, presentaban un mayor efecto sobre ésta (Fig. 4.21).

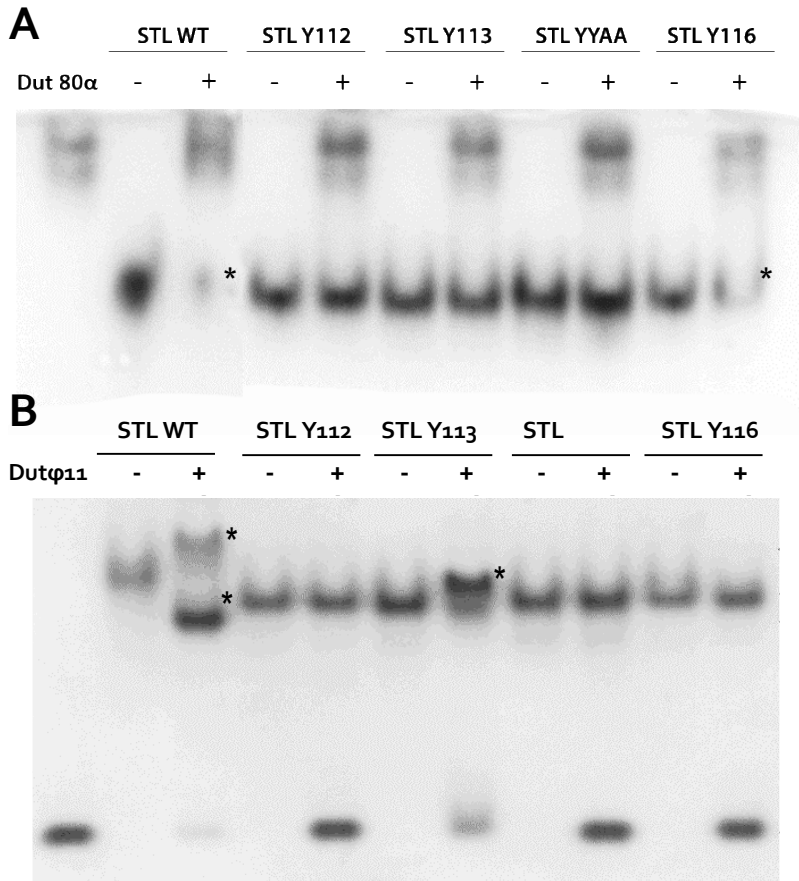


Figura 4.21. Prueba de la capacidad de unión entre la Dut80 α y los mutantes puntuales de BovI-Stl. Gel nativo donde se muestra el cambio de movilidad de las diferentes proteínas testadas cuando éstas son incubadas juntas. La primera calle corresponde a (A) Dut80 α o (B) Dut ϕ 11 sola. En las siguientes, se detalla con símbolos si esa calle tiene la proteína Stl sola (-) o en complejo con la Dut correspondiente (+). El asterisco marca el cambio en la movilidad de las bandas indicando la formación de complejo. En el caso de la Dut80 α , el asterisco marca el cambio en la densidad de la banda de BovI-Stl ya que el complejo no presenta una banda clara como en el caso de la Dut ϕ 11.

Si se comparan los resultados obtenidos en la misma prueba realizada con el complejo BovI-Stl:Dut ϕ 11 (Fig. 4.5) se pueden observar dos principales diferencias: (i) la mutación Y113A no muestra signos de interacción con la Dut80 α , sin embargo, mantiene la capacidad de interactuar con la Dut ϕ 11 y (ii) la mutación Y116A genera el efecto contrario, manteniendo algo de interacción con la Dut80 α , pero no con la Dut ϕ 11.

Que la mutación puntual Y113A genere un efecto tan grande en la Dut80 α , pero no en la Dut ϕ 11 es razonable si tenemos en cuenta que la primera presenta una menor afinidad por el represor en su estado silvestre. Por ello, leves disminuciones de la afinidad por la mutación de los residuos implicados en la formación del complejo pueden ser suficientes para romper el complejo en Dut80 pero no en Dut11. Por otro lado, el efecto de la mutación puntual Y116A sobre la Dut80 α es comprensible ya que este residuo está interactuando directamente con el motivo IV. Cuando el aminoácido con el que interactúa es una lisina (K133) (Tabla 5.2), como en el caso de la Dut ϕ 11, la afinidad por el represor aumenta, siendo el mutante Dut80 α ^{IV11} la prueba de la importancia de la secuencia del motivo IV (Tabla 1.1). Sin embargo, en el caso de la Dut80 α , el residuo encargado de interactuar con la Y116 es una arginina (R134). Si esta unión no genera una estabilidad como lo hace cuando hay una lisina, es normal que esta interacción no sea tan importante para la formación del complejo BovI-Stl:Dut80 α .

El efecto de la F165 en el complejo BovI-Stl:Dut80 α

A pesar de conocer la necesidad del motivo V en la Dut80 α , hasta la obtención del complejo con el represor Stl^{N-ter} no ha podido atribuirse ningún rol para este motivo puesto que hasta la fecha se desconocía su conformación en complejo.

Estos datos han permitido detallar las interacciones que tiene el motivo V con el represor BovI-Stl, que utiliza las hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ para su reconocimiento (Tabla 4.8 y 4.9). Tres residuos del *P-loop*, R160, E162 y F165, juegan un papel clave en la interacción con BovI-Stl^{N-ter}. Mientras que la R160 interacciona con los residuos N102 y F106 de BovI-Stl únicamente a través de la cadena principal, contactos realizados a través de la cadena lateral por E162 y sobretodo por el residuo F165 consolidan la interacción de este motivo con el represor. Este residuo aromático es crucial para la actividad enzimática de las Duts, situando su anillo aromático sobre el anillo de uracilo del ligando, un paso clave en la estabilización del motivo V sobre el centro activo una vez el nucleótido ha ocupado su lugar (García-Nafría *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando la Dut80 α está en complejo con BovI-Stl el centro activo está ocupado por este último, siendo imposible que el *P-loop* se organice de la misma manera que lo hace en presencia de nucleótido (Fig. 4.22). No obstante, esta fenilalanina vuelve a ser un elemento clave para el motivo V, ya que se introduce en un *pocket* hidrofóbico que se genera en el dominio intermedio BovI-Stl generado por las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 7$ (Fig. 4.23 y Tabla 4.9).

Este *pocket* hidrofóbico está formado por los residuos I67, P68 e I71 provenientes de la hélice $\alpha 5$, y F91, F94 e Y98 desde la hélice $\alpha 7$, realizando interacciones hidrofóbicas a través de los carbonos de sus

cadena laterales con la F165 de la Dut (Tabla 4.9). De este modo la Phe165 queda totalmente rodeada de residuos hidrofóbicos y ancla el motivo V a BovI-Stl. Adicionalmente, los residuos R160, G161 y E162 del L β 10 correspondiente al motivo V de la Dut80 α ^{E112K} se encuentran interactuando con diferentes residuos de la hélice α 7 de BovI-Stl^{N-ter} a través de interacciones entre carbonos. No obstante, mientras la R160 y la G161 utilizan el carbono de la cadena principal, E162 es capaz de hacerlo a través de su cadena lateral. Finalmente, el residuo D95 de BovI-Stl^{N-ter} realiza una interacción iónica con el nitrógeno de la cadena principal del motivo V de la Dut a través de su cadena lateral.

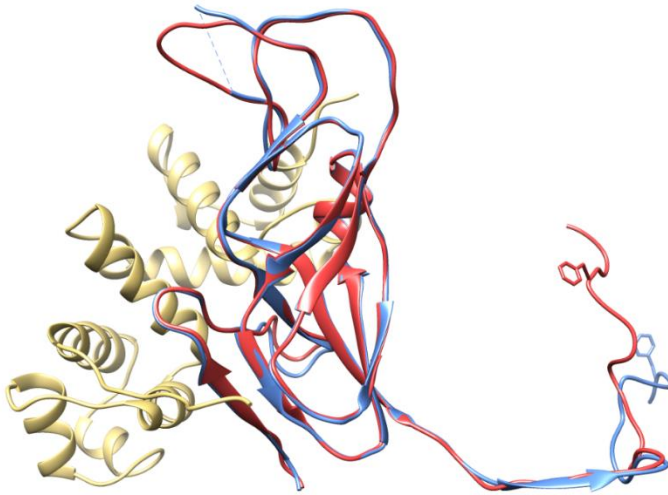


Figura 4.22. Cambios conformacionales en el motivo V de la Dut80 α . Superposición de la Dut80 α WT unida a nucleótido (rojo) con su mutante 80 α E112K (azul) en complejo con BovIStl (amarillo). Se destaca la posición del motivo V, con la Phe165 dibujada en “sticks”. Mientras la F165 en rojo interactúa con la base nitrogenada del nucleótido, la coloreada en azul lo hace con el pocket hidrofóbico de BovI-Stl.

Tabla 4.9. Interacciones intermoleculares del complejo Dut80 α^{E112K} :BovI-Stl^{N-ter} centrados en el motivo V.

Dut 80 α			Stl ^{N-ter}			Distancia	
Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo	Elemento estructural	Residuo	Tipo de átomo		
L β 10 (Motivo V)	160 (ARG)	C	α 7	106 (TYR)	CD2	3.90	
	161 (GLY)	CA		102 (ASN)	C	3.92	
		C		103 (LYS)	CA	3.52	
	162 (GLU)	CG		102 (ASN)	CG	4.00	
		CB		CB	99 (SER)	C	3.82
				CA	99 (SER)	CA	3.26
		N		99 (SER)	CB	2.80	
		CD2		99 (SER)	CA	2.98	
	165 (PHE)	CD1		95 (ASP)	OD1	3.35	
		CE1		L α 4 α 5	CG	3.57	
		CZ			68 (PRO)	CD	3.47
		CG		α 5	71 (ILE)	CD1	3.75
		166 (GLY)		N	α 7	98 (TYR)	CD2
				L α 4 α 5	67 (ILE)	CG	3.92
					66 (GLY)	O	3.41

En el complejo BovI-Stl^{N-ter}:Dut80 α^{E112K} , la contribución de las interacciones realizadas a través de la Phe165 del motivo V introduciéndose en el pocket hidrofóbico de BovI-Stl apoya nuestros resultados anteriores (Tabla 1.1). Como se puede observar en la tabla, la mutación F165A sobre la Dut80 α tiene el mismo efecto que la deleción completa del motivo V. A pesar de presentar interacciones otros residuos del motivo V, y debido a que las validaciones de las demás interacciones se enfocan en mutaciones sobre BovI-Stl y no sobre la Dut, se realizaron mutantes puntuales sobre alguno de los residuos del *pocket* hidrofóbico de BovI-Stl. La aproximación de estas mutaciones fue intentar generar un mutante que pudiera impedir a la Phe165 de la Dut introducirse dentro del *pocket* hidrofóbico, siendo seleccionadas las siguientes: I67W, F91R y D95R. Todas estas mutaciones en Stl mostraron *in vivo* la pérdida de la capacidad represora

de la isla al observar que SaPIs portando represores con estas mutaciones replicaban de forma constante e independiente de proteína inductora.

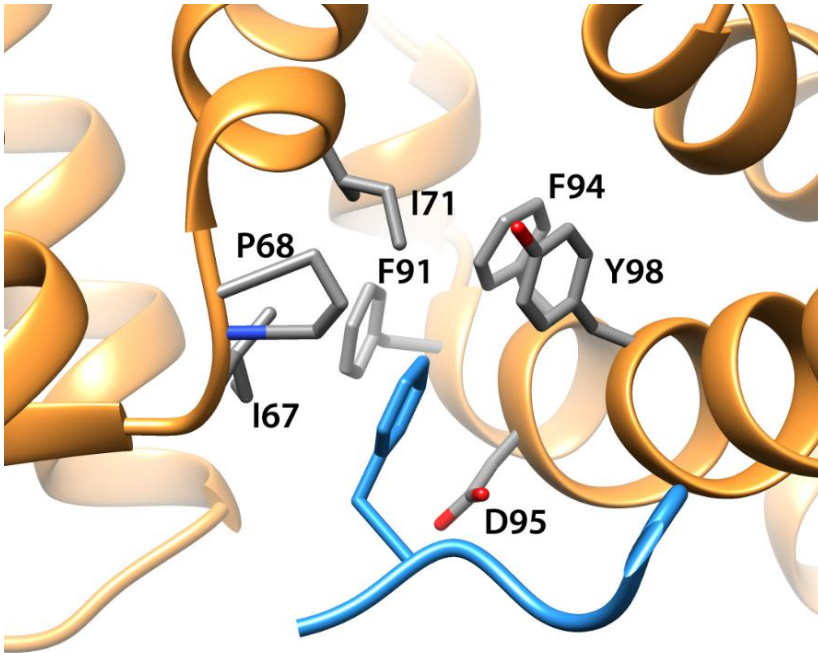


Figura 4.23. El motivo V se estabiliza mediante su unión a un pocket hidrofóbico de BovI-Stl. Imagen detallada del pocket hidrofóbico y de cómo la Phe165 de la Dut80 α (vista en stick azul) se introduce en él. Los residuos que conforman el pocket y que interactúan con la F165 están coloreados en gris y etiquetados con el tipo de residuo y su posición en la secuencia de BovI-Stl.

No es PEG todo lo que reluce

El complejo BovI-Stl^{N-ter}:Dut80 α ^{E112K} ha mostrado por primera vez el papel que el motivo V de las Duts triméricas desempeña en la unión a BovI-Stl. Aunque importante para todas ellas, el motivo V es crucial en la unión de Dut80 α y solo ésta dispone de dicha estructura visible en su estructura tridimensional. Por ello, y debido a los datos que este complejo mostró, reanalizamos los datos disponibles para los otros complejos Dut trimérica:BovI-Stl^{N-ter} descritos en la memoria de tesis, donde se encontró la presencia de densidad electrónica tanto en el modelo tridimensional del complejo con Dut ϕ 11 como con Dut ϕ 85, la cual coincide exactamente con el anillo de la fenilalanina F165 del complejo de la Dut80 α (Fig 4.24 y 4.25).

Estas densidades electrónicas habían sido asignadas inicialmente a pequeñas moléculas provenientes de las condiciones de cristalización, como el PEG, al no observarse continuidad con la cadena polipeptídica. Así pues, analizado los datos del complejo BovI-Stl^{N-ter}:Dut80 α ^{E112K}, indicaría que corresponde a la inserción del residuo de Phe en el pocket hidrofóbico. Sin embargo, esta interacción debe ser muy transiente e impide el ordenamiento del motivo V, al no ser una conformación constante para todas las moléculas que permita generar los datos de difracción necesarios para su resolución. Este hecho está en consonancia con la menor contribución que presenta este motivo para la unión de Dut ϕ 85 y Dut ϕ 11 a Stl.

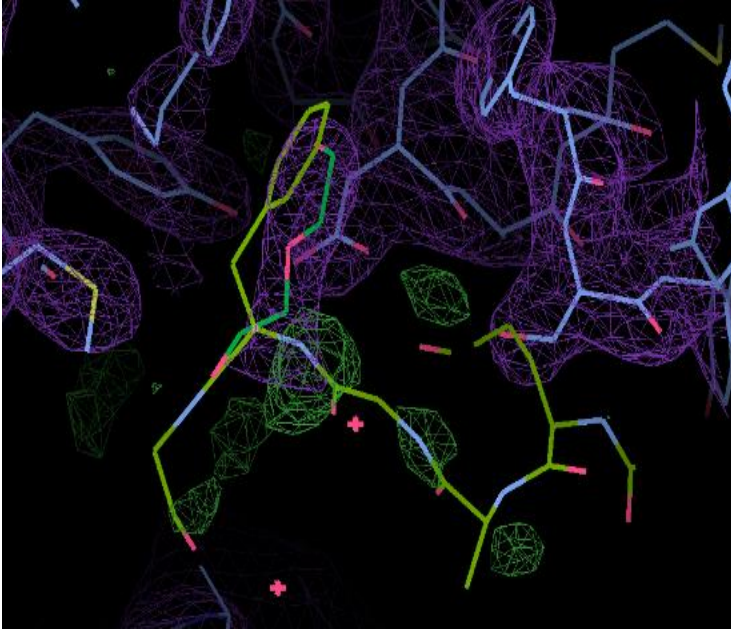


Figura 4.24. *Densidad electrónica del complejo Dut ϕ 11:BovI-StI. Superposición de los complejos Dut ϕ 11:BovI-StI^{N-ter} (azul) y Dut80 α ^{E112K}:BovI-StI^{N-ter} (amarillo). La densidad electrónica (morada) tras la superposición revela que una molécula de PEG (verde) podría estar mal posicionada, correspondiendo a la F164 de la Dut en cuestión.*

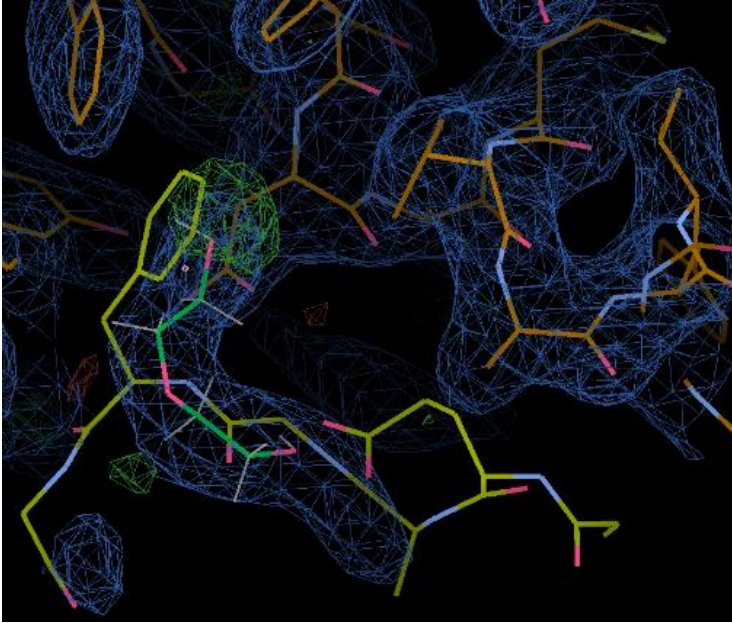


Figura 4.25. *Densidad electrónica del complejo Dutφ85:BovI-Stl. Superposición de los complejos Dutφ85:BovI-Stl^{N-ter} (naranja) y Dut80α^{E112K}:BovI-Stl^{N-ter} (amarillo). La densidad electrónica (azul) tras la superposición revela que una molécula de PEG (verde) podría estar mal posicionada, correspondiendo a la F174 de la Dut en cuestión.*

DISCUSIÓN

Revisión y propuesta de un nuevo modelo de interacción BovI-Stl:Dut

Los resultados previos del grupo acerca del estudio de estructura y función de la dUTPasa del fago $\phi 80\alpha$ y su capacidad de inducir el ciclo de la isla SaPI_{bov1} a través de la unión a su represor, BovI-Stl, llevaron a proponer a las Duts codificadas por fagos de *S. aureus* como proteínas con actividad moonlighting señalizadora y un mecanismo de acción análogo a las proteínas G (Tormo-Mas *et al.* 2013). Esta propuesta estaba basada en que (i) tanto las Duts como las proteínas G utilizan un nucleótido que actúa como segundo mensajero, modulando la unión a la proteína diana, (ii) que implican *P-loop(s)* (dos en el caso de las proteínas G y uno en Duts), elementos estructurales que cubren el centro activo de la proteína y que están involucrados en la unión de las proteínas diana, y (iii) que la hidrólisis del nucleótido alterna la forma activa/inactiva de la proteína para poder interaccionar con la proteína diana. Sin embargo, el análisis biofísico llevado a cabo por Szabo y colaboradores utilizando la Dut del fago $\phi 11$ como modelo, mostró que el dUTP dificulta la formación del complejo BovI-Stl:Dut (Szabó *et al.*, 2014). Esta observación llevó a los autores a proponer un modelo de interacción alternativo de inducción del ciclo de la SaPI por las Duts. En este modelo se asumía que los niveles intracelulares de dUTP en *S. aureus* son elevados en condiciones de crecimiento y que la Dut del fago trabajaría con su actividad enzimática, previamente a la replicación de la isla/fago, induciendo su ciclo una vez los niveles de este nucleótido fueran suficientemente bajos. De este modo el fago se replicaría en un ambiente libre de dUTP, evitando así la incorporación de este nucleótido a su genoma y las posibles mutaciones que ello implicaría. Sin embargo, y a pesar de la lógica que pueda soportar esta

propuesta, el modelo de Szabo y colaboradores implicaría que en ausencia de fagos los niveles de dUTP en *S. aureus* serían altos y, como recoge la literatura publicada, comprometerían la viabilidad celular, siendo en ocasiones letales para organismos tanto procariotas como eucariotas (Castillo-Acosta et al., 2013; Dengg et al., 2006; el-Hajj et al., 1988; Pecci et al., 2012).

El grupo del Dr. Penadés en la Universidad de Glasgow comprobó experimentalmente, al no poder medir los niveles de dUTP *in vivo*, si el mutante *knock-out* para el gen *dut* del fago (Δdut) presentaba efectos negativos sobre la transferencia de las SaPIs. Utilizando el fago $\phi 80\alpha$ que codifica las proteínas inductoras de las islas SaPIbov1 (a través de las Duts), SaPI1 (a través de Sri) y SaPIbov2 (a través del ORF15), se demostró que el mutante Δdut no se vio afectado en su capacidad para inducir y transferir las islas SaPI1 y SaPI2, pero lógicamente sí SaPIbov1 (Tormo-Más et al., 2010). Para completar este estudio, y analizar cómo la ausencia del gen *dut* influye en la transferencia de SaPIbov1, se hizo uso un mutante *knock-out* para el represor de SaPIbov1 (Δstl). Este mutante se induce de forma constitutiva en ausencia de cualquier fago inductor debido a que la isla no se encuentra reprimida por falta de la proteína represora (Úbeda et al., 2008). Este mutante se transfirió a cepas portadoras del fago $\phi 80\alpha$ y a otra cepa Δdut del fago $\phi 80\alpha$. Los profagos de ambas cepas fueron inducidos usando mitomicina C, y se analizó la transferencia del mutante Δstl de SaPIbov1.

Los resultados mostraron que, en el caso del fago con la mutación Δdut , se observa una frecuencia típica de la transferencia mediante transducción generalizada y no es específica de SaPI (Fig. 5.1), lo que indica la viabilidad del fago en ausencia de Dut y rebate la necesidad de una detoxificación del medio celular para la biología del fago.

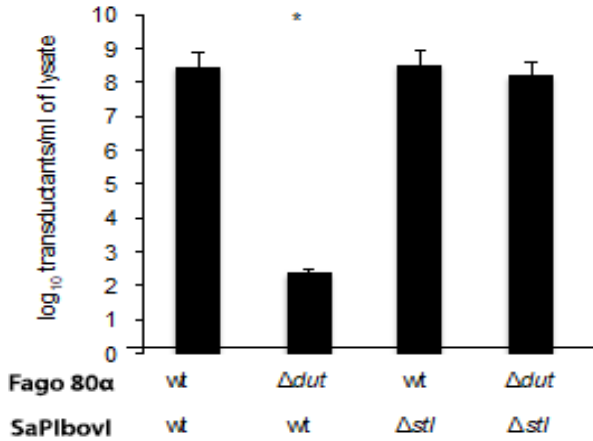


Figura 5.1. Efecto en la replicación y transferencia de SaPIbov1 del mutante Δstl . Cantidad de transductantes (\log_{10}) encontrados tras inducir un mililitro de cultivo de cepas RN4220. Se representa para cada caso en forma de barra la media de tres mediciones independientes junto a su desviación típica. Los grupos se compararon utilizando el test chi-cuadrado de Yates para calcular los P valores; las diferencias que estadísticamente significativas están indicadas mediante un asterisco ($P < 0.001$).

Por lo tanto, el modelo propuesto por Szabo y colaboradores con la implicación fisiológica de las Duts de fagos en generar un entorno de replicación de las SaPI libre de uracilo, la ausencia de datos experimentales y los resultados *in vivo* de nuestros colaboradores con fagos defectivos en Dut no apoyarían esta propuesta.

Es cierto que las condiciones de dUTP alto se han demostrado ser letales para varios organismos a menos que se carezca, bien de forma natural o artificial, del gen *ung* que codifica para una proteína clave para la reparación de base por escisión en el ADN (el-Hajj et al., 1988), pero los mismo autores demostraron que *S. aureus* carece de dUTPasa (Kerepesi *et al.*, 2016), por lo que i) o bien presenta otros mecanismos para mantener los niveles de dUTP bajos, lo que descartaría el papel detoxificador que proponen Szabo y colaboradores para la Dut de los fagos, o ii) este organismo es capaz de vivir en un ambiente uracilado, lo que llevaría a pensar que un fago, especializado en parasitar a esta especie, ha debido adaptarse a vivir en ese ambiente y no necesitaría de maquinaria extra para cambiar los niveles de dUTP. Por lo tanto, teniendo en cuenta que un fago es capaz de replicarse de manera normal en ausencia de Dut y que su presencia en el genoma no justificaría una función detoxificadora previa a la replicación de la isla y/o fago, no parece que esta propuesta sea el factor clave en la regulación de la unión entre la Dut y el represor StI.

Aunque estos autores no estuvieran de acuerdo con la propuesta inicial del mecanismo señalizador de las Duts que las comparaba con proteínas G y con la participación del dUTP como segundo mensajero, consideramos que sus resultados apoyan conceptualmente el mecanismo de señalización que el grupo propuso anteriormente (Tormo-Más *et al.*, 2013). A pesar de que Szabo y colaboradores demostraron que la conformación de la enzima cuando presenta dUTP bloquea la interacción con StI y por tanto la inducción del ciclo de la isla, en lugar de favorecerla como habíamos propuesto inicialmente (Tormo-Más *et al.*, 2013), este resultado confirma que el dUTP controla

los estados *on/off* de la señalización mediada por la Dut en el proceso de unión a Stl, confirmando su papel de segundo mensajero.

Debido al efecto inhibitor del dUTP en la unión BovI-Stl:Dut propuesto por Szabo y colaboradores utilizando la Dut ϕ 11 como modelo, quisimos revisar las propuestas anteriores de nuestro grupo utilizando otras Duts de *S. aureus* con el fin de generalizar el modelo de señalización y así incluir nuevas evidencias y que pudieran explicar todas las observaciones tanto *in vitro* como *in vivo* que presentamos en el capítulo 1 de esta tesis.

Después de confirmar que el dUTP también bloquea la interacción con BovI-Stl en nuestra dUTPasa modelo (Dut80 α), analizamos el efecto del nucleótido utilizando tanto algunos de los mutantes caracterizados previamente en los estudios originales del grupo (Tormo-Más et al., 2013) así como generando una nueva batería de mutantes diseñados específicamente para este trabajo. Además, también se analizaron algunas de estas mutaciones sobre la Dut ϕ 11 para descartar la posibilidad de que existieran dos mecanismos alternativos en la formación del complejo BovI-Stl:Dut. Los resultados tanto *in vivo* como *in vitro* sobre estos mutantes implican inequívocamente la intervención de los motivos V y VI en el reconocimiento y la unión de BovI-Stl, como se propuso anteriormente, pero con diferente contribución en función de la Dut que intervenga en la interacción con el represor BovI-Stl. Además, este nuevo análisis ha confirmado la participación del motivo IV en este reconocimiento y mecanismo de unión BovI-Stl:Dut. Espacialmente el motivo IV se encuentra en la zona donde coinciden los motivos V y VI y está involucrado en la coordinación entre el magnesio y la cadena de fosfatos (Vértessy and

Tóth, 2009). Además, los residuos del motivo IV analizados se encuentran situados en las proximidades de la región C-terminal del motivo V conservado y del pirofosfato, dos de los elementos que sufren mayores cambios conformacionales durante el proceso de catálisis (el primero cambia de conformación y el segundo se elimina al hidrolizarse el dUTP).

Esta parte del trabajo ayudó a delimitar el área de reconocimiento que BovI-Stl utiliza para unirse a las Duts y a definir la función de cada uno de los motivos de esta última: mientras que el motivo VI, altamente variable entre fagos, y el motivo IV conservado de las Duts conferirían especificidad a la enzima por BovI-Stl y actuarían como primer y principal punto de anclaje para la formación del complejo con el represor, el motivo V actuaría como una especie de interruptor molecular que añadiría estabilidad a la interacción BovI-Stl:Dut. Esta actuación como interruptor sería dependiente de la presencia del nucleótido, actuando el dUTP como segundo mensajero adoptando un estado *off* cuando está unido al centro activo, tal y como mostraron Szabo y colaboradores (Szabó et al., 2014) y se ha confirmado en este trabajo.

Apoyándonos en estos datos, y previamente a la resolución de la estructura de un complejo BovI-Stl:Dut, propusimos un modelo de interacción (Fig. 5.3) en el que BovI-Stl es capaz de reconocer la forma *apo* (con el centro activo libre) de la Dut interaccionando a través de los residuos de los motivos IV y VI del centro activo. Además, nuestros datos también apoyarían una aportación del motivo III a través de residuos como el Asp81 (Tabla 1.1).

En cuanto al motivo V de la región C-terminal de la Dut, una vez BovI-Stl se encuentre anclado, y debido a su naturaleza altamente flexible, interaccionaría con BovI-Stl estabilizando así el complejo de manera alostérica acercándolo e interaccionado con él. Por el contrario, cuando el dUTP se encuentra unido a la Dut, éste induce el ordenamiento y estabilización del motivo V sobre el centro activo, impidiendo así el acceso de BovI-Stl a su zona de anclaje e imposibilitando la unión. De esta manera, la participación sinérgica de tres motivos, dos de los cuales muestran variabilidad en su secuencia, en el proceso de la formación del complejo BovI-Stl:Dut explicaría las diferencias observadas en la afinidad por BovI-Stl entre la Dut80 α y la Dut ϕ 11.

Nuestros datos ponen de manifiesto que el motivo V es única y estrictamente necesario para la Dut80 α puesto que el mutante deletional del motivo V en la Dut ϕ 11 sigue manteniendo una buena afinidad por el represor BovI-Stl. Esto parece ser debido a que, mientras que la combinación de los motivos IV y VI en la Dut ϕ 11 genera una zona de anclaje de alta afinidad para BovI-Stl, en el caso de Dut80 α la afinidad generada por la combinación de estos motivos más baja. No obstante, a la hora de inhibir la unión de BovI-Stl el motivo V juega el mismo papel en ambas Duts ya que la conformación inducida por la unión del dUTP al centro activo de la molécula impide el acceso de BovI-Stl a su lugar de unión. Aunque el modelo de nuestro grupo era inicialmente erróneo en la función particular de las diferentes formas del nucleótido en el mecanismo, nuestros nuevos datos apoyan el modelo inicialmente propuesto para las Duts análogo a la proteína G-

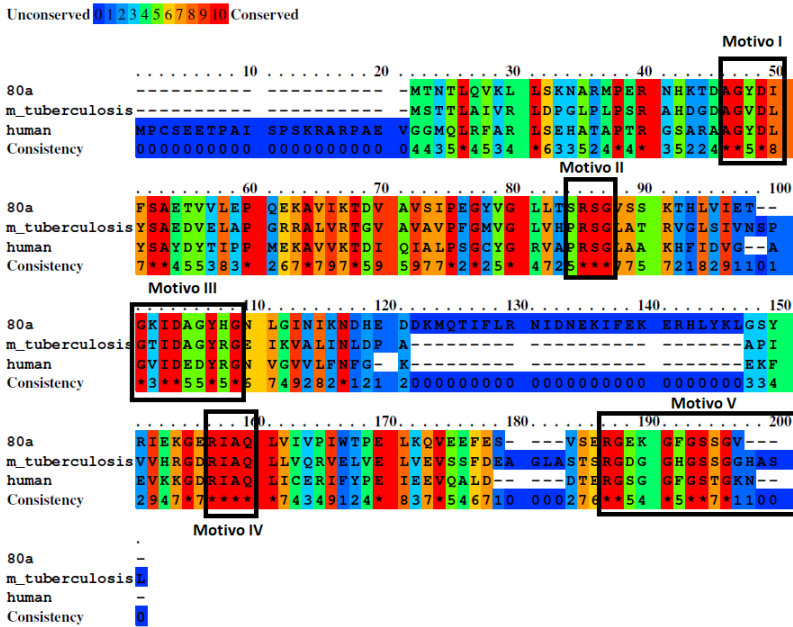


Figura 5.2. Alineamiento de secuencia de las Duts del fago 80a de *S. aureus* junto las Duts de *Mycobacterium tuberculosis* y de *Homo sapiens*. Los colores indican la conservación relativa de la secuencia en cada posición, siendo rojo muy conservado y azul muy poco conservado (adaptado del alineamiento generado con PRALINE). Los motivos I-V conservados en Duts se encuentran remarcados y anotados.

El hecho de que los dominios catalíticos participen en la unión a BovI-Stl explicaría el por qué otras Duts de diferentes especies como *M. tuberculosis*, *D. melanogaster* o incluso la humana son capaces de interactuar con BovI-Stl (Benedek *et al.*, 2017; Nyíri *et al.*, 2018). La alta conservación de los residuos que componen los motivos y que son utilizados por BovI-Stl para la unión explican esta promiscuidad (Fig. 5.2). La ausencia del motivo VI en otras Duts con capacidad de interactuar con BovI-Stl pone de manifiesto que este motivo no es estrictamente necesario. Sin embargo, nuestros resultados apoyan la idea que al menos éste estaría ejerciendo una función moduladora al ser

capaz de mejorar las constantes de afinidad en las Duts de fagos que sí lo integran en su secuencia (Tabla 1.1) en comparación a aquellas que no lo tienen (Nyíri *et al.*, 2018).

Se ha propuesto que estos EGM son satélites de fagos que generan una interferencia severa en la reproducción del fago ayudante (Ram *et al.*, 2014). En consecuencia, los fagos han evolucionado para evitar la inducción de las SaPI, generando variantes de las proteínas inductoras que presentan diferente afinidad por los represores StIs de las SaPIs (Frigols *et al.*, 2015). Siguiendo esta estrategia, los fagos que codifican Duts han debido evolucionar (Fig. 5.4) hacia variantes de estas enzimas que posean una muy baja afinidad por el represor BovI-StI pero que mantenga la función que debe realizar para el fago. Un muy buen ejemplo de esta estrategia sería la mostrada en este trabajo; la Dut80 α presenta una afinidad por BovI-StI un orden de magnitud inferior con respecto a la Dut ϕ 11 pero mantiene una similar actividad catalítica. Todos los fagos de *S. aureus* estudiados codifican Duts en su material genético, sugiriendo que esta proteína es muy importante para la biología del fago, proponiendo que, además de una actividad catalítica que se mantiene intacta, existe otra función o funciones que proponemos como señalizadoras. BovI-StI, por su parte, ha tomado ventaja de esta esencialidad. Partiendo de la hipótesis sobre una función *moonlighting* de las Duts, éstas deben interactuar con algún otro elemento del hospedador. Nuestra propuesta es que el represor BovI-StI ha emergido mimetizando la estructura de alguna de las dianas con las que la Dut del fago interactúa, representando un fascinante ejemplo de parasitismo molecular.

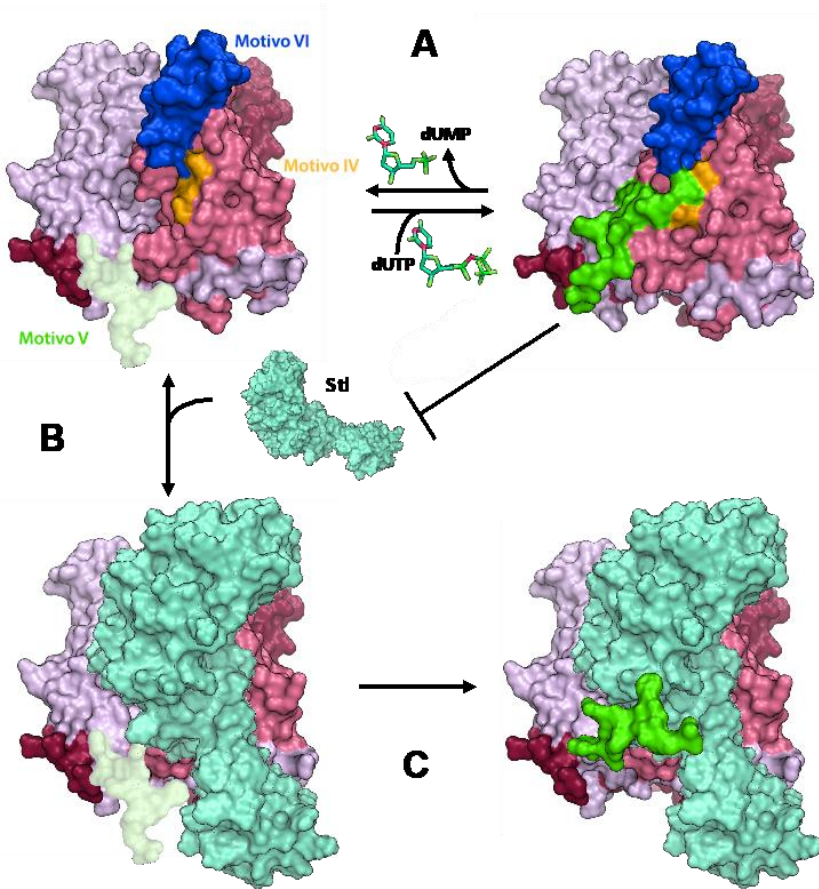


Figura 5.3. Modelo de interacción entre Duts de fagos de *S. aureus* con BovI-Stl. (A) Cuando el dUTP es hidrolizado por la Dut el motivo V (verde) se pliega y la localiza sobre el centro activo de la enzima, impidiendo el acceso de BovI-Stl a la zona de anclaje compuesta por el motivo IV (naranja) y el motivo VI (azul). (B) Sin el plegamiento del motivo V debido a la ausencia de ligando, la zona de anclaje con los motivos IV y VI se encuentra accesible y permite que BovI-Stl interacte en la zona del centro activo. (C) Cuando BovI-Stl se une a la Dut, el motivo V se plegaría e interactuaría con el represor estabilizando el complejo. Las estructuras se muestran en superficie utilizando para la Dut (diferentes tonos de azul) las estructuras obtenidas experimentalmente de Dut80 α (PDB 3ZEE) y para Stl (turquesa). Modelo generado in silico mediante I-Tasser (Yang et al., 2015) a partir de la secuencia de Stl. (Szabó et al., 2014).

Efectos epistáticos y el ordenamiento del motivo V. La importancia de la sinergia en las Duts.

Los análisis funcionales y enzimáticos han mostrado una correlación directa entre la capacidad catalítica de las Duts codificadas por los fagos y su capacidad de inducir la movilización de las SaPIs, habiéndose siempre observado que aquellas mutaciones en las Duts que disminuían o eliminaban su actividad enzimática presentaban capacidad reducida o nula para inducir la isla (Capítulo 1; Tormo-Más *et al.*, 2013; Frigols *et al.*, 2015). Dado que todas estas mutaciones afectan a residuos ubicados en el centro activo de la enzima, el motivo V conservado o el motivo VI específico de especie, regiones que localiza en una misma zona se presuponía que dichos residuos debían estar directamente involucradas en la unión al represor Stl. Por ello consideramos que la mutación D95E en la Dut del fago 80 α , localizada en una posición de difícil acceso en el canal central del dímero y alejada del centro activo, que no eliminaba la actividad del enzima, pero sí incapacitaba para inducir la isla parecía apropiada para estudiar el mecanismo molecular del reconocimiento Dut-Stl. El Asp95 está posicionado al comienzo del motivo VI y su cadena lateral está orientada hacia el canal central donde, en el trímero, los tres grupos carboxilo coordinan un ion metálico. La presencia de iones metálicos en el canal central del trímero de Dut también se ha visto en otras especies, principalmente en Duts de organismos eucariotas, aunque la posición relativa del ion dentro del canal y los residuos de coordinación podían variar (Fig. 5.5; Szabo *et al.*, 2016).

Se consideraba relevante las interacciones que ocurren en el canal central de las Duts por su analogía con lo observado en las dCTP deaminasas (DCD-DUT), las cuales comparten un núcleo estructural homotrimérico común a las dUTPasas (Johansson *et al.*, 2003; Helt *et al.*, 2008; Vértessy and Tóth, 2009) (Fig. 5.6). En ambos tipos de enzimas, las tres subunidades forman un canal central y presentan tres sitios activos equivalentes en las hendiduras entre subunidades (Fig. 5.6). La comunicación alostérica entre los sitios activos de las enzimas de la familia DCD ha sido investigada en varias especies (Helt *et al.*, 2008; Price, 1974; Björnberg *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2007), mostrando que estas enzimas presentan cooperatividad y que el canal central juega un papel principal en este proceso (Helt *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2007). Esta cooperatividad está mediada por un “loop” ubicado en la interfaz entre el sitio de unión de nucleótidos y el canal central. El *loop* alostérico puede adoptar las conformaciones activas e inactivas mutuamente excluyentes. El cambio conformacional de un *loop* facilita el mismo cambio conformacional en los otros dos *loops* del trímero por interacciones realizadas a través del canal central (Helt *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2007). Recientemente, se ha analizado si las Duts presentan un comportamiento alostérico similar, mostrando que ese tipo de comunicación no existe y que cada centro activo de estas enzimas funciona de forma independiente (Szabo *et al.*, 2016).

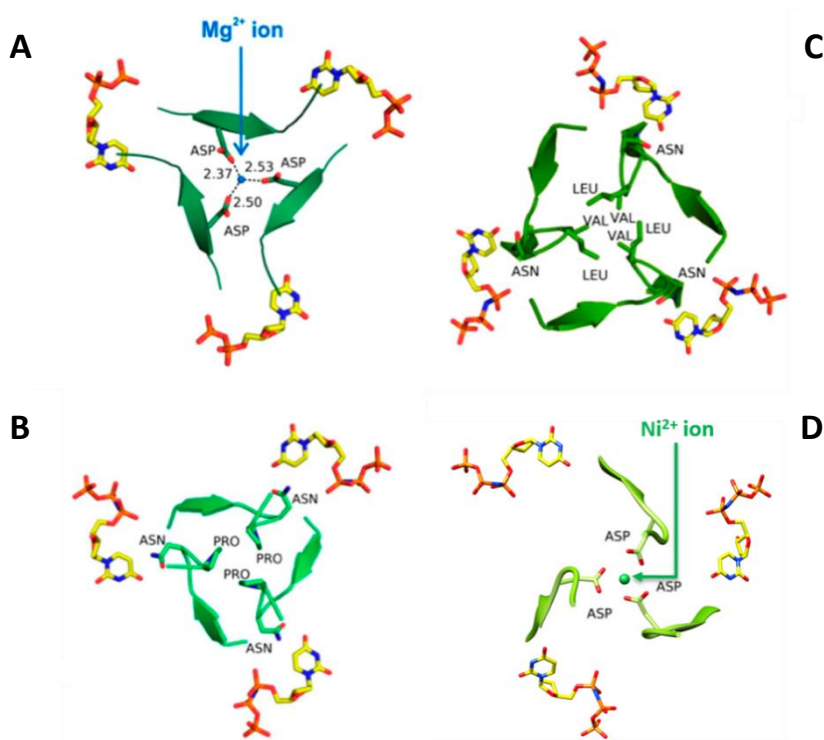


Figura 5.5. Estabilización del canal central en las Duts. Sección transversal del canal central de (A) la Dut humana (PDB 1Q5H), (B) de *E. coli* (PDB 1RN8), (C) de *M. tuberculosis* (PDB 3HZA) y (D) del fago $\phi 85$ al nivel de la unión de uracilo en el centro activo. Las cadenas laterales dentro del canal y los ligandos se muestran como sticks. Se señalan los iones metálicos Mg^{2+} y Ni^{2+} que se representan como esferas coloreadas en azul y verde, respectivamente.

Las diferencias en el comportamiento entre las DCD-DUT y las Dut se explican por la reducción en la flexibilidad del canal central inducida por la presencia en éste de iones metálicos y/o la de residuos hidrófobos (Fig. 5.5). Esta modificación no solo explica la ausencia de comunicación alostérica entre los centros activos, sino también la mayor especificidad para el dUTP que muestran las Duts en comparación con las DCD-DUT. El incremento en la especificidad se

obtiene además por el desarrollo concomitante del *P-loop* C-terminal (motivo V), característico de las Duts y ausente en las DCD-DUT, que permite la discriminación del ligando y mejora la eficiencia catalítica de las mismas (Fig. 5.6; Szabo *et al.*, 2016).

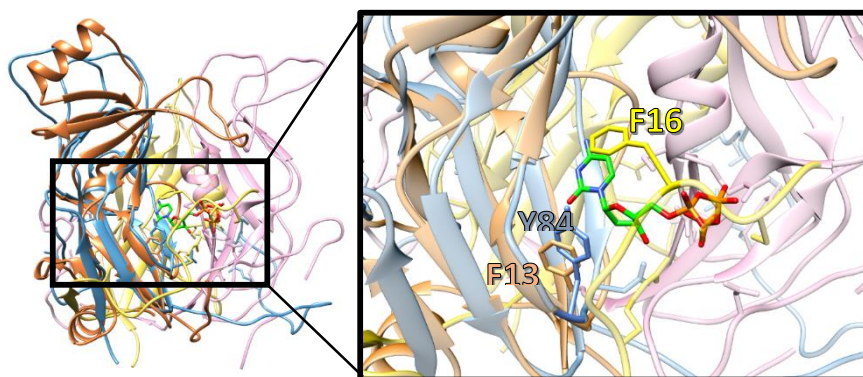


Figura 5.6. Diferencia del motivo V entre DCD-DUTs y dUTPasas. Superposición de un monómero de la DCD-DUT de *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB 1PKK, naranja) en complejo con dCTP (base nitrogenada y desoxirribosa en verde y fosfatos en naranja) y el trímero de la Dut80 α (PDB 3ZEZ, azul, amarillo y rosa).

La interrelación evolutiva entre el incremento de rigidez en el canal central y la aparición del motivo V parece conectar ambos elementos estructurales, como lo demuestra el mutante D95E. Nuestros datos estructurales con dicho mutante muestran dos instantáneas de este proceso conformacional. Mientras que el Asp95 de la Dut80 α silvestre es capaz de coordinar el ion metálico en el canal central de la Dut y ordenar correctamente el *P-loop* del motivo V, el mutante D95E presenta dificultades para llevar a cabo el mismo proceso, confirmando que es un proceso finamente controlado y que los cambios en el canal central se transfieren epistáticamente al motivo V de la región C-terminal (Fig. 2.2 y Fig. 2.5).

Además, hemos demostrado que en el caso de las Duts codificadas por fagos, dichos cambios también afectan a otros elementos estructurales como ciertas regiones del motivo VI (Fig. 2.5). En este último caso, no podemos distinguir si se trata de un efecto directo, ya que Asp95 se coloca al comienzo del motivo VI, o un efecto indirecto a través del motivo V, ya que nuestros datos estructurales anteriores mostraron que ambos elementos interactúan. Cabe destacar que estos pequeños efectos epistáticos en diferentes elementos estructurales no son suficientes para anular la actividad catalítica, pero tienen un enorme impacto en la capacidad de la Dut80 α para interactuar con el represor BovI-Stl. Este efecto se explica por la contribución sinérgica de cuatro elementos estructurales diferentes (motivos III, IV, V y VI) en el proceso de unión a Stl mostrada anteriormente en este trabajo (Tabla 1.1).

Modulación de BovI-StI. La evolución de las SaPIs.

La manera en que las SaPI han adquirido la capacidad de explotar procesos conservados de los fagos mediante la interacción con proteínas estructuralmente no relacionadas como los de-represores de la isla representa una adaptación evolutiva notable. Nuestros resultados muestran un escenario en el cual el represor BovI-StI puede interactuar con proteínas inductoras estructuralmente diferentes, aunque con la misma actividad, debido a la existencia de diferentes dominios. De esta forma, el represor StI de SaPIBovI es una proteína modular que presenta tres dominios correspondientes a i) un dominio HTH N-terminal requerido para reconocer el promotor de ADN, ii) un dominio intermedio agregado al dominio anterior para reconocer Duts triméricas y iii) un tercer dominio C-terminal para reconocer Duts diméricas.

La presencia de estos diferentes dominios permite pensar que existe una coevolución y una carrera armamentística establecida entre los fagos auxiliares, que tratan de evitar la inducción de la SaPI, y las islas parásitas, que tratan de sincronizar su ciclo con estos fagos (Frígols *et al.*, 2015). Este mecanismo también podría ser responsable, al menos en parte, de la distribución generalizada de las islas cromosómicas inducibles por fagos (PICIs, *phage inducible chromosomal islands*) en la naturaleza, teniendo en cuenta que recientemente se ha demostrado la existencia de estos elementos en organismos grampositivos (Fig. 5.9) (Martínez-Rubio *et al.*, 2017) y gramnegativos (Fillol-Salom *et al.*, 2018).

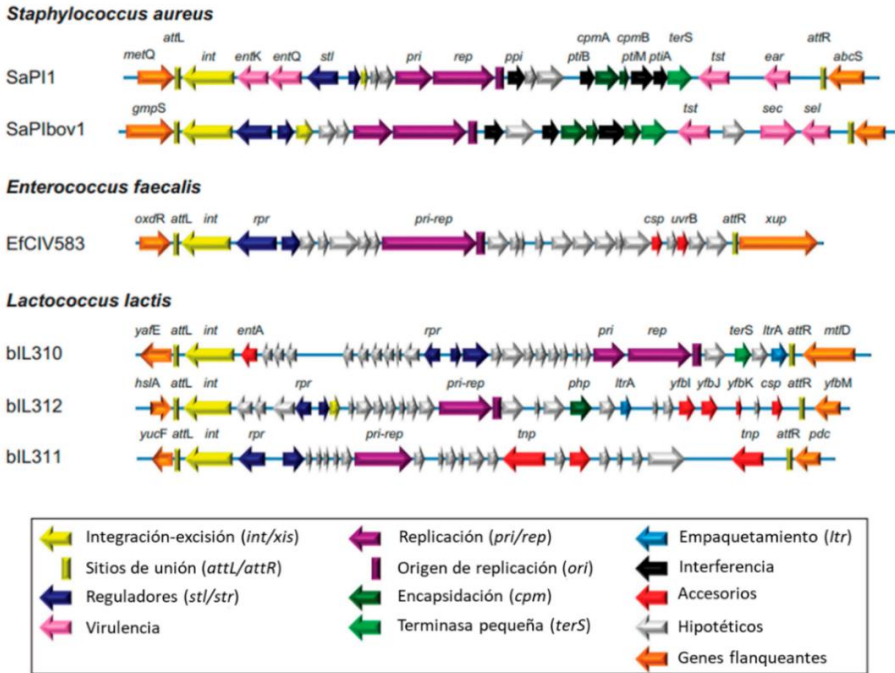


Figura 5.7. Mapas genómicos para PICI y elementos relacionados. Los PICI identificados originalmente en *E. faecalis* y *L. lactis* en comparación con los de SaPI1 y SaPIbov1 (Adaptada de Martínez-Rubio et al., 2017).

Suponemos que al comienzo de la “relación” entre un fago y una PICI, una proteína fágica única pudo haber sido originalmente seleccionada por la isla para sincronizar su ciclo utilizándola como de-represor. Para escapar de este proceso deletéreo, el fago pudo utilizar diferentes estrategias como mutar dicha proteína o sustituir el gen que codifica esta proteína por otro que codificara para una proteína no relacionada, pero con funciones similares para el fago. Estos cambios le darían una ventaja selectiva al no inducir el ciclo de la PICI. Como respuesta, y en el caso concreto de las SaPIs, la isla podría haber reclutado un nuevo represor Stl que reconociese otra proteína del fago

o haber evolucionado su represor StI para reconocer a las variantes mutacionales y/o las nuevas proteínas fágicas estructuralmente no relacionadas.

Tabla 5.1. Duts triméricas y diméricas inducen PICIs de diferentes especies estafilocócicas a través de su unión con represores homólogos a StI de SaPIbovI. Los resultados muestran 5 experimentos independientes de ensayos de β -lactamasa. Los niveles de inducción se basaron en las unidades calculadas por ml con los siguientes rangos: (-): sin inducción, < 1unidad / ml; (+): baja inducción, 1–5 unidades / ml; (++) : inducción moderada, 5–10 unidades / ml; (+++) : alta inducción, > 10 unidades/ml. Se realizó un ANOVA de 2 vías con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak para comparar las diferencias, siendo, en todos los casos estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

PICIs	Duts		
	Diméricas		Triméricas
	ϕ NM1	ϕ O11	ϕ 11
SaPIbovI	++	++	+++
ShoCI794_SEPI	++	++	+++
ShaCI51-48	+	+	+

El hecho de que los represores StI interactúen con proteínas estructuralmente no relacionadas que realizan la misma función, como Duts triméricas y diméricas, hace que esta estrategia sea única en su naturaleza y extremadamente efectiva. Hemos identificado homólogos a las islas SaPIbovI y SaPI2 en diferentes especies estafilocócicas como *S. haemolyticus* y *S. hominis* cuyos represores son capaces de interactuar con las Duts diméricas y triméricas de fagos de estas y otras especies de *Staphylococcus* (Fig. 5.10 y Tabla 5.1). El hecho de que algunas islas presenten proteínas muy similares apoya la idea de que algunos elementos ancestrales han podido ser transferidos

horizontalmente entre las diferentes especies, donde una vez instalados, podrían haber evolucionado de manera independiente con el fin de adaptarse al nuevo hospedador.

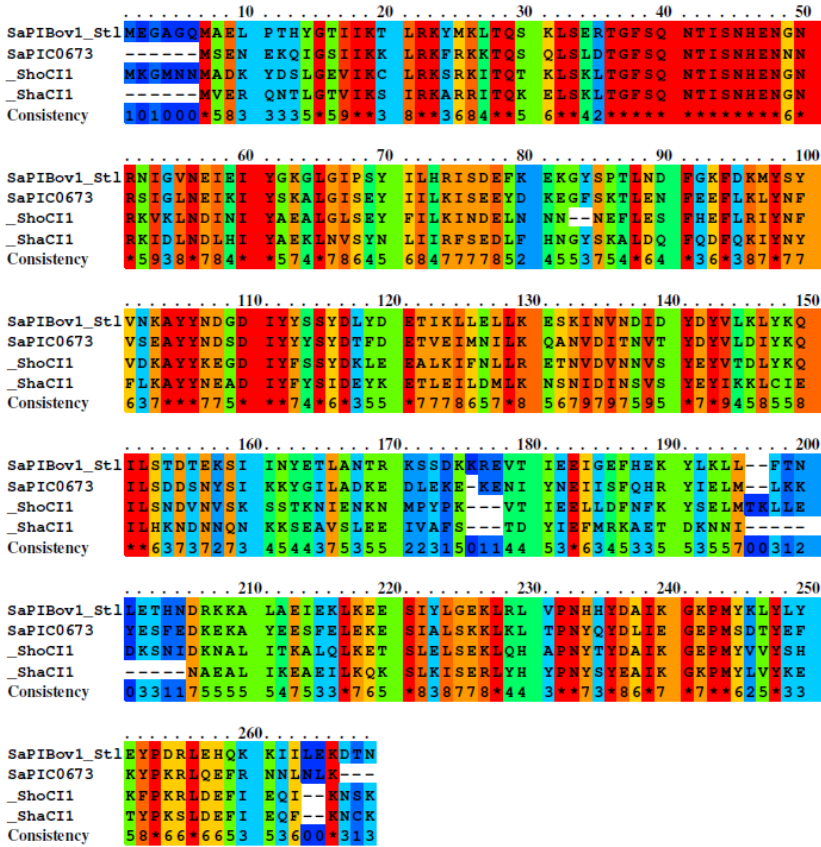


Figura 5.8. Alineamiento de secuencias homólogas a BovI-Stl codificadas por diferentes especies de *S. aureus*. Los colores indican la conservación relativa de la secuencia en cada posición, siendo rojo muy conservado y azul muy poco conservado (adaptado del alineamiento generado con PRALINE).

Nuestros resultados a través del estudio de la interacción BovI-Stl:Dut respaldan que, en lugar de cambiar el represor en respuesta a la sustitución del de-represor por el fago, SaPIBovI adapta su represor reclutando dominios capaces de reconocer estos nuevos de-represores. En términos de aumentar la capacidad de transferencia de las PICIs a través de la infección por fagos, una estrategia más simple podría haber sido el seleccionar a los represores Stl que pueden interactuar con proteínas que realizan diferentes funciones para el fago. De esta manera, independientemente del fago que infecte, se seleccionaría una proteína vital para la biología del fago. Sin embargo, dado que los fagos tienen mosaicismos y codifican múltiples versiones de proteínas no relacionadas que realizan la misma función, esta estrategia seleccionaría fagos insensibles a las SaPI que codifican la combinación correcta de proteínas no inductoras. Por el contrario, y dado que los procesos a los que apuntan las PICIs están extremadamente bien conservados en los fagos estafilocócicos, el hecho de que interactúen con diferentes versiones de proteínas involucradas en el mismo proceso biológico limita la capacidad de los fagos para superar el parasitismo de las islas, asegurando la transferibilidad de estos elementos. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que las interacciones del fago-PICI representan un microcosmos notable dentro del universo intracelular bacteriano, destacando a las PICIs como uno de los parásitos subcelulares más fascinantes y efectivos.

Reconocimiento del ADN y dimerización de BovI-Stl

La comparación de secuencias de SaPIbovI Stl con represores Stl homólogos de diferentes especies de estafilococos, también inducidos por Duts diméricas y triméricas de *S. aureus*, revela que las posiciones propuestas para el reconocimiento del ADN están completamente conservadas, apoyando que las secuencias de los represores se conserven entre las especies estafilocócicas (Fig. 5.11). Este estudio utilizó predicciones estructurales del represor Stl de SaPIbovI para identificar tres dominios diferentes dentro de la proteína. A partir de esto, el trabajo de modelado estructural realizado identificó una serie de residuos de interés, que se testaron *in vitro*, los cuales posteriormente, gracias a la obtención de la estructura de la región N-terminal e intermedia de BovI-Stl pudimos comprobar cómo podrían estar interviniendo.

La identificación de los residuos R22, Q29, S44, E47, N48, N45 y R51 de BovI-Stl como importantes para la unión al ADN se correlaciona con trabajos previos que identificaron el dominio HTH N-terminal y, más específicamente, los residuos Q40 y N41 como importantes para la unión al ADN (Nyiri *et al.*, 2015). Además, esto coincide con otros reguladores transcripcionales conocidos que presentan un dominio HTH y forman dímeros para unir dos secuencias palindrómicas (McGeehan *et al.*, 2008). La inducción de genes bajo la represión de varios reguladores de la familia 434 Cro, como SinR, implica la interrupción de las interacciones cuaternarias mediadas por los dominios carboxi-terminales y la disgregación de la forma competente para la unión de la proteína al ADN (Lewis *et al.*, 1998). Como en el caso de SinR, el cual se disocia del ADN al interaccionar

con SinI formando un heterodímero (Colledge *et al.*, 2011), la de-represión de SaPI_{bov1} también se produce por la interrupción del dímero del represor BovI-Stl. Mantener intacto el represor Stl permite que el proceso de de-represión sea transitorio; la de-represión podría revertirse si se rompe el heterodímero BovI-Stl:Dut, lo que abre la posibilidad de una regulación precisa de este proceso.

La mutagénesis dirigida de BovI-Stl, guiada por nuestras estructuras y los modelos derivados de ellas, nos ha permitido descifrar qué residuos son importantes para la unión al ADN. Una vez que se transfiere la PICI, se adapta a las Duts inductoras de los fagos de la nueva especie hospedadora, explicando así las diferencias en los residuos involucrados en la interacción. Dado que Stl reconoce el centro activo de las Duts y estas regiones se conservan tanto en la secuencia como en la estructura dentro de cada tipo de Dut, el proceso de adaptación solo habría requerido una modesta divergencia en la secuencia (Fig. 5.11). Por el contrario, no sería necesario alterar los residuos de unión al ADN una vez en un nuevo hospedador, ya que esta región solo interactúa con el ADN codificado por la SaPI, lo que explica la conservación del dominio HTH entre diferentes Stls de diferentes PICI (Fig. 5.11).

los represores canónicos de la familia 434 Cro, es monomérico en solución. Esto indica que el dominio intermedio tiene una capacidad de dimerización débil que podría atribuirse al alto carácter hidrófilo de la hélice $\alpha 5$, donde destacan los residuos R74 y H73 que parecen estar implicados en la dimerización de BovI-St1. En los represores canónicos, la hélice $\alpha 5$ es el principal elemento de dimerización, pero en BovI-St1, la presencia del dominio C-terminal adicional parece ser el actor principal en la contribución a la dimerización, compensando la capacidad débil del dominio intermedio. En este sentido parece que el represor BovI-St1 ha distribuido su superficie de dimerización en múltiples áreas de interacción débil a lo largo de su superficie de dimerización. Esta estrategia parece equilibrar su actividad como represor, lo que requiere una organización dimérica estable, con su activación promiscua que involucra la detección de múltiples proteínas inductoras no relacionadas.

Mimetismo. La elegante estrategia de BovI-Stl para interactuar con las Duts.

Una vez propuesto el modelo de interacción BovI-Stl:Dut tras analizar las áreas responsables de esta unión, y sobre todo tras el estudio de BovI-Stl como una proteína modular, pudimos obtener las estructuras tridimensionales de los complejos BovI-Stl:Dut e indagar a un nivel molecular cómo se estaba produciendo esta unión. El trabajo realizado indica que los módulos adquiridos por el represor Stl para reconocer las Duts objetivo son estructuralmente diferentes. Sin embargo, la estrategia de reconocimiento parece ser similar, siendo en ambos casos un mecanismo que imita las interacciones mediadas por el sustrato, dUTP, permitiendo un mecanismo transitorio de de-represión mencionado anteriormente. Sin embargo, entre estos dos tipos de complejos se observan ciertas diferencias: para las Duts triméricas, el dominio intermedio de BovI-Stl inserta una hélice en el centro activo, mientras que para las Duts diméricas, el dominio C-terminal de BovI-Stl utiliza un *loop* altamente flexible que adquiere una conformación estable solo cuando ocupa el sitio de unión del dUTP. Sin duda estas estrategias alternativas se deben a las amplias diferencias que presentan los centros activos de las Duts diméricas y triméricas, impuestas por sus mecanismos catalíticos alternativos (Hemsworth *et al.*, 2013; Barabas *et al.*, 2013). Además, el dominio C-terminal de BovI-Stl también agrega un segundo mecanismo de mimetismo al emular la superficie de dimerización de las Duts diméricas. Este segundo mecanismo de acción debe estar relacionado con la mayor contribución del dominio C-terminal a la dimerización del represor Stl, de manera que la rotura de ambos dímeros y la producción de un heterodímero Stl-Dut asegure la de-represión de SaPI.

Estos resultados coinciden con los anteriormente descritos que indican que un mutante truncado para los motivos HTH N-terminal y motivo intermedio de Stl de SaPI_{bov1} (residuos 176-267; BovI-Stl^{C_{ter}}) podría interactuar con las Duts diméricas, pero no con las Duts triméricas, mientras que un mutante truncado para el extremo C-terminal (residuos 1-156; BovI-Stl^{N_{ter}}) podría interactuar con los Duts triméricas y no con los Duts diméricas. La región HTH N-terminal ha sido implicada anteriormente en este trabajo en la interacción con las Duts triméricas, pero, y aunque implicada, aquí establecemos que los residuos Y112 e Y113, pertenecientes al dominio intermedio, son los vitales para esta interacción. Para las triméricas, se ha establecido un mecanismo parecido a un mimetismo estructural, donde los anillos de las tirosinas de la hélice $\alpha 8$ de BovI-Stl se sitúan en el centro activo e interaccionan con los residuos que estarían interaccionando con el ligando canónico de la Dut, el dUTP (Tabla 5.2).

Este mecanismo mimético ocurre en todas las Duts triméricas de las cuales se ha obtenido complejo con el mutante truncado de BovI-Stl (BovI-Stl^{N_{ter}}). Sin embargo, existen otros puntos de unión como se observa en sus respectivas tablas de contactos. La variabilidad del motivo IV en la Dut80 α con respecto al resto de Duts mostradas en complejo con el represor afecta directamente a su afinidad por el mismo y puede ser la explicación de por qué el motivo V es un elemento clave en la formación del complejo Dut80 α :BovI-Stl y solo tiene un efecto sumatorio en el resto de Duts. Además, también se observan nuevos contactos a través del motivo VI en el complejo Dut ϕ 85:BovI-Stl.

Tabla 5.2. Sustitución de residuos en el centro activo tras el mimetismo de StI.

	DutΦ11	DutΦ85	Dut80α	dUTP	StI ^{Nter}
Motivos	Residuo			Elemento estructural	Residuo
I	20 (ASN)			Pγ	70 (TYR)
II	64 (ARG)				Pβ
	65 (SER)			Pα	113 (TYR)
				Deoxiribosa	
				Uracilo	
	66 (GLY)			Pβ	
III	78 (GLY)			Uracil	-
	79 (LYS)			Deoxiribosa	112 (TYR)
	80 (ILE)			Uracilo	-
				Deoxiribosa	112 (TYR)
	81 (ASP)			Pα	
	84 (TYR)			Deoxiribosa	109 (GLY)
Uracilo				112 (TYR)	
89 (GLY)			Uracilo	Y113 (TYR)	
IV	136 (GLN)	147 (GLN)	137 (GLN)	Pα	-

No obstante, a pesar de presentar una nueva batería de residuos localizados en zonas donde la Dutφ11 no los presenta, la constante de afinidad por BovI-StI de ambas enzimas se encuentran dentro del mismo orden de magnitud (Tabla 1.4). Esto podría indicar que, como ya hemos comentado anteriormente con los mutantes delecionales del motivo VI, este motivo no es el principal para la unión de BovI-StI, pero si proporciona ciertos contactos que aumentan la afinidad por el represor. Si las interacciones producidas con los residuos pertenecientes a los cinco motivos catalíticos son suficientes para estabilizar el complejo, la contribución del motivo VI puede no jugar un papel vital, al menos para mediar la de-represión de la isla. Si por el contrario la afinidad inicial mediada por estos motivos es baja, el motivo VI tendrá un rol más importante en la formación de un complejo estable que es

requerido para desplazar al represor StI del ADN, como es el caso de la Dut80 α (Tabla 1.1 y Tabla 1.4).

Habiendo identificado los residuos involucrados en la formación del complejo BovI-StI:Dut y sabiendo que la mayoría están conservados en las demás Duts de fagos estafilocócicos es posible explicar la interacción de BovI-StI con Duts de otros organismos como *Mycobacterium tuberculosis* (Hirmondo *et al.*, 2015) y la dUTPasa humana (Nyíri *et al.*, 2018) al conservar los residuos que median la interacción con StI (Fig. 5.12).

Además, es posible realizar el mismo análisis a la inversa. Como se ha comentado previamente, existen diferentes PICIs con proteínas homólogas al represor StI de SaPIbovI. Algunas de ellas además han sido testadas y se ha confirmado su interacción con las Duts. Los residuos responsables de la formación de complejo BovI-StI:Dut, ya sean triméricas o dimericas, se encuentran parcialmente conservados entre las diferentes especies estafilocócicas, lo que explica las variaciones en la afinidad de los mismos frente a las Duts (Fig. 5.13)

La participación de los residuos catalíticos de las Duts en la interacción confirma la relevancia del nucleótido como regulador del complejo BovI-StI:Dut. Los nucleótidos contribuyen a la señalización celular en todas las formas de vida (Hancock, 2010). Entre otros, el AMPc y el GTP desempeñan funciones fundamentales al controlar un gran número de vías celulares en eucariotas (Hancock, 2010).

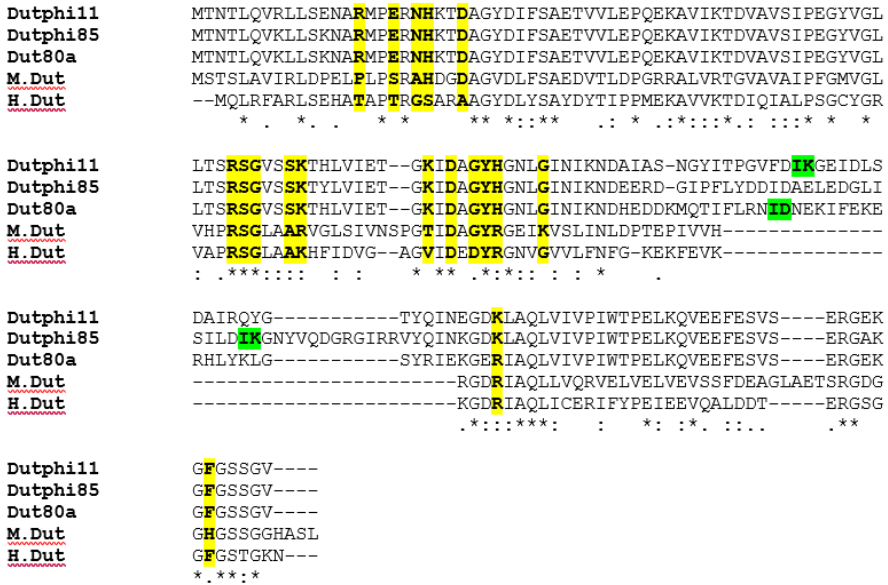


Figura 5.10. Alineación ClustalW de Duts de diferentes especies. La secuencia de los residuos involucrados en el reconocimiento de las Duts triméricas (amarillo) se conservan parcialmente entre las diferentes especies. Los residuos del β -hairpin del motivo VI propuestos en la interacción se encuentran marcados en verde.



Figura 5.11. Alineación ClustalW de SaPIbov1 Stl con represores homólogos a Stl de PICIs de diferentes especies. La secuencia Stl de *Auriococcus indicus* se incluye como género externo dentro de la familia *Staphylococcaceae* y *Streptococcus pneumoniae* que representa una especie más alejada del orden de *Lactobacillales*. Los residuos que participan en el reconocimiento de ADN (resaltado con fondo azul) están completamente conservados, mientras que los residuos involucrados en el reconocimiento de las Duts triméricas (amarillo) o diméricas (verde) se conservan parcialmente entre los represores de Stl. Los elementos estructurales secundarios se

representan sobre la secuencia de Stl de SaPIbovI y se colorean en azul, amarillo y verde para los dominios de unión a ADN de HTH, medio y C-terminal, respectivamente.

La alteración de estos finos mecanismos se asocia con múltiples enfermedades, incluido el cáncer (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Los nucleótidos de señalización procariótica, como di-AMP cíclico (di-AMPc), di-GMP cíclico (di-GMPc) y tetra- o pentafofato de guanosina ((p) ppGpp) contribuyen a la virulencia bacteriana (Corrigan and Grundling, 2013; Romling *et al.*, 2013; Kalia *et al.*, 2013). Nuestro grupo, al igual que otros, hemos propuesto que las Duts son moléculas de señalización, que involucran al dUTP como un segundo mensajero (Penadés *et al.*, 2013). Proponemos que las Duts que llevan dominios adicionales tienen proteínas diana con las que interactúan utilizando un mecanismo de activación/desactivación dependiente de dUTP, controlando así los procesos celulares clave. La reciente y emocionante evidencia que utiliza el complejo BovI-Stl:Dut apoya esta hipótesis. En este complejo, el dUTP bloquea la interacción BovI-Stl:Dut, mientras que la degradación del nucleótido hace que las Duts sean capaces de inducir el ciclo de la SaPI al liberar el centro activo. Por lo tanto, la importancia biológica de las Duts y el dUTP se ha subestimado hasta la fecha y el concepto de Duts como moléculas señalizadoras, involucrando a dUTP como un segundo mensajero, representa un cambio de paradigma que requiere una investigación profunda. Las bases moleculares establecidas en este trabajo de tesis apoyan esta propuesta y ayudarían a comprender muchos sistemas biológicos, desde los fagos hasta los eucariotas.

CONCLUSIONES

- 1- El reanálisis del modelo de interacción entre Duts triméricas de fagos de *S. aureus* y el represor StI de SaPIbovI ha confirmado el papel de los motivos catalíticos conservados III, IV y V en la formación del complejo BovI-StI:Dut trimérica. El motivo VI, pese a la variabilidad en su secuencia, adopta la estructura conservada de un β -hairpin que ha sido implicado en la formación del complejo, actuando en sinergia con el resto de motivos implicados en el reconocimiento y unión del represor.
- 2- La resolución de la estructura tridimensional de los complejos de Duts triméricas de fagos de *S. aureus* y StI de SaPIbovI muestra como mecanismo molecular de unión el mimetismo del sustrato por parte del represor, explicando la relación que existe entre la actividad enzimática de la Dut y la de-represora, y confirmando el papel de segundo mensajero para el dUTP.
- 3- Este mecanismo de interacción es generalizado a todas las Duts triméricas de fagos de *S. aureus* como los datos estructurales y funcionales confirman y explican por qué el represor StI es un inhibidor general de Duts triméricas.
- 4- El estudio del mutante Dut80 α^{D95E} confirma el papel del canal central y la importancia de los efectos epistáticos sobre el mecanismo molecular de las Duts mediante la correcta ordenación del *P-loop* C-terminal donde está incluido el motivo V de la enzima.

- 5- El represor transcripcional StI de SaPIbovI es una proteína multidominio compuesta por tres módulos con funciones específicas. Un dominio N-terminal HTH de interacción con ADN, un dominio intermedio para la interacción con Dut triméricas, y un dominio C-terminal para la interacción con Dut diméricas.

- 6- La capacidad de la proteína StI de SaPIbovI de interactuar con Duts triméricas y diméricas de fagos estafilocócicos, las cuales son diferentes en estructura y secuencia, apoya que este represor ha evolucionado para interactuar con proteínas no relacionadas estructuralmente pero que median una misma función.

- 7- A pesar de la similitud del dominio HTH N-terminal del represor StI de SaPIbovI con otros represores de la familia Cro, BovI-StI dimeriza por el módulo C-terminal, encargado también de la unión con Duts diméricas.

- 8- Gracias a su carácter modular, los represores StI podrían evolucionar modificando o reclutando otros dominios con el fin de aumentar la transferencia de la isla dirigiéndose hacia otras moléculas de diferentes procesos de los fagos sin necesidad de alterar el dominio HTH de unión a ADN conservado entre diferentes islas.

ANEXOS

Anexo I (listado de cepas)

Cepa	Descripción	Referencia
RN450	NCTC8325 libre de fagos ϕ 11, ϕ 12 y ϕ 13	Laboratorio colaborador
RN4220	Cepa derivada de RN450 defectiva para la restricción	Laboratorio colaborador
DH5 α	Cepa de transformación	Novagene
BL21	Cepa de expresión	Novagene
Rosetta 2	Cepa de expresión	Novagene
JP5359	BL21 pJP753	Tormo-Mas <i>et al.</i> , 2010
JP9351	BL21 pJP1146	Tormo-Mas <i>et al.</i> , (2013)
AM1	BL21 pJP1702	Este trabajo
AM2	BL21 pJP1838	Este trabajo
AM3	BL21 pJP1843	Este trabajo
AM4	BL21 pJP1132	Tormo-Mas <i>et al.</i> , 2013
AM5	BL21 pJP1147	Tormo-Mas <i>et al.</i> , (2013)
AM6	BL21 pJP1145	Tormo-Mas <i>et al.</i> , 2013
AM7	BL21 pJP1562	Frigols <i>et al.</i> , 2015
AM8	BL21 pAM1	Este trabajo
AM9	BL21 pAM2	Este trabajo
AM10	BL21 pJP666	Tormo-Mas <i>et al.</i> , 2010
AM11	BL21 pJP1828	Este trabajo
AM12	BL21 pJP1795	Este trabajo
AM13	BL21 pJP1829	Este trabajo
AM14	BL21 pJP1830	Este trabajo
AM15	BL21 pJP1841	Este trabajo
AM16	BL21 pJP1842	Este trabajo
AM17	pCH1001	Frigols <i>et al.</i> , 2015
AM18	-	Este trabajo
AM19	-	Este trabajo
AM22	BL21 pJP2040	Donderis <i>et al.</i> , (2017)
AM23	BL21 pJP2048	Bowring <i>et al.</i> , 2017

Cepa	Descripción	Referencia
AM24	BL21 pAM3	Este trabajo
AM25	Rosetta 2 pAM4	Este trabajo
AM26	Rosetta 2 pAM5	Este trabajo
AM27	Rosetta 2 pAM6	Este trabajo
AM28	Rosetta 2 pAM7	Invitrogen
AM29	Rosetta 2 pAM8	Este trabajo
AM30	Rosetta 2 pAM9	Este trabajo
AM31	Rosetta 2 pAM10	Este trabajo
AM32	Rosetta 2 pAM11	Este trabajo
AM33	Rosetta 2 pAM12	Este trabajo
AM34	Rosetta 2 pAM13	Este trabajo
AM35	Rosetta 2 pAM14	Este trabajo
AM36	Rosetta 2 pAM15	Este trabajo
AM37	Rosetta 2 pAM16	Este trabajo
AM38	Rosetta 2 pAM17	Este trabajo
AM39	Rosetta 2 pAM18	Este trabajo
AM40	Rosetta 2 pAM19	Este trabajo
AM41	Rosetta 2 pAM20	Este trabajo
AM42	Rosetta 2 pAM21	Este trabajo
AM43	Rosetta 2 pAM22	Este trabajo
AM44	Rosetta 2 pAM23	Este trabajo

Anexo II (listado de plásmidos)

Código	Dut	Gen	Plásmido	Descripción	Referencia
-	80 α	-	pet28a	Vector de expresión His-LIC	Novagen
pJP753		<i>dut80α^{WT}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{WT}	Tormo-Mas <i>et al.</i> , (2010)
pJP1146		<i>dut80α^{ΔV}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{ΔV}	Tormo-Mas <i>et al.</i> , (2013)
pJP1702		<i>dut80α^{ΔVI}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{ΔVI}	Este trabajo
pJP1843		<i>dut80α^{IV11}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{IV11}	Este trabajo
pJP1132		<i>dut80α^{D81A}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{D81A}	Tormo-Mas <i>et al.</i> , (2013)
pJP1145		<i>dut80α^{Y84I}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{Y84I}	Tormo-Mas <i>et al.</i> , (2013)
pJP1562		<i>dut80α^{G164S}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{G164S}	Frigols <i>et al.</i> , (2015)
pAM1		<i>dut80α^{F165A}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{F165A}	Este trabajo
pAM2		<i>dut80α^{D95E}</i>	pet28a	pET28a-dut80 α ^{D95E}	Este trabajo

Código	Dut	Gen	Plásmido	Descripción	Referencia
pJP666	φ11	<i>dutφ11</i> ^{WT}	pet28a	pET28a- <i>dutφ11</i> ^{WT}	Tormo-Mas <i>et al.</i> , (2010)
pJP1828		<i>dutφ11</i> ^{ΔV}	pet28a	pET28a- <i>dutφ11</i> ^{ΔV}	Este trabajo
pJP1795		<i>dutφ11</i> ^{ΔVI}	pet28a	pET28a- <i>dutφ11</i> ^{ΔVI}	Este trabajo
pJP1829		<i>dutφ11</i> ^{ΔV-ΔVI}	pet28a	pET28a- <i>dutφ11</i> ^{ΔV-ΔVI}	Este trabajo
pJP1830		<i>dutφ11</i> ^{ΔVI-F164A}	pet28a	pET28a- <i>dutφ11</i> ^{ΔVI-F164A}	Este trabajo
pJP1841		<i>dutφ11</i> ^{ΔVI-IV80α}	pet28a	pET28a- <i>dutφ11</i> ^{ΔVI-IV80α}	Este trabajo
pJP1842		<i>dutφ11</i> ^{IV80α}	pet28a	pET28a- <i>dutφ11</i> ^{IV80α}	Este trabajo
pCH1001	φ85	<i>dutφ85</i> ^{WT}	pet28a	pET28a- <i>dutφ85</i> ^{WT}	Frigols <i>et al.</i> , (2015)
-		<i>dutφ85</i> ^{ΔV}	pet28a	pET28a- <i>dutφ85</i> ^{ΔV}	Este trabajo
-		<i>dutφ85</i> ^{ΔVI}	pet28a	pET28a- <i>dutφ85</i> ^{ΔVI}	Este trabajo
pJP2040	φDI	<i>dutφDI</i> ^{WT}	pet28a	pET28a- <i>dutφDI</i> ^{WT}	Donderis <i>et al.</i> , (2017)
pJP2048	φO11	<i>dutφO11</i> ^{WT}	pet28a	pET28a- <i>dutφO11</i> ^{WT}	Bowring <i>et al.</i> , (2017)

Código	Gen	Plásmido	Descripción	Referencia
-	-	pETNKI 1.10	Vector de expresión His-SUMO3-LIC	NKI Protein Facility
pAM3	stl ^{WT}	pETNKI 1.10	pETNKI 1.10-stl ^{WT}	Este trabajo
pAM4	stl ^{N-ter}	pETNKI 1.10	pETNKI 1.10-stl ^{N-ter}	Este trabajo
pAM5	stl ^{N-ter H73C}	pETNKI 1.10	pETNKI 1.10-stl ^{N-ter H73C}	Este trabajo
-	-	pETNKI 1.1	Vector de expresión His-LIC	NKI Protein Facility
pAM6	stl ^{C-ter}	pETNKI 1.1	pETNKI 1.1-stl ^{C-ter}	Este trabajo
-	-	pLICSGC1	Vector de expresión His-LIC	Invitrogen
pAM7	stl ^{R22A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{R22A}	Este trabajo
pAM8	stl ^{Q29A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{Q29A}	Este trabajo
pAM9	stl ^{S44A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{S44A}	Este trabajo
pAM10	stl ^{N45A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{N45A}	Este trabajo
pAM11	stl ^{E47A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{E47A}	Este trabajo
pAM12	stl ^{N48A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{N48A}	Este trabajo
pAM13	stl ^{R51A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{R51A}	Este trabajo

Código	Gen	Plásmido	Descripción	Referencia
pAM14	stl ^{H73C}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{H73C}	Este trabajo
pAM15	stl ^{R74A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{R74A}	Este trabajo
pAM16	stl ^{Y112A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{Y112A}	Este trabajo
pAM17	stl ^{Y113A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{Y113A}	Este trabajo
pAM18	stl ^{YYAA}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{Y112A-Y113A}	Este trabajo
pAM19	stl ^{Y116A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{Y116A}	Este trabajo
pAM20	stl ^{Y234A}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{Y234A}	Este trabajo
pAM21	stl ^{YH-AD}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{YH-AD}	Este trabajo
pAM22	stl ^{GGGS}	pLICSGC1	pLICSGC1-stl ^{GGGS}	Este trabajo
pAM23	stl ^{H188C}	pETNKI 1.1	pETNKI 1.1-stl ^{H188C}	Este trabajo

Anexo III (listado de oligonucleótidos)

Plásmido	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
pAM1	80a_F165A_Fw 80a_F165A_Rv	AGAAAAAGGCGCAGGAAGTAGCGGAG CCACGTTCTGAAACACTTTC
pAM2	80a_D95E_Fw 80a_D95E_Rv	TATCAAGAATGAGCATGAAGATG TTAATCCCTAAATTGCCATG
pAM3	StI-M1SUMO-Fw StI-N267SUMO-Rv	CCAGCAGCAGACGGGAGGTATGGAAGGAGCTGGTCAAATGGCAG GGCGGCGGAGCCCCGTTAATTAGTGTCTTTTTCAAGTATGATTTTTTTTTTG
pAM4	StI_Nter_STOP_Fw StI_Nter_STOP_Rv	CACTGATACATAA AAATCAATAATAAATTACG GAAAGGATTTGTTTGTACAAC
pAM5	StI_NterH73C_Fw StI_NterH73C_Rv	TATATTCTATGCAGAATATCAGATGAGTTTAAAGAAAAAG CTGGGTATACCTAACCTTTAC
pAM6	FwStI1-8_K175-N267 RvStI1pETNKI1-8	CAGGGACCCGGTAAAAAAGAGAAGTAACAATAGAAG CGAGGAGAAGCCCGTTAATTAGTGTCTTTTTCAAGTATG
pAM7 a pAM 19	StI_OFA_Fw StI_OFA_Rv	TACTTCCAATCCATGATGGAAGGAGCTGGTCAAATG TATCCACCTTTACTGTCAATTAATTAGTGTCTTTTTCAAGTATG
pAM20 a pAM22	SaPIbov1-orf20-102m SaPIbov1-orf20-103c	TACTTCCAATCCATGATGGAAGGAGCTGGTCAAATGGC TATCCACCTTTACTGTCAATTAATTAGTGTCTTTTTCAAGTATG
Estos plásmidos fueron utilizados utilizando los mismos oligonucleótidos pero diferentes moldes de ADN		
pAM23	StI_H188C_Fw StI_H188C_Rv	TGGTGAATTTTGCGAAAAATATTTAAACTATTATTC ATTTCTTCTATTGTTACTTCTC
N/A	StI_ADN_BR1 StI_ADN_BR2	(5'-AAACATATTCTCACCTCCTCG-3') (5'-TAAATCCTGTCTTTCACTCAA-3')

BIBLIOGRAFÍA

Alibayov, B., Baba-Moussa, L., Sina, H., Zdeňková, K. & Demnerová, K. (2014) *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5005–5018.

Argemi, X., Martin, V., Loux, V., Dahyot, S., Lebeurre, J., Guffroy, A., Martin, M., Velay, A., Keller, D., Riegel, P., Hansmann, Y., Paul, N. & Prévost, G. (2017) Whole-genome sequencing of seven strains of *Staphylococcus lugdunensis* allows identification of mobile genetic elements. *Genome Biol. Evol.* 9, 1183–1189.

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C. & Rodicio, M. R. (2010) Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* 2, 1751–1773.

Ariza, M.-E., Glaser, R., Kaumaya, P. T. P., Jones, C., & Williams, M. V. (2009). The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(2), 851–859.

Ariza, M.-E., & Williams, M. V. (2011). A human endogenous retrovirus K dUTPase triggers a TH1, TH17 cytokine response: does it have a role in psoriasis? *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(12), 2419–2427.

Ashelford, K. E., Day, M. J. & Fry, J. C. (2003) Elevated abundance of bacteriophage bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 285–289.

Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(6), 1126–1145.

Baldo, A. M. & McClure, M. A. (1999) Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts. *J. Virol.* 73, 7710–21.

-
- Ball, C. A. & Johnson, R. C. (1991). Efficient excision of phage lambda from the *Escherichia coli* chromosome requires the Fis protein. *J. Bacteriol.* **173**, 4027–31.
- Ball, N. J., McGeehan, J. E., Streeter, S. D., Thresh, S. J., and Kneale, G. G. (2012) The structural basis of differential DNA sequence recognition by restriction-modification controller proteins. *Nucleic Acids Res* *40*, 10532-10542.
- Barabás, O., Németh, V., Bodor, A., Perczel, A., Rosta, E., Kele, Z., et al. (2013) Catalytic mechanism of alpha-phosphate attack in dUTPase is revealed by X-ray crystallographic snapshots of distinct intermediates, 31P-NMR spectroscopy and reaction path modelling. *Nucleic Acids Research*, *41*(22), 10542–10555.
- Barr, J. J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K. L., Erb, M. L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A. S., Doran, K. S., Salamon, P., Youle, M. & Rohwer, F. (2013) Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 10771–10776.ç
- Békési, A., Zagyva, I., Hunyadi-Gulyás, E., Pongrácz, V., Kovári, J., Nagy, A. O., et al. (2004). Developmental regulation of dUTPase in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(21), 22362–22370.
- Benedek, A., Pölöskei, I., Ozohanics, O., Vékey, K., Vértessy, B.G. (2017) The StI repressor from *Staphylococcus aureus* is an efficient inhibitor of the eukaryotic fruitfly dUTPase. *FEBS OpenBio*. Feb; *8*(2): 158–167.
- Bergonier, D., de Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G. & Berthelot, X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* *34*, 689–716.

Berngruber, T. W., Weissing, F. J. & Gandon, S. (2010) Inhibition of Superinfection and the Evolution of Viral Latency. *J. Virol.* 84, 10200–10208.

Bernier-Villamor, V., Camacho, A., Hidalgo-Zarco, F., Pérez, J., Ruiz-Pérez, L. M., & González-Pacanowska, D. (2002) Characterization of deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Letters*, 526(1-3), 147–150.

Bertani, L. E., Haggmark, A., & Reichard, P. (1961). Synthesis of pyrimidine deoxyribonucleoside diphosphates with enzymes from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, PC67–PC68.

Betley, M. & Mekalanos, J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. (1985) *Science* (80-). 229, 185–187.

Bianchi, V., Pontis, E. & Reichard, P. (1987) Regulation of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism by substrate cycles in dCMP deaminase-deficient V79 hamster cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4218–24.

Bishara, J., Goldberg, E., Leibovici, L., Samra, Z., Shaked, H., Mansur, N. & Paul, M. (2012) Healthcare-associated vs. hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Int. J. Infect. Dis.* 16, e457–e463.

Briani, F., Dehò, G., Forti, F. & Ghisotti, D. (2001) The Plasmid Status of Satellite Bacteriophage P4. *Plasmid* 45, 1–17.

Brussow, H., Canchaya, C. & Hardt, W.D. (2004) Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 560–602.

Camacho, A., Hidalgo-Zarco, F., Bernier-Villamor, V., Ruiz-Pérez, L. M., & González-Pacanowska, D. (2000) Properties of *Leishmania major* dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolysing enzyme in kinetoplastids. *The Biochemical Journal*, 346 (Pt 1), 163–168.

Caradonna, S. J., & Cheng, Y. C. (1981) Induction of uracil-DNA glycosylase and dUTP nucleotidohydrolase activity in herpes simplex virus-infected human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(19), 9834–9837.

Caradonna, S. J., & Adamkiewicz, D. M. (1984) Purification and properties of the deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase enzyme derived from HeLa S3 cells. Comparison to a distinct dUTP nucleotidohydrolase induced in herpes simplex virus-infected HeLa S3 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(9), 5459–5464.

Casino, P., Miguel-Romero, L., Huesa, J., Garcia, P., Garcia-del Portillo, F., and Marina, A. (2018) Conformational dynamism for DNA interaction in the *Salmonella* RcsB response regulator. *Nucleic Acids Res* 46: 456–472

Castillo-Acosta, V.M., Aguilar-Pereyra, F., García-Caballero, D., Vidal, A.E., Ruiz-Pérez, L.M. and González-Pacanowska, D. (2013) Pyrimidine requirements in deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase deficient *Trypanosoma brucei* mutants. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 187, 9–13.

Cedergren-Zeppezauer, E. S., Larsson, G., Nyman, P. O., Dauter, Z. & Wilson, K. S. (1992) Crystal structure of a dUTPase. *Nature* 355, 740–3.

Chambers, H. F. & Deleo, F. R. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 629–41.

Chan, S., Segelke, B., Lekin, T., Krupka, H., Cho, U. S., Kim, M.-Y., et al. (2004) Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis dUTPase: insights into the catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 341(2), 503–517.

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. *Appl Environ Microbiol* 70, 6076–6085.

Chen J. and Novick R. P. (2009) Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* 323:139–141.

Chen, H. J., Chang, Y. C., Tsai, J. C., Hung, W. C., Lin, Y. T., You, S. J., Tseng, S. P. & Teng, L. J. (2013) New structure of phage-related islands carrying fusB and a virulence gene in fusidic acid-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5737–5739.

Chen, J., Carpena, N., Quiles-Puchalt, N., Ram, G., Novick, R. P. & Penadés, J. R. (2014) Intra and inter-generic transfer of pathogenicity island-encoded virulence genes by cos phages. *ISME J.* 9, 1260–1263.

Chen J., Carpena N., Quiles-Puchalt N., Ram G., Novick R. P., Penadés J. R. (2015) Intra- and inter-generic transfer of pathogenicity island-encoded virulence genes by cos phages. *The ISME Journal* 9:1260–1263.

Christie, G. E., Matthews, A. M., King, D. G., Lane, K. D., Olivarez, N. P., Tallent, S. M., Gill, S. R. & Novick, R. P. (2010) The complete genomes of *Staphylococcus aureus* bacteriophages 80 and 80 α —Implications for the specificity of SaPI mobilization. *Virology* 407, 381–390.

Chu, R., Lin, Y., Rao, M. S., & Reddy, J. K. (1996). Cloning and identification of rat deoxyuridine triphosphatase as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27670–27676.

Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V & Heaphy, S. (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* 1, 31–45.

Colledge, V.L., Fogg, M.J., Levdikov, V.M., Leech, A., Dodson, E.J. and Wilkinson, A.J. (2011) Structure and Organisation of SinR, the Master Regulator of Biofilm Formation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol.* 411(3-26): 597–613.

Coleman, D. C., Sullivan, D. J., Russell, R. J., Arbuthnott, J. P., Carey, B. F. & Pomeroy, H. M. (1989) *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1679–97.

Copley, S. D. (2012) Moonlighting is mainstream: paradigm adjustment required. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 34(7), 578–588.

Corrigan, R. M. & Grundling, A. (2013) Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat Rev Microbiol* 11, 513–524.

Coulthurst, S. J. (2013) The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* 164, 640–654.

Craig, N. L. & Nash, H. A. (1984). *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* 39, 707–716.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. & Penades, J. R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183, 2888–2896.

Dauter, Z., Persson, R., Rosengren, A. M., Nyman, P. O., Wilson, K. S., & Cedergren-Zeppezauer, E. S. (1999) Crystal structure of dUTPase from equine infectious anaemia virus; active site metal binding in a substrate analogue complex. *Journal of Molecular Biology*, 285(2), 655–673.

Dengg, M., Garcia-Muse, T., Gill, S.G., Ashcroft, N., Boulton, S.J. and Nilsen, H. (2006) Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Rep.*, 7, 1046–1051.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 414–424.

Dodd, I. B., Shearwin, K. E., and Egan, J. B. Revisited gene regulation in bacteriophage lambda. *Curr Opin Genet Dev* 15, 145-152 (2005).

Dubrava, M.S., Ingram, W.M., Roberts, S.A., Weichsel, A., Montfort, W.R., and Cordes, M. H. (2008) N15 Cro and lambda Cro: orthologous DNA-binding domains with completely different but equally effective homodimer interfaces. *Protein Sci* 17, 803-812.

Edwards, A. M., Massey, R. C. & Clarke, S. R. (2012) Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Molecular Oral Microbiology* 27, 1–10.

Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635.

el-Hajj, H. H., Zhang, H. & Weiss, B. (1988) Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 1069–1075.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 66: 486–501.

Evans, P.R. (2011) An introduction to data reduction : space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 67: 282–292.

Evans, P. R., & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 7), 1204–1214.

Favre, A., Chams, V. & Caldeira de Araujo, A. (1986) Photosensitized UVA light induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Biochimie* 68, 857–864.

Federspiel, J., Stearns, S., Peppercorn, A., Chu, V. & Fowler, V. (2012) Increasing us rates of endocarditis with *Staphylococcus aureus*: 1999-2008. *Arch. Intern. Med.* 172, 363–365.

Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I. & Herskovits, A. A. (2015) A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 641–650.

Fillol-Salom, A., Bacarizo, J., Alqasmi, M., Ciges-Tomas, J.R., Martínez-Rubio, R., Roszak, A.W., Cogdell, R.J., Chen, J., Marina, A., Penadés, J.R. (2019) Hijacking the Hijackers: *Escherichia coli* pathogenicity islands redirect helper phage packaging for their own benefit. *Mol Cell.* 5;75(5):1020-1030.e4

Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(2), 136–169.

Fitzgerald, J. R., Sturdevant, D. E., Mackie, S. M., Gill, S. R. & Musser, J. M. (2001) Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: Insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8821–8826.

Fortier, L.-C. & Sekulovic, O. (2013) Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4, 354–365.

Frazeo, B. W., Fee, C. & Lambert, L. (2009) How Common is MRSA in Adult Septic Arthritis? *Ann. Emerg. Med.* 54, 695–700.

Freeman, L., Buisson, M., Tarbouriech, N., Van der Heyden, A., Labbé, P., & Burmeister, W. P. (2009) The flexible motif V of Epstein-Barr virus deoxyuridine 5'-triphosphate pyrophosphatase is essential for catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25280–25289.

Frigols, B., Quiles-Puchalt, N., Mir-Sanchis, I., Donderis, J., Elena, S. F., Buckling, A., Novick, R. P., Marina, A. & Penadés, J. R. (2015) Virus Satellites Drive Viral Evolution and Ecology. *PLOS Genet.* 11, e1005609.

Frimodt-Møller, N., Espersen, F., Skinhøj, P., Rosdahl, V. T., Dalton, H., Allison, M., Spengler, R., Greenough, I. W., Stolley, P., Gatell, J., Trilla, A., Latorre, X., Al, E., Bruun, B., Sloth, K., Bentzon, M., Frederiksen, W., Peltola, H., Salomaa, T., et al. (1997) Epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in Denmark from 1957 to 1990. *Clin. Microbiol. Infect.* 3, 297–305.

Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3.

García-Nafría, J., Burchell, L., Takezawa, M., Rzechorzek, N. J., Fogg, M. J., & Wilson, K. S. (2010) The structure of the genomic Bacillus subtilis dUTPase: novel features in the Phe-lid. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 9), 953–961.

García-Nafría, J., Timm, J., Harrison, C., Turkenburg, J. P., & Wilson, K. S. (2013) Tying down the arm in Bacillus dUTPase: structure and mechanism. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 8), 1367–1380.

Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J. C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piémont, Y., Brousse, N., Floret, D. & Etienne, J. (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359, 753–759.

Glass, J. I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M. R., Maruf, M., et al. (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 425–430.

Gorwitz, R. J., Kruszon-Moran, D., McAllister, S. K., McQuillan, G., McDougal, L. K., Fosheim, G. E., Jensen, B. J., Killgore, G., Tenover, F. C. & Kuehnert, M.

J. (2008) Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J. Infect. Dis.* 197, 1226–1234.

Greenberg, G. R., & Somerville, R. L. (1962) Deoxyuridylate kinase activity and deoxyuridinetriphosphatase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48, 247–257.

Hacker, J. & Carniel, E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* 2, 376–381.

Hancock, J. A. (2010) *Oxford University Press*, England.

Handler, M. Z. & Schwartz, R. A. (2014) Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28, 1418–1423.

Hao, Z., Duncan, G. S., Chang, C. C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W. C., Ohashi, P., Wang, X., Mak, T. W. (2005) Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell*. May 20;121(4):579-591.

Harkiolaki, M., Brzozowski, A. M., González-Pacanowska, D., Hidalgo-Zarco, F., & Wilson, K. S. (2001) New crystal forms of Trypanosoma cruzi dUTPase. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 57(Pt 6), 915–917.

Harkiolaki, M., Dodson, E. J., Bernier-Villamor, V., Turkenburg, J. P., González-Pacanowska, D., & Wilson, K. S. (2004) The Crystal Structure of Trypanosoma

cruzi dUTPase Reveals a Novel dUTP/dUDP Binding Fold. *Structure (London, England: 1993)*, 12(1), 41–53.

Hasty, M. B., Klasner, A., Kness, S., Denmark, T. K., Ellis, D., Herman, M. I. & Brown, L. (2007) Cutaneous community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among all skin and soft-tissue infections in two geographically distant pediatric emergency departments. *Acad. Emerg. Med.* 14, 35–40.

Helt, S. S., Thymark, M., Harris, P., Aagaard, C., Dietrich, J., Larsen, S. and Willemoe, M. (2008) Mechanism of dTTP inhibition of the bifunctional dCTP deaminase: dUTPase encoded by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* 376, 554–69.

Hemsworth, G. R., Moroz, O. V., Fogg, M. J., Scott, B., Bosch-Navarrete, C., González-Pacanowska, D., & Wilson, K. S. (2011) The crystal structure of the *Leishmania major* deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase in complex with nucleotide analogues, dUMP, and deoxyuridine. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 16470–16481.

Hemsworth, G. R., González-Pacanowska, D., & Wilson, K. S. (2013) On the catalytic mechanism of dimeric dUTPases. *The Biochemical Journal*, 456(1), 81–88.

Hendriks, W., Mulders, J. W., Bibby, M. A., Slingsby, C., Bloemendal, H. & de Jong, W. W. (1988) Duck lens epsilon-crystallin and lactate dehydrogenase B4 are identical: a single-copy gene product with two distinct functions. *PNAS.* 85 (19) 7114-7118.

Hermans, K., Devriese, L. A. & Haesebrouck, F. (2003) Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet. Microbiol.* 91, 57–64.

Herron-Olson, L., Fitzgerald, J. R., Musser, J. M. & Kapur, V. (2007) Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2, e1120.

Hidalgo-Zarco, F., Camacho, A. G., Bernier-Villamor, V., Nord, J., Ruiz-Pérez, L. M., & González-Pacanowska, D. (2001) Kinetic properties and inhibition of the dimeric dUTPase-dUDPase from *Leishmania major*. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 10(7), 1426–1433.

Hill R.L. and Dokland T. (2016) The type 2 dUTPase of bacteriophage fNM1 initiates mobilization of *Staphylococcus aureus* bovine pathogenicity island 1. *Journal of Molecular Biology* 428:142–152.

Hirmondó J.E., S., Dobrotka, P., Tóth, J., Vértessy, B.G. (2015) Cross-species inhibition of dUTPase via the Staphylococcal Stl protein perturbs dNTP pool and colony formation in Mycobacterium. *DNA Repair (Amst)*.Jun; 30:21-7.

Holden, M. T. G., Hsu, L.-Y., Kurt, K., Weinert, L. A., Mather, A. E., Harris, S. R., Strommenger, B., Layer, F., Witte, W., de Lencastre, H., Skov, R., Westh, H., Zemlickova, H., Coombs, G., Kearns, A. M., Hill, R. L. R., Edgeworth, J., Gould, I., Gant, V., et al. (2013) A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Res.* 23, 653–664.

Holland, T. L., Arnold, C. & Fowler, V. G. (2014) Clinical Management of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *JAMA* 312, 1330.

Holm, L., and Laakso, L.M. (2016) Dali server update. *Nucleic Acids Res* 44, W351-355.

Huberts, D. H. E. W., & van der Klei, I. J. (2010) Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1803(4), 520–525.

Inoue, S., Moriyama, T., Horinouchi, Y., Tachibana, T., Okada, F., Maruo, K. & Yoshiya, S. (2013) Comparison of clinical features and outcomes of *Staphylococcus aureus* vertebral osteomyelitis caused by methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains. *Springerplus* 2, 283.

Jared M. Sagendorf, Helen M. Berman and Remo Rohs. (2017). DNAProDB: an interactive tool for structural analysis of DNA–protein complexes. *Nucleic Acids Res* 2017, 45, W89-W97

Jeffery, C. J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8–11.

Johansson, E., Thymark, M., Bynck, J.H., Fanø, M., Larsen, S. and Willemoës, M. (2007) Regulation of dCTP deaminase from *Escherichia coli* by nonallosteric dTTP binding to an inactive form of the enzyme. *FEBS J.* 274, 4188–98.

Kabsch, W. (2010). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), 133–144.

Kalia, D. Gökçe M., Nakayama S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo Y., Guo M., Roembke B.T., Sintim, H.O. (2013) Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev* 42, 305–341.

Kalinka, J., Hachmeister, M., Geraci, J., Sordelli, D., Hansen, U., Niemann, S., Oetermann, S., Peters, G., Löffler, B. & Tuchscher, L. (2014) *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 1038–1049.

Karplus, A., and Diedrichs, K. (2012) Linking Crystallographic Model and Data Quality. *Science.* 336: 1030–1033.

Kenzaka, T., Tani, K. & Nasu, M. (2010) High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater environments determined at single-cell level. *ISME J.* 4, 648–659.

Kerepesi, C., Szabó, J.E., Papp-Kádár, V., Dobay, O., Szabó, D., Grolmusz, V. and Vértessy, B.G. (2016) Life without dUTPase. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1768.

Kim, B. & Little, J. W. (1993) LexA and λ CI repressors as enzymes: Specific cleavage in an intermolecular reaction. *Cell* 73, 1165–1173.

Kliem, M. & Dreiseikelmann, B. (1989) The superimmunity gene sim of bacteriophage P1 causes superinfection exclusion. *Virology* 171, 350–355.

Kluck, R. M., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Naiem, S., Yaffe, M. P., Margoliash, E., Bredesen, D., Mauk A. G., Sherman, F., Newmeyer, D. D. (2000) Determinants of cytochrome *c* pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation *J. Biol. Chem.*, 275, pp. 16127-16133.

Kluytmans, J., Van Belkum, A. & Verbrugh, H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 505–520.

Knowles, B., Silveira, C. B., Bailey, B. A., Barott, K., Cantu, V. A., Cobián-Güemes, A. G., Coutinho, F. H., Dinsdale, E. A., Felts, B., Furby, K. A., George, E. E., Green, K. T., Gregoracci, G. B., Haas, A. F., Haggerty, J. M., Hester, E. R., Hisakawa, N., Kelly, L. W., Lim, Y. W., et al. (2016) Corrigendum: Lytic to temperate switching of viral communities. *Nature* 539, 123–123.

Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W. & Friedrich, A. W. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles* 15, 19688.

Kovári, J., Barabás, O., Varga, B., Békési, A., Tölgyesi, F., Fidy, J., et al. (2008) Methylene substitution at the α - β bridging position within the phosphate chain of dUDP profoundly perturbs ligand accommodation into the dUTPase active site. *Proteins*, 71(1), 308–319.

Kreiswirth, B. N., Projan, S. J., Schlievert, P. M. & Novick, R. P. (1989) Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Is Encoded by a Variable Genetic Element. *Clin. Infect. Dis.* 11, S83–S89.

Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.

Larsson, G., Nyman, P. O., & Kvassman, J. O. (1996) Kinetic characterization of dUTPase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 24010–24016.

Lekkerkerk, W. S. N., Van Wamel, W. J. B., Snijders, S. V., Willems, R. J., Van Duijkeren, E., Broens, E. M., Wagenaar, J. A., Lindsay, J. A. & Vos, M. C. (2015) What is the origin of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 isolates from humans without livestock contact? An epidemiological and genetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1836–1841.

Lewis, R.J., Brannigan, J.A., Offen, W.A., Smith, I., and Wilkinson, A.J. An evolutionary link between sporulation and prophage induction in the structure of a repressor:anti-repressor complex. *J Mol Biol* 283, 907-912 (1998).

Leveles, I., Németh, V., Szabó, J. E., Harmat, V., Nyíri, K., Bendes, Á. Á., Papp-Kádár, V., Zagyva, I., Róna, G., Ozohanics, O., Vékey, K., Tóth, J. & Vértessy, B. G. (2013) Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69, 2298–2308.

Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.-O., Gauduchon, V., Vandenesch, F. & Etienne, J. (1999) Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin--Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1128–1132.

Lindsay, J. A., Ruzin, A., Ross, H. F., Kurepina, N. & Novick, R. P. (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 29, 527–543.

Lindsay, J. A., Knight, G. M., Budd, E. L. & McCarthy, A. J. (2012) Shuffling of mobile genetic elements (MGEs) in successful healthcare-associated MRSA (HA-MRSA). *Mob. Genet. Elements* 2, 239–243.

Lindsay, J. A. (2014) *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *International Journal of Medical Microbiology* 304, 103–109.

Łoś, M. & Węgrzyn, G. (2012) Pseudolysogeny. *Advances in Virus Research* 82, 339–349.

Lowder, B. V, Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Weinert, L. A., Conway-Morris, A., Cartwright, R. A., Simpson, A. J., Rambaut, A., Nubel, U. & Fitzgerald, J. R. (2009) Recent humanto-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19545–19550.

Madrid, A. S., & Ganem, D. (2012). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF54/dUTPase downregulates a ligand for the NK activating receptor NKp44. *Journal of Virology*, 86(16), 8693–8704.

Maiques, E., Úbeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, Í., Novick, R. P., Barbé, J. & Penadés, J. R. (2006) β -lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188, 2726–2729.

Maiques, E., Ubeda, C., Tormo, M. A., Ferrer, M. D., Lasa, I., Novick, R. P. & Penadés, J. R. (2007) Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *J. Bacteriol.* 189, 5608–16.

Maiorov, V.N., Crippen, G.M. (1994) Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 235 pp. 625.

Marsh, P. & Wellington, E. M. H. (1994) Phage-host interactions in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 99–107.

Martínez-Rubio R., Quiles-Puchalt N., Martí M., Humphrey S., Ram G., Smyth D., Chen J., Novick R. P., Penadés J.R. (2017) Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci. *The ISME Journal* 11:1029–1042.

Mašlaňová, I., Doškař, J., Varga, M., Kuntová, L., Mužík, J., Malúšková, D., Růžicková, V. & Pantůček, R. (2013) Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCCmec with different frequencies. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 66–73.

Maul, R. W. & Gearhart, P. J. (2010) AID and somatic hypermutation. *Adv. Immunol.* 105, 159–191.

McCarthy, A. J., Witney, A. A. & Lindsay, J. A. (2012) *Staphylococcus aureus* Temperate Bacteriophage: Carriage and Horizontal Gene Transfer is Lineage Associated. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 6.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40: 658–674.

McGeehan, J. E., Depledge, N. W., & McGeoch, D. J. (2001) Evolution of the dUTPase gene of mammalian and avian herpesviruses. *Current Protein & Peptide Science*, 2(4), 325–333.

McGeehan, J. E., Streeter, S. D., Thresh, S. J., Ball, N., Ravelli, R. B., and Kneale, G. G. (2008) Structural analysis of the genetic switch that regulates the expression of restriction-modification genes. *Nucleic Acids Res* 36, 4778-4787.

McGeoch, D. J. (1990) Protein sequence comparisons show that the “pseudoproteases” encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyuridine triphosphatase family. *Nucleic Acids Research*, 18(14), 4105–4110.

Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Szufnarowski, K., Pawełczyk, Z., Rogóż, P., Kłak, M., Wojtasik, E. & Górski, (2012) A. Clinical aspects of phage therapy. *Advances in virus research* 83. Miller, H. I., Abraham, J., Benedik, M., Campbell, A., Court, D., Echols, H., Fischer, R., Galindo, J. M., Guarneros, G., Hernandez, T., Mascarenhas, D., Montanez, C., Schindler, D., Schmeissner, U. & Sosa, L. (1981) Regulation of the integration-excision reaction by bacteriophage lambda. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 45 Pt 1, 439–445.

Miller, C. (2004) SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. *Science* (80-). 305, 1629–1631.

Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S. A., Wu, G. D., Lewis, J. D. & Bushman, F. D. (2011) The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 21, 1616–1625.

Mir-Sanchis, I., Martínez-Rubio, R., Martí, M., Chen, J., Lasa, Í., Novick, R. P., et al. (2012) Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision. *Molecular Microbiology*, 85(5), 833–845.

Mirzaei, M. K. & Maurice, C. F. (2017) Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 397–408.

Modi, S. R., Lee, H. H., Spina, C. S. & Collins, J. J. (2013) Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499, 219–222.

Mol, C. D., Harris, J. M., McIntosh, E. M. & Tainer, J. A. (1996) Human dUTP pyrophosphatase: Uracil recognition by a β hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure* 4, 1077–1092.

Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., et al. (2009). Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature Genetics*, 41(12), 1282–1289.

Moroz, O. V., Harkiolaki, M., Galperin, M. Y., Vagin, A. A., González-Pacanowska, D., & Wilson, K. S. (2004) The crystal structure of a complex of *Campylobacter jejuni* dUTPase with substrate analogue sheds light on the mechanism and suggests the “basic module” for dimeric d(C/U)TPases. *Journal of Molecular Biology*, 342(5), 1583–1597.

Muha, V., Horváth, A., Békési, A., Pukáncsik, M., Hodoscsek, B., Merényi, G., Róna, G., Batki, J., Kiss, I., Jankovics, F., Vilmos, P., Erdélyi, M. & Vértessy, B. G. (2012) Uracil-containing DNA in *Drosophila*: Stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet.* 8, e1002738.

Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H. & Hayashi, T. (2000) The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.* 38, 213–231.

Narita, S., Kaneko, J., Chiba, J. ichi, Piémont, Y., Jarraud, S., Etienne, J. & Kamio, Y. (2001) Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: Molecular analysis of a PVL-converting phage, ϕ SLT. *Gene* 268, 195–206.

Nelson, D. C., Schmelcher, M., Rodriguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D. G., Dong, S. & Donovan, D. M. (2012) Endolysins as antimicrobials. *Advances in virus research* 83.

Nienaber, J. J. C., Sharma Kuinkel, B. K., Clarke-Pearson, M., Lamlertthon, S., Park, L., Rude, T. H., Barriere, S., Woods, C. W., Chu, V. H., Marín, M., Bukovski, S., Garcia, P., Corey, G. R., Korman, T., Doco-Lecompte, T., Murdoch, D. R., Reller, L. B. & Fowler, V. G. (2011) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates Are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *J. Infect. Dis.* 204, 704–713.

Novick, R. P. (2003) Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: The superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49, 93–105.

Novick, R. P., Christie, G. E. & Penadés, J. R. (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 541–551.

Novick, R. P. & Ram, G. (2016) The Floating (Pathogenicity) Island: A Genomic Dessert. *Trends in Genetics* 32, 114–126.

Nyíri K., Kohegyi B., Micsonai A., Kardos J., Vertessy B. G. (2015) Evidence-based structural model of the staphylococcal repressor protein: separation of functions into different domains. *PLoS One* 10:e0139086.

Nyíri, K., Mertens, H.D.T., Tihanyi B., Nagy, G.N., Kőhegyi, B., Matejka, J., Harris, M.J., Szabó, J.E., Papp-Kádár, V., Németh-Pongrácz, V., Ozohanics, O., Vékey, K., Svergun, D.I., Borysik, A.J. and Vértessy, B.G. (2018) Structural

model of human dUTPase in complex with a novel proteinaceous inhibitor. *Sci Rep.* 2018; 8: 4326.

O'Donovan, G. A., Edlin, G., Fuchs, J. A., Neuhard, J. & Thomassen, E. (1971) Deoxycytidine triphosphate deaminase: characterization of an *Escherichia coli* mutant deficient in the enzyme. *J. Bacteriol.* 105, 666–672.

O'Neill, A. J., Larsen, A. R., Skov, R., Henriksen, A. S. & Chopra, I. (2007) Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1505–1510.

Ow, Y. P., Green, D.R., Hao, Z. & Mak, T. W. (2008) Cytochrome *c*: functions beyond respiration *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, pp. 532-542.

Pálinkás, H.L., Rácz, G.A., Gál, Z., Hoffmann, O.I., Tihanyi, G., Róna, G., Góczy, E., Hiripi, L. and Vértessy, B.G. (2019) CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of dUTPase in Mice Leads to Early Embryonic Lethality. *Biomolecules.* 9(4): 136.

Palmén, L. G., Becker, K., Bülow, L., & Kvassman, J.-O. (2008) A double role for a strictly conserved serine: further insights into the dUTPase catalytic mechanism. *Biochemistry*, 47(30), 7863–7874.

Papp-Kadar, V., Szabo, J. E., Nyiri, K., and Vértessy, B. G. (2016) In Vitro Analysis of Predicted DNA-Binding Sites for the StI Repressor of the *Staphylococcus aureus* SaPIBov1 Pathogenicity Island. *PLoS One* 11, e0158793.

Peacock, S. J., De Silva, I. & Lowy, F. D. (2001) What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends in Microbiology* 9, 605–610.

Pecsi, I., Szabo, J. E., Adams, S. D., Simon, I., Sellers, J. R., Vertessy, B. G., and Tóth, J. (2011) Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14437-14442.

Pecsi, I., Hirmondo, R., Brown, A.C., Lopata, A., Parish, T., Vertessy, B.G., and Tóth, J. (2012) The dUTPase Enzyme Is Essential in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One* 7: e37461.

Pegan, S. D., Tian, Y., Sershon, V., & Mesecar, A. D. (2010). A universal, fully automated high throughput screening assay for pyrophosphate and phosphate release from enzymatic reactions. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13(1), 27–38.

Penadés, J. R., Donderis, J., García-Caballer, M., Tormo-Más, M. Á. & Marina, A. (2013) dUTPases, the unexplored family of signalling molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 163– 170.

Penadés, J. R., & Christie, G. E. (2015) The Phage-Inducible Chromosomal Islands: A Family of Highly Evolved Molecular Parasites. *Annual Review of Virology*, 2(1), 181–201.

Persson, R., Cedergren-Zeppezauer, E. S., & Wilson, K. S. (2001) Homotrimeric dUTPases; structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP. *Current Protein & Peptide Science*, 2(4), 287–300.

Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F. & Baquero, F. (1987) Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 20, 631–638.

Piatigorsky, J & Wistow, G. J. (1989) Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*, 57, pp. 197-199.

Planet, P. J., Larussa, S. J., Dana, A., Smith, H., Xu, A., Ryan, C., Uhlemann, A. C., Boundy, S., Goldberg, J., Narechania, A., Kulkarni, R., Ratner, A. J., Geoghegan, J. A., Kolokotronis, S. O. & Prince, A. (2013) Emergence of the epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on skin. *MBio* 4, e00889-13.

Poornam, G., Matsumoto, A., Ishida, H., Hayward, S. (2009) A method for the analysis of domain movements in large biomolecular complexes. *Proteins*, 76, p210-212.

Powell, H. R., Johnson, O., & Leslie, A. G. W. (2013). Autoindexing diffraction images with iMosflm. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 7), 1195–1203.

Powell, H.R. (2017) X-ray data processing. *Biosci Rep* 37. pii: BSR20170227.

Prasad, G. S., Stura, E. A., McRee, D. E., Laco, G. S., Hasselkus-Light, C., Elder, J. H., & Stout, C. D. (1996) Crystal structure of dUTP pyrophosphatase from feline immunodeficiency virus. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 5(12), 2429–2437.

Prasad, G. S., Stura, E. A., Elder, J. H., & Stout, C. D. (2000) Structures of feline immunodeficiency virus dUTP pyrophosphatase and its nucleotide complexes in

three crystal forms. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 56(Pt 9), 1100–1109.

Quiles-Puchalt, N., Martínez-Rubio, R., Ram, G., Lasa, Í. & Penadés, J. R. (2014) Unravelling bacteriophage ϕ 11 requirements for packaging and transfer of mobile genetic elements in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 91, 423–437.

Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., Alonso, J. C., Novick, R. P., Marina, A. & Penades, J. R. (2014) Staphylococcal pathogenicity island DNA packaging system involving cos-site packaging and phage-encoded HNH endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6016–6021.

Ram, G., Chen, J., Kumar, K., Ross, H. F., Ubeda, C., Damle, P. K., Lane, K. D., Penadés, J. R., Christie, G. E., Novick, R. P., Penades, J. R., Christie, G. E. & Novick, R. P. (2012) Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16300–16305.

Ram, G., Chen, J., Ross, H. F. and Novick, R. P. (2014) Precisely modulated pathogenicity island interference with late phage gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111, 14536–14541.

Reich, K. A. (2000) The search for essential genes. *Research in Microbiology*, 151(5), 319–324.

Rocha, L. A., Marques Ribas, R., da Costa Darini, A. L. & Gontijo Filho, P. P. (2013) Relationship between nasal colonization and ventilator-associated

pneumonia and the role of the environment in transmission of *Staphylococcus aureus* in intensive care units. *Am. J. Infect. Control* 41.

Romling, U., Galperin, M. Y. & Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 1–52.

Ross, J. & Topp, E. (2015) Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7905–7913.

Ruzin, A., Lindsay, J. & Novick, R. P. (2001) Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 41, 365–77.

Safdar, N. & Bradley, E. A. (2008) The Risk of Infection after Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Medicine* 121, 310–315.

Sagendorf, J. M., Berman, H. M. & Rohs, R. (2017) DNAproDB: an interactive tool for structural analysis of DNA-protein complexes. *Nucleic Acids Res.* 45, W89–W97.

Salgado-Pabón, W., Breshears, L., Spaulding, A. R., Merriman, J. A., Stach, C. S., Horswill, A. R., Peterson, M. L. & Schlievert, P. M. (2013) Superantigens are critical for *Staphylococcus aureus* infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. *MBio* 4, e00494-13.

Sano, E., Carlson, S., Wegley, L. & Rohwer, F. (2004) Movement of viruses between biomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5842–5846.

Savitsky, P., Bray, J., Cooper, C. D. O., Marsden, B. D., Mahajan, P., Burgess Brown, N. A., & Gileadi, O. (2010). High-throughput production of human proteins for crystallization: the SGC experience. *Journal of Structural Biology*, 172(1), 3–13.

Schindler, D. & Echols, H. (1981) Retroregulation of the int gene of bacteriophage lambda: control of translation completion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4475–4479.

Schmidt, H. & Hensel, M. (2004) Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 14–56.

Scholl, D. & Martin, D. W. (2008) Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1647–1652.

Seed, K. D., Lazinski, D. W., Calderwood, S. B. & Camilli, A. (2013) A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 494, 489–491.

Selva, L., Viana, D., Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Corpa, J. M., Lasa, I., Novick, R. P. & Penadés, J. R. (2009) Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1234–8.

Simossis, V. A. & Heringa, J. (2003) The PRALINE online server: Optimising progressive multiple alignment on the web. *Comput. Biol. Chem.* 27, 511–519.

Simossis, V. A. & Heringa, J. (2005) PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res.* 33, W289–W294.

Spaulding, A. R., Satterwhite, E. A., Lin, Y.-C., Chuang-Smith, O. N., Frank, K. L., Merriman, J. A., Schaefer, M. M., Yarwood, J. M., Peterson, M. L. &

Schlievert, P. M. (2012) Comparison of *Staphylococcus aureus* strains for ability to cause infective endocarditis and lethal sepsis in rabbits. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 1–9.

Sulakvelidze, A. (2011) Bacteriophage. *Bacteriophage* 1, 1–2.

Sumby, P. & Waldor, M. K. (2003) Transcription of the Toxin Genes Present within the Staphylococcal Phage ϕ Sa3ms Is Intimately Linked with the Phage's Life Cycle. *J. Bacteriol.* 185, 6841–6851.

Susskind, M. M., Botstein, D. & Wright, A. (1974) Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. III. Failure of superinfecting phage DNA to enter sieA⁺ lysogens. *Virology* 62, 350–366.

Suttle, C. A. Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361 (2005).

Switalski, L. M., Patti, J. M., Butcher, W., Gristina, A. G., Speziale, P. & Höök, M. (1993) A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol. Microbiol.* 7, 99–107.

Szabo, J. E., Németh, V., Papp-Kádár, V., Nyíri, K., Leveles, I., Bendes, A.A., Zagyva, I., Róna, G., Pálinkás, H.L., Besztercei, B., Ozohanics, O., Vékey, K., Liliom, K., Tóth, J. and Vértessy, B.G. (2014) Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Res* 42, 11912–11920.

Szabo, J. E., Takacs, E., Merenyi, G., Vértessy, B. G. & Toth, J. (2016) Trading in cooperativity for specificity to maintain uracil-free DNA. *Sci Rep* 6, 24219.

Tallent, S. M., Langston, T. B., Moran, R. G., & Christie, G. E. (2007) Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPII are comprised of helper phage-encoded proteins. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7520–7524.

Tarbouriech, N., Buisson, M., Seigneurin, J.-M., Cusack, S., & Burmeister, W. P. (2005) The monomeric dUTPase from Epstein-Barr virus mimics trimeric dUTPases. *Structure (London, England : 1993)*, 13(9), 1299–1310.

Tattevin, P., Schwartz, B. S., Graber, C. J., Volinski, J., Bhukhen, A., Bhukhen, A., Mai, T. T., Vo, N. H., Dang, D. N., Phan, T. H., Basuino, L., Perdreau-Remington, F., Chambers, H. F. & Diep, B. A. (2012) Concurrent epidemics of skin and soft tissue infection and bloodstream infection due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 55, 781–788.

Tchigvintsev, A., Singer, A. U., Flick, R., Petit, P., Brown, G., Evdokimova, E., et al. (2011) Structure and activity of the *Saccharomyces cerevisiae* dUTP pyrophosphatase DUT1, an essential housekeeping enzyme. *The Biochemical Journal*, 437(2), 243–253.

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G. (2015) *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603–661.

Tormo, M. A., Ferrer, M. D., Maiques, E., Ubeda, C., Selva, L., Lasa, Í., et al. (2008) *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2434–2440.

Tormo-Más, M. Á. A., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S. M., Campoy, S., Lasa, Í., Barbé, J., Novick, R. P., Christie, G. E., Penadés, J. R., Lasa, I., Barbé, J., Novick, R. P., Christie, G. E., Penadés, J. R., Tormo-Mas, M. A., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S. M., et al. (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature* 465, 779–782.

Tormo-Más, M. Á., Donderis, J., García-Caballer, M., Alt, A., Mir-Sanchis, I., Marina, A. & Penadés, J. R. (2013) Phage dUTPases Control Transfer of Virulence Genes by a Proto-Oncogenic G Protein-like Mechanism. *Mol. Cell* 49, 947–958.

Tóth, J., Varga, B., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A. & Vértessy, B. G. (2007) Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.* 282, 33572–33582.

Tungteakkhun, S. S., & Duerksen-Hughes, P. J. (2008) Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Archives of Virology*, 153(3), 397–408.

Úbeda, C., Tormo, M. Á., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T. J., Lasa, Í. & Penadés, J. R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol. Microbiol.* 49, 193–210.

Úbeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, Í., Novick, R. P. & Penadés, J. R. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol. Microbiol.* 56, 836–844.

Úbeda, C., Barry, P., Penadés, J. R., & Novick, R. P. (2007a) A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(36), 14182–14188.

Úbeda, C., Maiques, E., Tormo, M. A., Campoy, S., Lasa, Í., Barbé, J., et al. (2007b) SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Molecular Microbiology*, 65(1), 41–50.

Úbeda, C., Maiques, E., Barry, P., Matthews, A., Tormo, M. A., Lasa, Í., et al. (2008) SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage. *Molecular Microbiology*, 67(3), 493–503.

Úbeda, C., Olivarez, N. P., Barry, P., Wang, H., Kong, X., Matthews, A., et al. (2009) Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 72(1), 98–108.

Úbeda, C., Tormo-Más, M. Á., Penadés, J. R., & Novick, R. P. (2012) Structure-function analysis of the SaPI_{bov1} replication origin in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 67(2), 183–190.

Vardakou, M., Salmon, M., Faraldos, J. A., & O'Maille, P. E. (2014). Comparative analysis and validation of the malachite green assay for the high throughput biochemical characterization of terpene synthases. *MethodsX*, 1, 187–196.

Varga, B., Barabás, O., Kovári, J., Tóth, J., Hunyadi-Gulyás, E., Klement, E., et al. (2007) Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase. *FEBS Letters*, 581(24), 4783–4788.

Varga, B., Barabás, O., Takács, E., Nagy, N., Nagy, P., & Vértessy, B. G. (2008) Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(1), 8–13.

Vértessy, B. G., Larsson, G., Persson, T., Bergman, A. C., Persson, R., & Nyman, P. O. (1998) The complete triphosphate moiety of non-hydrolyzable substrate analogues is required for a conformational shift of the flexible C-terminus in *E. coli* dUTP pyrophosphatase. *FEBS Letters*, 421(1), 83–88.

Vértessy, B. G. & Tóth, J. Keeping Uracil Out of DNA: Physiological Role, Structure and Catalytic Mechanism of dUTPases. *Acc. Chem. Res.* 42, 97–106 (2009).

Viana, D., Blanco, J., Tormo-Más, M. Á., Selva, L., Guinane, C. M., Baselga, R., Corpa, J. M., Lasa, Í., Novick, R. P., Fitzgerald, J. R. & Penadés, J. R. (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol. Microbiol.* 77, 1583–1594.

von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. & Peters, G. (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Study Group. N. Engl. J. Med.* 344, 11–6.

Wang, G., Xia Y., Cui J., Gu Z., Song Y., Chen Y. Q., Chen H., Zhang H., Chen W. (2013) The role of moonlighting proteins in bacteria. *Curr Issues Mol Biol.* 16:15-22.

Weisberg, R. A. & Landy, A. (1983). Site-Specific Recombination in Phage Lambda. *Lambda II* 211–250

Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. & Nouwen, J. L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet. Infect. Dis.* 5, 751–62.

Wichels, A., Biel, S. S., Gelderblom, H. R., Brinkhoff, T., Muyzer, G. & Schütt, C. (1998) Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4128–4133.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., *et al.* (2011) Overview of the CCP 4 suite and current developments. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 67: 235–242.

Wintjens, R., and Rooman, M. (1996) Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J Mol Biol* 262, 294-313.

Wistow, G. J., Lietman, T., Williams, L. A., Stapel S.O., de Jong, W. W., Horwitz, J. & Piatigorsky, J. (1988) Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *J. Cell Biol.*, 107 pp. 2729-2736.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., Jaskolski, M., and Physics, B. (2015) Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* 275: 1–21.

Wohlrab, F., & Francke, B. (1980) Deoxyribopyrimidine triphosphatase activity specific for cells infected with herpes simplex virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4), 1872–1876.

Wohlrab, F., Garrett, B. K., & Francke, B. (1982) Control of expression of the herpes simplex virus-induced deoxypyrimidine triphosphatase in cells infected

with mutants of herpes simplex virus types 1 and 2 and intertypic recombinants. *Journal of Virology*, 43(3), 935–942.

Wu, H.-J., Wang, A. H.-J., & Jennings, M. P. (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 93–101.

Yan, N., O'Day, E., Wheeler, L. A., Engelman, A. & Lieberman, J. (2011) HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9244–9249.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, 12, 7–8.

Yeh, W. C., Ohashi, P., Wang, X. & Mak, T. W. (2005) Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell*, 121, pp. 579-591.

Young, R. (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 56, 430–481.

Young, R. & Bläsi, U. (1995) Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 195–205.

Yu, V. L., Goetz, A., Wagener, M., Smith, P. B., Rihs, J. D., Hanchett, J. & Zuravleff, J. J. (1986) *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* 315, 91–96.

Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K. & Acheson, D. W. (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J. Infect. Dis.* 181, 664–670.