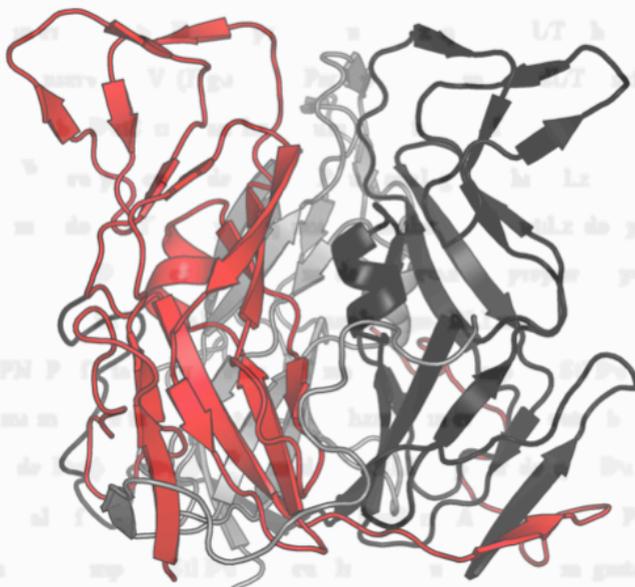


TESIS DOCTORAL

Valencia 2016



JORGE DONDERIS MARTÍNEZ

**BASES MOLECULARES DE LA
ACTIVIDAD SEÑALIZADORA
DE dUTPasas**



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



ibv INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC



UNIVERSITATIS VALÈNCIAE



INSTITUTO DE
BIOMEDICINA DE
VALENCIA CSIC

Doctorado en Bioquímica y Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

***Bases moleculares de la actividad
señalizadora de dUTPasas***

Jorge Donderis Martínez

Tesis Doctoral 2016

***Memoria presentada por Jorge Donderis Martínez para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Valencia***

Dirigida por el Dr. Alberto Marina Moreno

Unidad de Cristalografía de Macromoléculas

Departamento de Genómica y Proteómica

Instituto de Biomedicina de Valencia

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

València, 9 de Novembre de 2016

“Lo que una vez disfrutamos nunca lo perdemos.
Todo lo que amamos profundamente se convierte
en parte de nosotros mismos. “ (Hellen Keller)



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ALBERTO MARINA MORENO, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Científico en el Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INFORMA: que Jordi Donderis Martínez, Licenciado en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título “Bases moleculares de la actividad señalizado de dUTPasas” presenta para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, Octubre de 2016

Dr. Alberto Marina Moreno

Para la realización de esta Tesis, Jorge Donderis Martínez ha disfrutado de una beca lanzadera del CIBER de Enfermedades Raras y un contrato en la modalidad de prácticas suscrito en el marco del Programa Junta para la Ampliación de Estudios (JAE).

El trabajo se ha enmarcado en los proyectos “Estructura y función de máquinas moleculares implicadas en redes de señalización de microorganismos.” (BIO2010-15424) y “Análisis global de mecanismos reguladores antisentido en *Staphylococcus aureus*.” (PIM2010EPA-00606) financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación; y ”Estructura, función, reconocimiento y evolución en señalización celular: de lo bacteriano (sistemas de dos componentes) a lo universal (dUTPasas).” (BIO2013-42619-P) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, ; de los cuales el doctorando ha estado contratado a través de los proyectos PIM2010EPA-00606 y BIO2010-15424.

AGRADECIMIENTOS

Tras mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, llega el momento de cerrar una etapa. Una etapa de formación y crecimiento a nivel personal que debo agradecer a quienes me han acompañado y ayudado en ella.

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, el Dr. Alberto Marina, por darme la oportunidad de incorporarme a su laboratorio hace ya algunos años, siendo yo estudiante de prácticas, y darme a conocer el mundo de la cristalografía. He de agradecerle también su paciencia y consejos, pero además la accesibilidad y cercanía como jefe siempre dispuesto a escuchar y ayudar.

En segundo lugar, agradecer a todo el grupo de la Unidad de Cristalografía de Macromoléculas con el que he tenido la oportunidad de compartir todos estos años, dado que ellos han hecho del día a día más ameno entre risas, chistes, canciones del spoti y comilonas; pero también entre consejos, discusiones científicas y seminarios. Agradeceros a todos con los que más contacto he tenido: Marisa, Laura, Patri, Elisa, Rafa, Cris, Christian y Sara; pero en especial debo agradecer a Aaron el hecho de haber sido mi maestro Yoda en cuanto a técnicas cristalográficas se refiere y también a Paqui por su dedicación en el servicio de cristalografía.

Agradecer a toda la gente del IBV presente y no presente que he tenido el gusto de conocer y compartir tiempo tanto dentro como fuera del IBV. En especial debo reconocer el papel de todas las CdFs, todos sus miembros y representantes que han hecho del IBV algo más que un lugar de trabajo. Nada me honra más que haber presidido esta comisión y haber participado en los eventos que las distintas CdFs han organizado.

Agradecer al Dr. Jose Penadés y a su grupo, en especial a los dUTPásicos, la fabulosa colaboración y la comunicación establecida entre los dos laboratorios. Este trabajo es fruto de ello.

Agradecer a todos mis amigos “Los Moluscos bulbosos” del instituto y amigos y amigas por vuestra incondicional amistad y aguante con un servidor.

A Niut y Thysson, a quienes debo agradecer su lealtad y cariño.

A mi familia: tíos, tías, primos y primas, y allegados por teneros siempre cerca y ser un gran pilar de apoyo y comprensión. Además, dedicarles esta Tesis a mis abuelos a quienes me hubiera gustado tener hoy aquí, por haberme enseñado los valores a seguir en la vida. En especial dedicarles unas palabras a mi padre, madre y hermana por estar siempre cerca, comprenderme, entenderme y darme cariño; y a mi sobrino Ethan por su alegría y energía.

A Esther por su cariño, por ser comprensiva, atenta, paciente, por entenderme y por ser una persona simplemente genial. Tu apoyo ha sido fundamental para llegar hasta aquí. Por todo lo que hemos compartido, estamos viviendo y por lo que este viaje nos depare. ¿Quién nos lo iba a decir?

LISTA DE ABREVIATURAS

ϕ : fago

Å: ángstrom ($1\text{Å} = 1 \times 10^{-10}\text{m}$)

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNt: ARN de transferencia.

ATP: adenosina trifosfato.

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

BLI: interferometría en bicapa.

CTP: citosina trifosfato.

dATP: 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato.

dCTP: 2'-desoxicitosina 5'-trifosfato.

dITP: 2'-desoxiinosina 5'-trifosfato.

DTT: ditioteitol.

dTTP: 2'-desoxitimina 5'-trifosfato.

dUDP: 2'-desoxiuridina 5'-difosfato.

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

dUMP: 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato.

Dut: dUTPasa, dUTP pirofosfatasa, EC 3.6.1.23.

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

Dut ϕ 55: dUTPasa codificada por el fago ϕ 55.

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 DII: dUTPasa codificada por el fago ϕ DII.

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

Dut ϕ O46: dUTPasa codificada por el fago ϕ O46.

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

dUTP: 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato.

dXTP: 2'-desoxixantosa 5'-trifosfato.

EBV: *Epstein-Barr virus*.

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

EIAV: retrovirus de la anemia infecciosa equina.

FIV: virus como el de la inmunodeficiencia felina.

GADPH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

GTP: guanosa trifosfato.

HERV-K: retrovirus endógeno humano K

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

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

HGT: transferencia horizontal de genes (*Horizontal Gene Transfer*).

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

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

ITC: microcalorimetría isotérmica de titulación.

kb: kilo bases.

LB: medio de crecimiento Luria-Bertani.

LIC: método de clonación independiente de ligando (*Ligation-Independent Cloning*).

Mb: mega bases.

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

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PEG: polietilén glicol.

PGI: fosfoglucoasa isomerasa.

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)*).

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

TTP: timidina trifosfato.

UNG: uracilo N-glicosilasa.

UTP: uracilo trifosfato.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

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

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN 1

1. Proteínas *moonlighting*3

 1.1 ¿Qué son las proteínas *moonlighting*?3

 1.2 Proteínas *moonlighting* y factores de virulencia8

2. Las dUTPasas como proteínas *moonlighting* en la transferencia de islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) 11

 2.1 ¿Qué son las SaPIs? 11

 2.2 Ciclo biológico de las SaPIs 17

 2.3 Inducción de la movilidad de las SaPIs: especificidad por StI 19

3. dUTPasas22

 3.1 Papel de las dUTPasas en la célula22

 3.2 Clasificación de dUTPasas27

 3.2.1 dUTPasas triméricas28

 3.2.1.1 Centro activo31

 3.2.1.2 Mecanismo de hidrólisis36

 3.2.2 dUTPasas monoméricas37

 3.2.3 dUTPasas diméricas40

OBJETIVOS 45

CAPÍTULO 1. Las dUTPasas de fagos controlan la transferencia de genes de virulencia a través de un mecanismo similar al de las proteínas G protooncogénicas 49

 Contribución personal51

 Resumen53

 Introducción55

 Material y Métodos59

 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento59

 Métodos de ADN59

 Constructos en plásmidos59

 Inducción de islas de patogenicidad59

ÍNDICE GENERAL

Ensayos enzimáticos	59
Ensayos de microcalorimetría isotérmica de titulación (ITC).....	60
Expresión y purificación de las proteínas Dut80 α y mutantes.....	60
Cristalización, obtención de datos y construcción del modelo estructural	61
Resultados	63
La inducción de SaPIs depende de la conformación de la Dut	63
La conformación adoptada por la Dut codificada por el fago ϕ 80 α con dUTP unido induce el ciclo de la SaPI.....	66
La correcta conformación del motivo V de la Dut, pero no la actividad, es necesaria para la inducción de la SaPI	75
Los mutantes de Dut difieren en su afinidad por el represor StI codificado por la SaPI.....	76
El mecanismo encendido/apagado (<i>on/off</i>) previene la replicación sin control de la SaPI.....	77
Discusión	79
Material suplementario.....	83

CAPÍTULO 2. Otra mirada al mecanismo que implica a las dUTPasas triméricas en la inducción de las islas de patogenicidad de *S. aureus* presta un fuerte apoyo al modelo de cierre del dominio V

Contribución personal	101
Resumen.....	105
Introducción	107
Material y métodos.....	111
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	111
Manipulación del ADN	111
Construcción de plásmidos.....	111
Expresión y purificación de las proteínas	112
Interferometría en bicapa (BLI).....	114
Ensayo de actividad de dUTPasa.....	114

Cristalización de proteínas y recogida de datos	115
Determinación de las estructuras de Dut80 α ^{WT} -dUMP y Dut80 α ^{G164S} -dUPNPP	116
Resultados	119
Una concentración alta de dUTP bloquea la interacción Stl:Dut80 α	119
La implicación del motivo V en la inducción de la SaPI e interacción con Stl	123
El papel del dUMP en la unión Stl:Dut.....	129
El motivo VI es esencial para el reconocimiento de Stl	131
Los motivos V y VI también se encuentran involucrados en la interacción entre Dut ϕ 11 y Stl.....	133
El motivo IV también está implicado en la unión de Stl	135
Los niveles de dUTP no influyen en la transferencia de la SaPI	137
Discusión	141
Material suplementario	149
CAPITULO 3. Una para todas y todas para una. La función señalizadora de las dUTPasas de fagos de <i>S. aureus</i> depende de un dominio β-hairpin situado en el motivo no conservado	
Contribución personal	161
Resumen.....	163
Introducción	165
Material y métodos	167
Manipulación y trabajo con <i>S. aureus</i>	167
Métodos de ADN	167
Construcción de plásmidos.....	167
Expresión heteróloga de proteínas.....	168
Purificación de proteínas	169
Cristalización, recogida de datos de difracción de rayos-X y determinación de la estructura tridimensional	171
Resultados	173
Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel inducen la movilidad de SaPI _{bov1}	173

ÍNDICE GENERAL

Estructuras de Dut ϕ 85, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11 en complejo con dUMpNpp.....	174
El centro activo de las Duts codificadas por fagos de <i>S. aureus</i> se encuentra altamente conservado	180
El motivo VI adopta un plegamiento común en β -hairpin pese a su gran variabilidad de secuencia	183
El dominio β -hairpin es un elemento esencial para la inducción de SaPIbov1	187
Discusión	191
Material suplementario.....	195
CAPITULO 4. dUTPasas, una nueva familia de moléculas señalizadoras	205
Contribución personal.....	207
Resumen.....	209
Revisión	213
Estructura de las Duts.....	213
Las Duts virales controlan el sistema inmune	217
Las Duts de fagos controlan la transferencia de factores de virulencia codificados por islas de patogenicidad	219
Señalización mediante Duts en células procariotas	220
Señalización mediante Duts en células eucariotas	221
Un mecanismo similar al de las proteínas G protooncogénicas controlan la señalización mediada por las Duts	222
Conclusiones	225
CAPITULO 5. Las dUTPasas diméricas de fagos de <i>S. aureus</i> tienen capacidad de movilizar islas de patogenicidad	227
Contribución personal.....	229
Resumen.....	231
Introducción	233

Material y métodos	237
Métodos de ADN	237
Constructos en plásmidos.	237
Expresión heteróloga de proteínas.....	238
Purificación de la Dut ϕ DI.	239
Cristalización, recogida de datos de difracción de rayos-X y determinación de la estructura tridimensional.	239
Resultados.....	245
Presencia de variantes alélicas de Duts diméricas codificadas por fagos de <i>S. aureus</i>	245
Las Duts diméricas inducen el ciclo de las SaPIs.	247
Caracterización estructural de Dut ϕ DI en presencia de dUMpNpp.	249
Arquitectura del centro activo.	252
La unión al dUMpNpp no provoca cambios conformacionales en la estructura de Dut ϕ DI.....	255
Otras Duts diméricas no fágicas presentan motivos adicionales no conservados.	257
Discusión	261
Material suplementario	265
DISCUSIÓN GENERAL	273
Un nuevo mecanismo de señalización mediado por nucleótido.....	275
El dUTP como segundo mensajero.	282
Función biológica de las Duts codificadas por fagos.....	285
El papel de StI como inhibidor general de Duts.....	290
El mecanismo de interacción Dut-StI podría explicar las actividades <i>moonlighting</i> de otras Duts.	292
CONCLUSIONES	297
BIBLIOGRAFÍA.....	301

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN 1

Figura 0.1. Estrategias de regulación de las diferentes funciones en una proteína *moonlighting*8

Figura 0.2. Características generales de las islas genómicas.....13

Figura 0.3. Esquema general de diferentes SaPIs17

Figura 0.4. Microscopia electrónica de partículas de bacteriófagos e islas de patogenicidad de *S. aureus*19

Figura 0.5. Modelo de activación de SaPI_{bov1} mediada por dUTPasas22

Figura 0.6. Esquema de la reacción catalizada por las Duts.....23

Figura 0.7. Esquema de la composición química del dTTP y dUTP24

Figura 0.8. Esquema de la ruta de reparación por escisión25

Figura 0.9. Papel de la Dut en la célula27

Figura 0.10. Estado oligomérico y elementos secundarios de las tres familias de Duts28

Figura 0.11. Alineamiento de secuencia de Duts triméricas de diferentes organismos y motivos consenso29

Figura 0.12. Representación de un monómero de la Dut trimérica de *E. coli*30

Figura 0.13. Estructura de la Dut trimérica de *E. coli*31

Figura 0.14. Esquema de las interacciones entre centro activo y ligando.....35

Figura 0.15. Estructura de la Dut del *Epstein-Barr* virus39

Figura 0.16. Alineamiento de secuencias y motivos consenso en Duts diméricas41

Figura 0.17. Estructura de Duts diméricas42

Figura 0.18. Modelo de hidrólisis de las Duts diméricas43

Figura 0.19. Diferencias entre los mecanismos de hidrólisis de las Duts diméricas y triméricas44

OBJETIVOS 45

CAPÍTULO 1. Las dUTPasas de fagos controlan la transferencia de genes de virulencia a través de un mecanismo similar al de las proteínas G protooncogénicas..... 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Inducción de SaPIbov1 por diferentes Duts codificadas por fagos	64
Figura 1.2. Efectos de las mutaciones en la Dut del fago $\phi 80\alpha$ sobre la replicación y transferencia de SaPIs	65
Figura 1.3. Estructuras de Dut80 α <i>wild-type</i> en sus conformaciones apo y con dUMpNpp unido	68
Figura 1.4. Motivos V y VI de la forma <i>wild-type</i> y mutantes de Dut80 α	71
Figura 1.5. Estructura global y centro activo de los mutantes de Dut80 α	74
Figura 1.6. Inducción de la transcripción de <i>str</i> mediada por la expresión de <i>dut</i>	78
Figure 1.7. Diagrama esquemático de las actividades de las Duts.....	80
Figura S1.1. Efecto de las mutaciones sobre la unión del nucleótido.....	84
Figura S1.2. Motivo V <i>P-loop</i> en las formas <i>wild-type</i> y mutantes de Dut80 α	85
Figura S1.3. Comparación de las estructuras de Dut80 α y la Dut humana	86
Figura S1.4. Superimposiciones de la forma <i>wild-type</i> y mutantes.....	87
Figura S1.5. Estructura global y centro activo de los mutantes de Dut80 α	88
Figura S1.6. Localización del motivo V en la forma <i>wild-type</i> y los mutantes Y84 de Dut80 α	89
Figura S1.7. Estructura de los monómeros de diferentes Duts y localización del motivo extra VI.....	90

CAPÍTULO 2. Otra mirada al mecanismo que implica a las dUTPasas triméricas en la inducción de las islas de patogenicidad de *S. aureus* presta un fuerte apoyo al modelo de cierre del dominio V 99

Figura 2.1. Localización espacial en la estructura de Dut80 α de zonas y residuos relevantes para la interacción StI:Dut analizados en el trabajo	120
Figura 2.2. Efecto de mutaciones sobre las Duts de los fagos 80 α y $\phi 11$ sobre la replicación de SaPIbov1	124
Figura 2.3. La conformación del motivo V se correlaciona con el nucleótido unido al centro activo	128
Figura 2.4. Efecto en la replicación y transferencia de SaPIbov1 del mutante <i>stl</i>	139
Figura 2.5. Modelo de interacción entre Duts de fagos de <i>S. aureus</i> con StI	147
Figura S2.1. Alineamiento de secuencia de Duts codificadas por fagos	149

Figura S2.2. Modelado del motivo V C-terminal en las estructuras de Dut80 α ^{D81A} y Dut80 α ^{Y84I}	150
Figura S2.3. Estructura del mutante Dut80 α ^{G164S} y comparación con Dut80 α ^{WT}	151
Figura S2.4. Los cambios conformacionales inducidos por el nucleótido están restringidos al motivo V C-terminal	152
Figura S2.5. La conformación del motivo V inducida por el dUMP abre el centro activo	153
CAPITULO 3. Una para todas y todas para una. La función señalizadora de las dUTPasas de fagos de <i>S. aureus</i> depende de un dominio β-hairpin situado en el motivo no conservado	159
Figura 3.1. Inducción y replicación de SaPIbov1 por diferentes proteínas Dut ..	174
Figura 3.2. Alineamiento de secuencias de Duts fágicas	175
Figura 3.3. Estructuras de Dut80 α , Dut ϕ 85, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11.....	178
Figura 3.4. Centro activo de las Duts	182
Figura 3.5. Posicionamiento estructural del motivo VI respecto al resto de motivos en las Duts	185
Figura 3.6. Inducción de SaPIbov1 por diferentes alelos de Duts y sus correspondientes mutantes Δ GS	188
Figura S3.1. Monómeros de Duts fágicas	195
Figura S3.2. Vista global de las estructuras Duts triméricas fágicas.....	196
Figura S3.3. Vistas en superficie de las Duts triméricas fágicas	197
Figura S3.4. Posicionamiento estructural del extremo C-terminal.....	198
Figura S3.5. Visión del dominio β -hairpin del motivo VI	199
CAPITULO 4. dUTPasas, una nueva familia de moléculas señalizadoras	205
Figura 4.1. Estrategias reguladoras en la señalización mediada por Duts.....	211
Figura 4.2. Tipos de Duts y sus centros activos	215
Figura 4.3. El motivo VI extra es una característica común en las Duts triméricas	216

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 5. Las dUTPasas diméricas de fagos de <i>S. aureus</i> tienen capacidad de movilizar islas de patogenicidad	227
Figura 5.1. Alineamiento de secuencias de Duts diméricas de fagos	246
Figura 5.2. Replicación de SaPIbov1 mediante diferentes Duts diméricas de fagos de <i>S. aureus</i>	248
Figura 5.3. Estructura de la Dut ϕ DI en presencia de nucleótido	249
Figura 5.4. Dominio rígido y móvil de la Dut ϕ DI	252
Figura 5.5. Centro activo de Dut ϕ DI en presencia de nucleótido	253
Figura 5.6. Superposición de la Dut ϕ DI apo y Dut ϕ DI en presencia de dUMpNpp	257
Figura 5.7. Motivos adicionales en Duts diméricas de organismos prototipo	258
Figura S5.1. Alineamiento de secuencia de Duts diméricas prototipo junto con Dut ϕ DI	265
Figura S5.2. Posición del Motivo VI de Dut ϕ DI	266
Figura S5.3. Superposición de los dominios rígido y móvil de Duts diméricas ..	267
Figura S5.4 . Elementos para la formación del dímero de Dut ϕ DI	268
Figura S5.5. Disposición del nucleótido entre el dominio rígido y móvil	269
Figura S5.6. Red de interacciones del centro activo de Dut ϕ DI con su ligando.	270
DISCUSIÓN GENERAL.....	273
Figura 6.1. Comparación de los diferentes modelos de señalización	279
Figura 6.2. Alineamiento de secuencias de distintas Duts	282
CONCLUSIONES	297
BIBLIOGRAFÍA	301

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN 1

 Tabla 0.1. Tamaño del genoma y número de genes en diferentes especies4

 Tabla 0.2. Proteínas de diferentes organismos y sus funciones *moonlighting*6

 Tabla 0.3. Listado de SaPIs y factores de virulencia codificados14

 Tabla 0.4. Efecto de mutaciones en el fago $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$ sobre la movilidad de
 diferentes SaPIs21

OBJETIVOS 45

**CAPÍTULO 1. Las dUTPasas de fagos controlan la transferencia de
genes de virulencia a través de un mecanismo similar al de las
proteínas G protooncogénicas 49**

 Tabla 1.1. Estadísticas cristalográficas para el *wild-type* (WT) y los mutantes
 de la Dut80 α 62

 Tabla S1.1. Actividad dUTPasa91

 Tabla S1.2. Valores de RMSD al comparar las formas *wild-type* y mutantes de
 Dut80 α 92

 Tabla S1.3. Cepas utilizadas93

 Tabla S1.4. Plásmidos utilizados95

 Tabla S1.5. Oligonucleótidos utilizados96

**CAPÍTULO 2. Otra mirada al mecanismo que implica a las dUTPasas
triméricas en la inducción de las islas de patogenicidad de *S.*
aureus presta un fuerte apoyo al modelo de cierre del dominio V 99**

 Tabla 2.1. Estadísticas cristalográficas117

 Tabla 2.2. Valores cinéticos obtenidos por interferometría en bicapa (BLI) de
 la interacción StI:Duts en presencia o ausencia de nucleótidos de
 uracilo122

 Tabla 2.3. Actividad dUTPasa133

 Tabla S2.1. Cepas utilizadas154

 Tabla S2.2. Oligonucleótidos utilizados155

 Tabla S2.3. Plásmidos utilizados157

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO 3. Una para todas y todas para una. La función señalizadora de las dUTPasas de fagos de <i>S. aureus</i> depende de un dominio β-hairpin situado en el motivo no conservado	159
Tabla 3.1. Estadísticas cristalográficas para Dut ϕ 85, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11	172
Tabla 3.2. Valores de RMSD de la superimposición de monómeros de Duts ...	180
Tabla S3.1. Oligonucleótidos utilizados	200
Tabla S3.2. Plásmidos utilizados	201
Tabla S3.3. Porcentaje de homología de secuencia entre Duts	202
Tabla S3.4. Valores de RMSD obtenidos para la superimposición del dominio β -hairpin de diferentes Duts	203
CAPITULO 4. dUTPasas, una nueva familia de moléculas señalizadoras	205
Tabla 4.1. Duts involucrada en señalización	217
CAPITULO 5. Las dUTPasas diméricas de fagos de <i>S. aureus</i> tienen capacidad de movilizar islas de patogenicidad	227
Tabla 5.1. Estadísticas cristalográficas	243
Tabla S5.1. Oligonucleótidos utilizados	271
Tabla S5.2. Plásmidos utilizados	272
DISCUSIÓN GENERAL.....	273
CONCLUSIONES	297
BIBLIOGRAFÍA	301

INTRODUCCIÓN

1. Proteínas *moonlighting*

1.1 ¿Qué son las proteínas *moonlighting*?

Una visión clásica del dogma central de la biología molecular nos indicaría que cada gen es transcrito en un ARN mensajero (ARNm) que será responsable de producir una proteína que llevará a cabo una función celular. Siguiendo esta visión, llama la atención que el tamaño de los genomas, y por lo tanto del número de genes estimados que contienen, sea muy bajo para algunos organismos en comparación con otros que habitan nichos ecológicos similares (Tabla 0.1).

Especie	Tamaño del genoma (Mb)	Cantidad estimada de genes
Procariontas		
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58	500
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,02	2300
<i>Escherichia coli K-12</i>	4,06	4400
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5,07	5400
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	6,07	6200
Eucariotas		
Hongos		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	5800
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12	4900
Protozoos		
<i>Tetrahymena thermophila</i>	220	>20000
Invertebrados		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97	19000
<i>Drosophila melanogaster</i>	180	13700
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	845	~22000
<i>Locusta migratoria</i>	5000	nd
Vertebrados		
<i>Fugu rubripes</i>	365	>31000
<i>Homo sapiens</i>	2900	27000
<i>Mus musculus</i>	2500	29000
Vegetales		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	25500
<i>Oryza sativa</i>	430	>45000
<i>Zea mays</i>	2200	>45000
<i>Fritillaria assyriaca</i>	120000	Nd

Tabla 0.1. Tamaño del genoma y número de genes en diferentes especies (tomada de Biología molecular del gen).

INTRODUCCIÓN

En este contexto, la adaptación y viabilidad celular en diferentes nichos se debe en parte a procesos como: la fusión de genes, el *splicing* alternativo o las modificaciones postraduccionales que aumentan el número de proteínas y por tanto el de funciones dentro de la célula. Pero en la actualidad, cada vez son más los ejemplos en los que se le atribuye a una misma proteína diferentes funciones. A este tipo de proteínas se les conoce como proteínas multifuncionales o proteínas *moonlighting*. Las proteínas *moonlighting* son aquellas que sus múltiples funciones no pueden ser atribuidas a las diferentes variantes resultantes del procesamiento del ARNm originados por *splicing* alternativo o a fragmentos originados por procesos de proteólisis. Las diferentes funciones llevadas a cabo por una proteína *moonlighting*, llamadas funciones *moonlighting*, pueden o no estar relacionadas entre ellas, siendo en todo caso independientes (Copley, 2012; Huberts and van der Klei, 2010; Jeffery, 1999).

Se han descrito ejemplos de proteínas *moonlighting* en todos los organismos desde plantas, levaduras, procariotas y animales. Algunas proteínas *moonlighting* descritas en la bibliografía incluyen enzimas implicadas en diferentes procesos metabólicos, destacando diferentes enzimas glicolíticas, factores de transcripción y chaperonas (Tabla 0.2) (Huberts and van der Klei, 2010; Jeffery, 2009).

	Proteína	Función canónica	Función moonlighting
Animales			
<i>Drosophila melanogaster</i>	Complejo ESCRT-II	Formación de cuerpos multi-vesiculares	Correca localización del ARNm codificante <i>bicoid</i>
<i>Homo sapiens</i>	Aconitasa	Ciclo del ácido cítrico	Homeostasis del hierro
	ATF2	Factor de transcripción	Respuesta al daño en el ADN
	DLD	Metabolismo energético	Apoptosis
	ERK2	MAP quinasa	Represor de la transcripción
	STAT3	Factor de transcripción	Cadena transporte electrones
<i>Mus musculus</i>			
Varios	Enzimas del metabolismo	Rutas metabólicas	Proteínas estructurales en cristalinios
	Citocromo c	Metabolismo energético	Apoptosis
Plantas			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hexoquinasa	Metabolismo de la glucosa	Señalización mediada por glucosa
<i>Physcomitrella patens</i>	Presenilina	γ-secretasa	Regulación del citoesqueleto
Levadura			
<i>Hansenula polymorpha</i>	Piruvato cabroxilasa	Enzima anaplerótico	Ensamblaje alcohol oxidasa
<i>Pichia pastoris</i>	Fosfofructoquinasa	Enzima glicolítica	Autofagia de peroxisomas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aconitasa	Ciclo del ácido cítrico	Estabilidad del ADN mitocondrial
	Aldolasa	Enzima glicolítico	Ensamblaje bomba de H ⁺ en V-ATPasas
	Arg5,6	Biosíntesis arginina	Control transcripcional
	Enolasa	Enzima glicolítica	Fusión homotípica vacuolar
			Transportar el ARNt a la mitocondria
	Galactoquinasa	Catabolismo galactosa	Inducción de los genes del sistema <i>gal</i>
	Hal3	Tolerancia frente a sales	Síntesis de la coenzima A
	HSP60	Chaperona mitocondrial	Estabiliza las regions activas <i>ori</i> del ADN mitocondrial
	Vhs3	Tolerancia frente a sales	Síntesis de la coenzima A
Procariotas			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	GroEL	Chaperona	Toxina en insectos
<i>Escherichia coli</i>	Thioredoxina	Anti-oxidante	Subunidad de la T7 de la ADN polimerasa
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Aconitasa	Ciclo del ácido cítrico	Homeostasis del hierro
	MurI	Producción D-glutamato	Inhibidor ADN girasa
<i>Streptomyces coelicolor</i>	CYP170A1	Albaflavenona sintasa	Terpeno sintasa
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Enolasa	Enzima glicolítica	Unión fibrinógeno
Protistas			
<i>Plasmodium vivax</i>	Aldolasa	Enzima glicolítica	Invasión del hospedador

Tabla 0.2. Proteínas de diferentes organismos y sus funciones moonlighting (adaptada de Huberts and van der Klei, 2010).

Los primeros ejemplos de proteínas *moonlighting* fueron descritos a finales de la década de 1980. Un ejemplo clásico de proteína *moonlighting* es la fosfoglucosa isomerasa (PGI). La PGI es una enzima ubicua presente en el citosol y que lleva a cabo el paso de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato en la fase previa a la glucólisis para la obtención de energía y precursores de componentes celulares. La PGI lleva a cabo otras funciones fuera de la célula. La neuroleuquina y el factor de motilidad autocrino, pese a haberse considerado proteínas diferentes, se ha descrito que ambas son en realidad PGI. Como neuroleuquina, PGI actúa como citoquina activando la maduración de células B

INTRODUCCIÓN

hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos, mientras que como factor de crecimiento nervioso ayuda a la supervivencia de algunas neuronas espinales embrionarias y sensoriales (Jeffery, 1999). Por último también se ha descrito la implicación de PGI como factor mediador y diferenciador en células humanas de leucemia mieloide. (Jeffery, 1999). Otro de los primeros ejemplos descritos en la bibliografía son las proteínas que forman las lentes de los cristalinos de algunos vertebrados como en el caso de los patos, donde esta proteína es idéntica a la lactato deshidrogenasa, una oxidoreductasa que cataliza el paso de piruvato a lactato en el interior de la célula; o que en el caso de las tortugas es idéntica a la α -enolasa, proteína que cataliza el paso de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glicólisis (Huberts and van der Klei, 2010).

Pero, ¿Cómo y por qué han surgido las proteínas *moonlighting*? Desde un punto de vista evolutivo, un organismo siempre intenta sacar el máximo partido del medio que le rodea para intentar sobrevivir con el mínimo coste energético posible. 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 (Jeffery, 1999). Las nuevas funciones adquiridas por una proteína, por definición, deberían haber surgido después de su función canónica, entendiendo como canónica su función más ancestral y que debería estar conservada en todos los organismos donde la proteína esté presente (Copley, 2012). Mientras que la función canónica puede que se encuentre fijada, las nuevas funciones van a depender fuertemente del entorno, siendo por ello característica de la especie, del tipo celular o del momento en el que se exprese; y estando por tanto sometidas a una mayor presión evolutiva.

Las actividades de las proteínas *moonlighting* pueden estar mediadas por: (i) las regiones o aminoácidos responsables de su función canónica u (ii) otras zonas de la proteína, que siendo propias de esa proteína en comparación con sus

ortólogos, se utilicen específicamente para la actividad *moonlighting*. Estas proteínas *moonlighting* suelen participar como puntos de anclaje para la formación de macrocomplejos de proteínas o interacciones con ácidos nucleicos. Además, estas funciones suelen estar asociadas a diferentes estados conformacionales de la proteína (Copley, 2012). 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).

Las proteínas *moonlighting* benefician a un organismo, pero al mismo tiempo añaden complejidad. El organismo debe tener mecanismos para regular y elegir entre las diferentes funciones de una misma proteína. Esta regulación puede darse tanto en el espacio como en el tiempo. Los mecanismos de regulación evitan que las nuevas funciones adquiridas interfieran con la función canónica de estas proteínas. Algunas estrategias de regulación son: (i) la localización de la proteína (intra- o extra-celular, diferentes orgánulos, etc.); (ii) el tipo celular donde se exprese la proteína; (iii) el estado de oligomerización que tenga; (iv) la concentración de un ligando, producto o cofactor; (v) la formación de complejos macromoleculares con otras proteínas o (vi) presentando múltiples zonas de unión a diferentes dianas (Figura 0.1) (Jeffery, 1999).

INTRODUCCIÓN

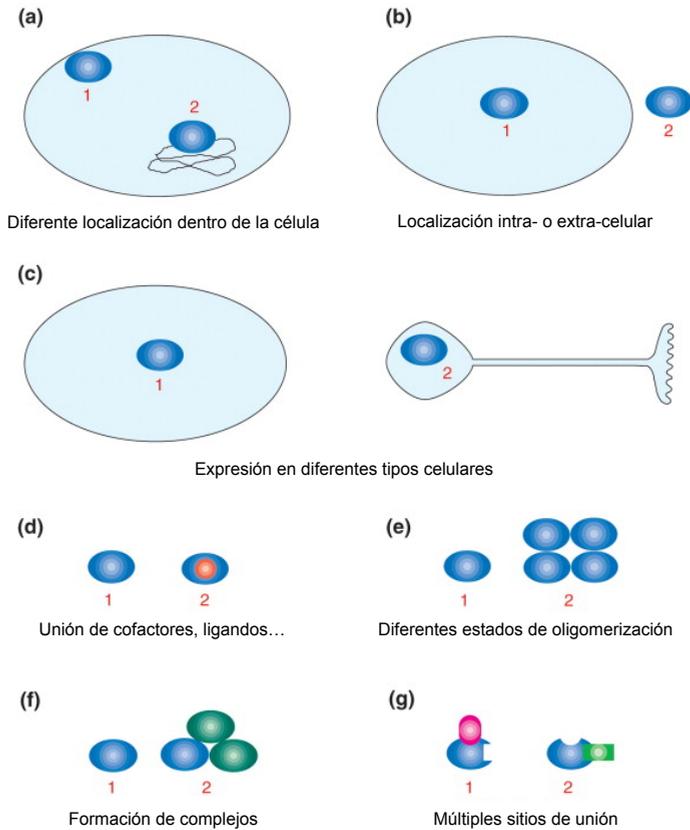


Figura 0.1. Estrategias de regulación de las diferentes funciones en una proteína *moonlighting* (adaptada de Jeffery, 1999).

1.2 Proteínas *moonlighting* y factores de virulencia

Las proteínas con función *moonlighting* se pueden encontrar en diferentes organismos. Estas proteínas pueden beneficiar al organismo que las expresa como en el caso de muchas bacterias y virus, donde las proteínas con función *moonlighting* actúan como factores de virulencia (moléculas expresadas por el organismo que le ayudan a adaptarse para ser funcional en condiciones adversas). Muchos de los factores de virulencia están involucrados en procesos como: (i) colonizar y sobrevivir a las etapas iniciales de la colonización del hospedador; (ii) en el proceso de replicación y supervivencia sin matar el hospedador; (iii) la formación de *biofilms* en el caso de bacterias o (iv) evadir

las defensas del sistema inmunitario (Finlay and Falkow, 1997; Wu *et al.*, 2008).

Tanto bacterias como virus son capaces de replicarse y multiplicarse; las bacterias de forma totalmente autónoma, mientras que los virus haciendo uso de la maquinaria celular de su hospedador. Para ambos casos se han descrito ejemplos de genomas muy pequeños y que codifican para pocas proteínas. Uno de los ejemplos más llamativos es el caso de *Mycoplasma genitalium*. Esta bacteria presenta un genoma de alrededor 580 kb que codifica para unas 482 proteínas (Glass *et al.*, 2006). A pesar del escaso número de proteínas codificadas, esta bacteria es capaz de dividirse de forma completamente autónoma. El hecho de que esta bacteria sea viable con tan escaso número de proteínas codificadas dio lugar a un proyecto para buscar el mínimo número de genes necesarios para que un organismo sea completamente autónomo. Trabajos realizados mediante el diseño de mutantes con *M. genitalium* ha permitido llegar a establecer un número mínimo de genes esenciales para la viabilidad de esta bacteria. *Mycoplasma laboratorium* es una bacteria sintética creada en el laboratorio a partir de la eliminación de genes de *M. genitalium* y que es viable en condiciones de laboratorio con tan solo 400 genes (Glass *et al.*, 2006; Reich, 2000). En el caso de los virus, estos necesitan de un hospedador para poderse replicar, pero aún así llama la atención que con genomas pequeños y codificando pocas proteínas sean capaces de infectar y replicarse, como el caso de algunos virus de la familia *Circoviridae* con un genoma inferior a las 2 kb y codificando tan solo dos proteínas.

En este sentido, las funciones *moonlighting* de algunas proteínas que codifican estos patógenos pueden ser importantes durante el desarrollo del proceso patogénico y, además, realizar otra función en la biología de dichos organismos (Copley, 2012; Wang *et al.*, 2013). En el caso de bacterias, los estreptococos del Grupo A presentan en su superficie la glicerolaldehido

INTRODUCCIÓN

3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). GAPDH es una enzima que participa en la ruta de la glicólisis pero, además, en este grupo de bacterias es capaz de unirse a la fibronectina facilitando la colonización de la faringe por parte del microorganismo (Wang *et al.*, 2013). Un papel similar lo realiza la enolasa de *Staphylococcus aureus* capaz de unirse a la laminina y al colágeno de tipo I (Wang *et al.*, 2013). Además, GAPDH puede actuar interfiriendo la respuesta inmune del hospedador, como en el caso de *Streptococcus agalactiae*, facilitando el proceso de colonización (Copley, 2012).

En el caso de los virus, estos son especialistas en utilizar las proteínas de la célula hospedadora que infectan para su propia biología. Pese a codificar un número pequeño de proteínas, los virus las emplean o bien en múltiples funciones o bien para secuestrar proteínas del hospedador al que infectan. El virus del papiloma humano codifica solamente ocho proteínas, una de ellas la proteína E6. E6 actúa como oncoproteína, aumentando la supervivencia de la célula donde se expresa hasta el punto de hacerla una célula inmortalizada. E6 interfiere en la función de p53, una proteína clave en la regulación del ciclo celular, bien de una forma directa marcando p53 para su degradación en el proteasoma mediante el complejo formado por la proteína E6 y la proteína asociada E6-AP (Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008); o de forma indirecta aumentando su inestabilidad a través de SET7 y disminuyendo los niveles de transcripción de p53 (Copley, 2012). E6, además, interacciona con proteínas que regulan la transcripción, procesos de apoptosis, adhesiones célula-célula, la estabilidad cromosomal, el reconocimiento por el sistema inmune, proteínas que controlan la proliferación celular, la polaridad de la célula o la estructura epitelial (Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008). La proteína E6 del virus del papiloma humano es un claro ejemplo de proteína *moonlighting*.

Otro ejemplo de proteína *moonlighting* descrita en virus son las dUTPasas. Recientemente se ha descrito la implicación de ciertas dUTPasas codificadas por fagos en la movilidad de islas de patogenicidad en *S. aureus* (Tormo-Más *et al.*, 2010).

2. Las dUTPasas como proteínas *moonlighting* en la transferencia de islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs)

2.1 ¿Qué son las SaPIs?

La transferencia horizontal de genes (*Horizontal Gene Transfer*, HGT) (Ochman *et al.*, 2000) entre bacterias es un mecanismo evolutivo rápido donde genes enteros son transferidos permitiendo una adaptación casi inmediata de la bacteria a nuevas condiciones ambientales. La HGT tiene implicaciones obvias para la salud humana, pues es utilizada por microorganismos patógenos en la propagación, incluso entre diferentes especies, de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos. Clásicamente se distinguen tres vías de HGT: la conjugación, que implica la interacción de dos células bacterianas; la transformación, que es la inclusión de ADN del medio; y la transducción, que es la transferencia de ADN mediada por fagos. Se piensa que alrededor del 20% del genoma actual de cualquier bacteria proviene de otros organismos y que posiblemente la mitad de ese 20% son elementos genéticos móviles (EGMs) (Novick *et al.*, 2010).

Los EGMs se pueden describir como fragmentos de ADN que codifican para enzimas y otras proteínas que permiten su transferencia a otras células y en algunos casos la integración al ADN (Frost *et al.*, 2005). Algunos de estos EGMs están claramente definidos como plásmidos (circulares o lineales), bacteriófagos o transposones. Otros se encuentran de forma transitoria integrados en el genoma de la bacteria como los profagos, los islotes genómicos (fragmentos menores que 10 kb) o las islas genómicas (fragmentos mayores que 10 kb) (Frost *et al.*, 2005). Algunas de estas islas genómicas han perdido

INTRODUCCIÓN

la capacidad de transferirse a otras células, pero otras mantienen esta capacidad de movilidad, ya sea mediante proteínas que están codificadas por la propia isla o por la ayuda de la maquinaria codificada por fagos que infectan a las bacterias donde residen, denominados fagos ayudantes (Novick *et al.*, 2010).

Estas islas genómicas, o cromosómicas, son fragmentos discretos y exógenos de ADN que no son propios del organismo, que han sido adquiridos por procesos de HGT e integrados en el genoma de la bacteria y que difieren entre cepas bacterianas estrechamente relacionadas. Por lo general estas islas se caracterizan por: (i) oscilar entre 10-200 kb (por debajo de 10 kb se les conoce como islotes genómicos); (ii) presentar un contenido G-C o un uso de codones diferente al del genoma de la bacteria donde se encuentran; (iii) insertarse en las zonas codificantes para ARN de transferencia (ARNt), o en genes conservados del genoma, asegurándose así un lugar de integración que estará siempre presente en la célula aceptora; (iv) estar flanqueados por repeticiones directas de 16-20 pb que dan especificidad por el sitio de integración al cromosoma bacteriano (att_c) y puedan actuar como secuencias de reconocimiento para su escisión del cromosoma (Schmidt and Hensel, 2004); (v) contener genes que codifican para integrasas y otros factores que permiten la transferencia de la isla genómica; (vi) contener elementos de inserción o transposones y (vii) contener genes que confieren algún tipo de ventaja adaptativa a la bacteria en la que residen (Figura 0.2) (Juhás *et al.*, 2009).

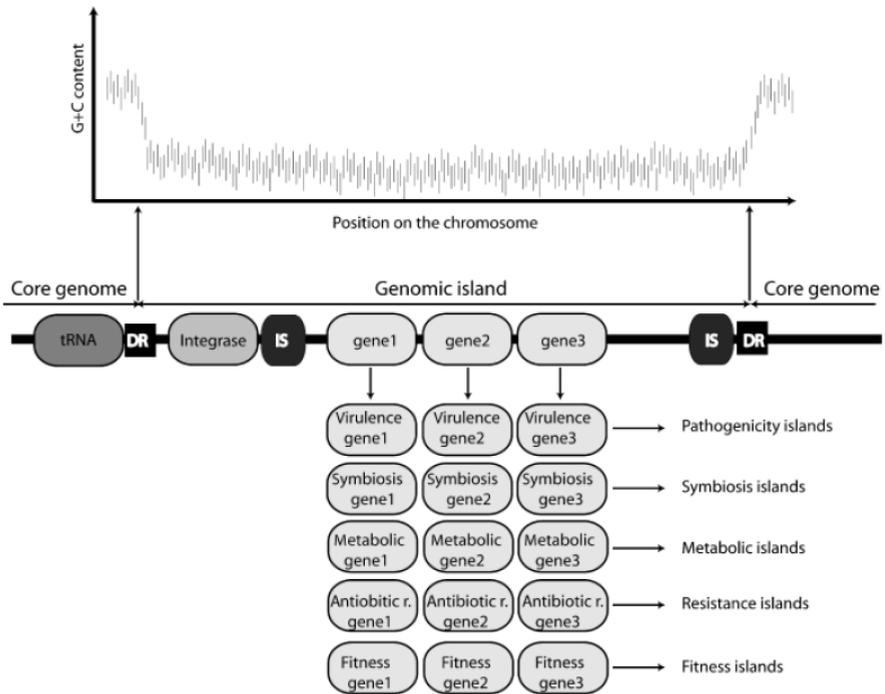


Figura 0.2. Características generales de las islas genómicas. En la figura se muestra esquemáticamente la composición general de una isla genómica, delimitada por las flechas verticales y la línea horizontal con las puntas de sus extremos orientadas hacia el exterior. Las islas genómicas suelen ser segmentos largos de ADN cuyo contenido en guanina y citosina difiere del resto del cromosoma. Suelen integrarse en los sitios codificantes para ARNt (tRNA), encontrarse flanqueadas por repeticiones directas (DR) y presentar secuencias de inserción (IS). Codifican para genes implicados en su transferencia como integrasas y transposasas, además de tener un contenido adicional de genes que le confieren alguna ventaja a la isla (tomada de Juhas *et al.*, 2009).

Dentro de los EGMs encontramos las islas de patogenicidad (IPs) que, además de presentar las características anteriormente enunciadas, llevan genes codificantes para toxinas, adhesinas, invasinas u otros factores de virulencia que confieren a la bacteria la capacidad de ser patógena. Un ejemplo de la presencia de estas islas la encontramos en *Staphylococcus aureus* conocidas como SaPIs (*Staphylococcus aureus* Pathogenicity Islands). *S. aureus* puede contener varias SaPIs integradas en su genoma. En la actualidad se asume que, probablemente, todas las cepas clínicas de *S. aureus* presentan al menos una SaPI, de las cuales

INTRODUCCIÓN

la mayoría codifican para TSST-1 (toxina del síndrome del shock tóxico) junto con dos o más superantígenos toxigénicos (Tabla 0.3) (Novick, 2003; Novick *et al.*, 2010).

Elemento	Genoma de estafilococo	Gen	Producto	Tamaño (kb)	Fagos inductores
SaPIbov1	<i>S. aureus</i> str. RF122	tst sec sel	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1) Enterotoxina C Enterotoxin L	15.8	ϕ 11 and 80 α
SaPIbov2	<i>S. aureus</i> str. V329	bap	Biofilm-associated protein (BAP)	27	80 α
SaPI _m 4	<i>S. aureus</i> str. mu50	fhuD	Ferrichrome ABC transporter homologue	14.4	Endogenous prophage
SaPI _m w2	<i>S. aureus</i> str. mw2	sec	Enterotoxina C	14.4	Endogenous prophage
SePI1	<i>S. aureus</i> str. FRI909	sec sel	Enterotoxina C Enterotoxin L	9.9	Not known
SaPI1	<i>S. aureus</i> str. RN4282	tst	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1)	15.2	80 α and ϕ 13
		ear	Penicillin-binding protein fragment		
		sek seq	Enterotoxin K Enterotoxin Q		
SaPI3	<i>S. aureus</i> str. COL	seb	Enterotoxina B	15.6	Not known
		ear	Penicillin-binding protein fragment		
		sek sel	Enterotoxin K Enterotoxin L		
SaPI5	<i>S. aureus</i> str. USA300	ear	Penicillin-binding protein fragment	14	Not known
		seq	Enterotoxin Q		
SaPI _n 1 and SaPI _m 1	<i>S. aureus</i> str. n315 and <i>S. aureus</i> str. mu50, respectively	tst	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1)	15	80 α
		sec	Enterotoxina C		
SaPI2	<i>S. aureus</i> str. RN3984	tst	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1)	14.7	80 and 80 α
		eta	Exfoliatin A		
SaRI _f usB	<i>S. aureus</i> European fusidic acid-resistant impetigo clone CS6	fusB	FusB (Fusidic acid resistance)	20.7	Not known
SaPI122	<i>S. aureus</i> str. RF122	mdr	Multidrug resistance protein	17.9	Endogenous prophage
SaPI6 Δ	<i>S. aureus</i> strains 8325, COL, USA300, MSSA476, Newman and mw2	actA	Acetyl transfer protein	3.14	Not known
SsPI15305	<i>S. saprophyticus</i> str. 15305	aad fosB	Aminoglycoside adenylyl transferase/Glutathione thionyl phosphatase	16.7	Not known

Tabla 0.3. Listado de SaPIs y factores de virulencia codificados (adaptada de Novick *et al.*, 2010).

Las SaPIs más estudiadas proceden de cepas de *S. aureus* humanas como: SaPI1, SaPI2, SaPI3, SaPI4 y SaPI_n1; o de cepas bovinas como: SaPI_{bov}1, SaPI_{bov}2 y SaPI_{bov}5. SaPI1 y SaPI_{bov}1 han sido utilizadas como prototipos para definir la composición de estas islas. Todas las SaPIs tienen una estructura similar presentando un *core* donde se agrupan cinco módulos conservados que agrupan los genes necesarios para regular su ciclo biológico (Figura 0.3) (Novick, 2003; Novick *et al.*, 2010):

Módulo de integración/escisión: compuesto por una integrasa específica de sitio (*int*) (Maiques *et al.*, 2007; Ubeda *et al.*, 2009; 2003) y un gen que codifica para una proteína con actividad escisionasa (*xis*) (Mir-Sanchis *et al.*, 2012).

Módulo de regulación: compuesto por los genes *stl* y *str* que codifican para dos represores de la movilidad de la SaPI (Novick *et al.*, 2010).

Módulo de replicación: compuesto por un origen de replicación (*ori*) y los genes *pri* y *rep*. El sitio *ori* posee una organización única para las SaPIs: se trata de repeticiones de unos pocos nucleótidos orientados en ambas direcciones y flanqueados por regiones ricas en A-T (Ubeda *et al.*, 2007a; 2012). Los genes *pri* y *rep* se pueden encontrar fusionados. Mientras que *pri* codifica para una primasa que mejora la replicación de la isla, *rep* codifica para una proteína que se une a las regiones ricas A-T del sitio *ori* y ejerce como helicasa (Ubeda *et al.*, 2007a)

Módulo de empaquetamiento: compuesto por el operón de empaquetamiento y regulado por LexA, una proteína que controla la expresión de genes en respuesta a la señal SOS (Baharoglu and Mazel, 2014; Ubeda *et al.*, 2007b). Este módulo codifica para las proteínas Cpm1 y Cpm2. Estas proteínas están implicadas en la producción de cápsides de pequeño tamaño junto con las proteínas estructurales codificadas en fagos (Tallent *et al.*, 2007; Tormo *et al.*,

INTRODUCCIÓN

2008). Este módulo, además, codifica para un homólogo de la subunidad pequeña de la terminasa de fagos a través del gen *terS*, responsable del empaquetamiento específico del ADN de las SaPIs dentro de las cápsides mediante una reacción endonucleolítica específica (Ubeda *et al.*, 2009).

Módulo de patogenicidad: este módulo se puede disponer a ambos extremos de la SaPI. La composición de este módulo varía entre SaPIs y confiere ventajas adaptativas. Las SaPIs pueden contener genes accesorios que codifican entre otros para superantígenos, transportadores de hierro, resistencia a antibióticos, toxinas, producción de *biofilms*, etc. De algunos de estos genes se han encontrado ortólogos en otros genomas mientras que otros, como son los que codifican para superantígenos como la toxina responsable del síndrome de shock tóxico TSST-1, se encuentran solo en las SaPIs (Novick *et al.*, 2010).

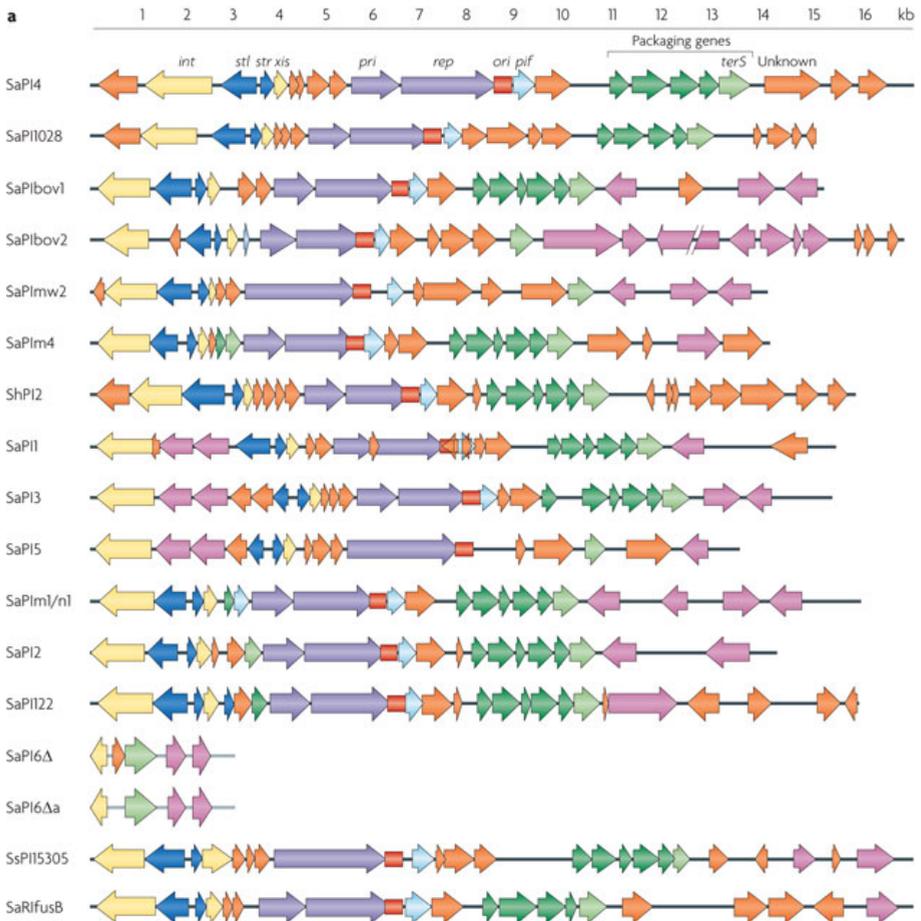


Figura 0.3. Esquema general de diferentes SaPIs. Los genes están coloreados en base a su secuencia y la función de la proteína codificante: *int* y *xis* (amarillo), reguladores de la transcripción (azul oscuro), *pri* y *rep* (morado), secuencia *ori* (rojo), genes implicados en la encapsidación (verde), *terS* (verde claro), genes que codifican para súper antígenos y otros genes accesorios (rosa), *pif* (azul claro) y genes codificantes para proteínas desconocidas (naranja) (tomada de Novick *et al.*, 2010).

2.2 Ciclo biológico de las SaPIs

Las SaPIs se encuentran integradas en el cromosoma de la bacteria de forma estable comportándose como un profago y requiere de la presencia de un fago ayudante, ya sea por infección o mediante respuesta SOS bacteriana, para iniciar su ciclo biológico. El ciclo biológico de las SaPIs, que incluye la

INTRODUCCIÓN

escisión, replicación y encapsidación de la SaPI está regulado por el represor global de la isla, la proteína Stl. Stl se encuentra codificada por la propia isla a través del gen *stl* y se ha descrito que mutaciones en dicho gen producen la inducción del ciclo biológico de la isla (Ubeda *et al.*, 2008).

El represor Stl, al contrario que los represores de los fagos temperados susceptibles a la respuesta SOS bacteriana, requiere de una proteína codificada por el fago como inductora del ciclo de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2010). En presencia de fago, Stl se une específicamente a una proteína del fago dejando libre la zona promotora de la isla para la expresión de los genes necesarios para la escisión, replicación y encapsidación de la isla (Tormo-Más *et al.*, 2010). El hecho de requerir la presencia de una proteína del fago para iniciar su ciclo biológico hace exista una sincronización temporal entre el ciclo de la SaPI con el ciclo lítico del fago, de tal manera que las SaPIs se empiezan a expresar un poco más tarde de lo que lo hace el fago (Lindsay *et al.*, 1998; Tormo-Más *et al.*, 2010). Esta sincronización es necesaria dado que las SaPIs carecen de parte de la maquinaria necesaria para su transferencia y utilizan algunas proteínas codificadas por los fagos ayudantes para poder transducirse (Novick *et al.*, 2010).

Dos herramientas que requiere la SaPI para su transferencia son: la maquinaria del fago para empaquetar su ADN en la cápside y la maquinaria que lisa a la bacteria para poder ser liberada. Como se ha descrito, las SaPIs codifican para un homólogo de las subunidad pequeña de la terminasa de fagos, terS, pero para su encapsidación correcta requieren de la subunidad mayor TerL codificada por el fago (Penadés *et al.*, 2014). Además, la SaPI debe tomar o utilizar las proteínas de la cápside del fago (Tormo *et al.*, 2008). Las SaPIs carecen de genes que codifiquen para las proteínas estructurales que forman las cápsides, y utilizan las que forman los viriones al encapsidarse (Tormo *et al.*, 2008). Estas cápsides pueden originar viriones de tamaño similar a las que

encapsidan el ADN del fago permitiendo la encapsidación de hasta tres copias del ADN de la SaPI, como en el caso de SaPI_{bov2} (Ubeda *et al.*, 2007b), o viriones más pequeños (de unos 20 nm de diámetro) capaces de contener un menor número de copias del genoma de la isla e incapaces de albergar el genoma del fago, como en el caso de SaPI₁ y SaPI_{bov1} (Figura 0.4) (Novick *et al.*, 2010). Además de las proteínas de la cápside, las SaPIs requieren de las proteínas que forman el resto del fago (cuello, cola, placa basal y fibras) para formar una partícula con capacidad infectiva.

La lisis de la bacteria mediada por el fago libera tanto a los fagos encapsidados como las SaPIs encapsidadas. Cuando estas cápsides infectan a una nueva bacteria, el material genético que contienen es inyectado dentro de la célula pudiendo entrar en un nuevo ciclo de replicación si la bacteria es infectada al mismo tiempo por un fago o en caso contrario integrarse en el genoma bacteriano (Novick *et al.*, 2010).

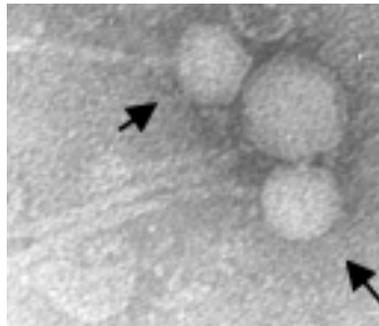


Figura 0.4. Microscopía electrónica de partículas de bacteriófagos e islas de patogenicidad de *S. aureus*. Las cápsides que contienen el material genético de la SaPI, que aparecen marcadas por flechas negras, suelen ser de un tamaño menor a aquellas que contienen el material del fago (tomada de Ubeda *et al.*, 2005).

2.3 Inducción de la movilidad de las SaPIs: especificidad por StI

La inducción de la movilidad de las islas de patogenicidad requiere de una sincronización con los fagos ayudantes dado que requiere de una proteína del fago para inducir los genes codificados por la isla. Esta sincronización entre

INTRODUCCIÓN

la isla y el fago se basa en la interacción específica entre proteínas de ambos elementos. Así, trabajos previos han descrito que la isla SaPI1 es escindida y circularizada con ayuda de los fagos $\phi 13$ y $\phi 80\alpha$. De la misma manera, la isla SaPI2 es escindida por el fago $\phi 80\alpha$ (Lindsay *et al.*, 1998). El fago $\phi 80\alpha$, además, es capaz de inducir la movilidad de las islas SaPI2, SaPI_n1, SaPI_{bov}2 o SaPI_{bov}1; esta última inducida también por el fago $\phi 11$ (Tormo-Más *et al.*, 2010). Estos datos indican que existen fagos que tienen la capacidad de inducir varias islas al contar en su genoma con diferentes inductores y, además, que existen a la vez islas que pueden ser inducidas por múltiples fagos al reconocer su represor diferentes proteínas inductoras (Tabla 0.4). De estas observaciones se explica que la especificidad fago-isla se basa en una especificidad a nivel de interacción entre el represor codificado por la isla y una proteína particular inductora del fago que es diferente para cada isla (Tormo-Más *et al.*, 2010). Trabajos realizados con el fago $\phi 80\alpha$ han mostrado que dicho fago es capaz de inducir tres islas de patogenicidad diferentes: SaPI_{bov}1, SaPI_{bov}2 y SaPI1. Mutantes puntuales han mostrado que este fago es capaz de movilizar cada una de estas tres SaPIs a través de tres proteínas diferentes codificadas por el fago, las cuales deben unirse de forma específica a cada uno de los represores de las tres islas. Mientras que la inducción de SaPI1 esta mediada por la proteína *sri*, que codifica una proteína que se une al ADN e inhibe la replicación; SaPI_{bov}2 lo está por la proteína codificada por el gen *orf15*, que codifica una proteína de función desconocida; y SaPI_{bov}1 lo está por la proteína codificada por el gen *dut*, que codifica para una dUTPasa (Tabla 0.4) (Tormo-Más *et al.*, 2010). Dado que las proteínas codificadas por el fago participan por una parte en sus propios procesos pero por otra parte tienen una función en la inducción de la isla, pueden ser consideradas proteínas *moonlighting*, como explica el punto 1 de la introducción.

Fago	SaPIbov1		SaPIbov2		SaPII	
	Título Isla	Título Fago	Título Isla	Título Fago	Título Isla	Título Fago
$\phi 80\alpha$ wt	4.1×10^7	1.5×10^8	1.3×10^8	6.0×10^7	1.6×10^8	1.1×10^8
$\phi 80\alpha \Delta dut$	8.3×10^2	4.4×10^{10}	1.1×10^8	9.1×10^7	2.8×10^8	4.3×10^8
$\phi 80\alpha \Delta sri$	5.3×10^7	2.1×10^8	9.2×10^7	8.2×10^7	3.8×10^2	2.3×10^{10}
$\phi 80\alpha \Delta orf15$	3.9×10^7	1.8×10^8	5.4×10^3	3.0×10^9	4.1×10^8	4.1×10^8
$\phi 11$	1.8×10^7	6.3×10^6	ND	ND	ND	ND
$\phi 11 \Delta dut$	9.2×10^2	9.4×10^8	ND	ND	ND	ND

ND: no determinado

Tabla 0.4. Efecto de mutaciones en el fago $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$ sobre la movilidad de diferentes SaPIs. La tabla representa los títulos de SaPI y fagos obtenidos a partir de 1 mL de lisado de la cepa no lisogénica de *Staphylococcus aureus* RN4220 portadora de cada una de las SaPIs. Los valores son indicadores del número de cápsides que contienen o bien del material genético de la SaPI o bien del fago con el que se induce la isla. ND: valores no determinados (adaptada de Tormo-Más *et al.*, 2010).

Como se ha indicado para el fago $\phi 80\alpha$, una de las proteínas que utilizan algunos fagos para inducir la movilidad de las islas de patogenicidad es la dUTPasa. Las dUTPasas de los fagos $\phi 80\alpha$ y $\phi 11$ son capaces de inducir la isla de patogenicidad SaPIbov1 (Tormo-Más *et al.*, 2010). En el caso de ambos fagos, mutantes que no codifican para la dUTPasa producen un número de cápsides de isla menor al que se obtiene con los fagos salvajes tras inducir el ciclo lítico del fago en una cepa de *S. aureus* portadora de la isla SaPIbov1 (Tabla 0.4), indicando la implicación de esta proteína en la movilidad de la isla (Tormo-Más *et al.*, 2010). Además, la sobre-expresión de los genes *dut* de ambos fagos en una cepa lisogénica de *S. aureus* portadoras de SaPIbov1 provoca la inducción de la escisión y replicación de la isla (Tormo-Más *et al.*, 2010). La dUTPasa se une a la proteína represora de la isla StI permitiendo la expresión de los genes que controla la movilidad de la misma (Figura 0.5), según muestran ensayos de co-purificación de ambas proteínas (Tormo-Más *et al.*, 2010).

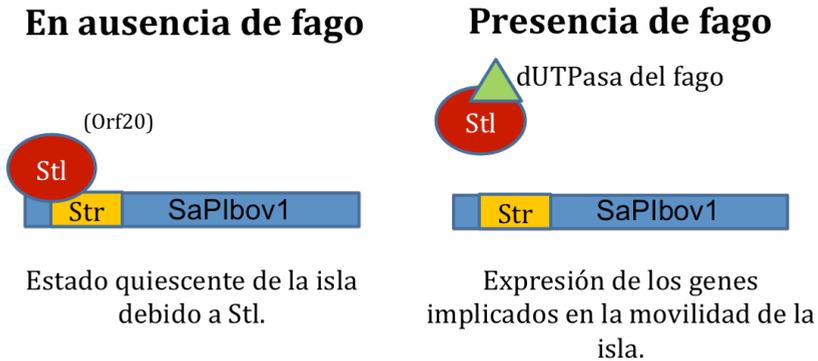


Figura 0.5. Modelo de activación de SaPIbov1 mediada por dUTPasas. En ausencia de fago, la isla SaPIbov1 se mantiene integrada en el cromosoma en un estado quiescente debido a la presencia del represor Stl (rojo). En presencia del fago ayudante, una proteína anti-represora del fago, que en el caso de SaPIbov1 es una dUTPasa (verde), se une a Stl des-reprimiendo a la isla y provocando la inducción de la expresión de los genes implicados en su transferencia.

El hecho de que las dUTPasas tengan como actividad enzimática básica la hidrólisis de dUTP (Vértessy and Tóth, 2009) y que por otra parte pueda llevar a cabo la inducción de islas de patogenicidad apoya la naturaleza *moonlighting* de estas enzimas, al menos para las dUTPasas codificadas por fagos de *S. aureus*. Pese a que por lo general las dUTPasas son proteínas que están bien caracterizadas a nivel estructural y funcional en lo relativo a su actividad catalítica, nada es conocido acerca de los mecanismos a través de los cuales estas proteínas llevan a cabo su actividad *moonlighting*.

3. dUTPasas

3.1 Papel de las dUTPasas en la célula

Las dUTPasas (dUTP pirofosfatasas; Duts; EC 3.6.1.23) son las enzimas responsables de catalizar la hidrólisis del 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (dUTP) originando 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) y pirofosfato inorgánico (PPi) como productos de la reacción (Figura 0.6) (Bertani *et al.*, 1961).

La primera Dut aislada fue por Bertani en el año 1961 a partir de extractos de *Escherichia coli* (Bertani *et al.*, 1961), pero no fue hasta 1962 cuando se encontró por primera vez el término dUTPasa en la bibliografía. El nombre a esta enzima fue acuñado por Greenberg y Somerville en su trabajo “Deoxyuridinetriphosphatase in *Escherichia coli*”. Esta enzima, además, parecía ser específica para dUTP ya que era incapaz de hidrolizar nucleótidos como dATP, dCTP, TTP, CTP o UTP (Greenberg and Somerville, 1962).

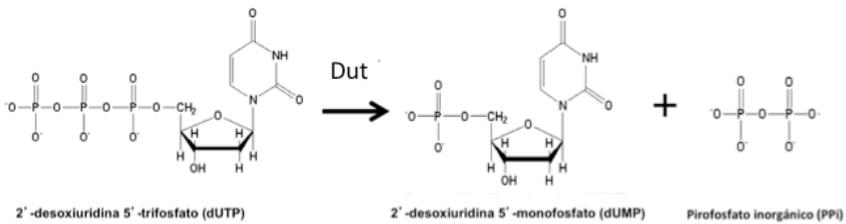


Figura 0.6. Esquema de la reacción catalizada por las Duts. La dUTPasa (Dut) cataliza la reacción de dUTP a dUMP y pirofosfato (PPi) en un único paso.

El dUTP es una molécula que se sintetiza continuamente a través de la ruta de síntesis de las pirimidinas por fosforilación del dUDP a dUTP o por desaminación del dCTP. A nivel estructural, el dUTP y el dTTP son prácticamente idénticos y se diferencian únicamente por un grupo metilo posicionado en el carbono cinco de la timidina (Figura 0.7). Esto hace que la mayoría de ADN polimerasas sean incapaces de diferenciar entre ambos nucleótidos pudiendo incorporar el dUTP al ADN durante la replicación u otros procesos que impliquen el copiado del ADN (Bessman *et al.*, 1958; Vértessy and Tóth, 2009).

INTRODUCCIÓN

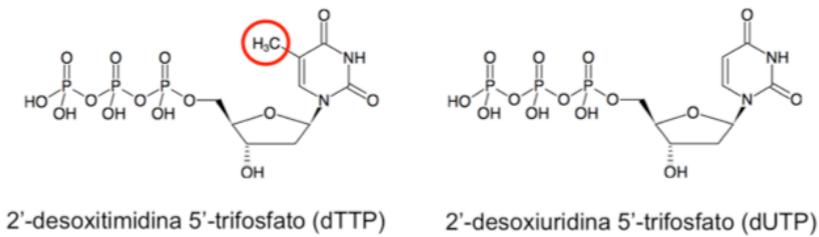


Figura 0.7. Esquema de la composición química del dTTP y dUTP. A diferencia del dTTP, el dUTP carece del grupo metilo (círculo rojo) presente en el C5 del anillo de pirimidina de la timidina.

Una de las fuentes más comunes de formación de uracilo es la desaminación de citosinas. El cambio de desoxicitosina a desoxiuracilo en el ADN por desaminación es uno de los mecanismos más frecuentes de mutación y debido a ello, las células han adoptado un mecanismo para evitar la presencia de uracilo en el ADN que se conoce como la ruta reparadora por escisión de base (BER, *Base Excision Repair*) (Figura 0.8). La uracilo N-glicosilasa (UNG) se encarga del primer paso del ciclo rompiendo el enlace entre el anillo de pirimidina y el resto de la molécula. Los pasos llevados por las dos siguientes enzimas del ciclo, AP-endonucleasa y 5'-fosfodiesterasa, dejan libre los extremos 5'-fosfato y 3'-OH que serán utilizados por la ADN polimerasa para introducir el desoxinucleótido correcto (dTTP o dCTP). Una vez el desoxinucleótido está incorporado, la ADN ligasa vuelve a enlazar el 5'-P de este con el 3'-OH que quedaba libre, cerrando de nuevo la cadena de ADN (Seeberg *et al.*, 1995; Vértessy and Tóth, 2009).

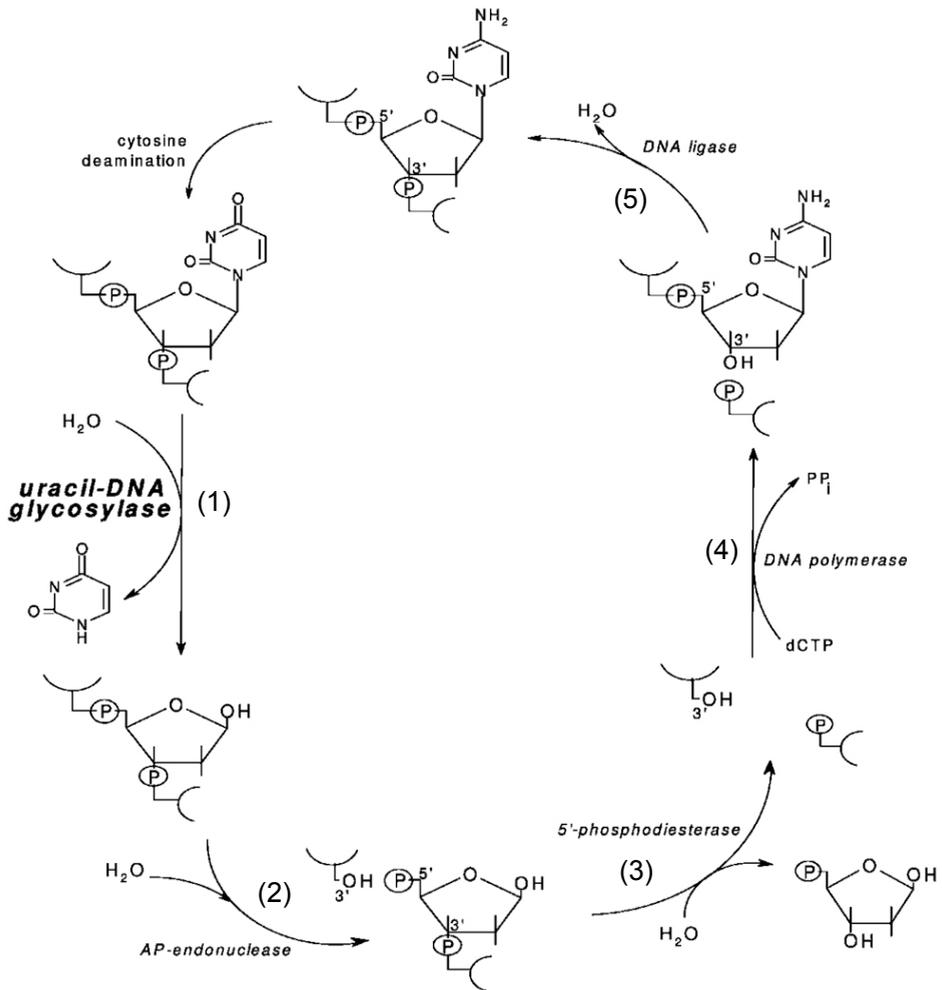


Figura 0.8. Esquema de la ruta de reparación por escisión. Cuando se produce una mutación en el ADN de citosina a uracilo por un proceso de desaminación, la ruta de reparación BER evita que dicha mutación perdure en el ADN. La ruta implica 5 pasos llevados a cabo por 5 enzimas diferentes: (1) uracil-ADN glicosilasa, (2) AP-endonucleasa, (3) 5'-fosfodiesterasa, (4) ADN polimerasa y (5) ADN ligasa (tomada de Vértessy and Tóth, 2009).

¿Qué función tiene la Dut? Clásicamente a la Dut se le ha atribuido la función de regular los niveles de dUTP intracelular (Vértessy and Tóth, 2009). Aunque existe un mecanismo mediante el cual la introducción de desoxiuracilo en el ADN puede ser reparado, la introducción masiva

INTRODUCCIÓN

de uracilo llevaría a la saturación del sistema BER provocando múltiples puntos de rotura de la doble hélice y la consiguiente muerte celular (Vértessy and Tóth, 2009). En este sentido, la Dut juega un papel fundamental manteniendo los niveles de dUTP intracelular bajos e impidiendo de esta forma que este nucleótido se incorpore al ADN (Figura 0.9). Además, la actividad catalítica genera dUMP como producto que sirve como precursor del dTTP, aumentando la ratio dTTP/dUTP en pro a la incorporación de dTTP por parte de la ADN polimerasa frente a la del dUTP. Además, en bacterias del género *Mycobacteria* y *Plasmodia*, la Dut es fundamental ya que forma parte de la única vía de obtención de dTTP para la célula (Vértessy and Tóth, 2009). Esta función es esencial, tal y como se ha probado en organismos procariotas y eucariotas como: *Escherichia coli* (Kouzminova and Kuzminov, 2004), *Saccharomyces cerevisiae* (Tchigvintsev *et al.*, 2011) o células cancerígenas (Koehler and Ladner, 2004).

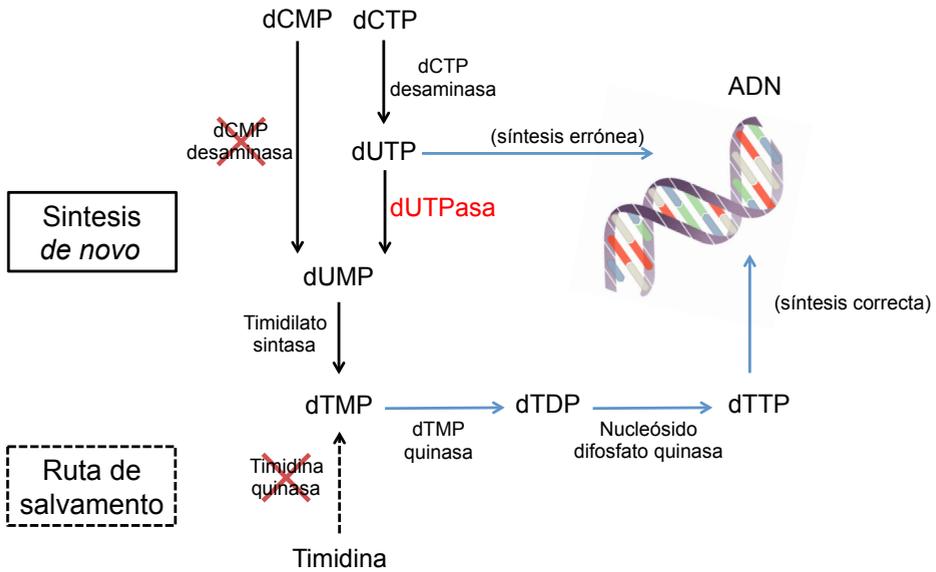


Figura 0.9. Papel de la Dut en la célula. El esquema muestra la doble función de la dUTPasa (resaltada con color rojo). La ruta de síntesis de dTMP de *de novo* está marcada con flechas negras sólidas, mientras que la ruta de salvamento para el dTMP está marcada con flechas negras discontinuas. La incorporación del desoxiuracilo durante la síntesis de ADN se evita de manera directa hidrolizando el dUTP dando lugar a dUMP; o de manera indirecta ya que el dUMP sirve como precursor para la síntesis de dTTP. Las enzimas ausentes en *Mycobacteria* y *Plasmodia* aparecen tachadas. El papel de la dUTPasa en *Mycobacteria* y *Plasmodia* es esencial para la obtención de dTTP, haciendo la vía de la dUTPasa la única ruta disponible para la obtención de este nucleótido (adaptada de Vértessy and Tóth, 2009).

3.2 Clasificación de dUTPasas

Las Duts son enzimas ubicuas. El gen *dut* que codifica para esta enzima se ha encontrado tanto en arqueas, organismos procariontas y eucariotas, como en virus de ADN (herpes virus, poxvirus o bacteriófagos) o de ARN incluyendo retrovirus (Baldo and McClure, 1999). Aunque las Duts son ubicuas, no todos los organismos presentan el mismo tipo de Dut. En función de su estado de oligomerización las Duts se han dividido en tres familias: monoméricas, diméricas y triméricas. Estructuralmente, las Duts monoméricas y triméricas son más similares entre sí, presentando ambas un plegamiento donde priman

INTRODUCCIÓN

casi exclusivamente las hebras β . Por el contrario, las Duts diméricas tan solo presentan hélices α en su plegamiento (Figura 0.10).

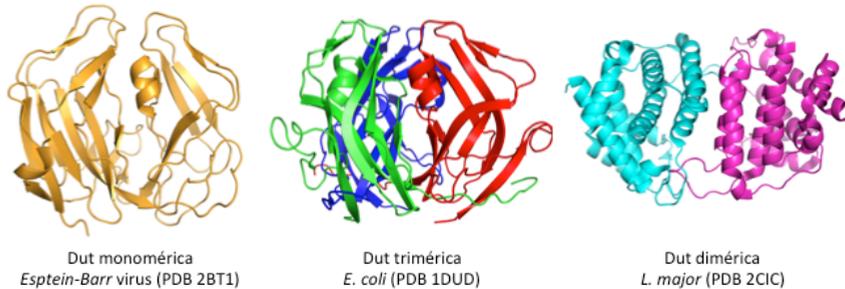


Figura 0.10. Estado oligomérico y elementos secundarios de las tres familias de Duts. El organismo y el código PDB de las estructuras aparecen situado debajo de cada una de las figuras mostradas. Cada uno de los monómeros de las diferentes familias se encuentra representado por un color: monomérica (naranja), trimérica (verde, rojo y azul) y dimérica (cian y morado). Mientras que las Duts monoméricas y triméricas están compuestas mayormente por hebras β , en el caso de las diméricas lo están por hélices α .

3.2.1 dUTPasas triméricas

Las Duts triméricas representan el grupo más abundante al que pertenece la mayoría de las Duts procariotas, eucariotas y un gran número de las víricas (Barabás *et al.*, 2013).

A nivel de secuencia, las Duts triméricas presentan cinco motivos consenso (I-V) altamente conservados repartidos a lo largo de la secuencia, destacando el motivo III que contiene el aspártico catalítico, conservado en todas ellas (Figura 0.11) (McGeoch, 1990; Vértessy and Tóth, 2009).

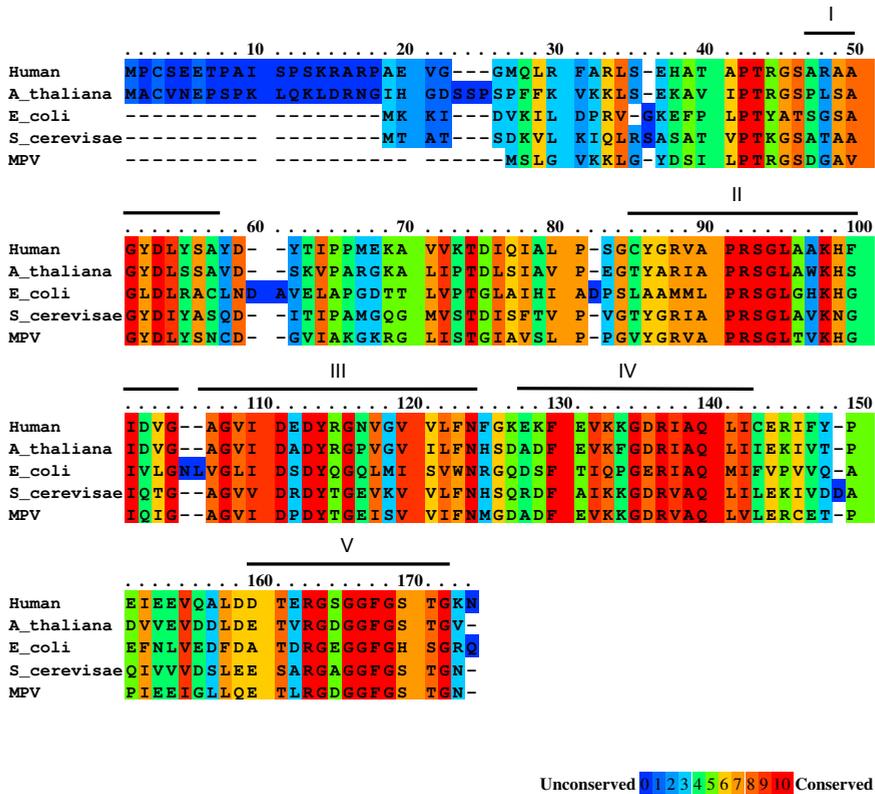


Figura 0.11. Alineamiento de secuencia de Duts triméricas de diferentes organismos y motivos consenso. Se han alineado las secuencias de cinco Duts triméricas de diferentes organismos: eucariotas, procariotas y virus. La figura muestra el grado de conservación de los diferentes amino ácidos: desde rojo (altamente conservado) hasta azul (no conservado). Los cinco motivos consenso para esta familia de Duts están representados con números romanos (I-V) y delimitados por una línea negra continua.

Esta familia ha sido caracterizada profundamente a nivel estructural, habiéndose resuelto la estructura tridimensional de las Duts triméricas de casi 30 organismos desde la resolución de la estructura de *E. coli* en 1992 (Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1992). El repertorio de estructuras conocidas incluyen ejemplos de virus como el de la inmunodeficiencia felina (FIV) (Prasad *et al.*, 1996) o el retrovirus de la anemia infecciosa equina (EIAV) (Dauter *et al.*, 1999); bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* (Chan *et al.*,

INTRODUCCIÓN

2004) o *Bacillus subtilis* (García-Nafría *et al.*, 2013); plantas como *Arabidopsis thaliana*; o la Dut humana (Mol *et al.*, 1996).

Todas estas Duts muestran una estructura cuaternaria de la proteína muy conservada. Cada una de ellas está formada por la interacción de tres monómeros idénticos. El cuerpo central de cada uno de los monómeros lo componen siete hebras β que se asocian en dos láminas β formando una estructura similar a la de un barril β . El cuerpo central se complementa con dos hebras β anti-paralelas que se sitúan separadas del barril, una sola hélice α , de cuatro a siete aminoácidos de longitud, y un largo extremo C-terminal que se proyecta hacia el exterior desde el cuerpo central del monómero (Figura 0.12) (Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1992).

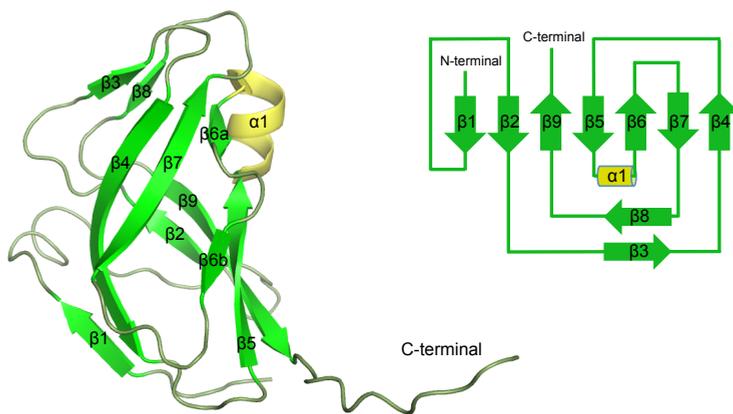


Figura 0.12. Representación de un monómero de la Dut trimérica de *E. coli*. La Dut de *E. coli* (PDB 1EUW) está compuesta por tres monómeros idénticos. **(Izquierda)** Estructura de uno de los monómeros compuesto por nueve hebras β (verde) y una única hélice α que forman el cuerpo central desde el que se proyecta el extremo C-terminal. **(Derecha)** Diagrama en 2D de la estructura donde las hebras β están representadas mediante flechas de color verde y la hélice α mediante un cilindro de color amarillo.

Estas tres subunidades se asocian a lo largo de un eje central de simetría tipo tres para originar el trímero, el cual presenta una forma piramidal. El

trímero es altamente estable gracias a las interacciones entre las tres subunidades que se dan 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 (Figura 0.13) (Persson *et al.*, 2001).

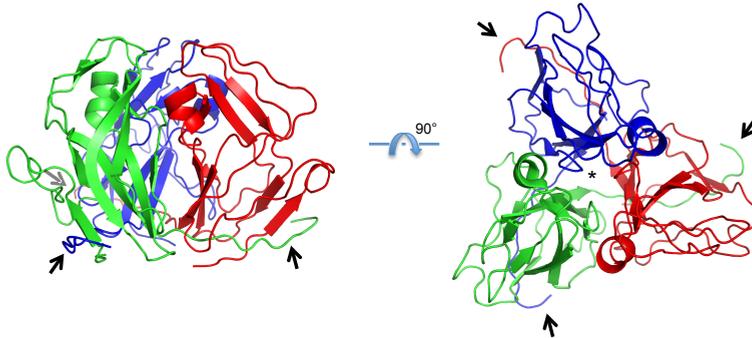


Figura 0.13. Estructura de la Dut trimérica de *E. coli*. La Dut de *E.coli* (PDB 1EUW) está formada por la interacción de tres monómeros idénticos (representados en verde, rojo y azul) que se agrupan formando un canal justo en el eje de simetría de la molécula (indicado con una estrella negra). El extremo C-terminal de cada uno de los monómeros está indicado mediante una flecha negra.

3.2.1.1 Centro activo

Las Duts triméricas presentan tres centros activos idénticos generados en la interfase entre subunidades y que implican los cinco motivos consenso (McGeoch, 1990; Vértessy and Tóth, 2009). De estos cinco motivos consenso, cuatro son aportados por dos subunidades adyacentes: una subunidad aporta los motivos I, II y IV mientras que la segunda subunidad aporta el motivo III. La tercera subunidad, que es la que se encuentra más distante del centro activo, aporta el motivo V que corresponde al extremo C-terminal, el cual actúa a modo de tapadera que cubre el centro activo y alterna los estadios abierto/cerrado durante el proceso catalítico (García-Nafría *et al.*, 2013; Vértessy *et al.*, 1998). De hecho, el motivo V es muy flexible y solo se ha observado ordenado en un número limitado de estructuras tridimensionales,

INTRODUCCIÓN

todas ellas resultas en presencias de nucleótido como: la Dut de *M. tuberculosis* en presencia del análogo no hidrolizable del dUTP, dUpNHpp unido a Mg^{2+} (Varga *et al.*, 2008); la Dut del virus FIV en presencia de dUDP (Prasad *et al.*, 2000); la Dut humana en presencia de dUMP, dUDP y dUTP (Varga *et al.*, 2007); o la Dut de *S. cerevisiae* en presencia de dUMP (Tchigvintsev *et al.*, 2011).

El dUTP se debe acomodar en el centro activo de la enzima de la forma correcta para que se pueda llevar a cabo la reacción de hidrólisis. Las interacciones entre el sustrato y la enzima son cruciales para dar especificidad discriminando el dUTP del reservorio de nucleótidos y posicionar el nucleótido en una conformación catalíticamente competente, que en el caso de las Duts triméricas corresponde a la conformación *gauche* (Kovári *et al.*, 2008; Varga *et al.*, 2007). En este sentido, los motivos consenso y los aminoácidos conservados dentro de estos motivos juegan un papel crucial (Figura 0.14).

El motivo III adopta una conformación de horquilla β que juega un papel crucial en el reconocimiento del dUTP frente a otras dos desoxipirimidinas: dCTP y dTTP. El uracilo interacciona con la cadena principal de este elemento estructural mediante cuatro puentes de hidrógeno y además con una molécula de agua conservada. La citosina, por el contrario, formaría un patrón de enlaces más débiles, dado que el uracilo forma un puente de hidrógeno a través del N3 de su anillo protonado con un el oxígeno de un grupo carbonilo de la cadena principal. La exclusión de la timina es por impedimentos estéricos; la horquilla β deja un espacio muy estrecho donde el grupo 5'-metilo de la timina chocaría con la cadena principal (Figura 0.14) (García-Nafría *et al.*, 2010).

Otro punto crítico es diferenciar el dUTP del UTP. La diferencia entre ambos reside en la presencia de un grupo -OH en posición C2' del anillo de la ribosa en el caso del UTP. Las Duts son capaces de diferenciar entre

ambos azúcares gracias a una tirosina altamente conservada en el motivo III. El anillo de esta tirosina se posiciona sobre el anillo de la desoxirribosa. Además, una isoleucina cercana a la posición C2' de la desoxirribosa ayuda, junto a la tirosina, a posicionar correctamente el anillo sobre la azúcar. Este empaquetamiento de la tirosina y la isoleucina hacen que se excluya estéricamente el UTP frente al dUTP, ya que el grupo hidroxilo de la ribosa entraría dentro del radio de las fuerzas de *Van der Waals* creada por los átomos de la cadena lateral de la tirosina. Además de estas interacciones, la desoxirribosa interacciona a través de su grupo 3'-hidroxilo con el aspártico conservado en el motivo III responsable del proceso catalítico (Figura 0.14) (Persson *et al.*, 2001).

Mientras que las interacciones con el anillo de uracilo y la ribosa están muy bien caracterizadas, las interacciones con los fosfatos no lo están tanto. Los fosfatos pueden adoptar diferentes conformaciones, *trans* y *gauche*, pero solamente la conformación *gauche* es la catalíticamente competente. Las interacciones de los grupos fosfatos con residuos de los motivos II, IV y V; y la presencia de un Mg^{2+} son necesarios para adoptar esta conformación *gauche* (Figura 0.14) (García-Nafría *et al.*, 2013; Kovári *et al.*, 2008).

En las Duts humana, del FIV, del EIAV o de *Bacillus subtilis* los motivos II y IV mantienen interacciones con los fosfatos tanto del dUTP como del dUDP (García-Nafría *et al.*, 2010). El fosfato en posición α mantiene interacciones con una serina conservada tanto en Duts triméricas como monoméricas (Chan *et al.*, 2004) situada al principio de la hélice α del motivo II. Se cree que esta serina juega un papel fundamental durante el proceso catalítico estabilizando las formas transitorias de la reacción (Palmén *et al.*, 2008). Esta misma serina, junto con el aminoácido básico que la precede, que suele ser una arginina o una lisina, interaccionan con el fosfato en posición β . Por último, el fosfato en

INTRODUCCIÓN

posición γ es estabilizado por interacciones con la arginina o lisina que preceden a la serina conservada (Figura 0.14).

El motivo V mantiene interacciones a través de la cadena lateral de una arginina conservada y a través de la cadena principal con el fosfato en posición α (Persson *et al.*, 2001). El motivo V es un motivo flexible debido a la presencia de glicinas. Este motivo en secuencia recuerda mucho a algunos motivos descritos en proteínas que interaccionan con grupos fosfato, como es el caso de los *P-loops* (Prasad *et al.*, 2001). Un residuo aromático conservado, que sitúa su anillo sobre el anillo de uracilo, ayuda a ordenar y estabilizar el motivo V (García-Nafría *et al.*, 2013). Al igual que en los *P-loops*, al final del motivo V suele encontrarse una serina o treonina que participa en la coordinación del ión metálico.

La actividad de hidrólisis del dUTP requiere de la presencia de un ión metálico divalente y se ha postulado que sea el Mg^{2+} (Larsson *et al.*, 1996). Este ión divalente coordina un oxígeno de cada uno de los tres fosfatos además de tres moléculas de agua, disponiendo el sustrato en conformación *gauche*, conformación necesaria para que se pueda llevar a cabo la hidrólisis (Kovári *et al.*, 2008). Para la coordinación del átomo de Mg^{2+} el motivo I juega un papel fundamental, como se ha observado en la estructura de la Dut de *M. tuberculosis* (PDB 1SIX) (Chan *et al.*, 2004), donde la presencia de dos aspárticos, Asp24 y Asp28, participan en la coordinación del metal divalente a través de puentes de hidrógeno establecidos mediante moléculas de agua. Además, el Asp24 presenta interacciones con la cadena lateral de la Arg148 cuya cadena lateral interacciona con el grupo γ -fosfato, grupo con el que también interacciona el Asp28, lo que implica a ambos aspárticos en la correcta ordenación del ligando (Figura 0.14).

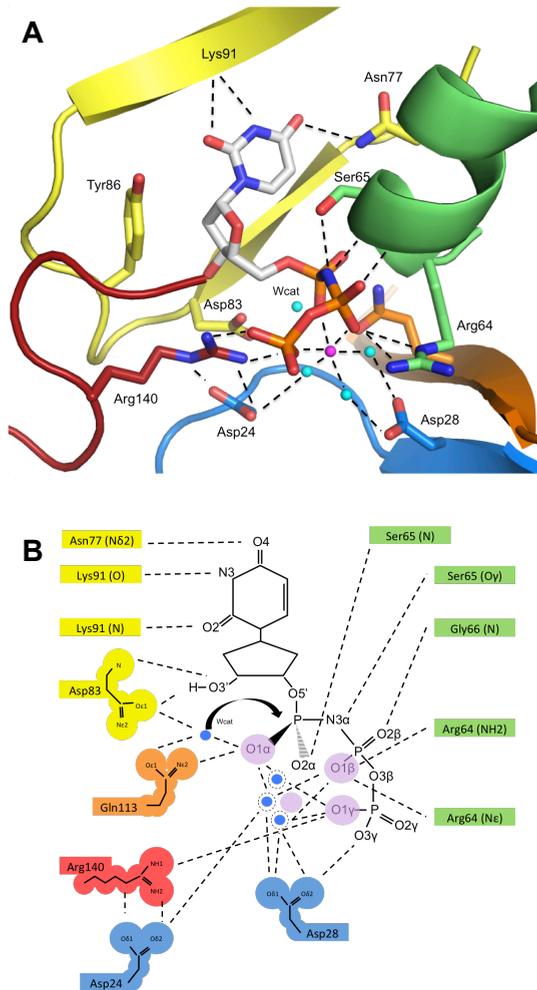


Figura 0.14. Esquema de las interacciones entre centro activo y ligando. Las figuras muestran las interacciones entre el centro activo de la Dut de *M. tuberculosis* (PDB 1SIX) y el análogo no hidrolizable del dUTP, dUpNHpp. Cada uno de los cinco motivos que participan en el centro activo está representado mediante colores: motivo I (azul), motivo II (verde), motivo III (amarillo), motivo IV (naranja) y motivo V (rojo). Las moléculas de agua están indicadas en color cian incluyendo el agua responsable del ataque nucleofílico (Wcat). El átomo de magnesio se encuentra indicado con color morado. Las interacciones entre los diferentes elementos se representan mediante líneas negras discontinuas. **(A)** Las cadenas laterales de los principales residuos que mantienen interacciones con el dUpNHpp se muestran como *sticks* coloreados según el átomo (rojo oxígeno, azul nitrógeno). **(B)** Los círculos con líneas discontinuas indican los puentes de hidrógeno establecidos entre las tres moléculas de agua que a su vez están coordinadas con el átomo de magnesio. En color morado se indica los oxígenos correspondientes a los grupos fosfatos del dUpNHpp coordinados con el magnesio (adaptada de Chan *et al.*, 2004).

3.2.1.2 Mecanismo de hidrólisis

Como se ha descrito, en cada uno de los centros activos de la enzima están involucrados los cinco motivos consenso de las Duts triméricas. Además, los aminoácidos que participan en la unión y en el proceso de hidrólisis del dUTP están altamente conservados en todas las especies (Barabás *et al.*, 2013; Vértessy and Tóth, 2009). Por este motivo, se piensa que el mecanismo de hidrólisis del dUTP debería ser similar para todas las Duts triméricas.

La hidrólisis tiene lugar mediante un ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que se posiciona en línea al fosfato α del dUTP y que se coordina con un aspártico conservado del motivo III, conocido como aspártico catalítico. Este aspártico actúa como base polarizando al agua que ataca al fosfato α (Barabás *et al.*, 2013; García-Nafría *et al.*, 2013; Vértessy and Tóth, 2009).

Se propone que el proceso de hidrólisis implica cuatro etapas (Tóth *et al.*, 2007): (i) una rápida unión del sustrato, (ii) posicionar el sustrato en orientación *gauche*, catalíticamente competente, (iii) la hidrólisis del sustrato y (iv) una rápida liberación de los productos de la reacción.

Se piensa que el motivo V juega un papel fundamental durante el proceso de hidrólisis. En la mayoría de estructuras este motivo no es visible, entendiéndose que está desordenado. Pero en aquellas estructuras donde es visible lo es solamente cuando el centro activo está ocupado por algún sustrato y, además, es el único cambio conformacional que se aprecia respecto a la forma apo de la enzima.

Durante la fase de unión del sustrato, el extremo C-terminal se encontraría desordenado y el dUTP se acomodaría dentro del centro activo, donde el ión magnesio ayudaría a orientar los fosfatos en una conformación *gauche*. Se piensa que el extremo C-terminal se ordenaría en la siguiente etapa de la

reacción. La correcta ordenación del motivo V es necesaria para el proceso de catálisis y en este aspecto tanto las glicinas como la fenilalanina, o en su defecto una histidina, que queda situada sobre el anillo de uracilo, presentes en este motivo juegan un papel muy importante. Este motivo tapa el centro activo después de la unión del sustrato adoptando una conformación que acomoda el fosfato en posición γ del dUTP y generando unas condiciones en el centro activo que facilitan el ataque nucleofílico por parte de la molécula de agua (García-Nafría *et al.*, 2013; Vértessy *et al.*, 1998; Vértessy and Tóth, 2009). La etapa de hidrólisis se iniciaría mediante la activación de la molécula de agua por parte del aspártico catalítico. Como se ha mencionado, esta molécula de agua atacaría nucleofílicamente el fosfato en posición α hidrolizando el dUTP a dUMP y pirofosfato inorgánico. En la última etapa de la reacción, el extremo C-terminal volvería a desordenarse facilitando la salida de los productos de la reacción y dejando libre el centro activo para un nuevo ciclo catalítico.

Como se ha visto, el Mg^{2+} juega un papel fundamental en el proceso de posicionar el sustrato en la orientación correcta para su hidrólisis. Pero además, este ión una vez producida la hidrólisis rompe la coordinación con el fosfato α , quedándose coordinado al pirofosfato inorgánico ayudando a disminuir la afinidad de la enzima por los productos generados (Vértessy and Tóth, 2009).

3.2.2 dUTPasas monoméricas

Las Duts monoméricas conservan los cinco motivos consenso de las Duts triméricas. No obstante, estos se encuentran presentes reordenados a lo largo de la cadena polipeptídica de forma diferente a como se encuentran en las Duts triméricas; proponiéndose que esta familia de Duts surgió posiblemente como resultado de procesos 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).

INTRODUCCIÓN

A este grupo pertenecen las Duts de virus de la familia *Herpesviridae* de mamíferos y aves como el caso del HSV-1 y HSV-2 (*Herpes Simplex Virus type 1 y 2*) o el *Epstein-Barr virus* (EBV) (Caradonna and Adamkiewicz, 1984; Caradonna and Cheng, 1981; McGeehan *et al.*, 2001; Wohlrab and Francke, 1980; Wohlrab *et al.*, 1982).

Estas Duts adoptan, a nivel estructural, un plegamiento que emula a las Duts triméricas (Tarbouriech *et al.*, 2005). Como muestra la estructura de la Dut del EBV, prototipo de las Duts monoméricas, la enzima presenta tres dominios que ocuparían cada uno de ellos la posición de cada uno de los monómeros en las Duts triméricas (Figura 0.15). Mientras que cada uno de los dos primeros dominios adoptan una estructura muy similar al cuerpo central de los monómeros en Duts triméricas, el tercer dominio adopta una estructura completamente diferente en la que solamente existe una homología de secuencia en el extremo C-terminal con el motivo V de las Duts triméricas (Tarbouriech *et al.*, 2005).

Estos tres dominios albergan los cinco motivos consenso conservados y los disponen a nivel espacial de forma análoga a lo observado en la estructura de las Duts triméricas (Figura 0.15), configurando un único centro activo con un mecanismo de hidrólisis y constantes catalíticas similares a los de las Duts triméricas (Freeman *et al.*, 2009; Tarbouriech *et al.*, 2005). Mientras que los motivos I, II y IV son aportados por uno de los dominios, el motivo III es aportado por el segundo dominio y el motivo V por el tercero de los dominios. Las estructuras publicadas de la Dut del EBV, en presencia de dUMP y de dUpNHpp, (PDBs 2BSY y 2BT1 respectivamente) (Tarbouriech *et al.*, 2005) han mostrado que la mayoría de las interacciones que existen en las Duts triméricas entre proteína y ligando están conservadas en Duts monoméricas, incluyendo aquellas que participan en la especificidad del sustrato y en

mantener una orientación *gauche* del grupo trifosfato, además de la presencia de un átomo de Mg^{2+} en el centro activo.

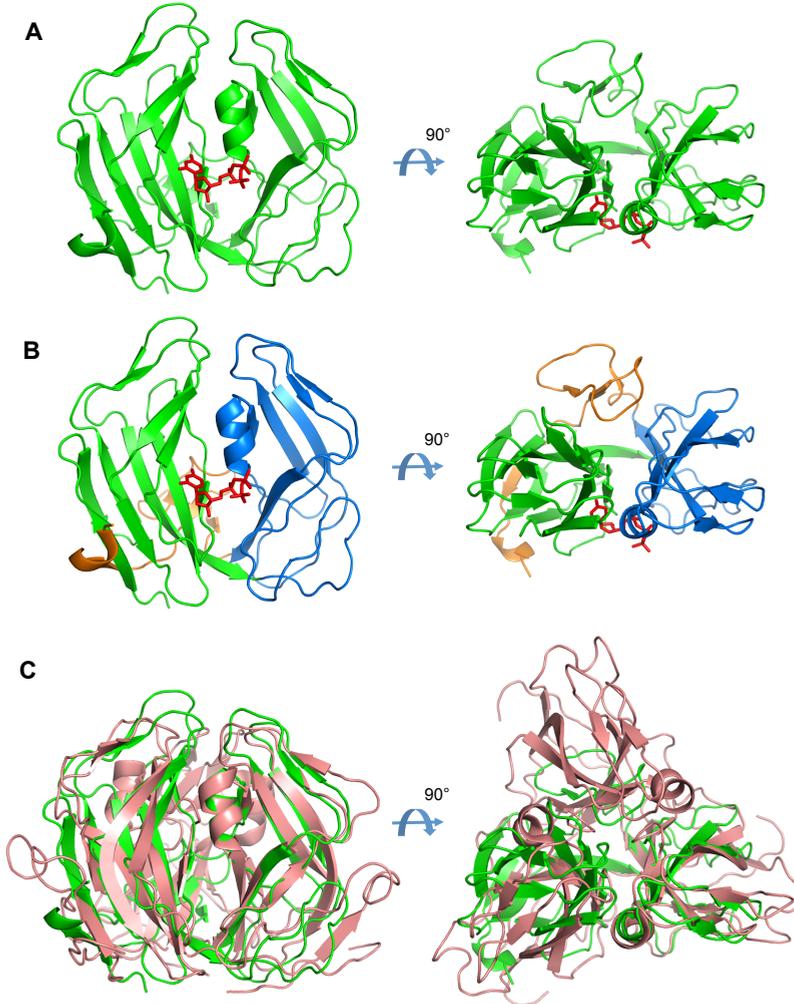


Figura 0.15. Estructura de la Dut del Epstein-Barr virus. (A) Vista lateral y superior de la Dut monomérica del Epstein-Barr virus (EBV) (PDB 2BT1) unida a dUpNHpp (sticks color rojo). La Dut del EBV está formada únicamente por un monómero (verde) con un único centro activo. (B) Vista de los tres dominios del monómero de la Dut del EBV (verde, azul y naranja). 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. (C) Superposición de la Dut monomérica del EBV (verde) y la Dut trimérica de *E. coli* (PDB 1EUW) (rojo pálido) en la misma orientación que (A) y (B).

INTRODUCCIÓN

El mecanismo enzimático es similar al descrito para las Duts triméricas. El motivo V parece contribuir en la hidrólisis del dUTP de la misma manera a través de una fenilalanina y una arginina que serían equivalentes a las de las Duts triméricas. La hidrólisis del dUTP se da por el ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que se coordina con un aspártico (Asp76 en la Dut del EBV) sobre el fosfato α , al igual que ocurre en Duts triméricas. No obstante, la correcta coordinación de este aspártico y el agua catalítica parece depender de cambios conformacionales que afectan a la parte inicial del motivo I, al contrario que en las Duts triméricas donde no se observan cambios conformacionales asociados a la unión del nucleótido en este motivo (Tarbouriech *et al.*, 2005).

3.2.3 dUTPasas diméricas

Las Duts diméricas, al contrario que las Duts monoméricas, no guardan ningún tipo de homología con la Duts triméricas. A nivel de secuencia, las Duts diméricas no presentan los cinco motivos consenso presentes en triméricas y monoméricas (Bernier-Villamor *et al.*, 2002) y esto se ve reflejado a nivel estructural, ya que no guardan similitud con las otras dos familias de Duts.

A fecha de hoy, en la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org>) hay publicadas 876 secuencias de Duts diméricas que pertenecen a 693 especies que incluyen bacterias, organismos eucariotas, arqueas y virus; siendo las Duts de parásitos como *Leishmania major*, *Trypanosomoma cruzi* y *Campylobacter jejuni* los prototipos de esta familia (Harkiolaki *et al.*, 2004; Hemsworth *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2004).

A nivel de secuencia, las Duts diméricas guardan entre ellas cierta homología ya que presentan cinco motivos conservados, totalmente diferentes a los de las Duts triméricas, que conforman el centro activo de la enzima (Figura 0.16) (Harkiolaki *et al.*, 2004; Moroz *et al.*, 2004). Estructuralmente, estas Duts

INTRODUCCIÓN

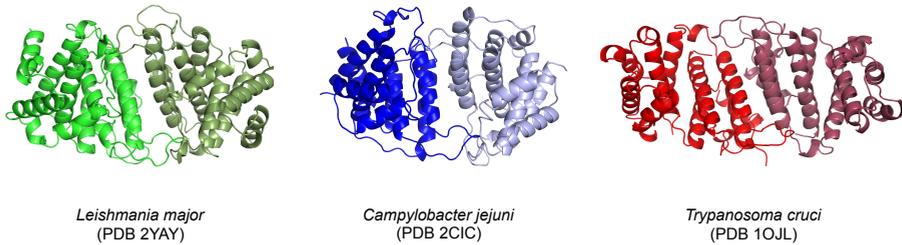


Figura 0.17. Estructura de Duts diméricas. La figura muestra la estructura de las Duts diméricas de tres organismos: *Leishmania major* (PDB 2YAY), *Campylobacter jejuni* (PDB 2CIC) y *Trypanosoma cruzi* (PDB 1OJL). Cada dímero está coloreado con un color diferente: *L. major* (verde), *C. jejuni* (azul) y *T. cruzi* (rojo) y cada uno de sus monómeros en diferentes tonalidades del color correspondiente. La estructura global de estas Duts es muy similar en todas con una composición mayoritaria de hélices α .

Las Duts diméricas presentan dos centros activos situados en el espacio entre el dominio rígido y móvil de cada una de las subunidades y posicionados en la misma cara del dímero. Mientras el estado relajado es una posición del dímero abierta, en presencia de ligando el dímero pasa a una conformación cerrada a través de cambios conformacionales que implican a los dominios móviles de cada uno de los monómeros (Figura 0.18) (Harkiolaki *et al.*, 2001).

Otra diferencia entre las Duts diméricas y las Duts monoméricas o triméricas reside en el mecanismo de hidrólisis. Mientras que las Duts monoméricas y triméricas presentan una alta especificidad por el dUTP como sustratos, las diméricas pueden utilizar también el dUDP como sustrato de la reacción, un potente inhibidor de las Duts monoméricas y triméricas (Camacho *et al.*, 2000; Hidalgo-Zarco *et al.*, 2001). Además, mientras que en las triméricas la hidrólisis del dUTP es dependiente de un ión de magnesio y de un aspártico catalítico responsable de activar la molécula de agua que realiza el ataque nucleofílico sobre el fosfato en posición α , en el caso de las diméricas la hidrólisis tanto del dUTP como del dUDP parece ser dependiente de la

presencia de dos iones de magnesio, de los cuales uno jugaría el mismo papel que el aspártico de las triméricas activando una molécula de agua, que en este caso realizaría el ataque sobre el fosfato en posición β (Figura 0.19) (Hemsworth *et al.*, 2013).

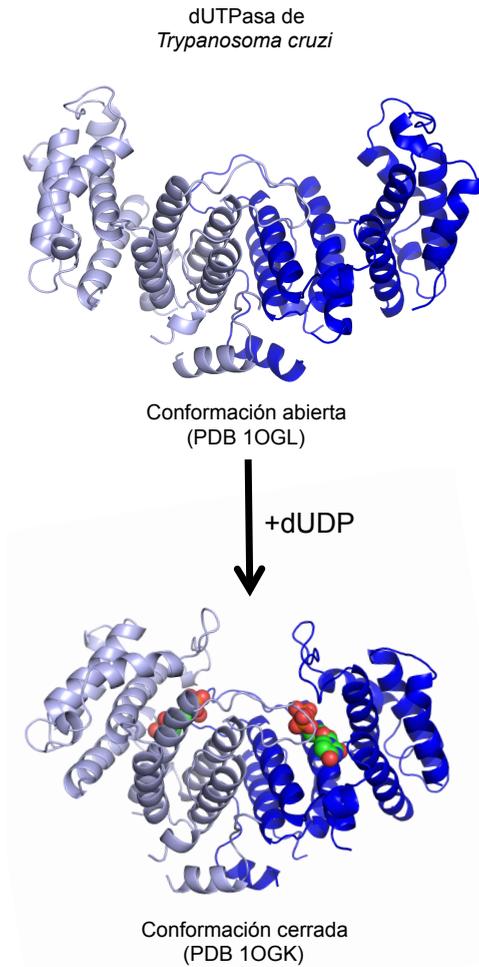


Figura 0.18. Modelo de hidrólisis de las Duts diméricas. La figura muestra la Dut de *Trypanosoma cruzi* (cada monómero representado en una tonalidad diferente de azul) en su forma apo (PDB 1OGL) o unida a dUDP (representado en esferas) (PDB 1OGK). Las Duts diméricas presentan dos centros activos. Mientras que la forma apo permanece en una conformación más relajada y abierta, la unión del dUDP provoca un cambio conformacional en los dominios móviles de ambos monómeros, dando lugar a una conformación más cerrada (adaptada de Harkiolaki *et al.*, 2001).

INTRODUCCIÓN

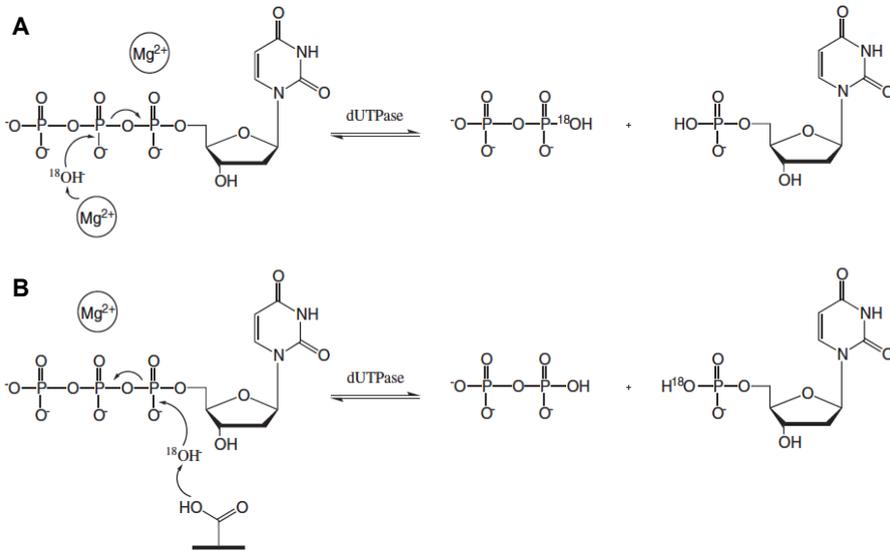


Figura 0.19. Diferencias entre los mecanismos de hidrólisis de las Duts dimericas y triméricas. (A) Modelo del mecanismo de hidrólisis en Duts dimericas. Se requieren dos átomos de magnesio de los cuales uno es el responsable de activar la molécula de agua que realiza el ataque nucleofílico sobre el fosfato en posición β . Esto hace posible que estas Duts puedan hidrolizar dUDP además del dUTP. (B) Modelo del mecanismo de hidrólisis en Duts triméricas. Se requiere un átomo de magnesio. Un aspártico conservado en el centro activo es el responsable de activar la molécula de agua que realiza el ataque nucleofílico sobre el fosfato en posición α . Esto hace que estas Duts solamente puedan hidrolizar dUTP (tomada de Hemsworth *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es el de abordar, desde el punto de vista estructural, el mecanismo de señalización de las dUTPasas utilizando como modelo de estudio las dUTPasas codificadas por fagos de *Staphylococcus aureus*. Este objetivo se pretende abordar a través de los siguiente puntos:

- El estudio funcional y estructural de las dUTPasas triméricas codificadas por fagos de *Staphylococcus aureus* en relación a su capacidad de inducir la movilidad de islas de patogenicidad de *S. aureus* mediante su interacción directa al represor general de la isla, la proteína StI.
- La elaboración de un modelo generalizado de señalización que permita explicar la capacidad *moonlighting* de las dUTPasas presentes en otros organismos, desde virus a organismos procariotas y eucariotas.
- El estudio funcional y estructural de la capacidad señalizadora de dUTPasas diméricas codificadas por fagos de *S. aureus* y su capacidad para inducir la movilidad de islas de patogenicidad de *S. aureus*.

CAPÍTULO

1.

Las dUTPasas de fagos controlan la transferencia de genes de virulencia a través de un mecanismo similar al de las proteínas G protooncogénicas

Contribución personal

Recientemente, se ha descrito la actividad *moonlighting* de las dUTPasas (Dut) codificadas por fagos de *Staphylococcus aureus* induciendo la transferencia de islas de patogenicidad. Esta función se debe a la interacción entre la Dut y el represor de la isla, la proteína StI, que permite la expresión de los genes implicados en el ciclo biológico de la isla.

En este capítulo se aborda el estudio del mecanismo molecular de la interacción entre Dut y el represor StI codificado por la isla. En concreto, y utilizando como modelo de estudio las Duts triméricas codificadas por fagos, hemos descrito el mecanismo a través del cual estas proteínas son capaces de inducir la transferencia de las islas de patogenicidad de *S. aureus*. Dicho mecanismo es homólogo al descrito para las proteínas G de eucariotas: un mecanismo con dos estados conformacionales (encendido/apagado) dependiente de la unión de un nucleótido (dUTP en el caso de las Duts), que controla el paso entre los dos estados.

El mecanismo que en este capítulo proponemos, abre la posibilidad al novedoso papel *moonlighting* de las Duts como moléculas señalizadoras y del dUTP como segundo mensajero.

Mi contribución en este capítulo ha sido la caracterización estructural y enzimática tanto de la forma salvaje como de los mutantes (D81A, D81N, Y84A, Y84I, Y84F, Δ V y D81A C-C) de la Dut codificada por el fago ϕ 80 α de *S. aureus*. Para ello ha sido necesario la sobre-expresión de las proteínas; el uso de diferentes técnicas de purificación, que incluyen la cromatografía de afinidad y exclusión molecular; puesta a punto y uso de la microcalorimetría (ITC) para la medición de la afinidad de la unión entre las diferentes Duts por el dUMpNpp, un ligando análogo no hidrolizable del dUTP; puesta a punto y cuantificación de la actividad enzimática de las diferentes Duts; así como

la cristalización y resolución de las estructuras tridimensionales de ocho proteínas 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 (ESRF en Grenoble, Francia; y DLS en Oxford, Reino Unido) o en fuentes de rayos-X en el propio laboratorio (*in home*).

Los resultados obtenidos fueron publicados en 2013 en la revista *Molecular Cell* con la siguiente referencia:

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

Resumen

Las dUTPasas (Duts) recientemente han emergido como prometedoras moléculas reguladoras capaces de controlar procesos celulares relevantes. No obstante, el mecanismo que se esconde bajo estas funciones reguladoras aún está por esclarecer. Utilizando las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) como modelo, mostramos que las Duts codificadas por fagos inducen la transferencia de los factores de virulencia codificados en las SaPIs a través de un mecanismo de encendido/apagado (*on/off*) relacionado con las conformaciones activa (unida a dUTP) e inactiva (estado apo) de la enzima; conformaciones que se deben a la actividad intrínseca de la Dut. El análisis de los resultados obtenidos a partir de técnicas de cristalografía y de ensayos de mutagénesis, demuestran que la unión del dUTP causa la ordenación del extremo C-terminal o motivo V de las Duts codificadas por los fagos, un motivo similar al *P-loop* de proteínas que unen ATP o GTP, dando lugar a la conformación activa de la enzima necesaria para la inducción de la escisión, replicación y encapsidación de la SaPI. Por otra parte, la conversión a la conformación apo de la enzima, debido a la hidrólisis del dUTP, genera una forma de la proteína que no es capaz de inducir el ciclo de la SaPI. Debido a que ninguno de los requerimientos involucrados en la transferencia de las SaPIs por las Duts es exclusivo de las Duts codificadas por fagos de *S. aureus*, proponemos que las Duts son reguladores celulares ampliamente distribuidos entre organismos y que actúan de una manera análoga a las proteínas G protooncogénicas de organismos eucariotas.

Introducción

Preservar la integridad del ADN es de vital importancia para todos los organismos. El metabolismo celular constantemente genera nucleótidos trifosfato no canónicos como dUTP, dITP, dXTP, 8-oxo-dGTP o 2-oxo-dATP; los cuáles se originan por oxidación, desaminación u otras modificaciones a partir de nucleótidos canónicos. La incorporación de nucleótidos no canónicos en el ADN origina un incremento de la mutagénesis y una saturación de los sistemas de reparación por escisión del ADN, dando lugar a múltiples roturas de la doble hélice y la consiguiente muerte celular. De entre los nucleótidos no canónicos, el dUTP es el más común, el cual se sintetiza de forma continua en la ruta de biosíntesis de pirimidinas por fosforilación del dUDP o por desaminación del dCTP (Vértessy and Tóth, 2009). La mayoría de las ADN polimerasas son incapaces de diferenciar entre la timina y el uracilo (a excepción de algunas enzimas de arqueas), por lo que la cantidad de dUTP o dTTP que se va a incorporar al ADN depende de la concentración relativa de estos nucleótidos en la célula. Los genomas de todos los organismos y de muchos virus codifican para la enzima dUTPasa (dUTP pirofosfatasa; Dut; EC 3.6.1.23), que hidroliza el dUTP dando lugar a dUMP y pirofosfato jugando un papel clave para prevenir la incorporación errónea del uracilo en el ADN (Vértessy and Tóth, 2009). Por ello, tradicionalmente, se ha asumido que las Duts son esenciales para la integridad del ADN y para la viabilidad de organismos eucariotas y procariotas como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, tripanosomas y células cancerígenas humanas (Koehler and Ladner, 2004; Kouzminova and Kuzminov, 2004; Tchigvintsev *et al.*, 2011; Whittingham *et al.*, 2005).

No obstante, estudios recientes, usando modelos completamente diferentes, han servido para eliminar el dogma del efecto deletéreo de la uracilación del ADN. La desaminación de la citosina para dar uracilo por parte de la

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

desaminasa activada por inducción (*activation-induced deaminase* o AID) es esencial para generar la diversidad en los genes de la inmunoglobulina (Maul and Gearhart, 2010; Petersen-Mahrt *et al.*, 2002). Por otra parte, lejos de ser peligroso, la uracilación del ADN del VIH en las fases tempranas del ciclo de vida del virus le confiere ventaja inhibiendo la autointegración del virus (Yan *et al.*, 2011). Finalmente, recientemente se ha demostrado que *Drosophila melanogaster* tolera altos niveles de uracilo en el ADN durante algunos estadios de su desarrollo, sugiriendo un nuevo papel del ADN con contenido de uracilo en la metamorfosis de *Drosophila* (Muha *et al.*, 2012). Si asumimos que la uracilación del ADN es beneficiosa en algunos procesos biológicos, y como la Dut está presente en todos estos escenarios; se puede especular con el hecho que estas enzimas tengan funciones adicionales en la célula.

Muchos virus (incluyendo herpes-virus, poxvirus, retrovirus y bacteriófagos) codifican para la proteína Dut. No deja de ser intrigante el por qué estos virus codifican una enzima que va a estar presente en todos sus hospedadores, ya sean eucariotas o procariotas. Estudios recientes apoyan la hipótesis de que las Duts codificadas por virus puedan actuar como proteínas multifuncionales (*moonlighting*) con diferentes funciones reguladoras. Así, la Dut del *Epstein-Barr virus* (EBV) activa la expresión de NF- κ B produciendo una disregulación del sistema inmunitario del hospedador como consecuencia de la unión de la Dut a los receptores celulares TLR-2 (*Toll-like receptor 2*) (Ariza *et al.*, 2009; Glaser *et al.*, 2006). El mismo receptor es la diana para la Dut del retrovirus endógeno humano K (*human endogenous retrovirus K*, HERV-K), la cual se ha visto como potencial contribuidora en la fisiopatología de la psoriasis (Ariza and Williams, 2011). De la misma manera, Leang y colaboradores demostraron que la expresión de la Dut viral del MHV-68 es esencial para el proceso de infección ya que bloquea la cascada

de señalización para la expresión del interferón tipo I, un proceso que no depende de la actividad enzimática intrínseca de la Dut del virus MHV-68 (Leang *et al.*, 2011). Finalmente, se ha descrito que la Dut del virus del sarcoma de Kaposi regula negativamente la respuesta inmune mediante la unión a algunos receptores de citoquinas, un proceso que no depende de la actividad enzimática de la proteína (Madrid and Ganem, 2012).

En un trabajo previo, Tormo-Más y colaboradores demostraron que las Duts tienen funciones reguladoras que involucran a estas proteína en el control de la transferencia de diferentes islas de patogenicidad en *Staphylococcus aureus* (SaPIs) (Tormo-Más *et al.*, 2010). Las SaPIs son islas de patogenicidad de estafilococos que se encuentran relacionadas con los fagos y que son portadoras y distribuidoras de superantígenos y otros genes de virulencia como la toxina responsable del shock tóxico o la enterotoxina B (Novick *et al.*, 2010). Las SaPIs se encuentran ampliamente distribuidas entre los estafilococos y son responsables de al menos una enfermedad humana grave: el síndrome de shock tóxico menstrual. En ausencia de un fago ayudante, las SaPIs residen pasivamente integradas en el cromosoma del hospedador, bajo el control de Stl, un represor global de la isla codificado por la propia SaPI (Ubeda *et al.*, 2008). Después de una infección o mediante inducción del fago ayudante, las SaPIs se escinden, se replican en gran número, y se encapsidan en partículas similares a los fagos producidas por las proteínas que forman los viriones de los fagos, dando lugar a partículas con una alta tasa de transferencia tanto inter- como intra-específicas (Chen and Novick, 2009; Maiques *et al.*, 2007). Sorprendentemente, las proteínas inductoras para un conjunto de islas de patogenicidad clínicamente relevantes (entre las que se incluyen el prototipo SaPI_{bov1}, SaPI_{bov5}, SaPI_{ov1} y SaPI_{S0385}) son las Duts codificadas por sus fagos ayudantes, las cuales se unen al represor Stl codificado por la isla actuando como anti-represor (Tormo-Más *et al.*, 2010). No obstante, cómo la

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

proteína Dut del fago interacciona con el represor StI codificado por la isla aún se desconoce.

En este capítulo, utilizando como modelo la Dut codificada por el fago 80 α de *S. aureus* (Dut80 α), describimos cómo las Duts codificadas por los fagos controlan la transferencia de SaPIs mediante una innovadora y sorprendente estrategia que involucra a estas proteínas en procesos de señalización celular. Más concretamente, demostramos que adicional a los cinco motivos consenso presentes en todas las Duts triméricas, las Duts codificadas por fagos de estafilococos presentan una región extra (que hemos llamado motivo VI) involucrada en la unión a StI y por consiguiente en la inducción del ciclo de las SaPIs. Este dominio o motivo extra, aunque es necesario, no es suficiente para inducir el ciclo de la SaPI. Las Duts controlan la transferencia de las SaPIs alternando entre las conformaciones activa (con dUTP unida) e inactiva (forma apo) de la proteína, una conversión catalizada por la actividad intrínseca de la propia enzima.

Tal como se ha publicado para las proteínas G protooncogénicas, proponemos que las Duts tienen un estado activo cuando el dUTP está unido que les permite interactuar con determinadas dianas de forma específica. La hidrólisis del dUTP unido, debida a la actividad intrínseca de la Dut, origina un cambio conformacional hacia una conformación más relajada que como consecuencia tiene la pérdida de la unión con dicha diana y una regulación negativa de la actividad inductora de la Dut devolviendo a esta a un estado de descanso (forma apo). Estos resultados, al igual que los publicados previamente para el dUTP (Williams *et al.*, 2011) y otros nucleótidos, apoyan un papel emergente del dUTP como segundo mensajero.

Material y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo están listadas en las Tablas S1.3 y S1.4. Los procedimientos para la preparación y el análisis de los lisados de fagos, así como de transducción y transformación de *S. aureus*, se llevaron a cabo como están descritos previamente (Tormo-Más *et al.*, 2010).

Métodos de ADN

Las manipulaciones generales de ADN se realizaron utilizando los procedimientos estándares. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio están listados en la Tabla S1.5. El marcaje de las sondas y la hibridación del ADN fueron llevados a cabo acorde al protocolo facilitado por la casa comercial *PCR-DIG DNA-labelling and Chemiluminescent Detection Kit* (Roche).

Para la producción de las mutaciones en el gen *dut*, se utilizó el plásmido pMAD, procedimiento previamente descrito (Tormo-Más *et al.*, 2010).

Constructos en plásmidos

Los constructos en plásmidos se prepararon mediante clonación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) utilizando las secuencias de oligonucleótidos como cebadores listados en la Tabla S1.5.

Inducción de islas de patogenicidad

Las proteínas Duts para los ensayos en *S. aureus* fueron expresadas en *S. aureus* con CdCl₂ bajo las condiciones inductoras del promotor *Pcad* en el vector de expresión pCN51, procedimiento previamente descrito (Tormo-Más *et al.*, 2010).

Ensayos enzimáticos

Los ensayos β -lactamasa, utilizando *Nitrocefin* como sustrato, fueron realizados como se describe previamente (Tormo-Más *et al.*, 2010). Los valores

CAPÍTULO 1: MATERIAL Y MÉTODOS

de las actividades β -lactamasa fueron registrados como el valor inicial de la pendiente obtenido del ensayo dividido por la densidad de células (V_{\max}/OD_{650}).

Los ensayos de actividad enzimática de las Duts fueron realizados utilizando el *EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit* (Molecular Probes) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

Ensayos de microcalorimetría isotérmica de titulación (ITC)

Los ensayos de ITC se realizaron para evaluar las constantes de disociación de Dut80 α y sus mutantes frente al dUMP Npp (Jena Bioscience). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C con concentraciones de proteínas entre 20 mM y 30 mM, y concentraciones entre 150 mM y 400 mM para el nucleótido en tampón 25 mM Tris y pH 8.0. Las reacciones se realizaron utilizando el instrumento *AUTO ITC Instrument Microcal Auto-iTC200*. La integración, la corrección y el análisis de los datos se realizaron utilizando el programa *Origin 7* (Microcal) aplicando como modelo para el ajuste de datos un único sitio de unión.

Expresión y purificación de las proteínas Dut80 α y mutantes

Las proteínas con cola de histidinas fueron producidas utilizando las cepas de expresión de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) transformadas con el correspondiente gen clonado en el vector pET-28a (Novagen).

Las proteínas se sobre-expresaron en *E. coli* creciendo las células a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 33 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina hasta alcanzar una densidad óptica $OD_{600}=0.5-0.6$ e induciendo la expresión con 1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 3 h a 37 °C. Las células fueron recogidas mediante centrifugación a 3500 g eliminando el sobrenadante.

Para la purificación, los pellets fueron resuspendidos en tampón A (100 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl) suplementado con 1 mM de fluoruro de

fenilmetilosulfonilo (PMSF). Las células fueron lisadas mediante sonicación y el lisado fue centrifugado 30 min a 25000 g. La fracción soluble fue cargada en una columna de afinidad *His-Trap HP* (GE Healthcare) equilibrada previamente con tampón A. La resina de la columna se lavó con tampón A suplementado con 10 mM de imidazol y las proteínas fueron eluidas con tampón A suplementado con 350 mM de imidazol.

Después de comprobar la pureza de las diferentes fracciones mediante gel SDS/PAGE, las fracciones que contenían las Duts fueron concentradas y cargadas en la columna de exclusión molecular *Superdex S200* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón A. Las fracciones recogidas fueron analizadas por SDS/PAGE; y las fracciones más puras fueron concentradas y congeladas a -80 °C.

Cristalización, obtención de datos y construcción del modelo estructural

Los cristales se obtuvieron a 21 °C mediante cristalización por difusión de vapor en gota sentada. Tanto la forma *wild-type* como los mutantes de Dut80 α (6-9 mg/ml) en presencia de 5 mM de dUMpNpp (Jena Bioscience) y 10 mM de MgCl₂ fueron cristalizadas en condiciones con 2-6% *tert*-butanol, 0.1 M Tris pH 8.5 y 30-50% 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) o 30-50% polietilén glicol (PEG) 400 como agente precipitante. Los cristales de la forma apo de Dut80 α se obtuvieron en condiciones similares pero en ausencia de nucleótido. Los cristales se congelaron directamente en N₂ líquido y la difracción con rayos-X fue llevada a cabo a 100 K haciendo uso de los sincrotrones ESRF, DLS así como el difractor *Supernova X-ray microsource* (Agilent). Todos los cristales de Dut80 α difractados pertenecen al grupo espacial P2₁3 y presentan celdas de tamaños muy parecidos con un monómero en la unidad asimétrica (Tabla 1.1). El modelo final de la forma apo de Dut80 α se obtuvo después de repetitivos ciclos de construcción y afinado haciendo uso de los programas Coot y Refmac5 del interfaz CCP4 (Emsley *et al.*, 2010; Winn *et al.*,

CAPÍTULO 1: MATERIAL Y MÉTODOS

2011). Las fases se obtuvieron por reemplazo molecular utilizando la Dut humana como modelo inicial de búsqueda (PDB 2HQJ). La estructura de la forma apo de Dut80 α fue utilizada como modelo inicial para la construcción y afinado del resto de estructuras.

	Dut80 α^{wt} dUMpNpp	Dut80 α^{wt} Apo	Dut80 α^{D81A} dUMpNpp	Dut80 α^{D81N} dUMpNpp	Dut80 α^{Y84I}	Dut80 α^{Y84A} dUMpNpp	Dut80 α^{Y84F} dUMpNpp	Dut80 $\alpha^{D81A-CC}$ dUMP
Data Collection								
Beamline	ESRF-ID23.1	DLS-I04-1	DLS-I04-1	DLS-I04-1	DLS-I04-1	DLS-I04-1	In home	ESRF-ID23.2
Wavelength (Å)	0.9334	0.9173	0.9334	0.9334	0.9795	0.9795	1.54	0.8726
Space group	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3
Cell dimensions (Å)	a=88.66	a=87.37	a=87.12	a=87.21	a=87.18	a=87.47	a=88.24	a=87.46
Resolution (Å) ^a	44.3-2.8 (2.95-2.8)	50.4-2.9 (3.06-2.9)	50.3-2.9 (3.06-2.9)	50.4-3.0 (3.16-3.0)	61.7-3.1 (3.27-3.1)	61.0-3.1 (3.27-3.1)	14.9-3.0 (3.16-3.0)	39.11-2.60 (2.74-2.60)
Unique reflections	5949 (849)	5142 (744)	5103 (722)	4611 (666)	4199 (601)	4224 (600)	4719 (682)	7102 (1028)
Completeness (%)	99.9 (100)	100 (100)	99.9 (100)	99.7 (100)	99.9 (100)	99.7 (100)	98.5 (100)	99.9 (100)
Multiplicity	6.1	9.2	8.1	7.4	5.2	5.3	4.4	5.7
i/ σ (i)	11.2 (2.1)	8.7 (1.9)	6.8 (2.1)	7.6 (2.2)	6.8 (2.6)	8.2 (2.4)	7.5 (2.3)	23.2 (3.9)
R merge	0.067 (0.375)	0.080 (0.402)	0.068 (0.352)	0.083 (0.333)	0.084 (0.295)	0.062 (0.326)	0.166 (0.348)	0.047 (0.403)
Refinement								
R _{work}	0.217	0.212	0.242	0.230	0.232	0.240	0.222	0.224
R _{free}	0.264	0.252	0.275	0.285	0.278	0.291	0.277	0.273
Number of atoms								
Protein	1317	1238	1177	1244	1234	1279	1316	1329
Ligand	28	-	28	28	-	28	28	20
Water	67	41	31	39	27	12	34	51
Others	8	18	2	3	2	3	3	2
Rmsd, bonds (Å)	0.0039	0.0046	0.0057	0.0051	0.0041	0.0041	0.0039	0.0046
Rmsd, angles (°)	1.021	0.8166	0.9960	0.9610	0.7825	0.9221	0.8581	0.8961
Ramachandran plot								
Preferred (%)	100	97.39	97.24	95.39	96.73	93.67	96.41	93.59
Allowed (%)		2.61	2.76	3.95	3.27	5.06	3.59	4.49

^aLos números entre paréntesis indican los valores para la celda de mayor resolución

Tabla 1.1. Estadísticas cristalográficas para el *wild-type* (WT) y los mutantes de la Dut80 α .

Resultados

La inducción de SaPIs depende de la conformación de la Dut

En un trabajo previo, se había demostrado que la expresión a partir de un vector plasmídico de la Dut del fago $\phi 11$ inducía el ciclo de la isla SaPIbov1 (Tormo-Más *et al.*, 2010). Más aún, el mismo grupo también había demostrado que la expresión del mutante catalíticamente inactivo D81A de la Dut del fago $\phi 11$ también era capaz de inducir SaPIbov1, indicando que la actividad dUTPasa *per se* no era responsable de la inducción de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2010). No obstante, un análisis más exhaustivo, ha mostrado que tanto las formas *wild-type* (WT) como los mutantes D81A de las Duts clonadas de los fagos $\phi 11$ y $\phi 71$ muestran la misma capacidad de inducir SaPIbov1 solamente cuando están sobre-expresadas; cuando los niveles de expresión son reducidos los mutantes *dut*^{D81A} no pueden inducir SaPIbov1, al contrario que las *dut*^{WT} que mantienen su capacidad inductora bajo estas mismas condiciones de expresión (Figura 1.1). Un ejemplo más drástico de este comportamiento se ha observado en un análisis de complementación utilizando el mutante D81A de la Dut del fago 80 α , el cual era incapaz de inducir SaPIbov1 incluso cuando se expresaba a niveles altos (Figura 1.1).

Estos resultados han sido confirmados *in vivo* generando una cepa lisogénica para el fago $\phi 80\alpha$ con la mutación D81A en el gen codificante para Dut en el propio genoma del fago. Como se esperaba, el fago que expresa el mutante D81A de Dut no induce la isla SaPIbov1 (Figura 1.2). Unos resultados similares se han obtenido para la isla SaPIbov5, la cual es también inducida por Dut80 α (Figura 1.2). Al ser los niveles de expresión para la cepa salvaje y para los mutantes D81A comparables en todos estos experimentos (Figuras 1.1 y 1.2), concluimos que las formas *wild-type* de las Duts son más efectivas en la inducción de las islas SaPIbov1 y SaPIbov5 que los mutantes D81A de estas Duts.

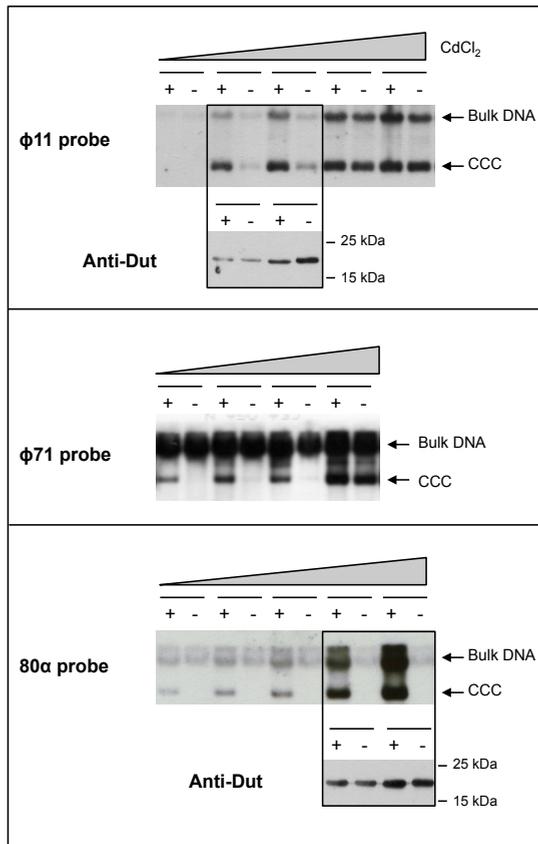


Figura 1.1. Inducción de SaPIbov1 por diferentes Duts codificadas por fagos. Escisión y replicación de SaPIbov1 después de la inducción con CdCl₂ de los alelos *dut* clonados (WT y D81A) de los fagos ϕ 11, ϕ 71 y ϕ 80 α . Una cepa no lisogénica de *S. aureus* portadora de SaPIbov1 fue complementada con un plásmido derivado de pCN51 capaz de inducir la proteína Dut fusionada a una cola 3xFLAG bajo las condiciones de inducción controladas por el promotor cadmio-dependiente *Pcad*. Un mililitro de cada uno de los cultivos (OD₅₄₀ = 0.3) fue tomado después de 2 horas de tratamiento con CdCl₂ (entre 0.05 a 2 mM) y utilizado para preparar minilizados estándares que fueron resueltos en gel 0.7% de agarosa y *southern blot* para la detección del ADN marcado mediante sonda de SaPIbov1. La banda superior "bulk DNA" corresponde a la cantidad total de ADN incluyendo el cromosomal, el del fago y el de la SaPI en fase de replicación. La banda CCC indica el ADN circular de la SaPI que se encuentra covalentemente cerrado y en fase de replicación. El panel inferior muestra la prueba de *western blot* realizada con el anticuerpo frente a la cola FLAG fusionada a las proteínas Dut. +, proteína WT; -, mutante D81A.

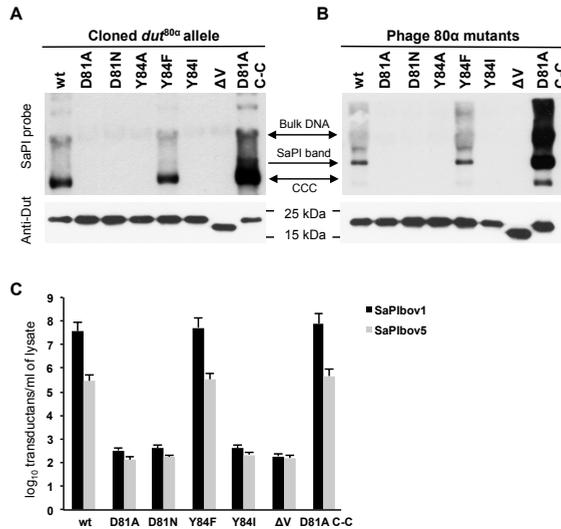


Figura 1.2. Efectos de las mutaciones en la Dut del fago $\phi 80\alpha$ sobre la replicación y transferencia de SaPIs. (A) Escisión y replicación de SaPIbov1 después de inducir los alelos clonados de *dut* del fago $\phi 80\alpha$. Una cepa no lisogénica derivada de la cepa RN4220 portadora de SaPIbov1 fue complementada con plásmidos derivados del pCN51 para la expresión de las diferentes Duts fusionadas a cola 3xFLAG. Un mililitro de cada uno de los cultivos ($OD_{540} = 0.3$) fue recogido después de 2 horas de tratamiento con 2 mM CdCl₂ y utilizado para preparar minilysados, los cuales fueron resueltos en gel 0.7% de agarosa del que se realizó *southern blot* para la detección del ADN marcado mediante sonda de SaPIbov1. La banda superior “bulk DNA” corresponde a la cantidad total de ADN incluyendo el cromosomal, el del fago y el de la SaPI en fase de replicación. La banda CCC indica el ADN circular de la SaPI que se encuentra covalentemente cerrado y en fase de replicación. En estos experimentos, realizados sin presencia de fago ayudante, el ADN de la SaPI escindido aparece como CCC y no como moléculas lineares, las cuales se observan debido a la inducción y posterior encapsidación mediada por el fago. El panel inferior muestra la prueba de *western blot* realizada con el anticuerpo frente a la cola FLAG fusionada a las proteínas Dut. (B) *Southern blot* de los lisados después de la inducción de los mutantes de $\phi 80\alpha$. Las muestras fueron apartadas durante 60 min después de la inducción con mitomicina C de las diferentes cepas lisogénicas *tst:tetM* portadoras de SaPIbov1. Las muestras fueron separadas en agarosa y utilizadas para la detección específica de SaPIbov1. La banda superior corresponde al “bulk DNA”. La banda intermedia corresponde a los monómeros lineares de SaPI liberados desde las cápsidas de los fagos. La banda más baja corresponde a la SaPI en forma de CCC. Como previamente se ha indicado, el panel inferior muestra la prueba de *western blot* realizada con el anticuerpo frente a la cola FLAG fusionada a las proteínas Dut. (C) La figura muestra el número de transductantes (\log_{10}) por mililitro de cultivo inducido, utilizando como aceptora la cepa RN4220. Se presenta la media de los resultados obtenidos para tres experimentos independientes. La frecuencia observada en los mutantes D81A, D81N, Y84I, y ΔV es típica de una transferencia por un mecanismo general de transducción y no específico de SaPIs.

¿Cómo se explica esta diferencia a nivel estructural? Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una posible explicación para la interacción Dut-Stl; las proteínas Dut presentan dos conformaciones con diferentes capacidades inductoras. Mientras que la conformación inductora de la SaPI debería corresponderse a la adoptada por las proteínas *wild-type*, la conformación no inductora debería corresponderse a la adoptada por los mutantes D81A.

La conformación adoptada por la Dut codificada por el fago $\phi 80\alpha$ con dUTP unido induce el ciclo de la SaPI

La posición equivalente a D81 en Dut80 α se encuentra ocupada por un aspártico catalítico que está estrictamente conservado en todas las Duts triméricas (Barabás *et al.*, 2004). Este residuo ácido, localiza y polariza una molécula de agua que es responsable de realizar el ataque nucleofílico en línea sobre el fosfato α durante la hidrólisis del dUTP (Barabás *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2004). Se ha descrito que la mutación conservadora D \rightarrow N en el residuo equivalente de la Dut humana perjudica la acomodación de esta molécula de agua, dando lugar a una enzima que tiene prácticamente nula actividad catalítica pero que mantiene la capacidad de unir el dUTP (Barabás *et al.*, 2004). Además, se ha predicho que este mutante debe presentar la región C-terminal (llamada motivo V en las Duts triméricas) desordenada, debido a que una correcta interacción entre el aspártico catalítico, la molécula de agua responsable del ataque nucleofílico y el dUTP es necesaria para la ordenación de este dominio en el caso de la Dut humana (Varga *et al.*, 2007).

De acuerdo con los resultados previamente publicados respecto a la Dut humana (Barabás *et al.*, 2004), los estudios de calorimetría y de actividad enzimática utilizando las proteínas purificadas Dut80 α ^{WT}, Dut80 α ^{D81A} y Dut80 α ^{D81N} confirman que los mutantes D81 presentan una diferencia en la capacidad de unir el dUTP, ligeramente reducida, respecto a los valores

obtenidos para la proteína *wild-type* (tres veces menor, Figura S1.1, Tabla S1.1) y que los mutantes D81 muestran una actividad hidrolítica extremadamente baja, no detectable en nuestros ensayos enzimáticos, cuando se comparan con la forma *wild-type* de Dut80 α (Tabla S1.1). Además, y como era de esperar, el mutante Dut80 α^{D81N} con el residuo catalítico D81 afectado es incapaz de inducir las islas SaPIbov1 o SaPIbov5 (Figura 1.2).

Estos resultados nos llevaron a formular la hipótesis de que las diferentes capacidades inductoras observadas para Dut80 α^{WT} y los mutantes D81 pudieran estar relacionadas con cambios conformacionales inducidos durante el proceso de unión del nucleótido. Para confirmar esta hipótesis, hemos resuelto las estructuras tanto de Dut80 α^{WT} en su forma apo como en presencia del análogo no hidrolizable del dUTP, α,β -imido-dUTP (dUMpNpp), con Mg $^{2+}$ a 2.9 Å y 2.8 Å de resolución respectivamente (Tabla 1.1). Estas dos conformaciones se corresponden a aquellas *in vivo*, ya que una vez hidrolizado el dUTP por parte de la Dut para dar dUMP y PPi, el producto de la hidrólisis se disocia rápidamente del centro activo (Vértessy and Tóth, 2009).

A nivel de estructura, la Dut80 α^{WT} presenta la organización típica de las Duts triméricas, con tres centros activos independientes, cada uno de los cuales está formado por la interacción de cinco motivos conservados (Figuras 1.3, 1.4 y S1.2). Las tres subunidades contribuyen a la formación del centro activo; los motivos I, II y IV de una de las subunidades contribuyen a la unión del grupo trifosfato del ligando, el motivo III de la subunidad adyacente está involucrado en la unión del nucleósido y aporta el aspártico catalítico (D81 en el caso de Dut80 α), mientras que el motivo V de la tercera subunidad, un motivo similar a los dominios *P-loop*, es el elemento que cubre el trifosfato del dUTP (Figuras 1.3, 1.4 y S1.2).

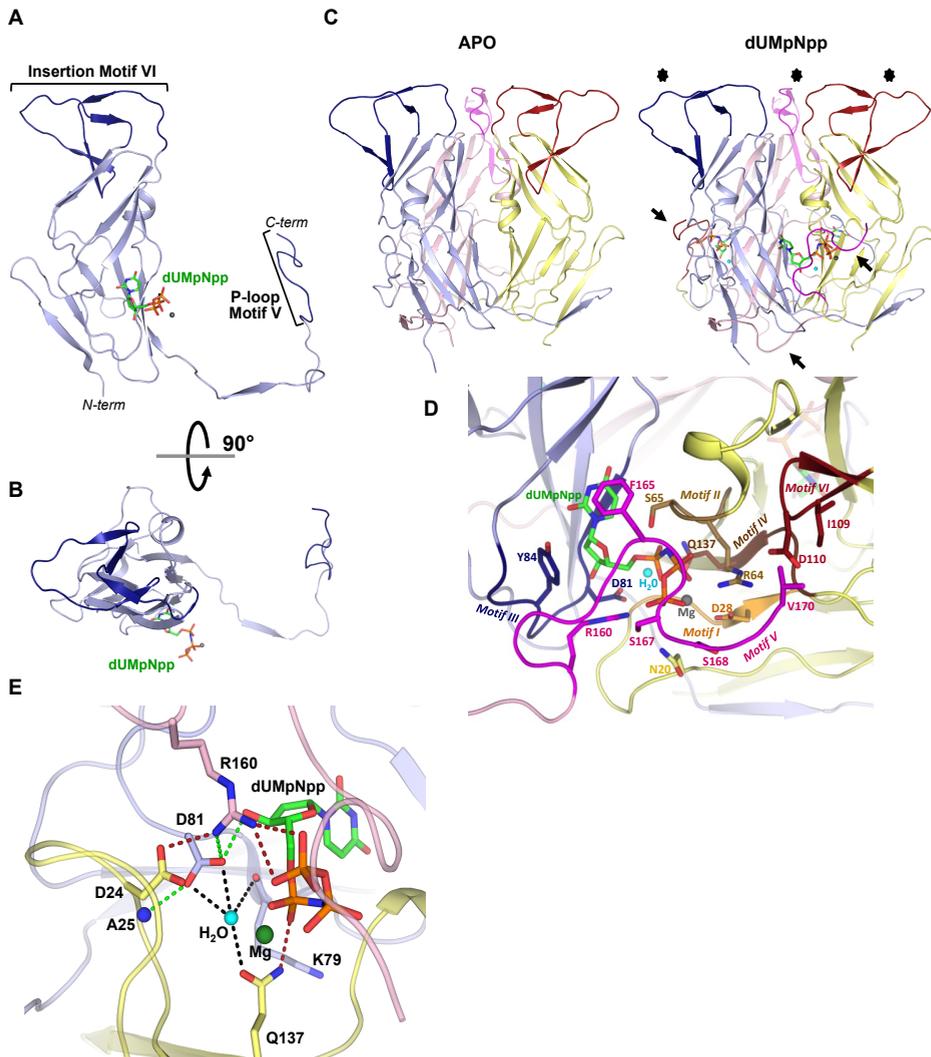


Figura 1.3. Estructuras de Dut80 α *wild-type* en sus conformaciones apo y con dUMpNpp unido. (A) Visión global de uno de los monómeros de Dut80 α que forman el trímero con dUMpNpp unido. La proteína se organiza alrededor del cuerpo central en forma de un barril β distorsionado desde el cual se proyectan el motivo V y VI (Motifs V y VI) (marcados). El nucleótido unido se muestra en forma de *stick* coloreado según el átomo (carbono, nitrógeno, oxígeno y fósforo en verde, azul, rojo y naranja respectivamente). (B) Visión del monómero en (A) girado 90 grados alrededor del eje horizontal. (C) Formas triméricas de Dut80 α apo y con dUMpNpp unido en la misma orientación que el monómero en (A) (monómeros en azul, amarillo y rosa). Ambas estructuras son virtualmente idénticas entre ellas (RMSD de 0.58 Å, Tabla S1.2) así como entre otro tipo de Duts (mirar Figura S1.4), con la excepción de la inserción característica (motivo VI) situada en la parte superior del trímero, resaltada con un color

más oscuro e indicada por una estrella negra en el trímero con dUMpNpp, que genera una superficie llana. En la forma con el nucleótido unido, cada uno de los centros activos contiene una molécula de dUMpNpp representada y coloreada como en (a). El **centro activo se encuentra cerrado por el motivo V C-terminal similar a los P-loop, resaltado con un color más oscuro e indicado por una flecha negra**, el cual solamente se ordena cuando el nucleótido se encuentra unido en una conformación catalítica competente (forma dUMpNpp). **(D)** Visión más de cerca del centro activo de la forma dUMpNpp. Los cinco motivos conservados (Motifs I, II, III, IV y V) en las Duts y el motivo adicional en Duts de fagos (Motif VI) están coloreados en tonos oscuros, y los residuos que interaccionan con el dUMpNpp se muestran como *sticks* con los átomos de carbono en el color correspondiente al motivo. El motivo V cubriendo el centro activo solamente es visible cuando la molécula de agua catalítica (esfera de color cian) se encuentra coordinada por D81 en una conformación catalítica competente. El ión de Mg quelado por el nucleótido se muestra como una esfera gris. **(E)** Vista cercana de la coordinación de la maquinaria catalítica del centro activo de Dut80 α . El agua nucleofílica (esfera cian) se posiciona para atacar el α -fosfato del dUTP (*sticks* con carbonos en verde) mediante una red de contactos directos e indirectos. Las líneas discontinuas indican los contactos y están coloreadas como contactos directos del agua nucleofílica (negro), contactos del D81 (verde) y contactos de otros residuos conservados (rojo oscuro). Los residuos se muestran como *sticks* coloreados acorde a su monómero y etiquetados. El Mg se encuentra representado como una esfera de color verde oscuro.

La Dut80 α ^{WT} contiene un motivo VI adicional (residuos 99-124; Figuras 1.3, 1.4 y S1.2) que corresponde a una región divergente no caracterizada que se encuentra presente en muchas de las Duts codificadas por fagos (Tormo-Más *et al.*, 2010), pero ausente en la Dut humana, la cual está relacionada estructuralmente con Dut80 α ^{WT} (Figura S1.3). Esta región se pliega en forma de L dando lugar a una horquilla β que, proyectándose lateralmente desde el borde de un canal característico situado en la superficie interna del trímero, se coloca sobre el cuerpo central de la molécula (Figuras 1.3, 1.4, S1.2 y S1.3). Dado que estudios previos habían demostrado que este motivo extra modula la afinidad de las diferentes Duts codificadas por fagos por el represor StI de SaPIbov1 (Tormo-Más *et al.*, 2010), pensábamos que el mecanismo mediante el cual la Dut reconoce StI debería estar mediado por las conformaciones alternativas que adoptaría esta región en función de la presencia del dUTP. Sorprendentemente este no es el caso. La superposición de las estructuras en forma apo y en presencia de nucleótido unido al centro activo de Dut80 α ^{WT} muestran que la conformación de este motivo extra se

CAPÍTULO 1: RESULTADOS

mantiene constante (Figuras 1.3, 1.4, S1.2 y S1.4). Aún más, ambas estructuras son prácticamente indistinguibles (RMSD de 0.58 Å para 154 residuos, Tabla S1.2), exceptuando el motivo V, el cual no es visible en la forma apo de la enzima (Figura 1.3, 1.4 y S1.2). Esta observación coincide con datos estructurales previos en otras Duts, que incluyen a Duts tanto procariotas como eucariotas, y las cuales demuestran que la unión del dUTP induce un cambio conformacional restringido al motivo V (Vértessy *et al.*, 1998), cuya ordenación correcta es esencial para el proceso de catálisis (Freeman *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2007). El motivo V tapa el centro activo cuando se une el ligando y es necesario para la discriminación del sustrato y la hidrólisis del dUTP pero no para la unión del nucleótido o la integridad de la estructura (Freeman *et al.*, 2009; Vértessy, 1997). Las interacciones entre los residuos del motivo V de Dut80 α con los fosfatos, el azúcar y la base del dUMpNpp confirman el papel de este elemento estructural en la unión y la discriminación del nucleótido (Figuras 1.3D y 1.3E). Además, el residuo conservado R160 del motivo V, el cuál es esencial para la hidrólisis del dUTP (Pecsi *et al.*, 2012), participa en la red de interacciones necesaria para localizar y activar la molécula de agua nucleofílica formando una interacción iónica con el Asp catalítico (Figura 1.3E). Esta red de interacciones también incluye puentes de hidrógeno entre la molécula de agua nucleofílica con el residuo conservado Q137 y con la cadena principal de la K79 (Figura 1.3E). Al igual que sucede en Dut80 α , el motivo V está desordenado en varias estructuras de Duts y aparece ordenado solamente en presencia de análogos no hidrolizables del dUTP (Varga *et al.*, 2007), sugiriendo que la ordenación del motivo V inducida por el dUTP podría ser la responsable del cambio conformacional que lleva a la unión entre Dut y Stl.

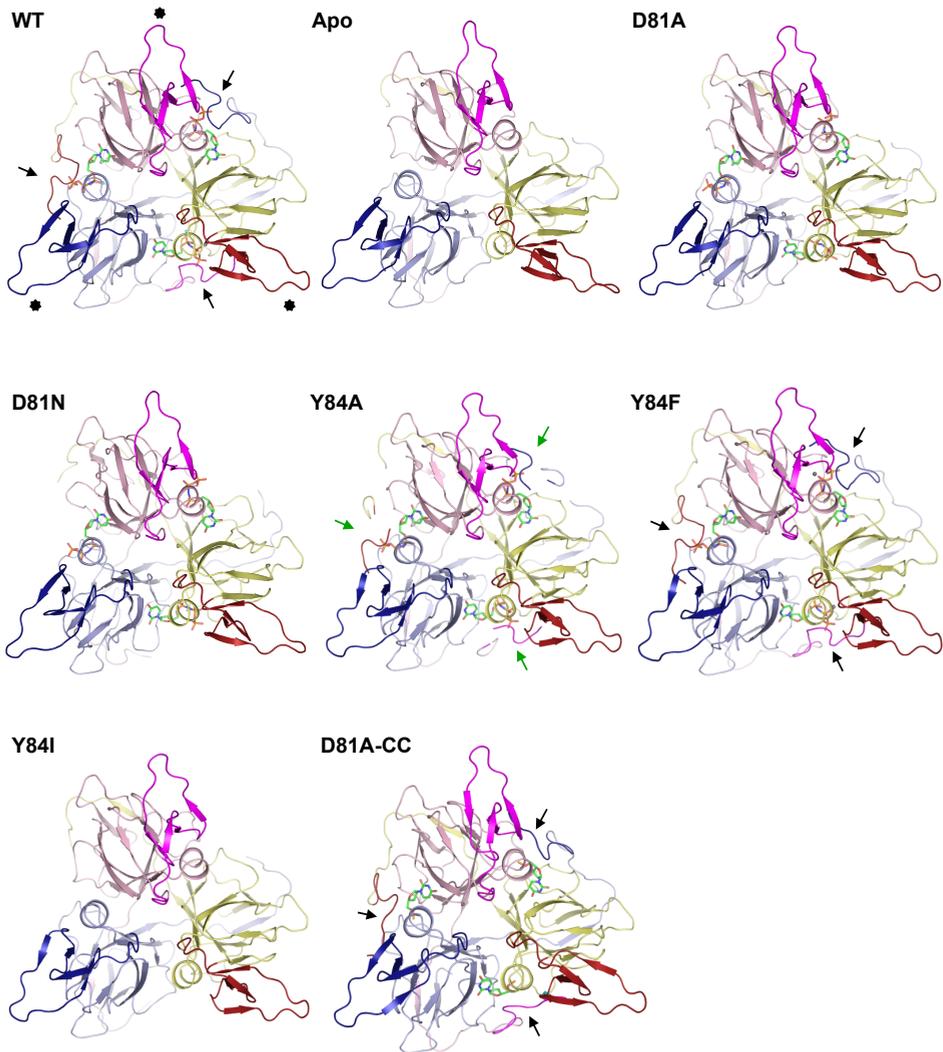


Figura 1.4. Motivos V y VI de la forma *wild-type* y mutantes de Dut80 α . Las estructuras de la forma *wild-type* (WT) y de los mutantes de Dut80 α son mostradas, vistas desde arriba, y coloreadas por monómeros. El motivo adicional (Motif VI), resaltado con un color más oscuro e indicado por una estrella negra en la estructura del WT, se encuentra conservado en todas las diferentes formas de la proteína independientemente de las mutaciones o de la presencia de nucleótidos. En estas estructuras, el motivo V similar a los *P-loop* (Motif V) se muestra resaltado con un color más oscuro y está marcado con flechas negras. La ordenación parcial del motivo V en el mutante Y84A está indicada con flechas verdes.

CAPÍTULO 1: RESULTADOS

Si nuestra hipótesis fuera correcta, las estructuras de los mutantes $Dut80\alpha^{D81A}$ y $Dut80\alpha^{D81N}$ deberían ser idénticas a aquella observada para la forma apo de $Dut80\alpha^{WT}$. Para comprobarlo, resolvimos las estructuras de los mutantes $Dut80\alpha^{D81A}$ y $Dut80\alpha^{D81N}$ (2.9 y 3.0 Å de resolución, respectivamente; Tabla 1.1). Como se había predicho, las estructuras de ambos mutantes D81 en presencia de dUMpNpp son prácticamente idénticas a la estructura de la forma apo de la proteína *wild-type* (Figuras 1.4, 1.5, S1.2 y S1.5, Tabla S1.2). Resultados similares se obtuvieron para las estructuras de ambos mutantes de D81 en ausencia de dUMpNpp (resultados no mostrados). De manera similar a lo que sucede en la forma apo de la enzima, el motivo V está completamente desordenado en ambos mutantes a pesar de que en las estructuras de los mutantes $Dut80\alpha^{D81A}$ y $Dut80\alpha^{D81N}$ el centro activo está ocupado por el nucleótido (Figuras 1.4, 1.5, S1.2 y S1.5). Este resultado confirma que la correcta localización de la molécula de agua nucleofílica por parte del aspártico catalítico (D81) es esencial para la organización del motivo V (Varga *et al.*, 2007) y, además, el resultado apoya la idea de que una disposición del motivo V catalíticamente competitiva es clave para la interacción con StI. De acuerdo con esta idea, la expresión del mutante truncado de $Dut80\alpha$ para el motivo V (ΔV) es incapaz de inducir la replicación tanto de SaPIbov1 como de SaPIbov5 (Figura 1.2).

Para confirmar claramente que la unión del nucleótido inducen los cambios conformacionales que controlan la inducción de SaPIbov1, tres mutantes adicionales de la tirosina estrictamente conservada Y84 (Y84F, Y84A y Y84I), responsable de la discriminación de la desoxirribosa, fueron analizados a nivel estructural y funcional (Figura 1.2; Tabla 1.1). El mutante Y84I presenta una nula capacidad por unir el dUTP (Figura S1.1, Tabla S1.1) y es incapaz de ordenar el motivo V C-terminal de la proteína (Figuras 1.4, S1.2 y S1.5). Como consecuencia, el mutante $Dut80\alpha^{Y84I}$ no induce ni SaPIbov1 ni SaPIbov5

(Figura 1.2). La estructura, básicamente idéntica a la observada para la forma apo, indica que el dUMpNpp no se encuentra unido al centro activo, el cual se encuentra parcialmente ocupado por la cadena lateral de la Ile (Figuras 1.4, S1.2, S1.4 y S1.5; Tabla S1.2). En cambio, el mutante Dut80 α ^{Y84F} presenta prácticamente la misma capacidad de unir el dUTP y de hidrolizarlo que la forma *wild-type* (Figura S1.1, Tabla S1.1), induce el ciclo de la SaPI (Figura 1.2) y el motivo V se encuentra ordenado por encima del nucleótido (Figuras 1.4, 1.5, S1.2 y S1.4; Tabla S1.2). Curiosamente, encontramos propiedades intermedias para el mutante Y84A. Este mutante presenta una reducida capacidad de unir el dUTP pero mantiene cierta actividad enzimática (Figura S1.1, Tabla S1.1). Estos resultados se correlacionan bien con una mayor libertad conformacional del motivo V C-terminal, que se refleja en una densidad electrónica pobre que nos ha permitido trazar un modelo parcial para esta región (Figuras 1.4, S1.2, S1.4, S1.5 y S1.6). Como esperábamos, la expresión del mutante Dut80 α ^{Y84A} no induce el ciclo de SaPI_{bov1} (Figura 1.2). Como habíamos demostrado previamente, la interacción Dut-Stl requiere de un motivo V ordenado en una conformación catalítica competente.

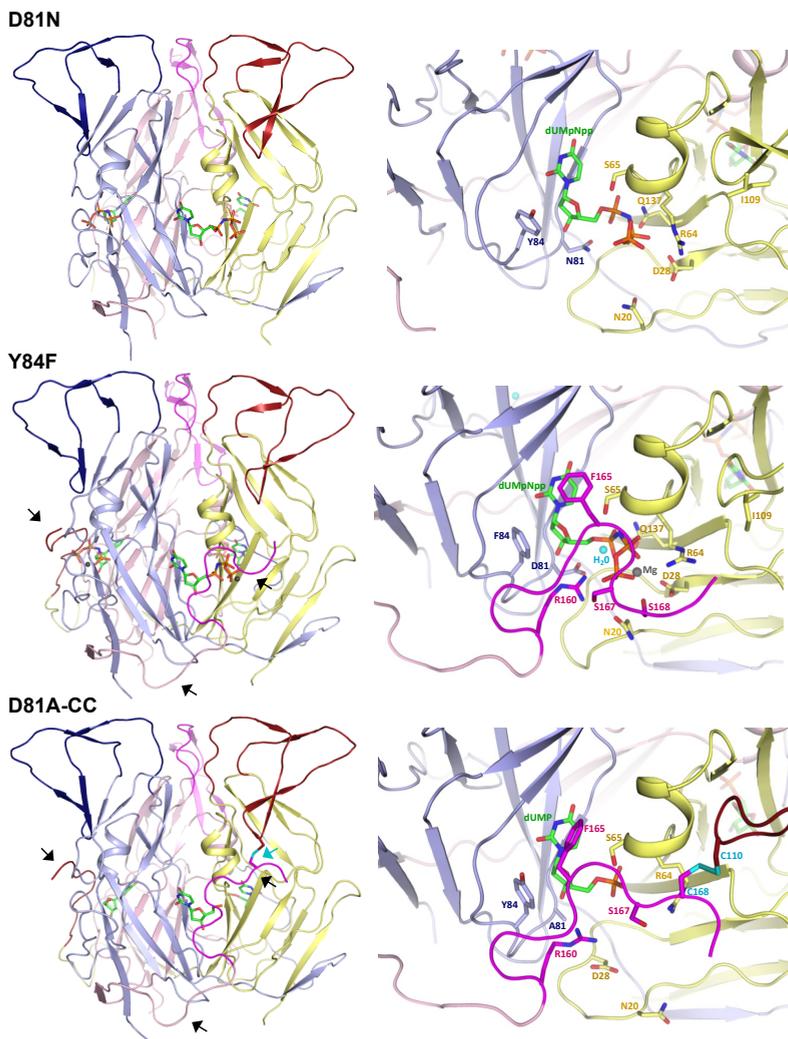


Figura 1.5. Estructura global y centro activo de los mutantes de Dut80 α . **(Izquierda)** Representación del trímero de los mutantes Dut80 α ^{D81N}, Dut80 α ^{Y84F} y Dut80 α ^{D81A-CC} (misma vista que en la Figura 1.3C) en complejo con dUMP/dUMP-Npp, excepto para el mutante Dut80 α ^{D81A-CC}, el cual muestra una molécula de dUMP en su centro activo. En estas estructuras en las que el motivo V estaba ordenado, este está resaltado con un color más oscuro y indicado con flechas negras. El puente di-sulfuro en el mutante Dut80 α ^{D81A-CC} está indicado con una flecha de color cian. **(Derecha)** Vista cercana de los centros activos. El nucleótido y los residuos que interactúan con él se muestran en forma de *sticks* y coloreados por átomos (carbonos en verde para el nucleótido y el color que corresponda del monómero para los residuos). Los residuos Cys (C110–C168) que forman el puente di-sulfuro se muestran como *sticks* y los átomos de azufre en color cian.

La correcta conformación del motivo V de la Dut, pero no la actividad, es necesaria para la inducción de la SaPI

En un trabajo previo, se había propuesto que la actividad de la Dut no es necesaria para inducir el ciclo de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2010). Esta idea se apoya en el análisis del mutante Dut80 α ^{D95E}, el cual mantiene la actividad enzimática pero es incapaz de inducir a SaPI_{bov1}. Además, la sobre-expresión del mutante inactivo Dut^{D81A} del fago ϕ 11 a partir del plásmido pCN51 induce SaPI_{bov1} (Figura 1.1) (Tormo-Más *et al.*, 2010). No obstante, los datos presentados aquí aparentemente contradicen esta idea, ya que solamente aquellas proteínas con una actividad enzimática similar a la *wild-type* son capaces de inducir SaPI_{bov1}. Basándonos en los datos cristalográficos obtenidos, y para claramente confirmar que el único papel que juega la actividad enzimática de la Dut en la inducción de SaPI_{bov1} es el de posicionar y estabilizar el motivo V C-terminal, diseñamos sobre el mutante inactivo Dut80 α ^{D81A} sustituciones en los residuos D110 (motif VI) y S168 (motif V), convirtiendo estos residuos a cisteínas (D110C y S168C). La proximidad de estos residuos (Figura 1.3) nos permite predecir la formación de un puente di-sulfuro entre ambos, llevando al motivo V a una conformación competente para inducir la SaPI. Para confirmar que el puente di-sulfuro entre subunidades es capaz de formarse y que el motivo V se posiciona ordenado, resolvimos la estructura del mutante Dut80 α ^{D81A-CC} (2.6 Å de resolución; Tabla 1.1). El puente di-sulfuro que mantiene unidas las cisteínas C110 y C168 fue trazado siguiendo el mapa de densidad electrónica así como el motivo V, que presentaba pequeñas diferencias respecto a la forma adoptada por el *wild-type* en los últimos tres residuos (Figuras 1.4, 1.5, S1.2 y S1.4B). El centro activo del mutante Dut80 α ^{D81A-CC} está ocupado por una molécula de dUMP y no de dUMpNpp, aún y cuando se añadió 5 mM de dUMpNpp en la mezcla de cristalización. El dUMP fue co-purificado junto con la proteína, sugiriendo que la movilidad reducida del motivo V debido al puente di-sulfuro podría haber

limitado la disociación del nucleótido. Como hemos propuesto, estos cambios generan un mutante sin actividad enzimática (Tabla S1.1) pero con una capacidad de inducir la replicación de SaPI_{bov1} mayor que la forma *wild-type* de Dut80 α (Figura 1.2), sugiriendo que las pequeñas diferencias observadas en el motivo V tienen un impacto mínimo en la unión a Stl, o que el represor Stl ajusta el posicionamiento del motivo V durante el proceso de unión (Figura S1.4B). De manera interesante, la alta capacidad inductora de este mutante para inducir el ciclo de la SaPI puede explicarse debido a que este mutante no presenta una respuesta alostérica a los niveles de dUTP. No obstante, el aumento en la replicación de la SaPI no se acompaña de un aumento en la transferencia de la SaPI (Figura 1.1), confirmando que no se requiere una amplia replicación de la SaPI para una alta tasa de transferencia (Ubeda *et al.*, 2008). Una posible explicación para esto se da a continuación.

Los mutantes de Dut difieren en su afinidad por el represor Stl codificado por la SaPI

Previamente a este trabajo se había demostrado que la única función para las Duts codificadas por fagos en el ciclo de las SaPIs es la de liberar el represor Stl codificado por la SaPI de su sitio diana en el ADN al que se encuentra unido (Tormo-Más *et al.*, 2010). Siendo esto así, se puede predecir que los diferentes mutantes de la Dut deberían inducir de una manera diferente la transcripción de los genes de la SaPI reprimidos por Stl. Esto se confirmó utilizando el plásmido pJP674, el cual lleva el gen reportero codificante para la β -lactamasa fusionado a *xis* en una región de la secuencia posterior a *str* y al promotor de *str* inhibido por Stl, y que además codifica para Stl (Figura 1.6A). Este plásmido fue introducido en cepas que expresan las diferentes Duts y cuya expresión fue testada en presencia de concentraciones inductoras de CdCl₂. La inducción de los plásmidos que expresan las proteínas Dut80 α ^{WT}, Dut80 α ^{Y84F} o Dut80 α ^{D81A-CC} resulta en un incremento en la expresión de β -lactamasa, pero

los plásmidos que expresan la proteína truncada para el motivo V (ΔV) o portadoras de las mutaciones D81A, D81N, Y84A o Y84I no inducen la expresión de β -lactamasa (Figura 1.6A). Además, y tal como era de esperar, los resultados obtenidos para el mutante $Dut80\alpha^{D81A-CC}$ demuestran un incremento de la afinidad por el represor Stl comparándolo con los resultados obtenidos para la forma WT y el mutante Y84F de la Dut (Figura 1.6A). Estos resultados confirman los resultados previos obtenidos a partir del análisis de la replicación de las SaPIs (Figura 1.2). De este último resultado podemos concluir que los cambios conformacionales descritos previamente determinan la capacidad de unión de las Duts por el represor Stl.

El mecanismo encendido/apagado (*on/off*) previene la replicación sin control de la SaPI

El proceso mediante el cual las islas de patogenicidad de estafilococos han adquirido la habilidad de explotar el cambio conformacional mediado por el dUTP en las Duts como un anti-represor, representa una adaptación evolutiva extraordinaria. ¿Por qué se necesita de un mecanismo altamente controlado para inducir SaPI_{bov1}? Previamente a este trabajo se había descrito que las mutaciones que inactivan cualquiera de los represores Stl codificados por las SaPIs provocan la replicación sin control de la SaPI que regulan; estas mutaciones no incrementan la tasa de transferencia de la isla pero sí afectan de forma severa la viabilidad de la bacteria (Ubeda *et al.*, 2008). Esto también se observó tras la expresión del mutante $Dut80\alpha^{D81A-CC}$, el cual no incrementa la tasa de transferencia de la SaPI pero sí que afecta de forma severa al crecimiento de la bacteria (Figuras 1.1 y 1.6B). En consecuencia, y como las SaPIs requieren de algunos componentes celulares para ser transferidas de una manera eficiente, es lógico que utilicen un mecanismo *on/off* para prevenir su replicación no controlada.

CAPÍTULO 1: RESULTADOS

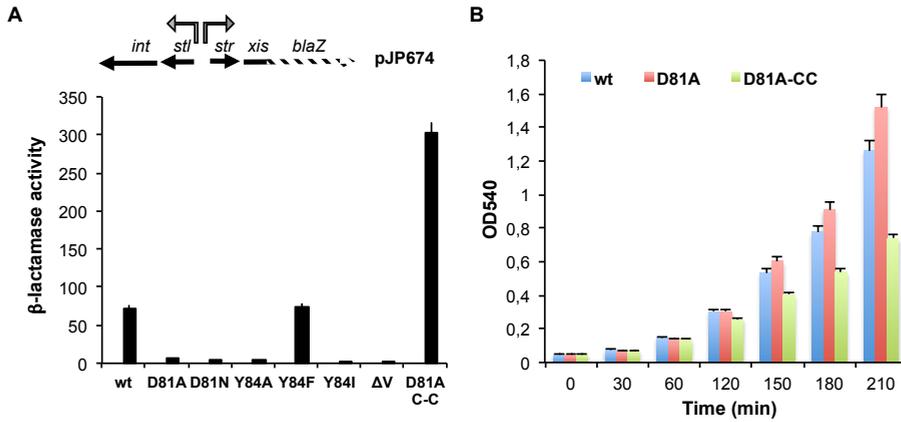


Figura 1.6. Inducción de la transcripción de *str* mediada por la expresión de *dut*. (A) Representación esquemática de la fusión transcripcional de *blaZ* generada en el plásmido pJP674. Cepas que contienen los plásmidos derivados de pJP674 y pCN51 para la expresión de los diferentes alelos del gen *dut* del fago $\phi 80\alpha$ fueron testados para su actividad β -lactamasa después de la inducción con 2 mM de CdCl_2 . Las muestras fueron normalizadas para el total de la masa de células. Los valores están presentados como las medias (\pm SD) de tres experimentos independientes. (B) Análisis de la fase de crecimiento de cepas de *S. aureus* después de inducir los alelos del gen *dut* del fago $\phi 80\alpha$. Una cepa no lisogénica derivada de RN4220 portadora de SaPIbov1 fue complementada con plásmidos derivados de pCN51 para poder expresar las diferentes proteínas Dut80 α (WT, D81A, o D81A D110C-S168C). Las bacterias fueron crecidas en medio LB (con 0.1 mM de CdCl_2) en un agitador rotatorio a 37 °C. Al tiempo indicado, la densidad óptica del cultivo fue medida a 540 nm. Los valores están presentados como las medias (\pm SD) de tres experimentos independientes.

Discusión

Nuestros resultados han demostrado que las Duts codificadas por fagos de estafilococo controlan tanto la inducción como la transferencia de las SaPIs a través de un mecanismo similar al descrito para las proteínas G protooncogénicas (mirar el esquema en la figura 1.7). Las proteínas G de mamíferos son una amplia familia de moléculas que actúan modulando rutas de señalización de muchos de los aspectos del comportamiento celular incluyendo la proliferación, diferenciación, movilidad y muerte celular; y que están reguladas por el GTP a través de un mecanismo similar al de un interruptor molecular con dos estados (*on/off*) (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Estas proteínas, por lo general, tienen una conformación activa cuando tienen unido el GTP mediante la cual interacciona con sus dianas. La hidrólisis del GTP unido, debido a la actividad GTPasa inducida o intrínseca de la proteína, genera un cambio conformacional que lleva las dos regiones que interaccionan con el γ -fosfato hacia una conformación más relajada, la cual libera la proteína diana unida y deja a la proteína G en estado de reposo (Vetter and Wittinghofer, 2001). Este mecanismo es similar al que hemos descrito en este capítulo para la capacidad de inducir a las SaPIs que tienen las Duts codificadas por fagos, pero en este caso implican un único elemento cambiante, el motivo V similar a los *P-loops*. Si tenemos en cuenta la alta conservación del motivo V podemos pensar que este motivo sea el responsable del mecanismo *on/off*, mientras que la presencia del motivo adicional, característico (motivo VI) en estas Duts codificadas por fagos, es el que debe proporcionar la especificidad por la proteína diana (Stl en el caso de las Duts codificadas por fagos). Se había descrito previamente que este motivo extra controla la afinidad entre Dut y Stl (Tormo-Más *et al.*, 2010). No obstante, este motivo por sí solo no es suficiente para inducir el ciclo de la SaPI, como hemos demostrado aquí. Ambos motivos implicados en el proceso, motivos V y VI,

CAPÍTULO 1: DISCUSIÓN

contactan entre ellos (por ejemplo la interacción hidrofóbica entre la Ile109 y la Val170 situados en los elementos estructurales de la inserción y del *P-loop* respectivamente) como se ha podido observar en la estructura obtenida para Dut80 α -dUMpNpp (Figura 1.3).

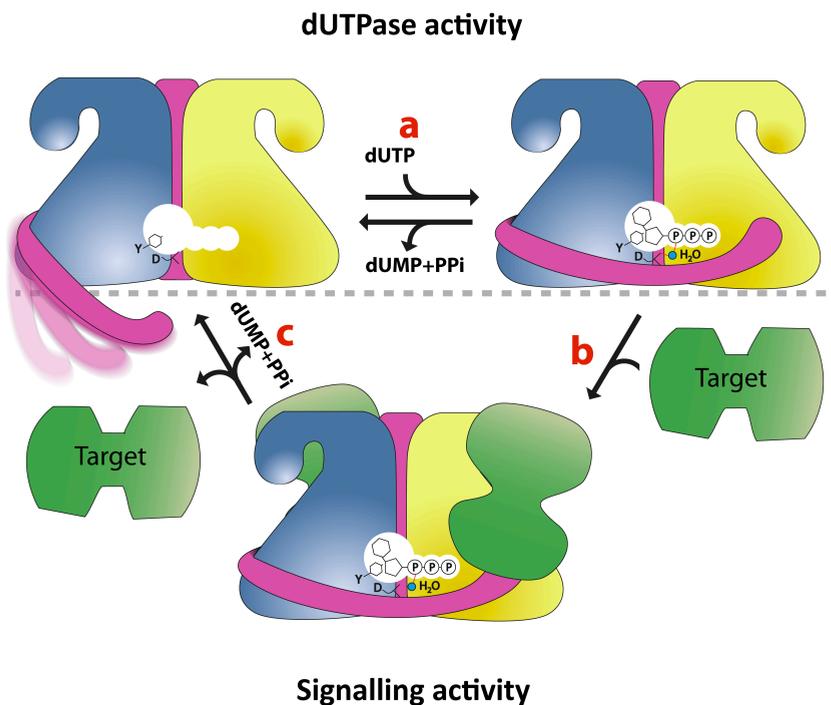


Figure 7. Diagrama esquemático de las actividades de las Duts. (Arriba) El dUTP es degradado a dUMP y pirofosfato debido a la actividad canónica de las Duts (a). La unión del dUTP en una conformación catalítica competente implica la estabilización del motivo V (color rosa), permitiendo el ataque nucleofílico por parte de la molécula de agua (color cian) situada en línea y activada por un residuo aspártico conservado (D) sobre el α -fosfato. La hidrólisis del enlace entre los fosfatos α y β induce un cambio conformacional del nucleótido que desestabiliza el motivo V y permite la liberación de los productos de la reacción (dUMP y PPI). **(Abajo)** Las Duts presentan una actividad señalizadora similar a la de las proteínas G. La forma que tiene unido el dUTP es reconocida por la proteína diana utilizando en motivo extra VI y el motivo V como interruptor de esta actividad (b). La liberación del nucleótido y del pirofosfato después de la hidrólisis del dUTP (c) permite que la zona del motivo V se relaje y pase a una conformación desordenada que induce la liberación de la proteína diana.

Previamente se ha descrito que la Dut de rata interacciona con el factor de transcripción PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*), reprimiendo la activación de la transcripción mediada por PPAR α (Chu *et al.*, 1996). De manera análoga a la interacción Dut-Stl presentada aquí, la interacción entre la Dut de rata y PPAR α depende de un motivo VI adicional N-terminal presente en la Dut además de la contribución del dominio C-terminal de la misma proteína (Chu *et al.*, 1996), sugiriendo fuertemente como común este mecanismo que involucra a las Duts en procesos de señalización. Pero, ¿existen más evidencias que apoyen la hipótesis que describimos aquí e impliquen a las Duts como moléculas señalizadoras ampliamente distribuidas? Como es de esperar para un mecanismo general, ninguno de los tres requisitos para el papel señalizador de las Duts es exclusivo de las Duts codificadas por fagos de estafilococos. En primer lugar, ha sido ampliamente descrito que la unión del dUTP genera el ordenamiento del motivo V en todas las Duts triméricas analizadas (Freeman *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2007; Vértessy *et al.*, 1998). En segundo lugar, la existencia de dominios o motivos extra en las Duts han sido descritos para los casos de rata, *Drosophila melanogaster*, *Plasmodium falciparum* y *Mycobacterium tuberculosis* (Chan *et al.*, 2004; Whittingham *et al.*, 2005). Además, la búsqueda en bases de datos revela la existencia de motivos adicionales presentes en múltiples dUTPasas procariotas y eucariotas (Figura S1.7). Aunque las funciones para estos motivos adicionales aún no han sido identificadas, estudios recientes han demostrado que la eliminación del motivo específico para Duts de micobacterias, cercano a la región C-terminal, no tiene ningún efecto en la actividad enzimática de la enzima a pesar de ser esencial para la supervivencia de la célula (Pecsi *et al.*, 2012). Finalmente, también se han descrito interacciones proteína-proteína entre Duts y dianas específicas. Por ejemplo, como se ha mencionado, las Duts virales del EBV y HERV-K interaccionan con los receptores tipo TLR-2 (Ariza and Williams, 2011; Ariza *et al.*, 2009), mientras que la Dut viral del

CAPÍTULO 1: DISCUSIÓN

MHV-68 bloquea la ruta de señalización dependiente del interferón tipo I (Leang *et al.*, 2011). En eucariotas, además de la ya mencionada interacción Dut-PPAR α (Chu *et al.*, 1996), estudios recientes han revelado algunas dianas prometedoras capaces de interactuar con las Duts que necesitan más confirmación. Por ejemplo, la implicación de la Dut humana en procesos como la apoptosis, la autofagia y el control del ruta de señalización del factor de crecimiento epidérmico (mediante la interacción con la proteína RhoB capaz de unir GTP y relacionada con la proteína Rho; las proteínas asociadas a los receptores GABA GABARAPL1, GABARAPL2 y GABARAP; la hormona de crecimiento 1 (GH1) y el receptor nuclear de estrógenos) han sido sugeridos (Behrends *et al.*, 2010; Blagoev *et al.*, 2003; Ewing *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012). Es más, estudios de interacción utilizando la Dut de levadura implican algunas proteínas reguladoras que incluyen proteínas que interactúan con GTPasas como TEM1, MUK1 y eIF-2B, junto con la ciclina dependiente de quinasa CKS1 (Ho *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008).

En resumen, todos estos resultados apoyan fuertemente la idea de que el mecanismo descrito aquí para la interacción entre Dut-Stl se encuentra ampliamente distribuido. Aunque se requiere de estudios adicionales para definir las rutas de señalización activadas por estas proteínas y para determinar cómo las Duts controlan estos procesos, nuestros resultados sugieren que las Duts definen una nueva familia de relevantes moléculas señalizadoras involucradas en varios procesos patogénicos relevantes.

Material suplementario

Información sobre el material suplementario

Figura S1.1. Relacionada con Figuras 1.3-1.5.

Figura S1.2. Relacionada con Figuras 1.3-1.5.

Figura S1.3. Relacionada con Figura 1.3.

Figura S1.4. Relacionada con Figuras 1.3-1.5.

Figura S1.5. Relacionada con Figuras 1.4 y 1.5.

Figura S1.6. Relacionada con Figuras 1.4 y 1.5.

Figura S1.7. Relacionada con la sección de discusión.

Tabla S1.1. Relacionada con Figuras 1.3-1.5.

Tabla S1.2. Relacionada con Figuras 1.3-1.5 y Tabla 1.1.

Tabla S1.3. Cepas utilizadas en este estudio.

Tabla S1.4. Plásmidos utilizados en este estudio.

Tabla S1.5. Cebadores y sondas utilizados en este estudio.

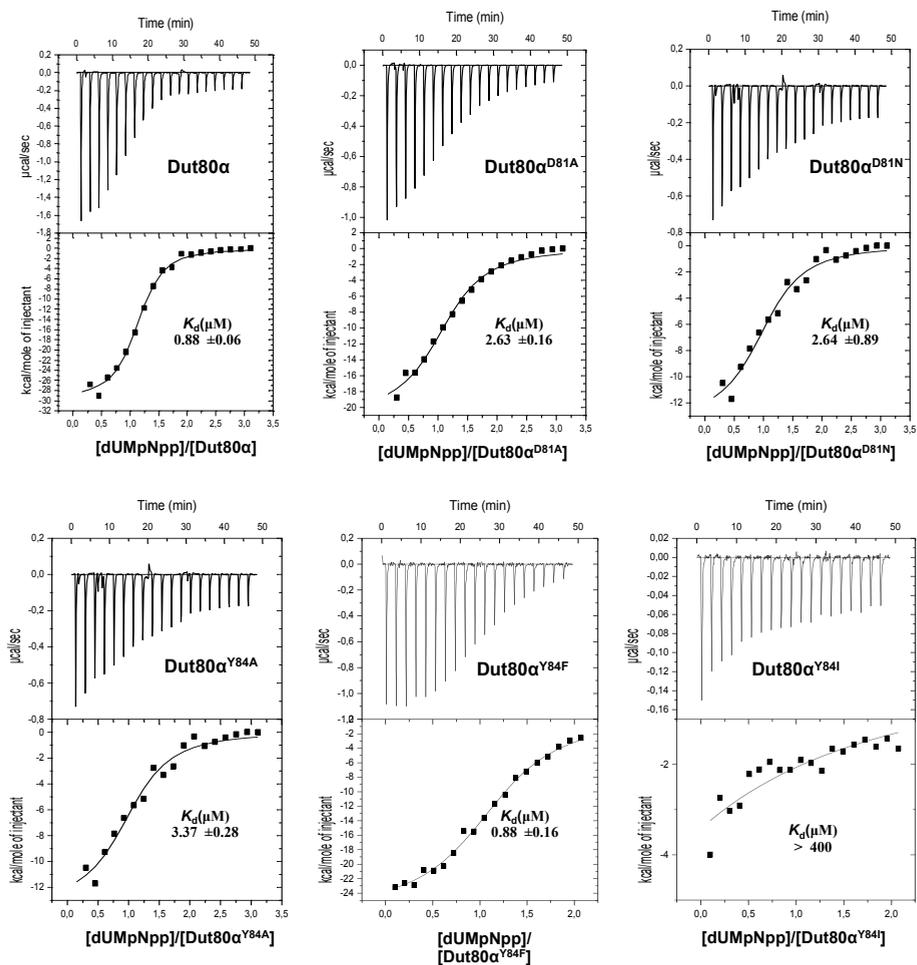


Figura S1.1. Efecto de las mutaciones sobre la unión del nucleótido (relacionada con figuras 1.3-1.5). Experimentos de ITC realizados con la proteína *wild-type* y diferentes mutantes de D81 y Y84 de Dut80α en presencia de dUMpNpp. En las gráficas se muestran los valores de K_d obtenidos.

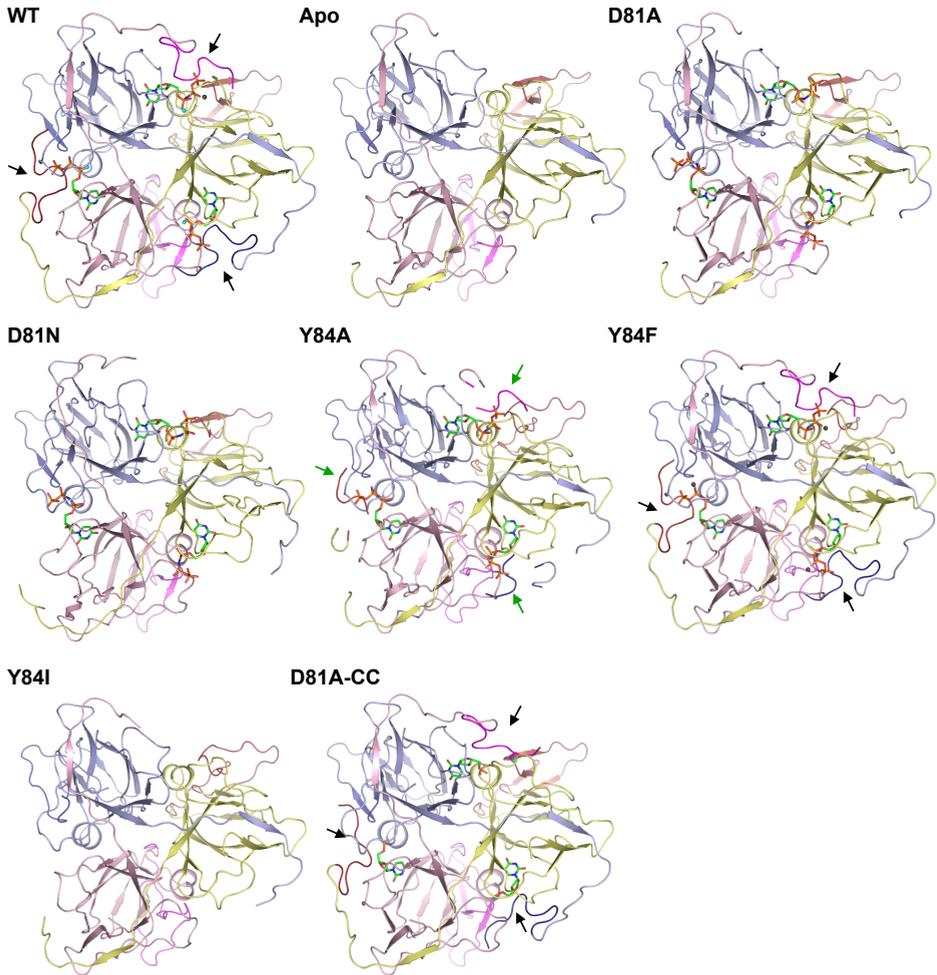


Figura S1.2. Motivo V *P*-loop en las formas *wild-type* y mutantes de Dut80 α (relacionada con figuras 1.3-1.5). Se muestran las estructuras en *cartoon*, vistas desde abajo, de las formas *wild-type* y mutantes de Dut80 α coloreadas por subunidades. Cuando se encuentra presente, el nucleótido se representa como *stick* coloreado según el tipo de átomo (carbonos en verde). En estas estructuras el motivo V *P*-loop ordenado está resaltado con un color más oscuro e indicado mediante flechas negras. El motivo V *P*-loop parcialmente ordenado del mutante Y84A está indicado con flechas verdes.

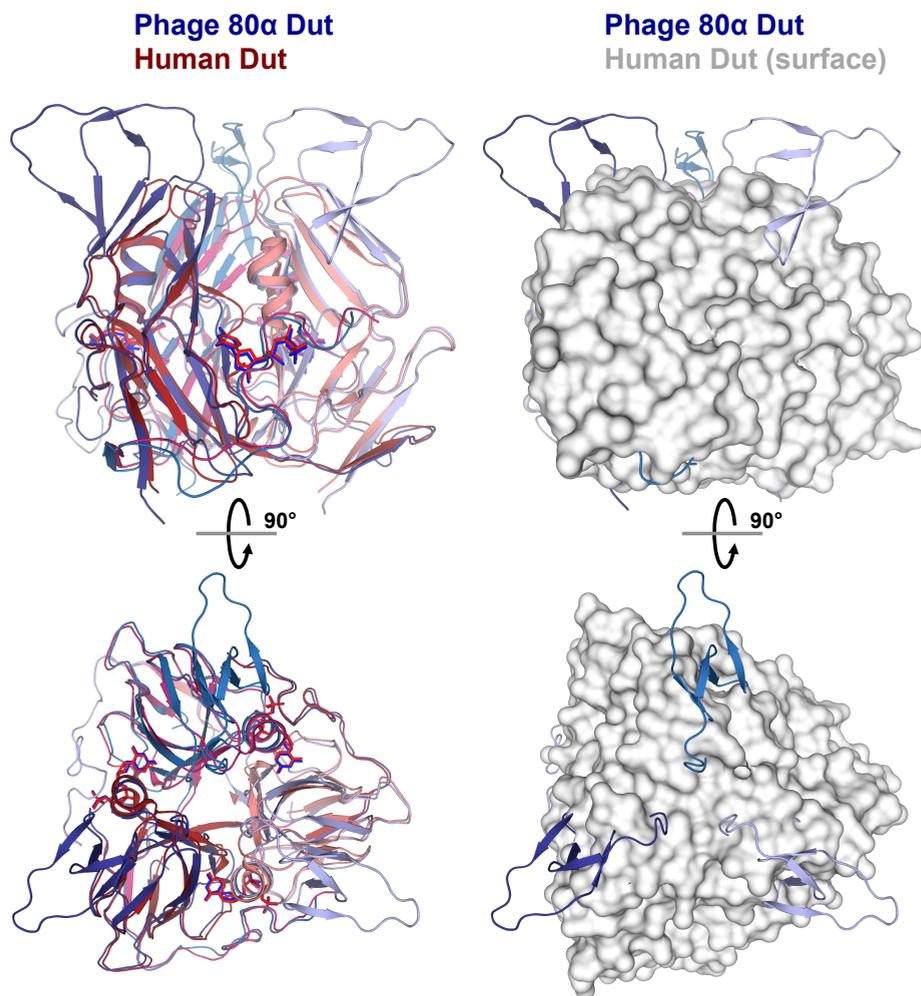


Figura S1.3. Comparación de las estructuras de Dut80 α y la Dut humana (relacionada con Figura 1.3). La estructura de Dut80 α (azul) es virtualmente idéntica a la Dut humana (rojo, PDB 2HQU) (r.m.s.d. aproximado a 1 Å para el trímero), con una disposición similar de los motivos conservados I-V (no mostrados), pero con la presencia de un motivo característico (motivo VI) en la parte superior del trímero, resaltado con un color más oscuro, que genera una superficie llana. Se muestran dos vistas (lateral y superior): izquierda, representación en cinta con los nucleótidos representados como *sticks*; derecha, se representa la superficie de la Dut humana para resaltar el motivo VI de la Dut80 α , mostrado como cinta.

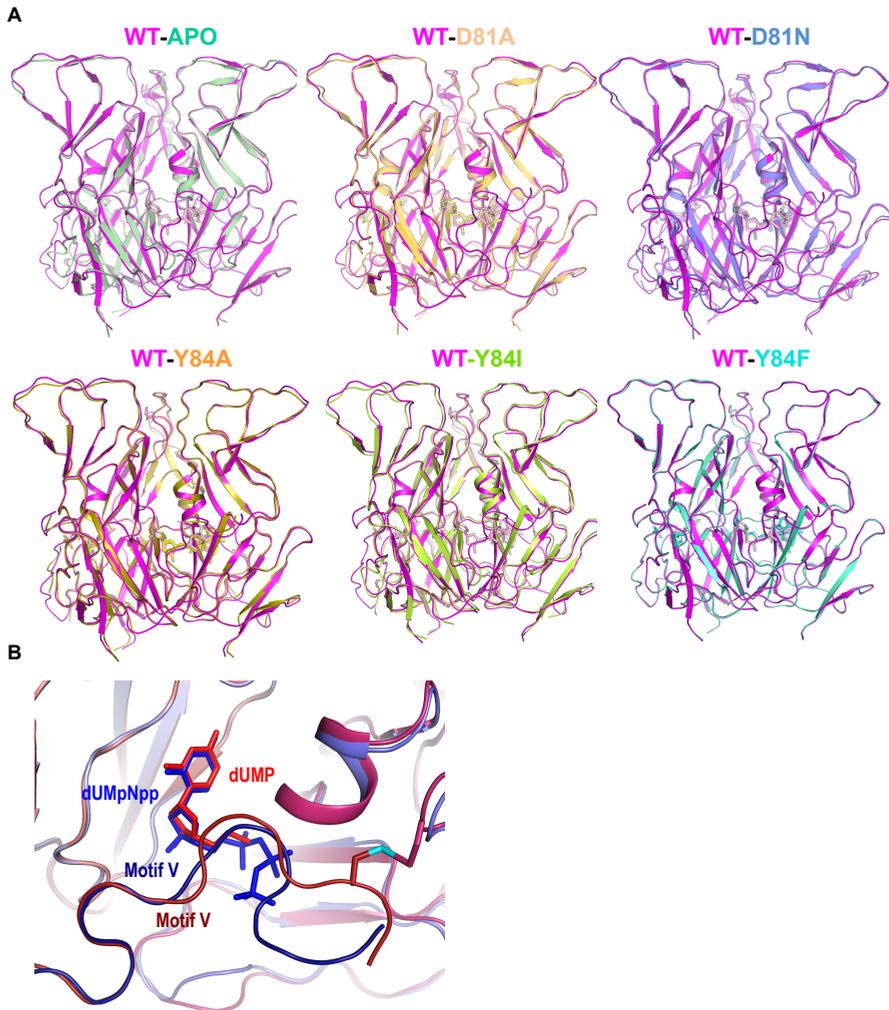


Figura S1.4. Superimposiciones de la forma *wild-type* y mutantes (relacionada con figuras 1.3-1.5). **(A)** Superposición de la forma *wild-type* en presencia de nucleótido de Dut80 α con las formas apo y mutantes. Las estructuras de los trímeros fueron alineados sobre la estructura de Dut80 α con dUMPpNpp (magenta). Los nucleótidos se representan como *sticks* y está coloreado acorde al trímero. **(B)** Sitio de unión del nucleótido de la forma *wild-type* de y del mutante Dut80 α ^{D81A-CC}. Las estructuras del trímero de Dut80 α (tonos de azul) y del mutante Dut80 α ^{D81A-CC} (tonos de rojo) fueron superpuestas, y una vista más cercana del centro activo es mostrada. A pesar de la mutación del D81 en el mutante Dut80 α ^{D81A-CC} y la presencia de nucleótidos diferentes (dUMPpNpp para Dut80 α *wild-type* y dUMP para Dut80 α ^{D81A-CC}), el motivo V se presenta en una disposición muy similar en ambas estructuras con la excepción de una ligera diferencia en la posición de los últimos tres residuos. Los nucleótidos y el puente di-sulfuro en el mutante Dut80 α ^{D81A-CC} se muestran como *sticks*.

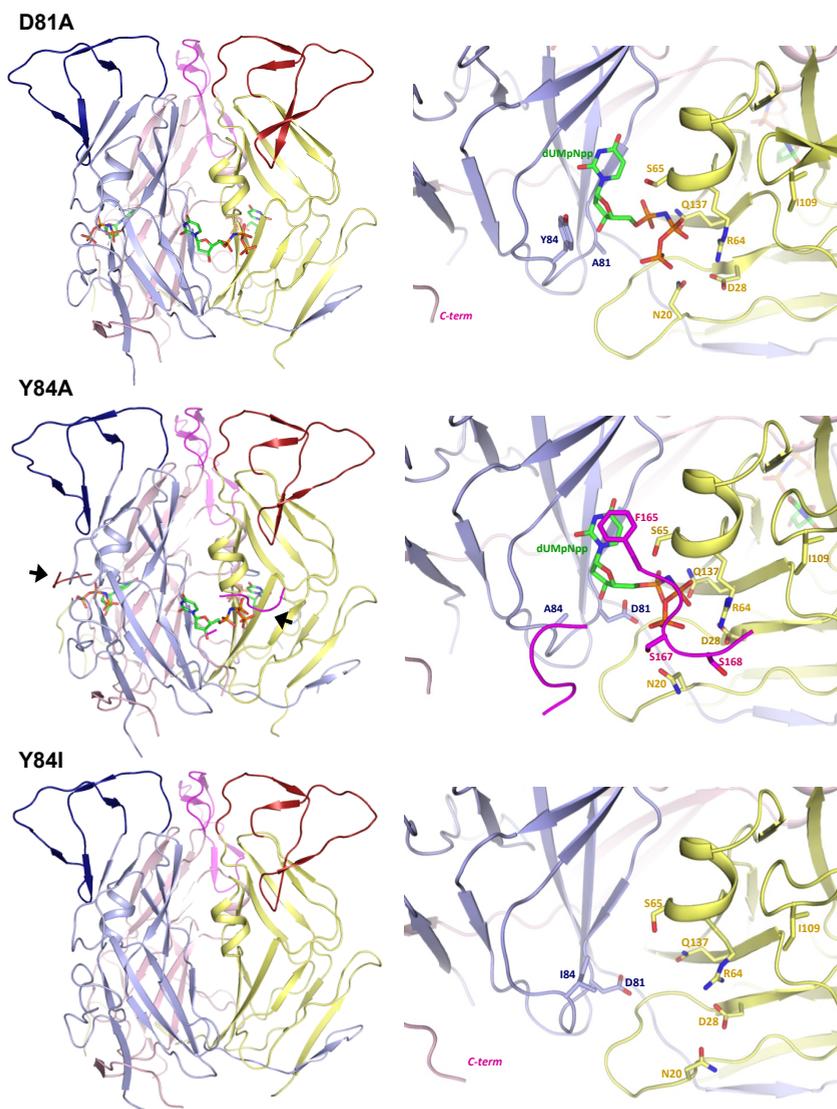


Figura S1.5. Estructura global y centro activo de los mutantes de Dut80 α (relacionada con Figuras 1.4 y 1.5). **(A)** Representación de los mutantes Dut80 α ^{D81A}, Dut80 α ^{Y84A} y Dut80 α ^{Y84I} en complejo con dUMPnpp, exceptuando el mutante Dut80 α ^{Y84I} el cual no une el análogo del nucleótido. El ordenamiento parcial del motivo V *P-loop* en el mutante Dut80 α ^{Y84A} está indicado con flechas negras. **(B)** Vista cercana de los centros activos. El nucleótido y los residuos que interaccionan se muestran como *sticks* coloreados por átomos (carbonos en verde para el nucleótido y con el color del monómero correspondiente los residuos). En Dut80 α ^{Y84I} cuyo centro activo está vacío, los residuos conservados que interaccionan con el nucleótido también se muestran.

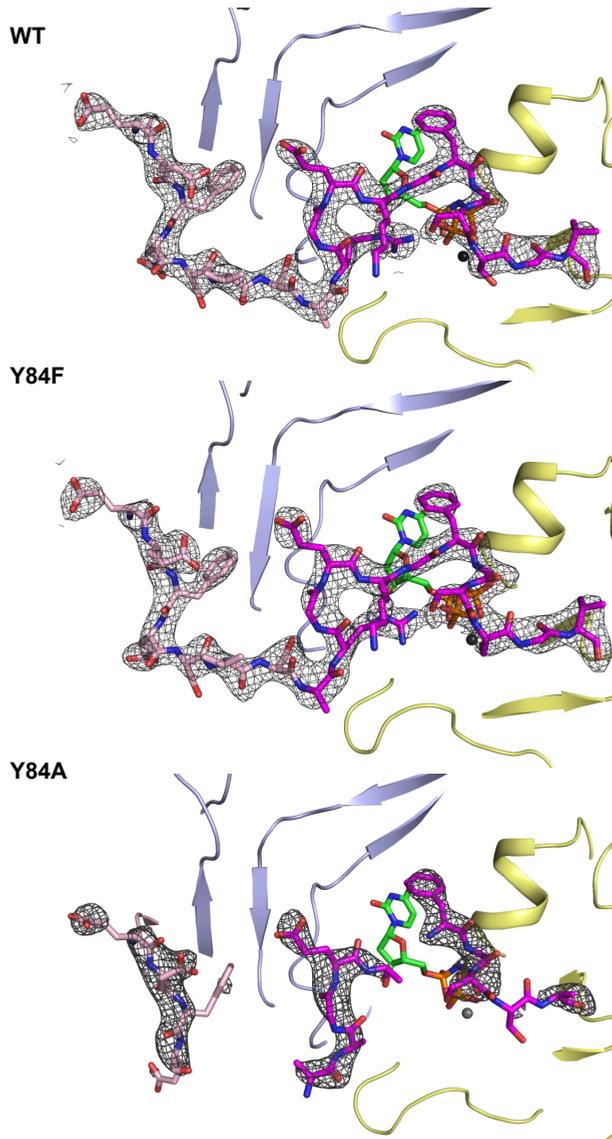


Figura S1.6. Localización del motivo V en la forma *wild-type* y los mutantes Y84 de **Dut80 α** (relacionada con Figuras 1.4 y 1.5). Los residuos modelados del extremo C-terminal (152-170) se muestran como *sticks* coloreados por átomos y los átomos de carbono en diferentes tonos de rosa. Una coloración más oscura se ha utilizado para los carbonos del motivo V (160-170). Los mapas 2Fo-Fc utilizados para modelar las estructuras se muestran en gris y mostrados a un nivel de 1.5 σ . El nucleótido se representa como *sticks* con los átomos coloreados (carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre en verde, azul, rojo y naranja respectivamente) y el resto de subunidades se muestran en cinta (coloreadas con azul y amarillo).

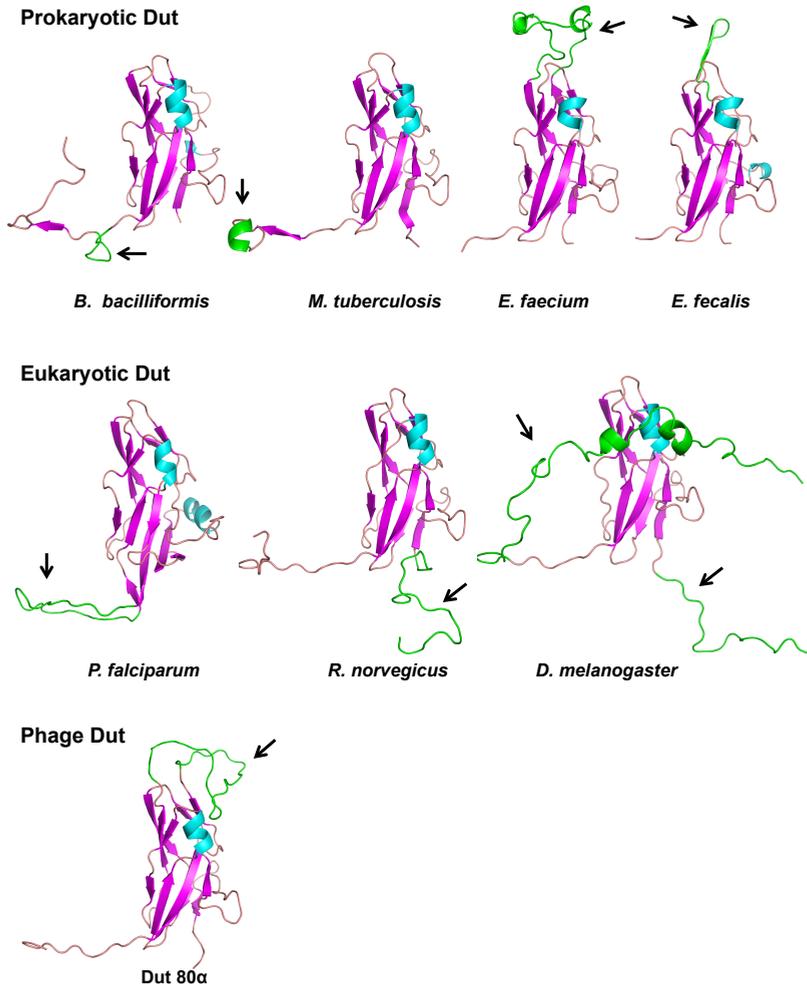


Figura S1.7. Estructura de los monómeros de diferentes Duts y localización del motivo extra VI (relacionada con la sección de discusión). Las estructuras de *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Drosophila melanogaster* y el fago $\phi 80\alpha$ de estafilococos han sido previamente resueltas experimentalmente. Las proteínas de *Bartonella bacilliformis* y de enterococos (*E. faecium* y *E. faecalis*) fueron modeladas utilizando el servidor *Swiss-Model* (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) frente a los mutantes de las Duts de *Brucella melitensis* y *Streptococcus* respectivamente. La Dut de rata fue modelada utilizando el servidor SAM-T08 (http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T08/T08-query.html). La conformación del motivo VI se muestra resaltado en verde y señalado con flechas negras. Este motivo extra se puede localizar en la región N-terminal (rata, *Plasmodium* y *Drosophila*), región C-terminal (*Bartonella*, *Mycobacterium* y *Drosophila*) o en el medio (estafilococos y enterococos) de la Dut. A pesar de la diferente localización, el motivo VI de rata y *Mycobacterium* también están relacionadas en procesos de señalización.

CAPÍTULO 1: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Fago	Proteína ^a	Actividad (nM/min) ^b	K _d (μM)
φ80α	wt	1.81	0.88
φ80α	D81A	0	2.63
φ80α	D81N	0	2.64
φ80α	Y84A	0.44	3.37
φ80α	Y84F	1.04	0.88
φ80α	Y84I	0	>400
φ80α	ΔV	0	ND
φ80α	D81A C-C	0	ND

^a Proteína purificada His₍₆₎-Dut.

^b Medida como producción de PPi utilizando 0.1μg de proteína. Las variaciones se encuentran dentro de un ±5% en todos los casos.

ND: No determinado.

Tabla S1.1. Actividad dUTPasa. En la tabla se muestran los valores de actividad enzimática y constantes de disociación K_d para las formas *wild-type* y mutantes de la proteína Dut80α.

CAPÍTULO 1: MATERIAL SUPLEMENTARIO

	Dut80 α WT dUMpNpp	Dut80 α WT Apo	Dut80 α D81A dUMpNpp	Dut80 α D81N dUMpNpp	Dut80 α Y84F dUMpNpp	Dut80 α Y84A dUMpNpp	Dut80 α Y84I	Dut80 α D81A-CC dUMP
Dut80 α ^{WT} dUMpNpp		154 (2-155)	154 (2-155)	155 (2-156)	169 (2-170)	159 (2- 156/160- 163)	155 (2-156)	165 (2-166)
Dut80 α WT Apo	0.58		143 (2-19/25- 150)	153 (2-154)	154 (2-155)	154 (2-155)	154 (2-155)	155 (2-156)
Dut80 α D81A dUMpNpp	0.43	0.57		149 (2-150)	142 (2-19/25- 159)	147 (2-19/25- 150)	149 (2-150)	149 (2-19/25- 155)
Dut80 α D81N dUMpNpp	0.50	0.46	0.38		155 (2-156)	154 (2-155)	155 (2-156)	155 (2-156)
Dut80 α Y84F dUMpNpp	0.46	0.62	0.46	0.53		158 (2- 155/160- 163)	155 (2-156)	165 (2-166)
Dut80 α Y84A dUMpNpp	0.44	0.63	0.41	0.49	0.46		155 (2-156)	154 (2-155)
Dut80 α Y84I	0.62	0.48	0.56	0.56	0.65	0.62		155 (2-156)
Dut80 α D81A-CC dUMP	0.60	0.53	0.43	0.41	0.63	0.57	0.49	

Tabla S1.2. Valores de RMSD al comprar las formas *wild-type* y mutantes de Dut80 α (relacionada con Figuras 1.3-1.5 y Tabla 2.1). Valores de RMSD en Å (parte inferior) obtenidos a partir de la superposición del número indicado de C α de los residuos indicados entre paréntesis (parte superior).

CAPÍTULO 1: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Strains	Description	Reference
RN4220	Restriction-defective derivate of RN450	Laboratory strain
RN450	NCTC8325 cured of $\phi 11$, $\phi 12$ and $\phi 13$	Laboratory strain
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> expression strain	Stratagene
RN10359	RN450 80 α	(Úbeda et al., 2007)
JP3603	RN10359 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	(Tormo-Más et al., 2010)
JP7084	RN10359 SaPIbov5 <i>tetM</i>	This work
JP6774	RN4220 Δspa SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	(Tormo-Más et al., 2010)
JP9338	RN450 Δspa SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	This work
JP8255	JP3603 3xflag- <i>dut</i> 80 α	This work
JP8256	JP3603 3xflag- <i>dut</i> _{D81A} 80 α	This work
JP8258	JP3603 3xflag- <i>dut</i> _{D81N} 80 α	This work
JP8941	JP3603 3xflag- <i>dut</i> _{Y84A} 80 α	This work
JP8257	JP3603 3xflag- <i>dut</i> _{Y84I} 80 α	This work
JP8766	JP3603 3xflag- <i>dut</i> _{Y84F} 80 α	This work
JP9051	JP3603 3xflag- <i>dut</i> ΔV 80 α	This work
JP9340	JP3603 3xflag- <i>dut</i> _{D81A, D110C, S168C} 80 α	This work
JP9016	JP7084 <i>dut</i> _{D81A} 80 α	This work
JP9017	JP7084 <i>dut</i> _{D81N} 80 α	This work
JP9018	JP7084 <i>dut</i> _{Y84A} 80 α	This work
JP9020	JP7084 <i>dut</i> _{Y84I} 80 α	This work
JP9019	JP7084 <i>dut</i> _{Y84F} 80 α	This work
JP9021	JP7084 <i>dut</i> ΔV 80 α	This work
JP9341	JP7084 <i>dut</i> _{D81A, D110C, S168C} 80 α	This work
JP5359	BL21(DE3) pJP753	(Tormo-Más et al., 2010)
JP8474	BL21(DE3) pJP1132	This work
JP8475	BL21(DE3) pJP1133	This work
JP9348	BL21(DE3) pJP1143	This work
JP9349	BL21(DE3) pJP1144	This work
JP9350	BL21(DE3) pJP1145	This work
JP9351	BL21(DE3) pJP1146	This work
JP8434	BL21(DE3) pJP1147	This work

Tabla S1.3. Cepas utilizadas.

CAPÍTULO 1: MATERIAL SUPLEMENTARIO

JP9026	JP6774 pJP821	(Tormo-Más et al., 2010)
JP9027	JP6774 pJP1157	This work
JP9028	JP6774 pJP1158	This work
JP9029	JP6774 pJP985	This work
JP9030	JP6774 pJP982	This work
JP9031	JP6774 pJP983	This work
JP9032	JP6774 pJP1159	This work
JP9343	JP6774 pJP1160	This work
JP9344	JP9338 pJP821	This work
JP9345	JP9338 pJP1157	This work
JP9040	JP9338 pJP812	This work
JP9041	JP9388 pJP1161	This work
JP9346	JP9388 pJP1162	This work
JP9347	JP9388 pJP1163	This work
JP9033	pJP674 pJP821	This work
JP9034	pJP674 pJP1157	This work
JP9035	pJP674 pJP1158	This work
JP9036	pJP674 pJP985	This work
JP9037	pJP674 pJP982	This work
JP9038	pJP674 pJP983	This work
JP9039	pJP674 pJP1159	This work
JP9342	pJP674 pJP1160	This work

Tabla S1.3 (cont.). Cepas utilizadas.

CAPÍTULO 1: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Plasmids	Description	Reference
pMAD	Vector for efficient allelic replacement	(Arnaud et al., 2004)
pCN51	Expresion vector	(Charpentier et al., 2004)
pET28a	Expresion vector	Novagen
pRN8298	Expresion vector	(Charpentier et al., 2004)
pJP1156	pMAD- <i>dut</i> _{D81A} 80 α	This work
pJP943	pMAD- <i>dut</i> _{D81N} 80 α	This work
pJP972	pMAD- <i>dut</i> _{Y84A} 80 α	This work
pJP973	pMAD- <i>dut</i> _{Y84I} 80 α	This work
pJP974	pMAD- <i>dut</i> _{Y84F} 80 α	This work
pJP1141	pMAD- <i>dut</i> _{ΔV} 80 α	This work
pJP1136	pMAD- <i>dut</i> _{D81A, D110C, S168C} 80 α	This work
pJP980	pMAD-3xflag- <i>dut</i> 80 α	This work
pJP753	pET28a- <i>dut</i> 80 α	(Tormo-Más et al., 2010)
pJP1132	pET28a- <i>dut</i> _{D81A} 80 α	This work
pJP1133	pET28a- <i>dut</i> _{D81N} 80 α	This work
pJP1143	pET28a- <i>dut</i> _{Y84A} 80 α	This work
pJP1144	pET28a- <i>dut</i> _{Y84F} 80 α	This work
pJP1145	pET28a- <i>dut</i> _{Y84I} 80 α	This work
pJP1146	pET28a- <i>dut</i> _{ΔV} 80 α	This work
pJP1147	pET28a- <i>dut</i> _{D81A, D110C, S168C} 80 α	This work
pJP821	pCN51-3xflag- <i>dut</i> 80 α	(Tormo-Más et al., 2010)
pJP1157	pCN51-3xflag- <i>dut</i> _{D81A} 80 α	This work
pJP1158	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{D81N} 80 α	This work
pJP985	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{Y84A} 80 α	This work
pJP982	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{Y84F} 80 α	This work
pJP983	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{Y84I} 80 α	This work
pJP1159	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{ΔV} 80 α	This work
pJP1160	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{D81A, D110C, S168C} 80 α	This work
pJP812	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> ϕ 11	This work
pJP1161	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{D81A} ϕ 11	This work
pJP1162	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> ϕ 71	This work
pJP1163	pCN51- 3xflag- <i>dut</i> _{D81A} ϕ 71	This work
pJP674	pRN8298-clor-plnt-20-19-18b/aZ	(Tormo-Más et al., 2010)

Tabla S1.4. Plásmidos utilizados.

CAPÍTULO 1: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Plasmids	Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
pJP1156	Orf32-80α -3mB	CGCGGATCCATCGAGTTTAAAGAAGGAGCC
	Orf25phi11-6m	GAAACAGGCAAGATAGCTGCAGGATATCACGGC
	Orf25phi11-7c	GCCGTGATATCCTGCAGCTATCTTGCCTGTTTC
	Orf32-80α-6cS	ACGCGT <u>CGAC</u> GCATCATTCTTAACATAGCCC
pJP943	Orf32-80α -3mB	CGCGGATCCATCGAGTTTAAAGAAGGAGCC
	Orf25-phi11-51c	GCCGTGATAACCCGCGTTTATCTTGCC
	Orf32phi80a-50m	GGCAAGATAAACGCGGGTTATCACGGC
	Orf32-80α-6cS	ACGCGT <u>CGAC</u> GCATCATTCTTAACATAGCCC
pJP972	Orf32-80α -3mB	CGCGGATCCATCGAGTTTAAAGAAGGAGCC
	Orf25-phi11-57c	CCTAAATTGCCGTGAGCTCCCGCGTC
	Orf25-phi11-56m	GACGCGGGAGCTCACGGCAATTTAGG
	Orf32-80α-6cS	ACGCGT <u>CGAC</u> GCATCATTCTTAACATAGCCC
pJP973	Orf32-80α -3mB	CGCGGATCCATCGAGTTTAAAGAAGGAGCC
	Orf25-phi11-53c	GCCGTGAATTCGCCGTCTATCTTGCC
	Orf25-phi11-52m	GGCAAGATAGACGCGGAATTCACGGC
	Orf32-80α-6cS	ACGCGT <u>CGAC</u> GCATCATTCTTAACATAGCCC
pJP974	Orf32-80α -3mB	CGCGGATCCATCGAGTTTAAAGAAGGAGCC
	Orf25-phi11-55c	GCCGTGAAATCCCGCGTCTATCTTGCC
	Orf25-phi11-54m	GGCAAGATAGACGCGGGATTCACGGC
	Orf32-80α-6cS	ACGCGT <u>CGAC</u> GCATCATTCTTAACATAGCCC
pJP1141	Orf32-80α -48mB	CGCGGATCCGGATGACACAAATGAATAATCG
	Orf25-phi11-63c	AACACTTTCGAACTCCTCCACTTGC
	Orf32-80α -53m	GCAAGTGGAGGAGTTCGAAAGTGTTTAAAGACATATTAGATAGA GTCAAGG
	Orf32-80α-6cS	ACGCGT <u>CGAC</u> GCATCATTCTTAACATAGCCC
pJP1136	Orf32-80α -3mB	CGCGGATCCATCGAGTTTAAAGAAGGAGCC
	orf32-phi80a-38m	CTTTTTAAGAAACATATGCAATA
	orf32-phi80a-39c	CAATATTGCATATGTTTCTTAAA
	orf32-phi80a-40m	GGCTTCGGAAGTTGCGGAGTGTAAGACATATTAGATAG
	orf32-phi80a-41c	CTTTACTCCGCAACTCCGAAGCCTTTTTCTCCAC
	Orf32-80α-6cS	ACGCGT <u>CGAC</u> GCATCATTCTTAACATAGCCC
pJP980	Orf31phi80α-1mB	CGCGGATCCCCTTAATCTGGAAAGATGGGG
	orf31-phi80alpha-5c	CATCGTGATCTTTATAATCCATTTTCTATTCTCTCATATTTA
	orf32-phi80alpha-29m	ATGGATTATAAAGATCACGATGGCGATTATAAAGATCACGATATC GATTATAAAGATGATGATGATAAAATGACTAACACATTACAAGTAA AA
	Orf31phi80α-4cS	ACGCGTGCACCTGACCCACTTTAATAACTGC

Tabla S1.5. Oligonucleótidos utilizados.

CAPÍTULO 1: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Plasmids	Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
pJP1132	Orf32phi80α -12mB	<u>CGCGGATCC</u> ATGACTAACACATTACAAGTAAAC
pJP1133	Orf32phi80α -13cS	ACGCGT <u>CGACTC</u> TTTACTCTCCGCTACTTCC
pJP1143		(these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)
pJP1144		
pJP1145		
pJP1147		
pJP1146	Orf32phi80α -12mB	<u>CGCGGATCC</u> ATGACTAACACATTACAAGTAAAC
	Orf32-80alpha-54cS	ACGCGT <u>CGACTC</u> TTTAAACACTTTCCAACCTCCTCC
pJP1147	Orf32phi80α -12mB	<u>CGCGGATCC</u> ATGACTAACACATTACAAGTAAAC
	Orf32-phi80alpha-31cH	<u>CCCAAGCTT</u> CCTTGACTCTATCTAATATGTC
pJP1157	Orf32-80α-17m	ATGGATTATAAAGATCACGATGGCGATTATAAAGATCACGATATC GATTATAAAGATGATGATGATAAAATGACTAACACATTACAAGTAA AAC
pJP1158		
pJP985		
pJP982	Orf32-80α-2cB	<u>CGCGGATCC</u> TACCCAAAACCTCCTTGACTC
pJP983	Orf32-80α-18mS	ACGCGT <u>CGACATT</u> TATGGCAGGTCAAAGTTGTCTATAAATATGAGGA GGAATAGGAAAATGGATTATAAAGATCACGATGG
pJP1159		
pJP1160		(these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)
pJP812	ORF25-phi11-36mS	<u>ACGCGTCCGAC</u> GAAATTGAGAATAGCGTTTGCTACAGCTAGGGAG GAGCAGGAAAATGGATTATAAAGATCACGATGG
	Orf25-phi11-35m	ATGGATTATAAAGATCACGATGGCGATTATAAAGATCACGATATCG ATTATAAAGATGATGATGATAAAATGACTAACACATTACAAGTAA G
	ORF25-phi11-5cB	<u>CGCGGATCC</u> CCTTGACTCGATCTAAGATGTC
pJP1161	ORF25-phi11-36mS	ACGCGT <u>CGACG</u> AAATTGAGAATAGCGTTTGCTACAGCTAGGGAG GAGCAGGAAA ATGGATTATAAAGATCACGATGG
	Orf25phi11-6m	GAAACAGGCAAGATAGCTGCAGGATATCACGGC
	Orf25phi11-7c	GCCGTGATATCCTGCAGCTATCTTGCCGTGTTTC
	ORF25-phi11-5cB	<u>CGCGGATCC</u> CCTTGACTCGATCTAAGATGTC
pJP1162	Orf26-phi71-3xflag-1mS	<u>ACGCGTCCGAC</u> ATGAAATTAATGTAGAGTGGAACAGGAAAATGG ATTATAAAGATCACGATGGC
	Orf26phi71-3xflag-2m	ATGGATTATAAAGATCACGATGGCGATTATAAAGATCACGATATC GATTATAAAGATGATGATGATAAAATGACTAACACATTACAAGTAA AA
	Orf26-phi71-3cB	<u>CGCGGATCC</u> CCCCAAAACCTCCTTGACTCG
pJP1163	Orf26-phi71-3xflag-1mS	ACGCGT <u>CGACAT</u> GAAATTAATGTAGAGTGGAACAGGAAAATGG ATTATAAAGATCACGATGGC
	ORF26-phi71-4m	GAAACAGGCAAGATAGCTGCAGGATATCATGGT
	ORF26-phi71-5c	ACCATGATATCCTGCAGCTATCTTGCCGTGTTTC
	Orf26-phi71-3cB	<u>CGCGGATCC</u> CCCCAAAACCTCCTTGACTCG
Probe	Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
SaPIbov1	SaPIbov1-112mE	<u>CCGGAATTC</u> AATTGCTGAGGCAAACTTC
	SaPIbov1-113cB	<u>CGCGGATCC</u> TAATTCACAGCTAAAGC

Sequences recognized by the restriction enzymes used in cloning are underlined

Tabla S1.5 (cont.). Oligonucleótidos utilizados.

CAPÍTULO

2.

Otra mirada al mecanismo que implica a las dUTPasas triméricas en la inducción de las islas de patogenicidad de *S. aureus* presta un fuerte apoyo al modelo de cierre del dominio V

Contribución personal

Los resultados descritos en el capítulo 1 abrieron la puerta a una nueva visión de las dUTPasas (Duts) como moléculas señalizadoras. Utilizando como modelo las Duts de fagos de *Staphylococcus aureus* propusimos el posible mecanismo molecular a través del cual estas Duts señalizaban. Este mecanismo implicaba dos estados conformacionales de la molécula, encendido (*on*)/apagado (*off*), regulados por la actividad intrínseca de la propia enzima al unir e hidrolizar el dUTP. La unión al dUTP produce un cambio conformacional en el motivo V conservado en estas enzimas situado en el extremo C-terminal de la molécula, situándolo sobre el centro activo, actuando como interruptor de la capacidad señalizadora. Tras la hidrólisis del ligando el extremo C-terminal vuelve a un estado conformacional más relajado liberando el producto de la reacción e inhibiendo la capacidad inductora. Aunque el motivo V es necesario, un motivo adicional, conocido como motivo VI, codificado por Duts de fagos, también es necesario para la actividad señalizadora de la enzima.

Con posterioridad a nuestro trabajo, el grupo liderado por la Dra. Vertessy publicó el análisis de la interacción de la Dut del fago $\phi 11$ de *S. aureus* con el represor StI de la isla SaPI_{bov1}. Sus resultados mostraban que la unión del dUTP a la enzima inhibía la unión a StI. Basados en esta observación propusieron un mecanismo alternativo donde StI y dUTP competían por el centro activo de la enzima y donde el motivo V situado en el extremo C-terminal no era necesario para la unión a StI. Además, el mismo grupo a través de otra publicación y utilizando la Dut de *Mycobacterium tuberculosis* concluía que el motivo VI adicional codificado por Duts de fagos tampoco era necesario para la inducción de la isla. El resumen de ambos trabajos publicados por el grupo de la Dra. Vertessy concluían que nuestro mecanismo previo no era correcto. Esta propuesta nos sorprendió, ya que conceptualmente ambos

modelos defendían que las Duts funcionaban conceptualmente de forma similar a las proteínas G, ya que el nucleótido actuaba como interruptor, aunque con la diferencia de que la forma trifosfato en un caso activaba la inducción (estado *on*) y en otro caso la inhibía (estado *off*). El mismo grupo, además asigna una función fisiológica a las Duts codificadas por fagos *a priori* en contra de los datos bibliográficos. En el trabajo publicado por Szabo y colaboradores se menciona que *S. aureus* presenta unos niveles altos de uracilo en la célula y la función de la Dut codificada por el fago es la de crear un entorno libre de uracilo para la transferencia de la SaPI. Esto no tiene sentido si pensamos que la transferencia de SaPIs interfiere con la replicación del fago y que además se ha publicado la letalidad en varios organismos, incluyendo bacterias, de mutaciones deletéreas que codifiquen para Dut.

Para intentar resolver la controversia entre ambos modelos analizamos en profundidad el efecto del nucleótido en la interacción de la Dut del fago $\phi 80\alpha$ con StI utilizando aproximaciones experimentales similares a las utilizadas por el grupo de la Dra. Vertessy. Este análisis se realizó no solo con la forma salvaje del enzima, sino también con una amplísima batería de mutantes, algunos de los cuales fueron caracterizados estructural y genéticamente. Los resultados apoyaron nuestro modelo de un mecanismo similar al de las proteínas G aunque con la diferencia, puesta de manifiesto por el grupo de la Dra. Vertessy, que la forma trifosfato del nucleótido inhibiría la interacción con la diana. Los resultados obtenidos y presentados en este capítulo ponen de manifiesto que para la transferencia de la SaPI es necesaria la participación del motivo V. No obstante, estos datos no contradicen el modelo similar a las proteínas G de eucariotas, descrito en el capítulo 1; un mecanismo dependiente de nucleótido y con dos conformaciones (una activa *on* y una inactiva *off*) que controlan la capacidad inductora de la enzima.

Además, nuestros datos apoyan la participación del motivo VI en la interacción Dut-Stl, al igual que la participación del motivo conservado IV.

Mi contribución en este capítulo ha sido la caracterización estructural de la Dut del fago $\phi 80\alpha$ en presencia de dUMP y del mutante G164S en presencia de dUPNPP, un análogo no hidrolizable del dUTP. Además de la caracterización, también he participado en la caracterización cinética de la actividad hidrolítica y de la interacción entre el represor Stl y las diferentes proteínas Duts (forma salvaje y mutantes ΔV , D81A, Y84I, F165A, G164S, D81A C-C, ΔVI , ΔVI - ΔIV Y IV). Para ello ha sido necesario la sobre-expresión de las proteínas; el uso de diferentes técnicas de purificación, que incluyen la cromatografía de afinidad y exclusión molecular; puesta a punto y uso de la interferometría en bicapa (BLI) para la medición de la cinética de la unión entre las diferentes Duts por el represor de la SaPI Stl; la puesta a punto del ensayo de verde malaquita para la medición de la actividad catalítica; así como la cristalización y resolución de las estructuras tridimensionales de las dos proteínas mencionadas 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 (ESRF en Grenoble, Francia; y ALBA en Barcelona, España).

Los resultados obtenidos han sido recientemente publicados en la revista *Nucleic Acid Research* con la siguiente referencia.

Maiques, E., Quiles-Puchalt, N., Donderis, J., Ciges-Tomas, J. R., Alite, C., Bowring, J. Z., *et al.* (2016). Another look at the mechanism involving trimeric dUTPases in *Staphylococcus aureus* pathogenicity island induction involves novel players in the party. *Nucleic Acids Research*, 1-13.

Resumen

En la actualidad, está asumida la idea que las dUTPasas (Duts) son enzima ubicuas que se encargan de regular los niveles de dUTP en la célula evitando su incorporación en el ADN. Recientemente hemos descrito que las Duts codificadas por fagos estafilocócicos son moléculas señalizadoras que actúan de forma análoga a como lo hacen las proteínas G eucarióticas, utilizando el dUTP como segundo mensajero, induciendo la movilidad de islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs). Para llevar a cabo este papel regulador, estas Duts requieren de un motivo característico adicional o motivo VI presente en todas las Duts triméricas codificada por fagos estafilocócicos, así como del motivo V conservado en todas las Duts. No obstante, recientemente, un modelo completamente diferente que implica a las Duts en la transferencia de las SaPIs ha sido sugerido, cuestionando tanto el mecanismo similar a las proteínas G como la implicación de los motivos V y VI. Aquí, y utilizando nuevas técnicas, revisamos nuestro modelo.

Nuestros resultados confirman claramente que el mecanismo, mediante el cual las Duts inducen el ciclo de las SaPIs, dependen del dUTP y requiere de los motivos V y VI, como propusimos previamente. Sorprendentemente, el motivo IV, conservado en las Duts, también se encuentra implicado en la inducción de la SaPI. No obstante, y de acuerdo con el modelo alternativo al nuestro que se ha propuesto, el modo como el dUTP controla el proceso ocurre de una manera diferente a como habíamos anticipado, inhibiendo la inducción de la SaPI. Mientras que la ordenación de motivo conservado V, inducida por el dUTP, es necesario para iniciar el proceso, las Duts adquieren la conformación competente para la señalización tras la hidrólisis del dUTP.

En resumen, nuestros resultados validan con pequeñas modificaciones nuestro modelo previamente propuesto, estableciendo el mecanismo a través del cual las Duts llevan a cabo funciones reguladoras.

Introducción

Las islas de patogenicidad de estafilococos (SaPIs) son elementos genéticos móviles portadores y transportadores de genes de virulencia en *Staphylococcus aureus* (Novick *et al.*, 2010; Penadés *et al.*, 2015; Penadés and Christie, 2015). Las SaPIs se mantienen en un estado quiescente dentro del cromosoma del hospedador bajo el control de StI, un represor global codificado por la isla. Tras la infección por un fago ayudante, o la inducción de un profago residente, la isla se escinde, replica y es empaquetada en partículas similares a los fagos compuestas por las proteínas que forman los viriones del fago (Quiles-Puchalt *et al.*, 2014; Tormo *et al.*, 2008), dando lugar a partículas con elevadas tasas de transferencia tanto inter- como intra-genéricas (Chen *et al.*, 2015; Chen and Novick, 2009). El ciclo de las SaPIs es inducido por una proteína específica codificada por el fago, la cual se une al represor StI actuando como anti-represor (Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010). Tanto las Duts triméricas como diméricas codificadas por fagos actúan como anti-represor para un conjunto de SaPIs que incluye SaPIbov1, SaPIbov5 o SaPIov1 (Hill and Dokland, 2016; Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010).

El hecho de que las Duts triméricas sean uno de los inductores de las SaPIs despertó nuestra curiosidad. El por qué los virus codifican una enzima ya presente en sus células hospedadoras es una pregunta intrigante. Al igual que nuestro modelo, en el que las Duts participan en la movilidad de diferentes SaPIs, se ha propuesto que las Duts codificadas por virus podrían tener diferentes funciones *moonlighting* como proteínas con diferentes funciones reguladoras (Penadés *et al.*, 2013). En vista de esto, nuestro trabajo se ha centrado recientemente en la elucidación de los mecanismos mediante los cuales las Duts realizan su función reguladora.

En respuesta a esta pregunta, y sorprendentemente para una enzima metabólica, una comparación de secuencias entre Duts triméricas de varios

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

fagos estafilocócicas reveló una alta similitud de secuencia, a excepción de una región no conservada central que definimos como motivo VI (Tormo-Más *et al.*, 2010) (Figura S2.1A). Este motivo es altamente divergente entre las Duts de los fagos de *S. aureus* pero no es necesario para la actividad enzimática (Leveles *et al.*, 2013) y se encuentra ausente en algunas Duts de otras especies relacionadas funcionalmente (Figura S2.1B). Sin embargo, nuestros resultados analizando la Dut del fago $\phi 80\alpha$ (Dut80 α), revelaron que el motivo VI es esencial para la interacción con el represor StI codificado por la SaPI, determinando la afinidad por la que las Duts se unen al represor StI (Leveles *et al.*, 2013; Penadés *et al.*, 2013; Tormo-Más *et al.*, 2010).

Curiosamente, a pesar de que el motivo VI es necesario, no es suficiente para inducir el ciclo de la SaPI. El extremo C-terminal o motivo V, fuertemente conservado y presente en todas las Duts triméricas caracterizadas (desde fagos a humanos), también juega un papel clave en la inducción de la SaPI. Nuestros análisis cristalográficos, mutagénicos e *in vivo* sugerían que la unión a dUTP ordena el motivo V sobre el centro activo de la Dut codificada por el fago $\phi 80\alpha$, haciendo que esta proteína adopte la conformación requerida para la inducción de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2013). Nuestros resultados también sugirieron que las Duts codificadas por fagos controlan la inducción y transferencia de SaPIs a través de un mecanismo similar al de las proteínas G de eucariotas, implicando la unión de un nucleótido, dUTP en este caso, en el proceso de unión a la proteína diana (Tormo-Más *et al.*, 2013). Si tenemos en cuenta la alta conservación del motivo V, este elemento es más probable que sea el responsable del mecanismo de *on/off*, y que el motivo más variable propio de las Duts codificadas por estos fagos, el motivo VI, sea el responsable de la especificidad de la unión a la proteína diana.

No obstante, Szabo y colaboradores han propuesto recientemente un modelo alternativo para la inducción de SaPI_{bov1} mediada por Duts tras el análisis de

la Dut codificada por el fago $\phi 11$ (Dut $\phi 11$) usando diferentes métodos bioquímicos *in vitro* (Szabó *et al.*, 2014). Sorprendentemente, ambos modelos implican el dUTP como segundo mensajero, aunque Szabo y colaboradores proponen que es la forma apo de la Dut $\phi 11$ la que interactúa con Stl cuando los niveles de dUTP están reducidos (Szabó *et al.*, 2014). Estos autores sugieren que dUTP y Stl compiten por su unión a Dut $\phi 11$. No obstante, cómo el dUTP inhibe la interacción con Stl sigue siendo un misterio. Además, este modelo alternativo propone que el motivo V no se requiere para interactuar con el represor Stl (Szabó *et al.*, 2014). Aún más, recientemente y a través del análisis de la Dut de *Mycobacterium tuberculosis*, que no contiene el motivo extra VI pero que interacciona con el represor Stl de SaPIbov1, el mismo grupo ha propuesto también que el motivo VI no tiene ningún papel en la formación del complejo Stl:Dut o en la separación del Stl a su sitio de unión en el ADN (Hirmondo *et al.*, 2015). No obstante, en un estudio posterior utilizando la Dut $\phi 11$, el mismo grupo ha sugerido que aunque no se encuentre involucrado en la formación del complejo Dut:Stl, el motivo VI puede ser importante en la separación de Stl y la zona de ADN a la que se encuentra unido (Nyíri *et al.*, 2015).

En este trabajo, utilizando enfoques similares a los utilizados por Szabo y colaboradores, complementados con nuevos datos estructurales y biológicos *in vivo*, hemos revisado nuestro modelo propuesto anteriormente. Nuestros resultados claramente indican que los motivos V y VI de la Dut80 α participan en la unión al represor Stl y, sorprendentemente, también involucran al motivo IV en la interacción Dut:Stl. Por otra parte, también confirmamos que la correcta ordenación del motivo V es un requisito previo para la inducción de la SaPI. Sin embargo, nuestros resultados actuales sugieren que la conformación competente del motivo V requerida para la inducción de la SaPI no es la inducida por la unión del dUTP. No obstante, y aunque los datos sugieren que

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

el motivo V debe encontrarse de alguna manera ordenado, la conformación competente para la inducción de la SaPI de este motivo aún se encuentra por esclarecer. Estos resultados apoyan nuestro mecanismo previamente propuesto similar a las proteínas G, aunque en una forma inversa, donde el trifosfato posiciona el mecanismo en un estado inactivo (*off*), confirmando el dUTP como un segundo mensajero.

Material y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se muestran en las Tabla S2.1. Los procedimientos para la preparación y el análisis de los lisados de fagos, además de la transducción y transformación de *S. aureus*, fueron realizados como se encuentran previamente descritos (Ubeda *et al.*, 2008; 2007).

Manipulación del ADN

Las manipulaciones generales de ADN se realizaron utilizando los procedimientos estándar. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se encuentran listados en la Tabla S2.2. El marcaje de las sondas y la hibridación del ADN fueron llevados a cabo de acuerdo el protocolo facilitado con el *PCR-DIG DNA-labelling and Chemiluminiscent Detection Kit* (Roche).

Construcción de plásmidos

Las construcciones de plásmidos para expresar las diferentes Duts fueron descritas previamente (Tabla S2.3) o fueron preparadas mediante clonación de productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos listados en las Tabla S2.2. 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).

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 cola de seis histidinas para purificar por afinidad y la proteína SUMO para incrementar la solubilidad. Esta cola HisSUMO3 puede ser quitada utilizando la enzima *SUMO Protease 2* (SEN2P2). La clonación se realizó mediante la técnica LIC (*Ligation-Independent Cloning*) (Savitsky *et al.*, 2010). Para amplificar el gen *stl* los cebadores

CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS

Stl-M1SUMO-FW y Stl-N267SUMO-RV (Tabla S2.2) fueron utilizados y el ADN genómico de la cepa JP3603 de *S. aureus* se utilizó como molde. El vector resultante, pETNKI-Stl, fue secuenciado para su verificación en el servicio de secuenciación del Instituto de Biomedicina de Valencia.

Expresión y purificación de las proteínas

La expresión de las proteínas Dut en su forma salvaje (*wild-type*, WT) y sus mutantes, fusionadas a cola 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) (Tabla S2.3), como se describió previamente (Tormo-Más *et al.*, 2013). Las proteínas fueron sobre-expresadas creciendo las células en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina a una concentración final de 33 μ g/ml a 37 °C hasta fase exponencial de crecimiento (densidad óptica 0.6-0.8 medida a $\lambda=600$ nm). Alcanzada la fase exponencial la inducción de las proteínas se realizó mediante la adición de 1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 3 horas a 37 °C. Tras la inducción, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 5000 g 20 min a 4°C y guardados a -80 °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 (100 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl) suplementado con 1 mM fluoruro de fenilmetilosulfonilo (PMSF) y lisado mediante sonicación. El lisado fue centrifugado durante 40 min a 16000 g y la fracción soluble fue cargada en una columna *HisTrap HP* (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 (100 mM HEPES pH 7.5,

250 mM NaCl). Las fracciones fueron analizadas mediante SDS/PAGE y aquellas fracciones de mayor pureza fueron seleccionadas, concentradas y guardadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la expresión de Stl, el vector pETNKI-Stl fue transformado en células *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). La proteína fue sobre-expresadas creciendo las células en medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de $33\text{ }\mu\text{g/ml}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta fase exponencial de crecimiento (densidad óptica 0.6-0.8 medida a $\lambda=600\text{ nm}$). Alcanzada la fase exponencial, la inducción de las proteínas se realizó mediante la adición de 0.1 mM de IPTG durante 16 horas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras la inducción, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 5000 g durante 20 min a 4°C y guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todos los pasos descritos a continuación fueron realizados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ si no se menciona otra temperatura. El *pellet* se resuspendió en tampón STL (75 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM DTT) suplementado con 1 mM de PMSF. Las células fueron lisadas mediante sonicación y el lisado fue centrifugado a 16000 g durante 40 minutos. La fracción soluble fue cargada en una columna de afinidad *HisTrap HP* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón STL. Tras un lavado con 10 volúmenes de columna con tampón STL suplementado con 10 mM de imidazol, la proteína fue eluida con tampón STL suplementado con 300 mM de imidazol. La proteína eluida fue digerida con SENP2 para quitar la cola 6His-SUMO con una relación molar de 1:50 (proteasa:proteína eluida) durante 16 horas aplicando una lenta agitación. Tras la digestión, la muestra fue concentrada y cargada en una columna de exclusión molecular *Superdex S200* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón STL. 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Interferometría en bicapa (BLI)

Los parámetros cinéticos de la interacción, afinidad de la unión (K_D) y constantes de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}), entre Duts y Stl fueron medidos mediante Interferometría en bicapa (*Biolayer Interferometry*, BLI) utilizando el sistema *BLITz* (FortéBio). Las proteínas fueron diluidas en tampón STL y los ensayos fueron llevados a cabo en el mismo tampón, siendo suplementado cuando era necesario con el nucleótido correspondiente a una concentración final entre 0,5 mM de dUPNPP o 5 mM de dUMP. Un tampón no reductor fue utilizado para evaluar la interacción del mutante Dut80 α ^{D81A C-C} con Stl (75 mM HEPES pH7.5, 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). La hidratación de los biosensores, las líneas base y el análisis de la disociación se llevaron a cabo con tampón STL sin la adición de nucleótido. Para cada interacción, la correspondiente Dut fusionada a cola de histidinas fue inmovilizada sobre un biosensor Ni-NTA (FortéBio) a una concentración de 1 μ M. Al menos cinco diluciones diferentes de Stl (desde 4 a 0,062 μ M más la referencia sin Stl) fueron utilizadas en las etapas de asociación y disociación para cada interacción Stl:Dut medida, ajustando la concentración más alta de Stl hasta 10 veces el valor estimado de K_D . El cálculo de los valores cinéticos y el análisis de los datos se realizó con el programa informático *BLITz Pro 1.2*. Para ajustar los datos se utilizó el modelo de interacción 1:1.

Ensayo de actividad de dUTPasa

La actividad enzimática de las Duts 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 μ l de volumen de ensayo con tampón de reacción (100 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,01 U de pirofosfatasa inorgánica (Thermo scientific) y 0,1 μ g de la correspondiente Dut) (Gonçalves *et al.*, 2011). Las reacciones fueron iniciadas mediante la adición de

dUTP (concentración final de 400 μ M) y diferentes muestras fueron tomadas a los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 min parando la reacción mediante la adición de 50 μ l 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*.

Cristalización de proteínas y recogida de datos

Las proteínas Dut80 α^{WT} y su mutante Dut80 α^{G164S} fueron cristalizadas a 10 mg/mL mediante la técnica difusión de vapor en gota sentada. Los cristales de Dut80 α^{WT} en presencia de dUMP y de forma cúbica se obtuvieron bajo las condiciones 60% etanol y 0.1 M NaCl sin haber añadido ningún nucleótido durante el proceso de cristalización. Los cristales de Dut80 α^{G164S} se obtuvieron incubando con 0,5 mM de dUMpNpp (dUPNPP) (Jena Biosciences) y 5 mM de MgCl₂ la proteína purificada. Se obtuvieron cristales de morfología cúbica para este mutante en presencia de dUPNPP en la condición de cristalización conteniendo 18% etanol, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5.

Los cristales de Dut80 α^{WT} fueron directamente congelados en nitrógeno líquido sin necesidad de crioprotectores mientras que los cristales de Dut80 α^{G164S} se congelaron en 18% etanol, 20% glicerol y 0,1 M Tris-HCl pH 8.5 como condición crioprotectora para el proceso de difracción.

Un único juego de datos fue recogido para cada una de las proteínas a 100 K en las instalaciones de los sincrotrones ESRF (Grenoble, Francia) y ALBA (Barcelona, España) y procesados y reducidos mediante los programas iMosflm (Powell *et al.*, 2013), XDS (Kabsch, 2010) y Aimless (Evans and Murshudov,

2013), de la interfaz CCP4 (Winn *et al.*, 2011). Las estadísticas de la recogida de datos se muestran en la Tabla 2.1.

Determinación de las estructuras de Dut80 α ^{WT}-dUMP y Dut80 α ^{G164S}-dUPNPP

Ambas estructuras fueron resueltas mediante reemplazo molecular utilizando el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y el PDB editado y publicado de la Dut80 α (PDB 3zez). Basándonos en los resultados previos publicados (Tormo-Más *et al.*, 2013) se han excluido para el modelo inicial de búsqueda las zonas de alta flexibilidad: extremo N-terminal y el motivo V, y el motivo VI no conservado presente en las Duts triméricas de fagos (rangos de amino ácidos 2-12, 142-170 y 95-127 respectivamente). 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. Los ciclos de afinado y construcción de modelo se realizaron utilizando los programas Coot (Emsley *et al.*, 2010) y Phenix (Adams *et al.*, 2010). Los modelos finales incluyen un protómero de Dut (rango de amino ácidos 2-168 y 2-170) con un dUMP y dUPNPP-Mg en el centro activo para Dut80 α ^{WT}-dUMP y Dut80 α ^{G164S}-dUPNPP respectivamente. Ambas estructuras presentan una buena geometría como indica el diagrama de Ramachandran (cada residuo está dentro de su región óptima). Un resumen de las estadísticas del proceso de afinado de las estructuras se muestra en la Tabla 2.1.

	Dut80α ^{WT} dUMP	Dut80α ^{G164S} dUPNPP
Processed data		
Beamline	ID23_1 (ESRF)	XALOC (ALBA)
Wavelength (Å)	0.98	0.98
Space group	P2 ₁ 3	P2 ₁ 3
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	87.00	87.47
α, β, γ (°)	90	90
Resolution (Å) ^a	61.5–2.33 (2.46–2.33)	43.7–2.4 (2.53–2.4)
R _{pim} (%)	0.031 (0.100)	0.029 (0.338)
Mean I/σ(I)	16.2 (6.2)	13.4 (2.0)
Unique reflections	9645 (1387)	8960 (1267)
Completeness (%)	99.9 (100)	99.6 (98.7)
Redundancy	11 (10.6)	5.2 (4.9)
Refined data		
Resolution (Å)	61.5–2.33 (2.39–2.33)	43.7–2.4 (2.74–2.4)
R _{factor} (%)	0.201 (0.228)	0.216 (0.263)
R _{free} (%)	0.249 (0.357)	0.249 (0.325)
No. non-hydrogen atoms	1413	1327
RMSD		
Bond deviation (Å)	0.0122	0.002
Angle deviation (°)	1.633	0.609
Mean B value (Å ²)	39.43	40.36
Ramachandran Map		
Favoured (%)	98.8	97
Allowed (%)	1.2	3
Disallowed region (%)	0	0
PDB accession code	5CCO	5CCT

^aValues in parentheses correspond to the data for the highest resolution shell

$$R_{pim} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{1/(n-1)} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)_i}$$

$$R_{factor} = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

R_{free} is the R_{factor} calculated with 5% of the total unique reflections chosen randomly and omitted from refinement.

Tabla 2.1. Estadísticas cristalográficas.

Resultados

Una concentración alta de dUTP bloquea la interacción Stl:Dut80 α

Como se mencionó anteriormente, Szabo y colaboradores proponen que tanto el represor Stl como el dUTP compiten entre sí para unirse a la Dut codificada por el fago $\phi 11$ (Szabó *et al.*, 2014). Por el contrario, nuestra hipótesis original, basada en el análisis de la Dut codificada por el fago 80 α , era que la interacción Stl:Dut se produce una vez que el dUTP ha ordenado el motivo conservado V (Figura 2.1). Para probar cómo el dUTP influye en la interacción Stl:Dut80 α se analizó la unión de Stl a la forma salvaje de Dut80 α (Dut80 α^{WT}) en presencia de dUPNPP, un análogo no hidrolizable del dUTP, usando métodos biofísicos y bioquímicos similares a los utilizados por Szabo y colaboradores. De acuerdo con este modelo alternativo (Szabó *et al.*, 2014), el análisis por BLI muestra que la presencia de dUPNPP afecta severamente la formación del complejo Stl:Dut80 α (Tabla 2.2). El mismo resultado se obtuvo al analizar la interacción entre Stl y la forma salvaje de Dut $\phi 11$ (Dut $\phi 11^{WT}$) mediante BLI, a pesar de que Dut $\phi 11$ es más sensible al efecto del nucleótido que Dut80 α . Así, el dUPNPP reduce la afinidad del complejo Stl:Dut80 α en alrededor un orden de magnitud, pero en dos órdenes de magnitud para la interacción Stl:Dut $\phi 11$ (Tabla 2.2) De manera importante, en ausencia de nucleótido Dut $\phi 11^{WT}$ presenta una afinidad por Stl 20 veces superior a la que tiene Stl por Dut80 α^{WT} (Tabla 2.2), estando estos datos de acuerdo con la eficacia superior de Dut $\phi 11$ en la inducción del ciclo de SaPIbov1 previamente descrita (Tormo-Más *et al.*, 2010). Las diferencias en afinidad por el represor Stl entre ambas Duts son debidas principalmente a una menor constante de disociación del complejo para Dut $\phi 11^{WT}$ (una k_{off} 16 veces menor), y no tanto a las constantes de asociación obtenidas para ambas proteínas (el k_{on} para Dut $\phi 11^{WT}$ es de 1,6 veces mayor al de Dut80 α^{WT}). Contrariamente,

analizados se muestran etiquetados y en forma de *sticks*. (B) Alineamiento de las secuencias de Dut80 α y Dut ϕ 11 basada en la estructura. El símbolo (*) indica los residuos conservados y (.) o (..) sustituciones conservadas. Los elementos estructurales secundarios se muestran e identifican sobre la secuencia de aminoácidos en color azul. Los cinco motivos conservados en las Duts aparecen sombreados I, II y III (gris), IV (rosa) y V (rojo); así como el motivo específico de Duts de fagos de *S. aureus* VI (verde). Las mutaciones puntuales analizadas y que aparecen señaladas y representadas como *sticks* en la Figura 2.1A están indicadas mediante flechas de color cian. En los mutantes delecionales del motivo VI Dut80 $\alpha^{\Delta VI}$ y Dut ϕ 11 $^{\Delta VI}$, la zona sombreada con verde fue substituida por Asn-Ser. Para los mutantes del extremo del motivo V situado en C-terminal Dut80 $\alpha^{\Delta V}$ y Dut ϕ 11 $^{\Delta V}$, se introdujo un codón de parada al inicio del motivo V (S158 y S157 para Dut80 $\alpha^{\Delta V}$ y Dut ϕ 11 $^{\Delta V}$, respectivamente). Los residuos intercambiados del motivo IV entre Dut80 α (Glu133-Arg134-Ile135) y Dut ϕ 11 (Asp132-Lys133-Leu134) aparecen enmarcados en rosa.

Como la unión al dUTP induce un cambio conformacional en el motivo V conservado y presente en todas las Duts triméricas analizadas, dos posibles escenarios podrían explicar la inhibición mediada por el dUTP: (i) el motivo V se encuentra involucrado, aunque de una manera contraria a la que habíamos propuesto anteriormente (en este caso el ordenamiento del motivo V mediado por el dUTP bloquearía la interacción Stl:Dut80 α); o (ii) como se propone en el modelo alternativo, el motivo V no está involucrado y no juega ningún papel en esta interacción, lo que supone que el dUTP interfiere con la formación del complejo compitiendo con el represor Stl por la interacción a las Duts.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

Protein ^a		Nucleotide ^b	K _D (k _{off} /k _{on}) (M)	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	
Dut80α	Dut80α ^{WT}	-	4 x 10 ⁻⁸	2.5 x 10 ⁴ ± 6 x 10 ²	1 x 10 ⁻³ ± 3 x 10 ⁻⁵	
		dUPNPP	4.66 x 10 ⁻⁷	3 x 10 ³ ± 2 x 10 ²	1.4 x 10 ⁻³ ± 3 x 10 ⁻⁵	
		dUMP	2.35 x 10 ⁻⁸	3.4 x 10 ⁴ ± 4 x 10 ²	8 x 10 ⁻⁴ ± 2 x 10 ⁻⁵	
	Dut80α ^{ΔV}	-	5.3 x 10 ⁻⁷	1.7 x 10 ⁴ ± 4 x 10 ²	9 x 10 ⁻³ ± 2 x 10 ⁻⁴	
		dUPNPP	5.25 x 10 ⁻⁷	8 x 10 ³ ± 1 x 10 ²	4.2 x 10 ⁻³ ± 7 x 10 ⁻⁵	
		dUMP	6.02 x 10 ⁻⁷	8.3 x 10 ³ ± 2 x 10 ²	5 x 10 ⁻³ ± 1 x 10 ⁻⁴	
	Dut80α ^{D81A}	-	1.61 x 10 ⁻⁷	2.6 x 10 ⁴ ± 9 x 10 ²	4.2 x 10 ⁻³ ± 2 x 10 ⁻⁴	
		dUPNPP	NBD ^c			
	Dut80α ^{Y84I}	-	NBD			
		dUPNPP	NBD			
	Dut80α ^{F165A}	-	5.81 x 10 ⁻⁷	2.7 x 10 ⁴ ± 2 x 10 ²	1.57 x 10 ⁻² ± 2 x 10 ⁻⁴	
		dUPNPP	NBD			
	Dut80α ^{G164S}	-	1.56 x 10 ⁻⁷	3 x 10 ⁴ ± 4 x 10 ²	4.7 x 10 ⁻³ ± 5 x 10 ⁻⁵	
		dUPNPP	NBD			
	Dut80α ^{D81A C-C} (reducing conditions)	-	5.83 x 10 ⁻⁸	2.4 x 10 ⁴ ± 6 x 10 ²	1.4 x 10 ⁻³ ± 4 x 10 ⁻⁵	
		dUPNPP	1.92 x 10 ⁻⁷	2.6 x 10 ⁴ ± 8 x 10 ²	5 x 10 ⁻³ ± 9 x 10 ⁻⁶	
	Dut80α ^{D81A C-C} (non-reducing conditions) ^d	-	6 x 10 ⁻⁹	1.4 x 10 ⁵ ± 1 x 10 ¹	8.5 x 10 ⁻⁴ ± 1 x 10 ⁻⁵	
		dUPNPP	1.93 x 10 ⁻⁸	5.7 x 10 ⁴ ± 6 x 10 ²	1.1 x 10 ⁻³ ± 2 x 10 ⁻⁵	
	Dut80α ^{ΔVI}	-	NBD			
		dUPNPP	NBD			
Dut80α ^{ΔVI-IV-11}	-	4.56 x 10 ⁻⁹	5.7 x 10 ⁴ ± 3 x 10 ²	2.6 x 10 ⁻⁴ ± 6 x 10 ⁻⁶		
Dut80α ^{IV-11}	-	3.13 x 10 ⁻⁹	6.7 x 10 ⁴ ± 2 x 10 ¹	2.1 x 10 ⁻⁴ ± 2 x 10 ⁻⁵		
Dutφ11	Dutφ11 ^{WT}	-	1.84 x 10 ⁻⁹	5 x 10 ⁴ ± 3 x 10 ²	9.2 x 10 ⁻⁵ ± 3 x 10 ⁻⁶	
		dUPNPP	3 x 10 ⁻⁷	2 x 10 ³ ± 1 x 10 ²	6 x 10 ⁻⁴ ± 1 x 10 ⁻⁵	
		dUMP	1.93 x 10 ⁻⁹	3 x 10 ⁴ ± 2 x 10 ²	5.8 x 10 ⁻⁵ ± 7 x 10 ⁻⁷	
	Dutφ11 ^{ΔV}	-	1.42 x 10 ⁻⁹	2.8 x 10 ⁴ ± 2 x 10 ²	4 x 10 ⁻⁵ ± 2 x 10 ⁻⁶	
		dUPNPP	3.84 x 10 ⁻⁹	1.3 x 10 ⁴ ± 5 x 10 ¹	5 x 10 ⁻⁵ ± 1 x 10 ⁻⁶	
	Dutφ11 ^{ΔVI}	-	1.14 x 10 ⁻⁸	2.1 x 10 ⁴ ± 1 x 10 ²	2.4 x 10 ⁻⁴ ± 3 x 10 ⁻⁵	
		dUPNPP	1.27 x 10 ⁻⁸	1.1 x 10 ⁴ ± 4 x 10 ²	1.4 x 10 ⁻⁴ ± 2 x 10 ⁻⁶	
	Dutφ11 ^{ΔV-ΔVI}	-	1.11 x 10 ⁻⁷	1.7 x 10 ⁴ ± 1 x 10 ²	1.9 x 10 ⁻³ ± 1 x 10 ⁻⁵	
		dUPNPP	2 x 10 ⁻⁷	9.5 x 10 ³ ± 6 x 10 ²	1.9 x 10 ⁻³ ± 1 x 10 ⁻⁵	
	Dutφ11 ^{ΔVI F164A}	-	1.31 x 10 ⁻⁷	1.6 x 10 ⁴ ± 5 x 10 ²	2.1 x 10 ⁻³ ± 6 x 10 ⁻⁵	
dUPNPP		3.78 x 10 ⁻⁷	8.2 x 10 ³ ± 6 x 10 ²	3.1 x 10 ⁻³ ± 2 x 10 ⁻⁵		
Dutφ11 ^{ΔVI-IV-80α}	-	NBD				
Dutφ11 ^{IV-80α}	-	3.33 x 10 ⁻⁹	7.5 x 10 ⁴ ± 1 x 10 ³	2.5 x 10 ⁻⁴ ± 1 x 10 ⁻⁵		

^aHis(6)-Dut protein purified.

^bdUPNPP was used at a final concentration of 0,5 mM; dUMP was used at 5 mM.

^cNBD: not binding detected in the experimental conditions used. KD > 1 x 10⁻⁶M.

^dnon-reducing buffer: 400mM NaCl, 75mM HEPES (pH7,5), 5mM MgCl2

Tabla 2.2. Valores cinéticos obtenidos por interferometría en bicapa (BLI) de la interacción StI:Duts en presencia o ausencia de nucleótidos de uracilo.

La implicación del motivo V en la inducción de la SaPI e interacción con StI

A fin de analizar la interacción StI:Dut y establecer claramente el papel del motivo V en este proceso, hicimos uso del mutante en el motivo V de Dut80 α previamente caracterizado (Dut80 $\alpha^{\Delta V}$), en el que se ha deleciónado la región C-terminal de la proteína, lo que corresponde al motivo conservado V (Figuras 2.1 y S2.1A). Este mutante no induce la isla *in vivo* (Figura 2.2A), a pesar de que une el dUTP (Tormo-Más *et al.*, 2013). Dado que el dUTP interfiere con la formación del complejo StI:Dut, investigamos si la incapacidad de este mutante de inducir la isla es debida a la presencia del dUTP o a la deleción del motivo V. Por ello, la interacción entre StI:Dut80 $\alpha^{\Delta V}$ fue analizada en ausencia de dUTP. Como muestra la Tabla 2.2, el motivo V de Dut80 α es esencial para la interacción StI:Dut ya que su deleción disminuye la afinidad por el represor StI más de 10 veces. Sorprendentemente, el dUTP no tiene casi efecto sobre este mutante, el cual muestra una afinidad similar por StI en presencia o ausencia de este nucleótido (Tabla 2.2), indicando que la inhibición de la unión de StI es mediada por la conformación del motivo V inducida por el dUTP más que por la unión del propio nucleótido.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

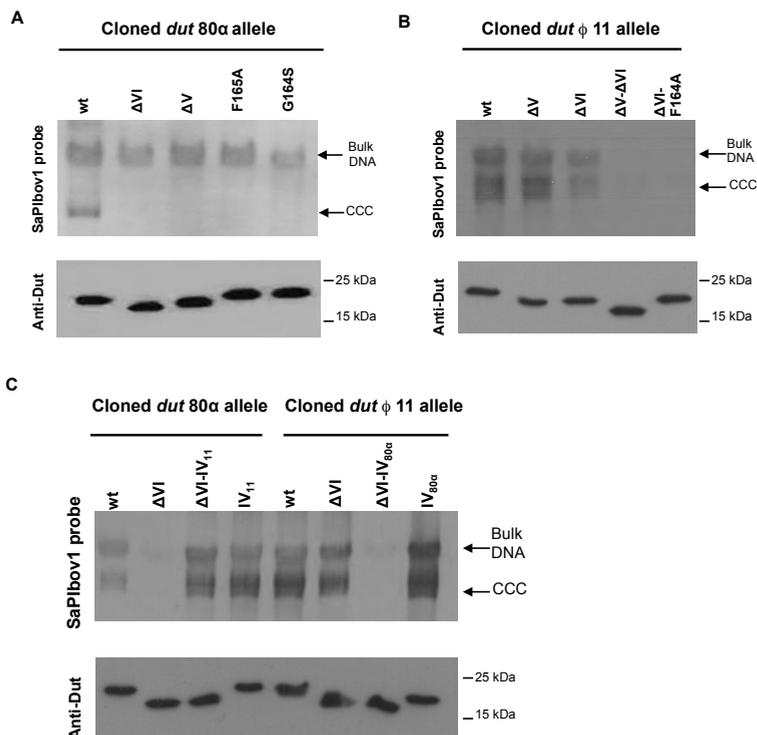


Figura 2.2. Efecto de mutaciones sobre las Duts de los fagos ϕ 80 α y ϕ 11 sobre la replicación de SaPIbov1. (A) Escisión y replicación de SaPIbov1 tras la inducción de los alelos *dut* de los fagos ϕ 80 α y ϕ 11. Una cepa no lisogénica derivada de la cepa RN4220 portadora de SaPIbov1 se complementó con plásmidos derivados del pCN51 capaces de expresar las diferentes Duts etiquetadas con 3xFLAG. Se tomó un mililitro de cada uno de los cultivos (OD₅₄₀ = 0.2) pasadas 2 horas tras el tratamiento con (A) 1 μ M CdCl₂, (B) 0,2 μ M CdCl₂ o (C) 2 μ M CdCl₂ y se utilizó para preparar minilizados estándar, los cuales se resolvieron mediante gel de agarosa al 0,7%, *southern blot*, y una sonda específica para el ADN de SaPIbov1. En todas las figuras (A-C) la banda superior *bulk DNA* correspondiente a la mayor parte del ADN; y las moléculas circulares covalentemente cerradas (CCC) indican el ADN de SaPIbov1 que se encuentra replicando. En estos experimentos, dado que se realizaron en ausencia de fago ayudante, el ADN escindido de la SaPI aparece como moléculas CCC y no como monómeros lineares, los cuales aparecen tras la infección y encapsidación mediada por fago. El panel inferior muestra una *western blot* utilizando un anticuerpo frente al FLAG fusionado en la proteínas Duts. (A) mutantes del fago 80 α Dut. wt: Dut80 α ^{WT}; Δ V: Dut80 α ^{Δ V}; Δ VI: Dut80 α ^{Δ VI}; F165A: Dut80 α ^{F165A}; G164S: Dut80 α ^{G164S}. (B) mutantes del fago ϕ 11 Dut. wt: Dut ϕ 11^{WT}; Δ V: Dut ϕ 11 ^{Δ V}; Δ VI: Dut ϕ 11 ^{Δ VI}; Δ V- Δ VI: Dut ϕ 11 ^{Δ V- Δ VI}; Δ VI F164A: Dut ϕ 11 ^{Δ VI F164A}. (C) Intercambio de los residuos del motivo IV entre los fagos ϕ 11 y 80 α Duts. Alelo de *dut*80 α clonado: wt: Dut80 α ^{WT}; Δ VI: Dut80 α ^{Δ VI}; Δ VI-IV11: Dut80 α ^{Δ VI-IV11}; wt-IV11: Dut80 α ^{IV-11}. Alelo de *dut* ϕ 11 clonado: wt: Dut ϕ 11^{WT}; Δ VI: Dut ϕ 11 ^{Δ VI}; Δ VI-IV80 α : Dut ϕ 11 ^{Δ VI-IV80 α} ; wt-IV80 α : Dut ϕ 11^{IV-80 α} .

Dado que los datos apoyan la idea de que el motivo V es esencial para la interacción Stl:Dut, dos nuevas posibilidades fueron analizadas: (i) la interacción Stl:Dut requiere la forma *apo* de la Dut con un motivo V completamente desordenado (que sería la conformación esperada en ausencia de nucleótido); o más improbable, (ii) la interacción Stl:Dut requiere el motivo V en una conformación alternativa.

Para resolver esta dicotomía, hicimos uso de diferentes mutantes de Dut80 α que no pueden ordenar el motivo V, aún en presencia de dUTP, previamente caracterizados por nosotros Dut80 α D81A (Dut80 α ^{D81A}) y Dut80 α Y84I (Dut80 α ^{Y84I}) (Tormo-Más *et al.*, 2013). Además, junto con estos mutantes, se ha generado y analizado el mutante F165A (Dut80 α ^{F165A}), que presenta una mutación localizada en el motivo V conservado (Figuras 2.1 y S2.1A). Previamente, habíamos mostrado que los mutantes catalíticos Dut80 α ^{D81A} y Dut80 α ^{Y84I} ni inducen SaPIbov1 ni tampoco ordenan el motivo V en presencia de dUTP, a pesar de que Dut80 α ^{D81A} pero no Dut80 α ^{Y84I} es capaz de unir el nucleótido (Tormo-Más *et al.*, 2013). Por otra parte, la Phe en posición 165 situada en el motivo conservado V, se sitúa sobre el anillo de uracilo (Figura 2.1A) y se ha propuesto que tenga un papel tanto en el ordenamiento de este motivo y en la actividad catalítica de las Duts (Mol *et al.*, 1996; Pecsí *et al.*, 2010). Tal como anticipamos, la mutación de este residuo a Ala (Dut80 α ^{F165A}) genera una proteína sin actividad hidrolítica dUTPasa que es incapaz de inducir la movilidad de la SaPI (Tabla 2.3 y Figura 2.2A). De manera importante, los mutantes Dut80 α ^{D81A} y Dut80 α ^{Y84I} son casi idénticos estructuralmente a la forma *apo* de Dut80 α ^{WT} con el motivo V completamente desordenado a pesar de que la Dut80 α ^{D81A} tiene el centro activo ocupado por el nucleótido (Tormo-Más *et al.*, 2013). Los análisis de los datos de interacción con Stl, mediante BLI, muestran comportamientos diferentes para ambos mutantes. Dut80 α ^{D81A}, el cual es capaz de unir el nucleótido, tiene una afinidad

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

algo menor por Stl respecto a la Dut80 α ^{WT} en ausencia de nucleótido (una K_D de $1,61 \times 10^{-7}$ M para Dut80 α ^{D81A} frente 4×10^{-8} M para Dut80 α ^{WT}), pero es incapaz de unir Stl en presencia de nucleótido (Tabla 2.2). Esta ligera disminución tiene grandes consecuencias *in vivo*, ya que el mutante Dut80 α ^{D81A} no puede inducir el ciclo de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2013). En cambio, Dut80 α ^{Y84I}, el cual muestra una afinidad aún mucho más menor (indetectable mediante BLI) por el represor Stl, es insensible al análogo dUPNPP (Tabla 2.2), de acuerdo con la incapacidad de este mutante de unir nucleótido (Tormo-Más *et al.*, 2013).

Para abordar estas diferencias desde el punto de vista estructural revisamos las estructuras previamente resueltas de los mutantes Dut80 α ^{D81A} y Dut80 α ^{Y84I} (Tormo-Más *et al.*, 2013). Superpusimos ambas estructuras sobre la estructura de Dut80 α en complejo con dUPNPP. La superposición muestra que el motivo V puede ordenarse, con mínimos impedimentos estéricos, sobre el centro activo del mutante Dut80 α ^{D81A}, indicando que esta mutación tiene un impacto mínimo en el centro activo (Figura S2.2A). Por el contrario, la mutación Dut80 α ^{Y84I} induce un giro en el β -hairpin conservado en el motivo III de las Duts (Figura S2.2B), sugiriendo que el acercamiento del motivo V se vería obstaculizado si se acercase al centro activo.

El mutante Dut80 α ^{F165A}, mutación situada en el motivo V, muestra una afinidad extremadamente baja por Stl incluso en ausencia de nucleótido, pareciéndose al mutante Dut80 α ^{Y84I} (Tabla 2.2). Extraordinariamente, la disminución en la afinidad por Stl que se observa en Dut80 α ^{D81A} y Dut80 α ^{F165A} se debe a un incremento en la constante de disociación (k_{off}) mientras que los valores para la constante de asociación (k_{on}) no se ven muy afectados respecto a los valores obtenidos para Dut80 α ^{WT} (Tabla 2.2). Este mecanismo cinético es diferente del que se observa para el de la inhibición

de la unión de Stl mediada por dUTP, el cual se logra por una disminución en la constante de asociación (Tabla 2.2). Dado que el motivo V se encuentra estructuralmente desorganizado en los mutantes analizados ($\text{Dut80}\alpha^{\text{D81A}}$ y $\text{Dut80}\alpha^{\text{Y84I}}$), estos resultados apoyan la idea que la interacción Stl:Dut requiere la forma *apo* de la enzima para la unión de Stl pero con el motivo V estabilizando de alguna manera el complejo Stl:Dut. Esta idea se confirma parcialmente con el análisis del mutante $\text{Dut80}\alpha^{\text{G164S}}$, que presenta una mutación dentro del motivo conservado V.

En un estudio complementario hemos mostrado que pese que el mutante $\text{Dut80}\alpha^{\text{G164S}}$ presenta la actividad enzimática ligeramente reducida (Tabla 2.3), su capacidad por inducir la isla SaPI_{bov1} se encuentra altamente afectada (Figura 2.2A) (Frigols *et al.*, 2015). A la vista de estos datos, especulamos que este mutante debería ser capaz de ordenar el motivo V aunque las cinéticas de este procesos se encuentren afectadas de alguna manera. Como anticipamos, la caracterización estructural del mutante $\text{Dut80}\alpha^{\text{G164S}}$ (Tabla 2.1) muestra que este mutante es capaz de ordenar el motivo V en presencia de dUTP en una conformación idéntica a la observada para $\text{Dut80}\alpha^{\text{WT}}$ (Figuras 2.3A y B). En esta conformación, la cadena lateral de la nueva Ser queda expuesta al solvente en la superficie del motivo V (Figura 2.3B). No se ha observado ninguna diferencia más cuando al comparar la estructura de este mutante con la forma salvaje de la proteína (Figura S2.3).

El análisis de la interacción con Stl, mediante BLI, muestra que el mutante $\text{Dut80}\alpha^{\text{G164S}}$, como ocurría en $\text{Dut80}\alpha^{\text{D81A}}$, tienen una afinidad disminuida por el represor Stl que se hace indetectable en presencia de nucleótido (Tabla 2.2). Sorprendentemente, la disminución en la afinidad por Stl observada en el mutante $\text{Dut80}\alpha^{\text{G164S}}$, como ocurría en los mutante $\text{Dut80}\alpha^{\text{D81A}}$ y $\text{Dut80}\alpha^{\text{F165A}}$, se debe a un incremento en la constante de disociación sin verse afectada o muy poco afectada la constante de asociación (Tabla 2.2). En resumen, estos

resultados apoyan nuestra propuesta en la que el motivo V ejerce una doble función como conmutador *on/off* de la unión a Stl y como elemento de reconocimiento para dicha unión. Por una parte, la conformación del motivo V inducida por la unión del dUTP interfiere en la unión de Stl (ya que el dUTP disminuye la constante de asociación); por otra parte, una conformación alternativa de este motivo se encuentra implicada en la estabilización del complejo Stl:Dut (ya que deleciones o mutaciones que afecten a este motivo incrementan la constante de disociación).

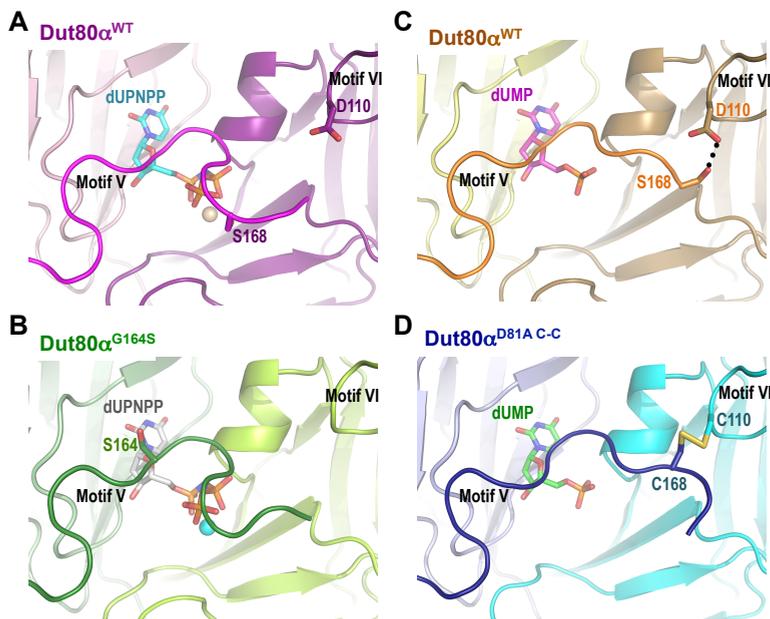


Figura 2.3. La conformación del motivo V se correlaciona con el nucleótido unido al centro activo. (A) $Dut80\alpha^{WT}$ y (B) $Dut80\alpha^{G164S}$ unidos a dUPNPP, y (C) $Dut80\alpha^{WT}$ y (D) $Dut80\alpha^{D81A\ C-C}$ unidos a dUMP. En las estructuras el motivo V C-terminal adquiere diferentes conformaciones dependiendo del nucleótido presente en el centro activo. Los motivos V y VI están etiquetados, y los residuos D110 y S168 mutados a Cys, y que se encuentran formando un puente di-sulfuro en $Dut80\alpha^{D81A\ C-C}$, se muestran como *sticks* en (A), (C) y (D). El puente de hidrógeno entre D110 y S168 en $Dut80\alpha^{WT}$ en presencia de dUMP aparece como una línea discontinua de color negro en (C). La G164 mutada en $Dut80\alpha^{G164S}$ se muestra como *sticks*. Para diferenciar las subunidades dentro de los trímeros, cada una se ha coloreado con un color de diferente tonalidad. Los nucleótidos están etiquetados y mostrados como *sticks*.

El papel del dUMP en la unión Stl:Dut

Para explorar con más detalle esta posibilidad de función dual, analizamos la posibilidad de que el motivo V pueda adquirir diferentes conformaciones durante el proceso de reconocimiento y de unión a Stl. Szabo y colaboradores mostraron en su modelo alternativo que el dUTP, pero no el dUMP, inhibía la unión de Stl a Dut ϕ 11 (Szabó *et al.*, 2014). Como muestra la Tabla 2.2, y de acuerdo con los datos obtenidos por Szabo y colaboradores con Dut ϕ 11, el dUMP no interfiere con la formación del complejo Stl:Dut. Este resultado resulta sorprendente dado que en el mecanismo alternativo propuesto por Szabo y colaboradores se propone que el dUTP y Stl compiten por la unión a la Dut y dado que dUTP y dUMP comparten el mismo sitio de unión en las Duts. Nuestra propuesta es que el efecto diferencial que se observa para cada nucleótido pudiera estar relacionado con el mecanismo de unión de Stl e intentamos esclarecer esta ambigüedad utilizando dos estrategias complementarias: resolviendo la estructura de Dut80 α en presencia de dUMP (Tabla 2.1) y analizando la formación del complejo Stl:Dut en presencia de dUMP.

Sorprendentemente, la estructura de Dut80 α ^{WT} en presencia de dUMP muestra el motivo V ordenado sobre el centro activo. La comparación de esta estructura con la de Dut80 α ^{WT} en presencia de dUPNPP muestra ligeras, pero evidentes, diferencias en la conformación del motivo V, las cuales afectan a los últimos cuatro residuos del extremo C-terminal (Figuras 2.3A y C, y S2.4). Esta región (GSSGV), parcialmente conservada, de motivo V (Figura S2.1A), la cual está involucrada en el reconocimiento del fosfato en posición γ y en la actividad enzimática de la Dut (Pecsi *et al.*, 2011), adopta una conformación alternativa en presencia de dUMP, acercándose al motivo VI. Esta conformación abre un canal en el centro activo que puede ser utilizado para liberar el pirofosfato, producto de la reacción de hidrólisis de la Dut

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

(Figuras 2.3C y S2.5). La liberación de los productos de la hidrólisis del dUTP, dUMP y pirofosfato, descrita como una etapa rápida de la reacción en Duts (Tóth *et al.*, 2007), podría verse facilitada por la estabilización débil del motivo V sobre el centro activo en presencia de dUMP como muestra el incremento de los valores de B-factor para esta región (un 30% superiores respecto a los valores del cuerpo central de la molécula) y la ausencia de densidad para los dos últimos residuos del extremo C-terminal para la Dut80 α unida a dUMP. Sorprendentemente, la conformación del motivo V inducida por dUMP es similar a la conformación adoptada por uno de los mutantes previamente caracterizado por nosotros, en este caso Dut80 α S168C D110C D81A (Dut80 $\alpha^{\text{D81A C-C}}$) (Tormo-Más *et al.*, 2013). En este mutante, los residuos D110 (en el motivo VI) y S168 (en el motivo V) han sido mutados a cisteínas (D110C y S168C) (Figura 2.1). Tal como los datos cristalográficos confirmaron, la proximidad de estos residuos en la proteína nativa permite la formación de un enlace di-sulfuro, haciendo que el motivo V permanezca ordenado sobre el centro activo en una conformación similar a la obtenida para la Dut80 α^{WT} en presencia del dUMP, con la excepción de mínimos cambios generados por el puente di-sulfuro (Figuras 2.3C y D; y S2.4). Este mutante mostró una mayor capacidad para inducir la SaPI que la forma *wild-type* de Dut80 α a pesar de ser catalíticamente inactivo (el-Hajj *et al.*, 1988). Es importante destacar que la presencia del dUTP no tiene un gran efecto en esta interacción (Tabla 2.2), probablemente debido a la incapacidad del nucleótido por acceder al centro activo. Finalmente, y cuando este mutante es analizado en presencia de agentes reductores, muestra un comportamiento similar al observado para la proteína *wild-type* (Tabla 2.2), sugiriendo que el acceso del dUTP al centro activo debe inducir cambios conformacionales en el motivo V que impiden la unión de StI. Apoyando esta idea, la cristalización del mutante Dut80 $\alpha^{\text{D81A C-C}}$ en condiciones oxidantes, la proteína purificada (a partir de células de *E. coli*) siempre contenían el dUMP en el centro activo y no el análogo del dUTP (Figura 2.3D),

a pesar de que este mutante fuera catalíticamente inactivo y que el dUPNPP fuera añadido a la solución de cristalización (Tormo-Más *et al.*, 2013).

Dado que los nuevos resultados sugerían que la conformación competente que debía adoptar la Dut para la inducción de la SaPI pudiera ser aquella en presencia de dUMP, analizamos el efecto de este nucleótido en la interacción Stl:Dut. Sorprendentemente, y como previamente observamos para el dUTP, el dUMP tiene un efecto mínimo sobre la unión de Stl al mutante Dut80 $\alpha^{\Delta V}$ (Tabla 2.2), confirmando que es la conformación que adopta el motivo V inducida por el nucleótido, más que la presencia del nucleótido por si mismo en el centro activo, la que es responsable de las diferencias observadas en las afinidades de unión a Stl. Dado que proponemos que el dUMP pudiese favorecer una conformación alternativa y competente del motivo V, inicialmente esperábamos que la afinidad de la Dut con dUMP unido por Stl se viera incrementada en presencia de este nucleótido. No obstante, este no fue el caso. Los cambios cinéticos que se observan no son los que se esperaban, y el dUMP no produce un incremento claro de la afinidad de Dut80 α por Stl (Tabla 2.2).

En resumen, mientras los datos cristalográficos muestran que el dUMP induce un cambio conformacional en la parte C-terminal del motivo V, la afinidad del complejo Stl:Dut no se ve incrementada en presencia de este nucleótido, sugiriendo que este cambio ni favorece ni dificulta la interacción de la Dut con el represor. Aunque el motivo V se encuentra claramente involucrado en la interacción Stl:Dut80 α , nuevos experimentos deben llevarse a cabo para esclarecer cuál es la conformación competente que debe adoptar el motivo V para inducir el ciclo de SaPI_{bov1}.

El motivo VI es esencial para el reconocimiento de Stl

En un trabajo previo se había demostrado la importancia del motivo VI utilizando diferentes estrategias complementarias, incluyendo el análisis de la

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

Dut del fago PH15 de *Staphylococcus epidermis*, la cual es similar a Dut80 α exceptuando la falta del motivo extra VI y, en consecuencia, incapaz de inducir el ciclo de la SaPI (Figura S2.1B) (Tormo-Más *et al.*, 2010). Sin embargo, un artículo reciente, sugiere que este motivo no es necesario para el proceso ya que el represor StI de SaPIbov1 y la Dut de *Mycobacterium tuberculosis*, que no contiene el motivo VI variable, son capaces de formar un complejo estable *in vitro* (Hirmondo *et al.*, 2015). Decidimos, pues, obtener una mayor claridad sobre la importancia del motivo extra VI en la inducción de la SaPI analizando la afinidad de StI por un mutante de Dut80 α que careciese de este motivo, substituyendo este motivo (residuos 96-124) por dos residuos (Ser-Asn) produciendo el mutante Dut80 $\alpha^{\Delta VI}$, el cual mantiene una actividad enzimática intacta (Tabla 2.3, Figuras 2.1A y S2.1A). Recientemente, se ha descrito una construcción similar de Dut ϕ 11, que igualmente carece del motivo VI, la cual no presenta grandes diferencias en sus constantes cinéticas respecto a la forma salvaje de la proteína (Leveles *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que este motivo VI, específico de Duts de fagos, no presenta ninguna implicación sobre la actividad enzimática de la proteína. De acuerdo con la especificidad en la unión de StI propuesta para este motivo, el mutante Dut80 $\alpha^{\Delta VI}$ no muestra ningún tipo de unión a StI ya sea en ausencia como en presencia de nucleótido al analizarlo mediante BLI (Tabla 2.2). Los datos *in vivo* confirman que este mutante es incapaz de inducir SaPIbov1, aún cuando es sobre-expresado desde plásmido (Figura 2.2A), confirmando nuestros resultados previos *in vivo* que apuntaban al papel de este motivo en el reconocimiento de StI (Tormo-Más *et al.*, 2010).

Protein ^a	Activity (μmoles/min/ug protein) ^b
Dut80α ^{WT}	0.038
Dut80α ^{G164S}	0.019
Dut80α ^{F165A}	ND ^c
Dut80α ^{ΔVI}	0.042
Dut80α ^{ΔVI-IV-11}	0.071
Dut80α ^{IV-11}	0.038
Dutφ11 ^{WT}	0.0124
Dutφ11 ^{ΔV}	ND
Dutφ11 ^{ΔVI}	0.041
Dutφ11 ^{ΔV-ΔVI}	ND
Dutφ11 ^{ΔVI F164A}	ND
Dutφ11 ^{ΔVI-IV-80α}	0.045
Dutφ11 ^{IV-80α}	0.018

^aHis(6)-Dut protein purified.

^bMeasured as production of PPI at 25°C. 400 μM dUTP. Variation was within ±10%.

^cND: no activity detected in the experimental conditions used

Tabla 2.3. Actividad dUTPasa.

Los motivos V y VI también se encuentran involucrados en la interacción entre Dutφ11 y StI

A diferencia de estos resultados utilizando la Dut del fago φ80α, resultados recientemente publicados parecen indicar que la Dutφ11 no necesita ni el motivo V ni el motivo VI para interactuar con StI (Szabó *et al.*, 2014). Dado que las Duts codificadas por los fagos φ80α y φ11 tienen una secuencia completamente divergente en su motivo VI (Figura S2.1A), pero ambas pueden inducir el ciclo de SaPI_{bov1} (Tormo-Más *et al.*, 2010), se postuló con la posibilidad de que estas proteínas interactúen con StI de manera diferente. Adicionalmente, cabe destacar que, como se ha indicado previamente, la afinidad por el represor StI es un orden de magnitud mayor para Dutφ11 comparada con la Dut80α (Tabla 2.2).

Para analizar esta posibilidad, hemos testado el efecto de deletar el motivo V y el motivo VI en Dutφ11 tanto *in vitro* como *in vivo*. La delección del motivo V genera el mutante Dutφ11^{ΔV}, que es capaz de inducir el ciclo de

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

SaPIbov1, con una afinidad por Stl idéntica a la observada para Dut ϕ 11^{WT}, pero sin actividad catalítica (Figura 2.2B y Tablas 2.2 y 2.3). No obstante, como observábamos para Dut80 $\alpha^{\Delta V}$, la afinidad de este mutante por Stl es insensible al dUTP (Tabla 2.2), apoyando nuestra propuesta sobre el papel central del motivo V en la inhibición de la unión de Stl mediada por dUTP. Para testar el papel del motivo VI en Dut ϕ 11, se sustituyeron el rango de residuos 96-123 por Ser-As generando el mutante Dut ϕ 11 ^{Δ VI} (Figura 2.1). Este mutante muestra una actividad enzimática superior a la forma salvaje pero una capacidad ligeramente reducida de inducir SaPIbov1 (Tabla 2.3 y Figura 2.2B). En concordancia con los datos *in vivo*, Dut ϕ 11 ^{Δ VI} muestra una disminución de un orden de magnitud su afinidad por Stl cuando se mide *in vitro* mediante BLI (Tabla 2.2).

Estos resultados fueron sorprendentes, abriendo nuevas posibilidades. Por una parte, puede ser posible que Dut80 α y Dut ϕ 11 tengan diferentes mecanismos de unión a Stl. Otra posibilidad puede ser que los motivos implicados en la unión a Stl, que son idénticos en ambas Duts, contribuyen en la interacción con Stl de manera diferente dependiendo de la Dut. Finalmente, también puede ser posible que otro motivo divergente entre ambas Duts participe en la interacción Stl:Dut. Para resolver estas dudas, y para esclarecer el papel de los motivos V y VI en la interacción Stl:Dut ϕ 11, decidimos eliminar ambos motivos (V y VI) de la Dut ϕ 11 generando el mutante Dut ϕ 11 ^{Δ V- Δ VI}. Apoyando el papel de los motivos V y VI en la interacción con Stl, el doble mutante Dut ϕ 11 ^{Δ V- Δ VI} muestra una disminución significativa en su capacidad por inducir SaPIbov1 y una fuerte disminución (dos ordenes de magnitud en el K_D) en la afinidad de unión a Stl respecto a los mutantes simples (Tabla 2.2 y Figura 2.2B), sugiriendo un efecto sinérgico de ambos motivos en la unión a Stl. Más aún, cuando la Phe presente en el motivo V es mutada a Ala en el mutante Dut ϕ 11 ^{Δ VI}, se obtiene el mutante Dut ϕ 11 ^{Δ VI F164A} catalíticamente

inactivo, con un comportamiento similar tanto *in vitro* como *in vivo* a Dut ϕ 11 ^{Δ V- Δ VI} (Tablas 2.2 y 3; y Figura 2.2B). Sorprendentemente, y como previamente mostraba la caracterización de Dut80 α , la delección del motivo V así como la mutación Phe164Ala origina proteínas con una afinidad por unir Stl e inducción de SaPIbov1 casi idéntica. Todo junto, nuestro análisis en paralelo con Dut80 α y Dut ϕ 11 apoya un mecanismo de interacción Stl:Dut donde participen el motivo V y VI y que parece estar conservado entre Duts de fagos de *S. aureus*, aunque, como se discutirá más adelante, la relevancia de los diferentes motivos en la unión a Stl difiere entre las Duts estudiadas. Finalmente, la capacidad de los mutantes Dut ϕ 11 ^{Δ VI} y Dut80 α ^{Δ VI} por unir Stl sugiere que otro motivo participe en la interacción Stl:Dut.

El motivo IV también está implicado en la unión de Stl

A pesar de que nuestros datos apoyan un mecanismo de interacción Stl:Dut conservado, la diferencia en afinidad entre los mutantes defectivos para el motivo VI de Dut ϕ 11 y Dut80 α resulta confusa. En *S. aureus*, las Duts triméricas codificadas por fagos están altamente conservadas en secuencia a excepción del motivo divergente VI (Figura S2.1A). Basados en estas diferencias a nivel de secuencia y en las afinidades por Stl que tienen Dut ϕ 11 y Dut80 α , inicialmente asumimos que la diferente capacidad por inducir SaPIbov1 se debía exclusivamente al motivo VI. No obstante, cuando se comparan, las secuencias de los mutantes Dut ϕ 11 ^{Δ VI} y Dut80 α ^{Δ VI} son básicamente idénticas exceptuando nueve residuos (Figura S2.1A). Sorprendentemente, los mutantes Dut ϕ 11 ^{Δ VI} y Dut80 α ^{Δ VI} muestran diferencias en su capacidad de inducir SaPIbov1 (Figura 2.2), sugiriendo que estas diferencias pueden también tener un impacto importante en el control de la interacción Stl:Dut. Hipotetizamos inicialmente que tres de estos nueve residuos que son diferentes (Glu133/Arg134/Ile135 en Dut80 α ,

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

o Asp132/Lys133/Leu134 en Dut ϕ 11) podrían ser clave en el reconocimiento de Stl ya que: (i) estos residuos se sitúan en la región donde los motivos de unión a Stl, V y VI, se aproximan, (ii) estos residuos forman parte del dominio conservado IV implicado en la coordinación del ión magnesio y los fosfatos del nucleótido y (iii) el motivo pirofosfato, el cuál diferencia el dUTP del dUMP, se encuentra cercano a estos residuos (Figura 2.1A) (Vértessy and Tóth, 2009).

Para comprobar nuestra hipótesis, intercambiamos estos tres residuos entre los mutantes Dut80 $\alpha^{\Delta VI}$ y Dut ϕ 11 $^{\Delta VI}$, generando los mutantes Dut80 $\alpha^{\Delta VI-IV-11}$ y Dut ϕ 11 $^{\Delta VI-IV-80\alpha}$, respectivamente. Dado que el motivo VI es altamente divergente y que claramente se encuentra involucrado en la interacción Stl:Dut, inicialmente analizamos el impacto de los residuos del motivo IV en los mutantes sin motivo VI. Los mutantes Dut80 $\alpha^{\Delta VI-IV-11}$ y Dut ϕ 11 $^{\Delta VI-IV-80\alpha}$ muestran una actividad catalítica intacta, indicando que los tres residuos intercambiados tienen poca influencia a nivel cinético (Tabla 2.3). Sorprendentemente, cuando estos tres residuos dentro de la zona divergente del motivo IV son intercambiados, la eficiencia con la que tiene lugar la inducción de SaPIbov1 se transfiere junto con el intercambio de estos tres residuos (Figura 2.2C). La posibilidad de que los niveles de expresión de ambos genes fuera responsable de estas diferencias se descartó mediante *western blot* (Figura 2.2C), cuyo resultado confirma que los dos genes se han expresado al mismo nivel. Mediante BLI confirmamos la observaciones *in vivo*. Los datos obtenidos muestran que la afinidad por Stl es transferida junto con estos residuos. Los valores de K_D para el mutante Dut80 $\alpha^{\Delta VI-IV-11}$ son similares a aquellos obtenidos para Dut ϕ 11^{WT}, y tal como se observó para el mutante Dut80 $\alpha^{\Delta VI}$ no se detecta formación de complejo para el mutante Dut ϕ 11 $^{\Delta VI-IV-80\alpha}$ (Tabla 2.2).

Seguidamente, analizamos el impacto de los tres residuos nombrados en la afinidad de las formas salvajes de las Duts por el represor Stl. Para hacer esto, intercambiamos estos tres residuos entre las formas salvajes de Dut80 α y Dut ϕ 11, generando los mutantes Dut80 α ^{IV-11} y Dut ϕ 11^{IV-80 α} , respectivamente, los cuales mantienen intactas sus actividades catalíticas (Tabla 2.3). No obstante, el intercambio tiene un fuerte impacto en la afinidad de Dut80 α por Stl. En este mutante, la afinidad por Stl aumenta en un orden de magnitud, mostrando un valor de K_D similar al de Dut ϕ 11^{WT} (Tabla 2.2). De acuerdo con este incremento en la afinidad, Dut80 α ^{IV-11} muestra una mayor capacidad de inducir SaPIbov1 *in vivo* cuando se expresa mediante plásmido (Figura 2.2C). Por otra parte, y de acuerdo con el descubrimiento que el motivo VI presente en Dut ϕ 11 confiere mayor afinidad por el represor Stl que el que se encuentra en Dut80 α , el mutante Dut ϕ 11^{IV-80 α} muestra una leve disminución en su afinidad por Stl y un capacidad por inducir SaPIbov1 similar a la forma salvaje (Figura 2.2C). En resumen, estos resultados apoyan la involucración del motivo IV en el reconocimiento de Stl. Como previamente se ha mencionado, el motivo IV se encuentra localizado en el punto de convergencia entre los motivos V y VI, lo que explicaría la participación sinérgica de todos estos motivos en la interacción con Stl, y consecuentemente, la inducción del ciclo de la SaPI.

Los niveles de dUTP no influyen en la transferencia de la SaPI

A día de hoy en un misterio cómo *S. aureus* regula los niveles de dUTP. En el trabajo publicado por Szabo y colaboradores se asume que los niveles de dUTP intracelular deben ser elevados debido a la falta de una Dut genómica en esta bacteria (Szabó *et al.*, 2014). En esta situación, Szabo y colaboradores sugieren que el papel de la Dut codificada por el fago debería ser el de reducir los niveles de dUTP hasta concentraciones fisiológicas, evitando la incorporación del dUTP durante la replicación de la SaPI, lo que debería

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

afectar al ciclo de la SaPI. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que este supuesto no se apoya en la literatura publicada previamente, ya que los niveles altos de dUTP debido a deleciones del gen *dut* o mutaciones que eliminen la actividad hidrolítica de la enzima son críticas para la viabilidad celular, llegando a ser letales tanto en organismos procariotas como eucariotas (en todas las bacterias testadas los mutantes en *dut* son letales) (Castillo-Acosta *et al.*, 2013; Dengg *et al.*, 2006; el-Hajj *et al.*, 1988; Pecsí *et al.*, 2012). Esto también sugiere que *S. aureus* probablemente tiene vías inexploradas para el control de los niveles de dUTP, que son completamente independientes de las Duts codificadas por fagos. En apoyo a esto, se ha publicado recientemente la existencia de cepas virulentas no lisogénicas de *S. aureus* que carecen de fagos con un núcleo central del genoma extremadamente bien conservado y capaces de producir epidemias en conejos (Viana *et al.*, 2015).

Dado que la discusión anterior es totalmente especulativa, y debido a que no podemos medir los niveles de dUTP *in vivo*, hemos analizado experimentalmente si la ausencia del gen *dut* codificado por el fago tiene efectos negativos sobre la transferencia de SaPIs. Nuestros experimentos originales de identificación de los inductores de las SaPIs mostraron que este no es el caso. Así pues, y haciendo uso del fago $\phi 80\alpha$, que codifica las proteínas para inducir las isla SaPIbov1 (Dut), SaPI1 (Sri) y SaPIbov2 (ORF15), hemos demostrado que el mutante *dut* del fago $\phi 80\alpha$ no vio afectada su capacidad para inducir y transferir SaPI1 y SaPIbov2 (Tormo-Más *et al.*, 2010). Dado que las cepas utilizadas en este estudio no codifican para el gen *dut*, y asumiendo que la Dut codificada por el fago fuera esencial para la detoxificación del dUTP, estos resultados descartan la posibilidad de que la uracilación sea perjudicial para el ciclo de la SaPI.

Para completar este estudio, y analizar cómo la ausencia del gen *dut* influye en la transferencia de SaPIbov1, se hizo uso del mutante *stl* para el represor

de SaPI_{bov1}. Este mutante se induce de forma constitutiva en ausencia de cualquier fago inductor (Ubeda *et al.*, 2008). Este mutante se transfirió a cepas RN10359 (portadoras del fago salvaje $\phi 80\alpha$) y JP6032 (un mutante derivado de RN10359 en la *dut* del fago $\phi 80\alpha$). Los profagos de ambas cepas fueron inducidos usando mitomicina C, y la transferencia del mutante *stl* de SaPI_{bov1} fue analizado. Los resultados no mostraron diferencias en la replicación o la transferencia de la SaPI del mutante *stl* en el caso del fago *dut* mutado (Figura 2.4), lo que confirma los resultados anteriores que descartan un papel de la uracilación en el ciclo de las SaPIs.

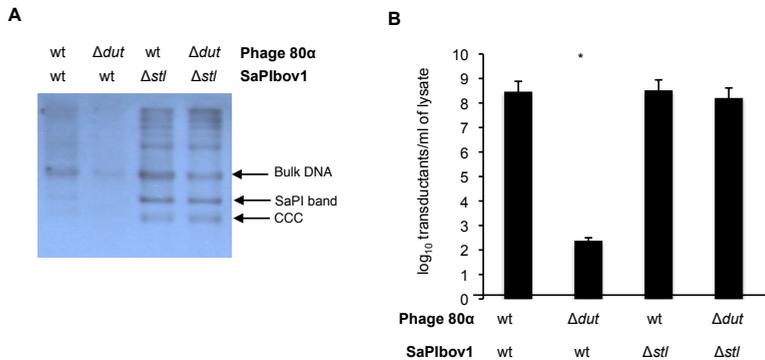


Figura 2.4. Efecto en la replicación y transferencia de SaPI_{bov1} del mutante *stl*. **(A)** *Southern blot* de lisados tras la inducción de los fagos $\phi 80\alpha$ wt o el mutante Δdut . Las muestras fueron aisladas pasados 60 min de la inducción con mitomicina C de las diferentes cepas lisogénicas portadoras de SaPI_{bov1} *tst::tetM* (wt) o SaPI_{bov1} Δstl *tst::tetM* (Δstl). Las muestras fueron separadas en un gel de agarosa y reveladas frente a una sonda específica de SaPI_{bov1}. La banda superior “*bulk DNA*”, incluye el ADN cromosomal, del fago y de la SaPI que se encuentra replicándose. La banda intermedia corresponde a los monómeros lineales de SaPI liberados desde las cápsides de los fagos. La banda inferior corresponde a las moléculas de SaPI_{bov1} circulares covalentemente cerradas (CCC). **(B)** La figura muestra el número de transductantes (\log_{10}) por mililitro de cultivo inducido, utilizando RN4220 como cepa receptora. La media de los resultados de tres ensayos independientes se muestra. La frecuencia observada en el mutante Δdut es típica de la transferencia mediante transducción generalizada y no es específica de SaPI. El test *Yates' chi-squared* fue utilizado para calcular los *P* valores para la comparación entre grupos; las diferencias que estadísticamente significativas están indicadas mediante un asterisco ($P < 0.001$).

Discusión

Nuestros resultados previos, tanto estructurales como funcionales, acerca de la Dut del fago $\phi 80\alpha$ y su capacidad de inducir el ciclo de SaPI_{bov1}, indicaban que las Duts codificadas por fagos son proteínas señalizadoras con un mecanismo de control similar al de las proteínas G. Dado que las proteínas G y las Duts muestran diferentes propiedades cinéticas, nuestra similitud conceptual propuesta se basaba en: (i) ambas familias de proteínas funcionan como mecanismos señalizadores junto con un nucleótido que actúa como segundo mensajero, (ii) implican *P-loop(s)* (dos en el caso de las proteínas G), los cuales cubren el centro activo, en la unión de las proteínas diana, y (iii) la hidrólisis del nucleótido alterna entre la capacidad señalizadora activa/inactiva (*on/off*) de la proteína. Los datos obtenidos previamente mostraban una clara correlación entre la ordenación del *P-loop* del motivo V de las Duts, como se observó en presencia de dUTP, y la inducción de la SaPI, apoyando la analogía con las proteínas G de un estado activo en presencia de nucleótido (dUTP) y un estado inactivo cuando el nucleótido era hidrolizado (dUMP). No obstante, el análisis biofísico llevado a cabo por Szabo y colaboradores con la Dut del fago $\phi 11$, mostró que el dUTP dificulta la unión de StI a la Dut (Szabó *et al.*, 2014). Basados en esta observación los autores propusieron un modelo alternativo al nuestro mediante el cual las Duts inducen el ciclo de la SaPI. En este modelo, para que se pueda unir StI, la Dut codificada por el fago debería reducir la cantidad de dUTP, y así, en ausencia de sustrato, la Dut se encontraría disponible para interactuar con StI de una forma que no requiere la participación del motivo V. Aunque estos autores no estuvieran de acuerdo con nuestra propuesta inicial, que sugiere que las Duts inducen las SaPIs por un mecanismo parecido al de las proteínas G, con la participación del dUTP como segundo mensajero, consideramos que sus resultados confirman conceptualmente nuestro mecanismo de señalización propuesto.

CAPÍTULO 2: DISCUSIÓN

Es cierto que, contrariamente a nuestra idea inicial, los autores demostraron que la forma con dUTP bloquea la inducción de las SaPIs (en lugar de favorecerla). Sin embargo, este resultado demuestra claramente que el dUTP controla los estados *on/off* de la señalización mediada por la Dut en el proceso de unión a Stl.

Por último, el modelo alternativo propuesto parece estar muy lejos de un contexto fisiológico ya que Szabo y colaboradores asumen un alto nivel de dUTP intracelular en *S. aureus* en condiciones basales de crecimiento, condiciones que se han demostrado ser letales para varios organismos a menos que el gen *ung*, un gen presente en *S. aureus* e implicado en la reparación de base por escisión en el ADN (el-Hajj *et al.*, 1988), se encuentre eliminado.

El efecto inhibitor del dUTP en la unión Stl:Dut, propuesto por Szabo y colaboradores con Dut ϕ 11, nos obligó a revisar nuestros datos anteriores con el fin de generar un modelo que pudiera explicar todas las observaciones *in vitro* e *in vivo*. Dado que nuestros datos estructurales y funcionales anteriores correlacionan claramente el ordenamiento del motivo V y la inducción de las SaPIs, y dado que el posicionamiento del motivo V sobre el centro activo se ha demostrado en la literatura como el principal cambio conformacional inducido por el dUTP tras su unión; fue sorprendente que este nucleótido impidiera la interacción Stl:Dut, bloqueando la inducción de la SaPI. Después de confirmar que el dUTP también bloquea la interacción Stl:Dut80 α , analizamos el efecto del nucleótido en la interacción Stl:Dut utilizando algunos de los mutantes caracterizados previamente en nuestros estudios originales (Tormo-Más *et al.*, 2013) y generando además una nueva batería de mutantes diseñados específicamente para este estudio. En paralelo, analizamos algunas de estas mutaciones en Dut ϕ 11 para descartar la posibilidad de dos mecanismos alternativos en la interacción Stl:Dut. Los análisis *in vitro* e *in vivo* de estos mutantes confirman la implicación tanto del motivo V como del motivo VI en

el reconocimiento y la unión de Stl, como previamente habíamos propuesto, pero con diferente contribución en función de la Dut en la interacción con el represor Stl. Además, el análisis en paralelo ha confirmado que el motivo IV también participa en la interacción con Stl. Esta nueva región descrita se encuentra descubierta en la zona donde los motivos V y VI se aproximan y está involucrada en la coordinación entre el magnesio y la cadena de fosfatos (Vértessy and Tóth, 2009). Además, los residuos del motivo IV analizados se sitúan en las proximidades del pirofosfato y de la parte C-terminal del motivo V, los dos elementos que muestran cambios (el primero ausente y el segundo cambia de conformación), dependiendo de si es el dUMP o el dUTP el que se encuentra unido al centro activo de la enzima. Este resultado relaciona la zona de interacción con el diferente efecto de estos dos nucleótidos en la unión de Stl. Aún más, la caracterización en paralelo ha ayudado a delimitar el área de reconocimiento para Stl y a definir la función de cada uno de los motivos: mientras que el motivo específico para cada fago, motivo VI, y el motivo conservado IV de las Duts conferirían selectividad por Stl y actuarían como primer y principal punto de anclaje para la unión con el represor; el motivo conservado V actuaría como un interruptor molecular estabilizando o desestabilizando la interacción Stl:Dut. La manera en la que el motivo V actuaría como interruptor sería dependiente de nucleótido, con el dUTP como segundo mensajero, de manera que la conformación adoptada cuando el dUTP se une correspondería al estado *off* tal como mostraron Szabo y colaboradores (Szabó *et al.*, 2014) y confirmado por nosotros en este trabajo. De esta manera, proponemos un modelo revisado (Figura 2.5) en el que Stl reconoce la forma *apo* de la Dut interaccionando con residuos de los motivos IV y VI en la proximidad del centro activo. Unido Stl, el motivo V, altamente flexible, interaccionaría con Stl estabilizando el complejo. En este paso, es tentador especular que Stl unido a la Dut actúe de manera alostérica acercando el motivo V e interaccionado con él, mimetizando la conformación que adoptaría en

CAPÍTULO 2: DISCUSIÓN

presencia de dUTP. Por el contrario, el dUTP unido a la forma *apo* de la Dut induce el plegamiento y estabilización del motivo V sobre el centro activo, dificultando el acceso de Stl a la zona de anclaje y evitando la unión. Este modelo es coherente con las observaciones de Szabo y colaboradores y con nuestro modelo inicial propuesto para las Duts como moléculas señalizadoras con un mecanismo conceptualmente análogo a las proteínas G. Así, la participación sinérgica de tres motivos en el proceso de unión de Stl, los cuales muestran variabilidad en secuencia, explica las diferencias observadas en la afinidad por Stl entre Dut ϕ 11 y Dut80 α . Mientras que la combinación de los motivos IV y VI en Dut ϕ 11 genera una zona de anclaje de alta afinidad para Stl, en el caso de Dut80 α la combinación de estos motivos da lugar a un sitio de unión de poca afinidad. En este escenario, la contribución del motivo V en la estabilización del complejo Dut:Stl es irrelevante para Dut ϕ 11 y crucial para Dut80 α . Contrariamente, el motivo V juega el mismo papel en ambas Duts en la inhibición de la unión de Stl en su conformación inducida por dUTP, dificultando el acceso de Stl a su sitio de unión.

El análisis cristalográfico, bioquímico e *in vivo* de los mutantes generados confirman nuestra propuesta anterior de que la interacción Stl:Dut requiere dos motivos de las Duts: si bien el motivo VI específico de fagos confiere la selectividad por la diana Stl, el motivo conservado V trabaja como un conmutador molecular. Contrariamente a nuestro modelo inicial, y en base a los resultados publicados por Szabo y colaboradores (Szabó *et al.*, 2014), nos hemos dado cuenta de que nuestra propuesta inicial de que el estado “*on*” que corresponde a la conformación del motivo V inducida por el dUTP es parcialmente incorrecta. Aunque la ordenación o posicionamiento del motivo V inicialmente se requiere en el proceso, como lo demuestra el hecho claro de que todos los mutantes incapaces de ordenar este motivo son incapaces de inducir el ciclo de la SaPI, nuestros nuevos datos apoyan la idea de que el estado “*on*”

requiere el cambio de conformación producido en el motivo V una vez que el dUTP ha sido hidrolizado, una conformación similar a la adoptada por el motivo V cuando el dUMP ocupa el centro activo. Aunque fallamos en un primer momento en asignar la forma del nucleótido correcta que debe estar unido al centro activo para el estado señalizador de la molécula, nuestro modelo inicialmente propuesto para las Duts análogo a la proteína G se ha confirmado.

El modelo propuesto por Szabo y colaboradores, además tiene implicaciones fisiológicas adicionales asignando a la Dut del fago la función de generar a la SaPI un entorno de replicación libre de uracilo. En ausencia de datos experimentales relacionados con el efecto de los niveles de dUTP de *S. aureus* sobre la biología de la SaPI, nuestros resultados *in vivo* con fagos defectivos en Dut no apoyan esta idea. Consideramos que la implicación de la Dut en el ciclo de la SaPI se limita a su inducción. Se ha descrito previamente que las SaPIs son satélites de fagos que interfieren severamente con la reproducción del fago ayudante (Ram *et al.*, 2014). En consecuencia, y para evitar la inducción de la SaPI, los fagos evolucionan generando variantes de los inductores de las SaPI con diferente afinidad por los represores StI de la SaPI (Frigols *et al.*, 2015). Con esta estrategia los fagos tratan de codificar variantes de proteínas Dut (Figura S2.1) que puedan tener muy baja afinidad por el represor StI pero todavía funcional para el fago. Un muy buen ejemplo de esta estrategia se muestra aquí; la Dut80 α presenta significativamente una menor afinidad por StI que la Dut ϕ 11. Cabe destacar que todos los fagos de *S. aureus* codifican para Duts apoyando la esencialidad de esta proteína para la biología del fago, no como una enzima necesaria para disminuir los niveles de dUTP, como previamente se ha sugerido, sino para ser utilizada en diferentes estados del ciclo reproductivo del fago. Resultados obtenidos recientemente apoyan la idea acerca de la importancia del papel que tienen las Duts de fagos en la biología del fago (Frigols *et al.*, 2015). Tomando ventaja de la esencialidad de esta

CAPÍTULO 2: DISCUSIÓN

función, proponemos que el represor StI ha emergido mimetizando la estructura de alguna de las dianas con las que la Dut del fago interacciona, representando un fascinante ejemplo de parasitismo molecular.

Finalmente, esta proposición da lugar a interesantes preguntas sobre el mecanismo que se esconde tras la interacción StI:Dut: si asumimos que los fagos intentan esquivar la inducción de SaPI_{bov1} codificando Duts con poca afinidad por el represor StI, ¿por qué el fago $\phi 11$ codifica una Dut con tanta afinidad por StI? Obviamente, aún no tenemos la respuesta a esta cuestión, pero podemos anticipar que la interacción StI:Dut ofrecerá nuevas e inesperadas respuestas sobre cuestiones básicas científicas, incluyendo cuál es el papel que juegan estas enzimas en muchos organismos, desde fagos a humanos.

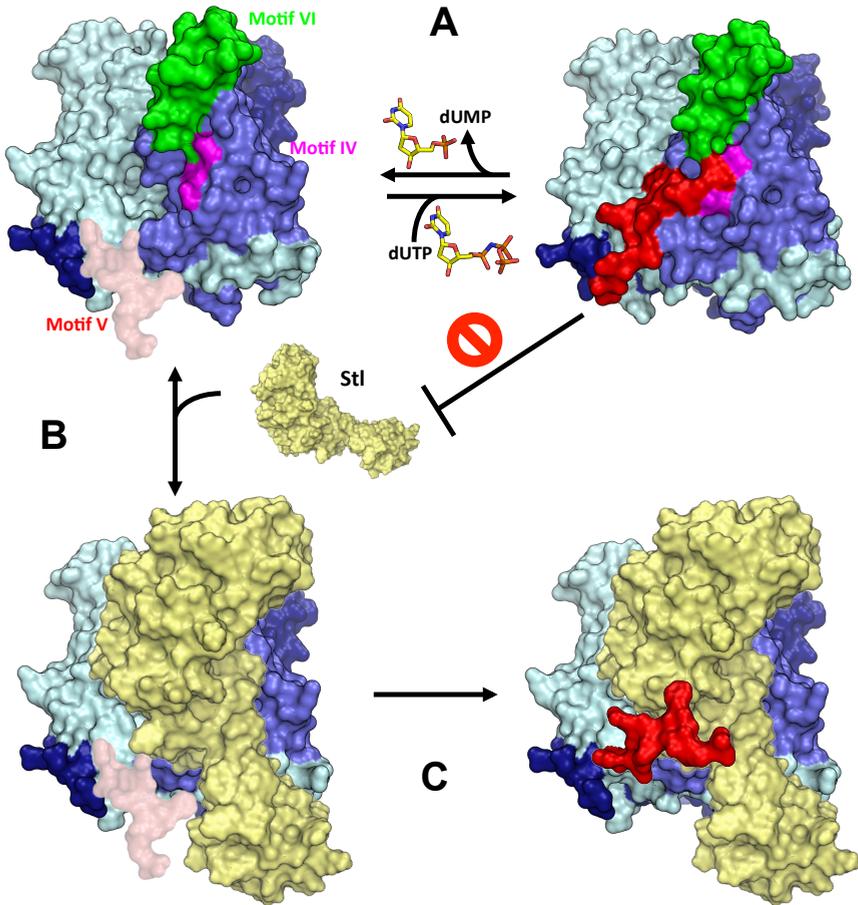


Figura 2.5. Modelo de interacción entre Duts de fagos de *S. aureus* con Stl. (A) La hidrólisis y la unión del dUTP por parte de la Dut implica el plegamiento y la estabilización de motivo conservado V, altamente flexible (rosa-rojo) sobre el centro activo. Esta disposición del motivo V limita el acceso de Stl a su zona de anclaje formada por el motivo IV (magenta) y el motivo VI (verde) dificultando su unión. (B) Por el contrario, en la forma *apo* de la Dut, la zona de unión de Stl se encuentra accesible debido a la flexibilidad del motivo V, permitiendo que Stl interacte con los residuos de los motivos IV y V en las proximidades del centro activo. (C) Unido Stl, el motivo V interaccionaría con Stl, 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 (amarillo) un modelo generado *in silico* mediante I-Tasser (Yang *et al.*, 2015) a partir de la secuencia de Stl. Para simplificar una única molécula de Stl se muestra en la figura, dos moléculas adicionales de Stl deberían estar presentes siguiendo el eje de simetría tres de las Duts para completar el modelo de interacción Stl:Dut 1:1 (Szabó *et al.*, 2014).

Material suplementario

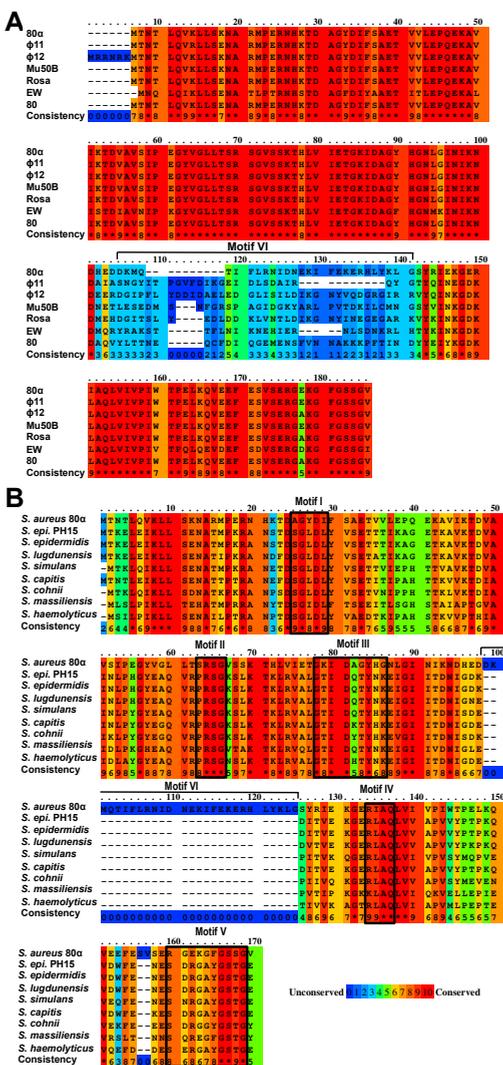


Figura S2.1. Alineamiento de secuencia de Duts codificadas por fagos. Los colores indican la conservación relativa de la secuencia en cada posición, siendo rojo muy conservado y violeta muy poco conservado (adaptado del alineamiento generado con PRALINE). **(A)** Duts de fagos de *S. aureus*. El corchete negro indica la localización del motivo VI. **(B)** Comparación de las Duts codificadas por diferentes fagos de estafilococos. El fago φ80α de *S. aureus* y el fago PH15 de *S. epidermidis* se encuentran en primera y segunda posición, respectivamente. Los motivos I-V conservados en Duts se encuentran remarcados y anotados. Nótese la ausencia de motivo VI en Duts no codificadas por fagos de *S. aureus*.

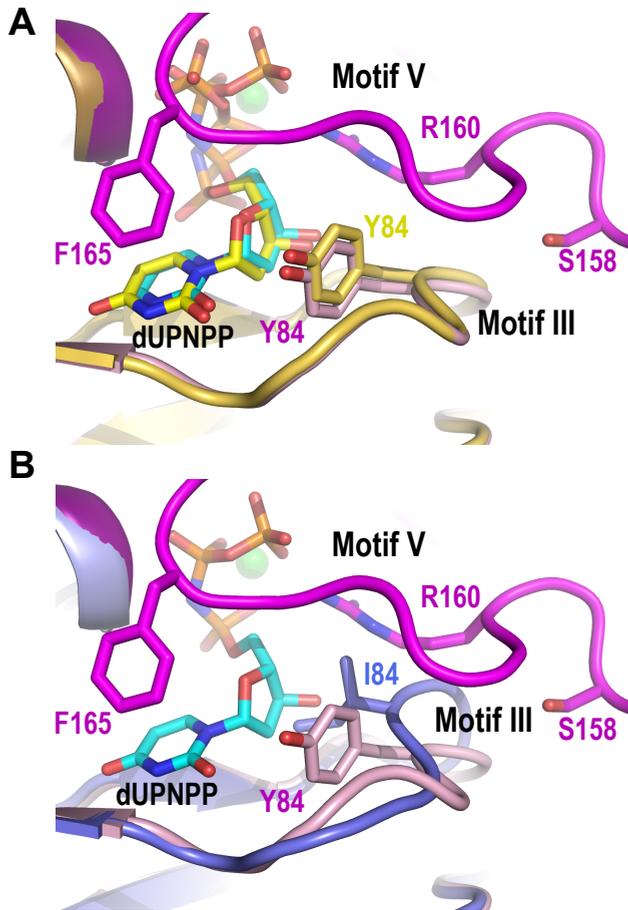


Figura S2.2. Modelado del motivo V C-terminal en las estructuras de $Dut80\alpha^{D81A}$ y $Dut80\alpha^{Y84I}$. La superposición de la estructura de $Dut80\alpha^{WT}$ unida a dUPNPP (tonos rosados; PDB 3ZEZ) sobre las estructuras de **(A)** $Dut80\alpha^{D81A}$ (tonos amarillos; PDB 3ZF0) y **(B)** $Dut80\alpha^{Y84I}$ (tonos azules; PDB 3ZF3) fue utilizada para emplazar el motivo V C-terminal (magenta) sobre los centros activos de estas estructuras. El dUPNPP de las estructuras de $Dut80\alpha^{WT}$ y $Dut80\alpha^{D81A}$ se muestra en *sticks* con los átomos de carbono en cian y amarillo respectivamente. Los residuos relevantes que se encuentran interactuando con el nucleótido y/o del motivo III se muestran como *sticks* con los átomos de carbono coloreados con el correspondiente color de la subunidad y se encuentran etiquetados.

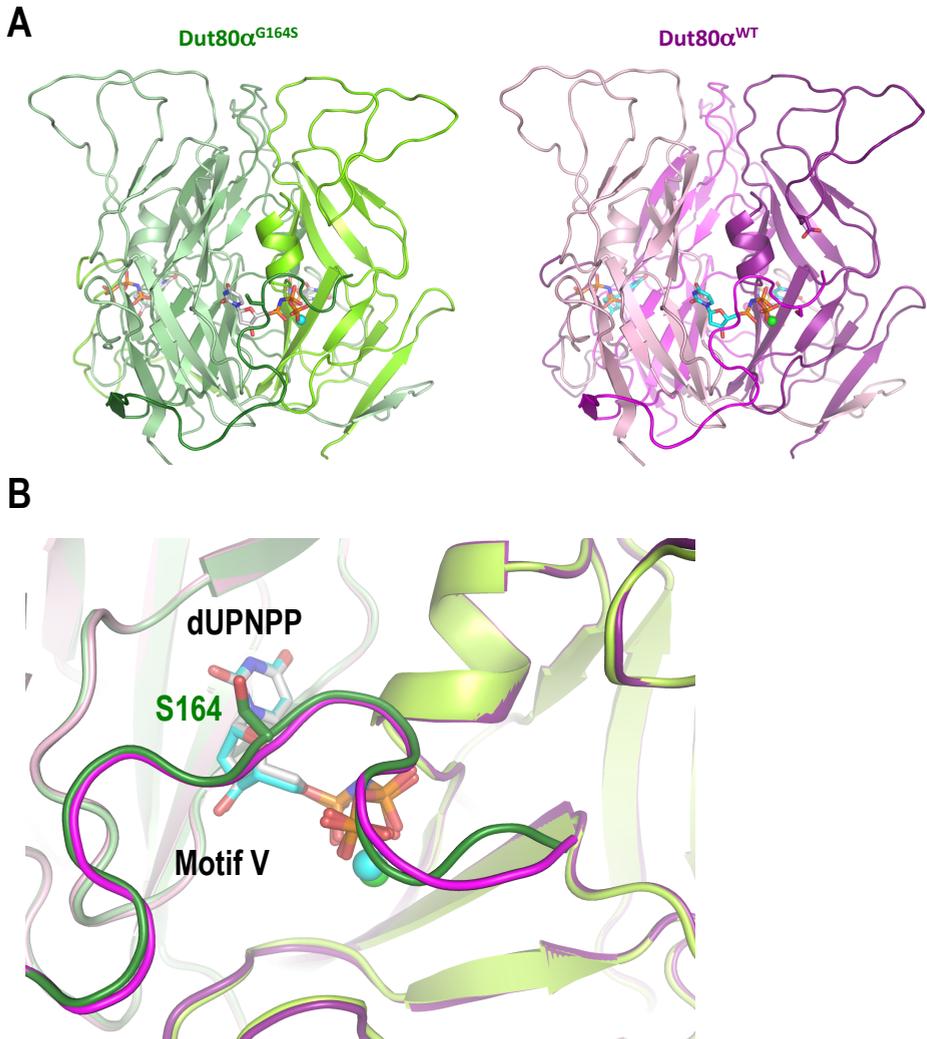


Figura S2.3. Estructura del mutante Dut80 α ^{G164S} y comparación con Dut80 α ^{WT}. (A) La estructura de Dut80 α ^{G164S} (izquierda, tonos verdes) en presencia de dUPNPP muestra que este mutante muestra una conformación idéntica a la *wild-type* unida al mismo nucleótido (derecha, tonos rosados). (B) La superposición de ambas estructuras muestra una manera similar de unir el nucleótido (en *sticks*) y de la conformación del motivo V C-terminal, solamente diferenciadas por la exposición hacia el solvente de la nueva Ser en posición 164 (en *sticks*) en el mutante.

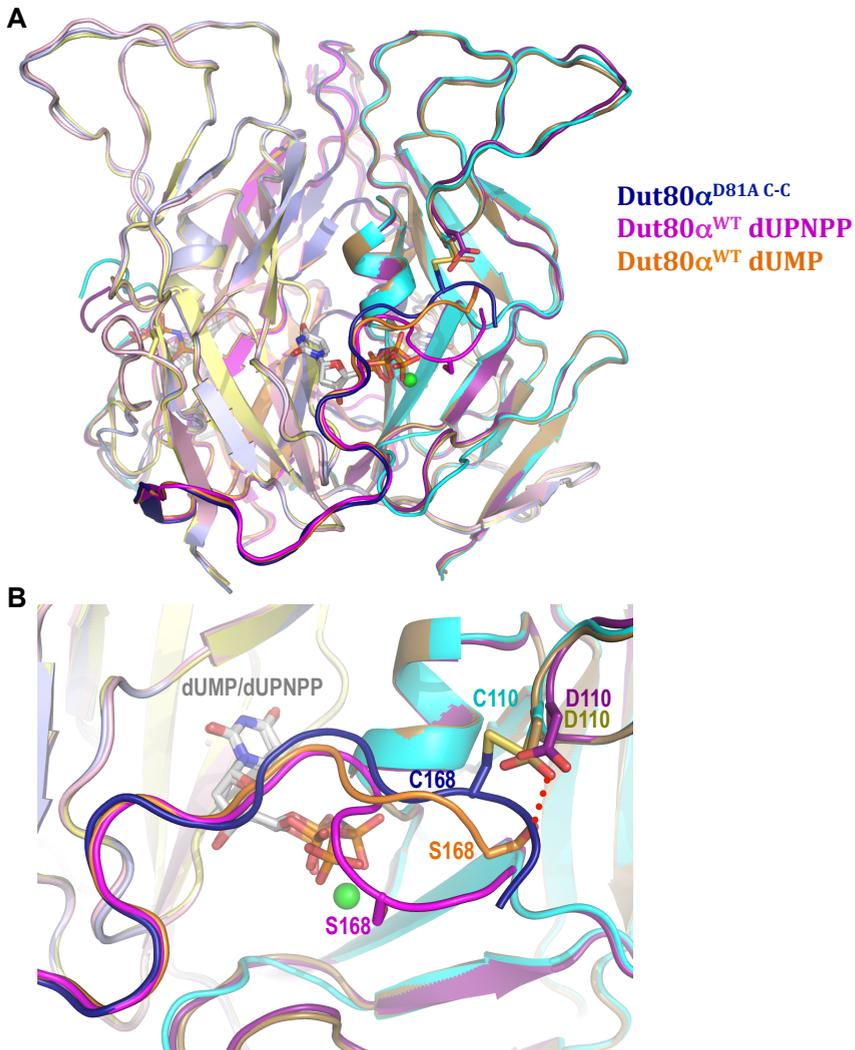


Figura S2.4. Los cambios conformacionales inducidos por el nucleótido están restringidos al motivo V C-terminal. (A) La superposición de las estructuras triméricas de Dut80 α en presencia de dUPNPP (tonos rosados; PDB 3ZEZ) y dUMP (tonos amarillos) con el mutante Dut80 α ^{D81A C-C} (tonos azulados; PDB 3ZF6) muestra los pocos cambios conformacionales que están restringidos al motivo V C-terminal. **(B)** La vista en detalle de los centros activos de estas estructuras muestra que los cuatro últimos residuos del motivo V adquieren conformaciones alternativas en presencia de dUMP y dUPNPP situando, en el primero de los casos, a estos residuos a una distancia de interacción con el motivo VI (el puente de hidrógeno entre D110 y S168 se encuentra resaltado con una línea discontinua de color rojo). La conformación del motivo V en presencia de dUMP es casi idéntica a la observada en el mutante Dut80 α ^{D81A C-C}.

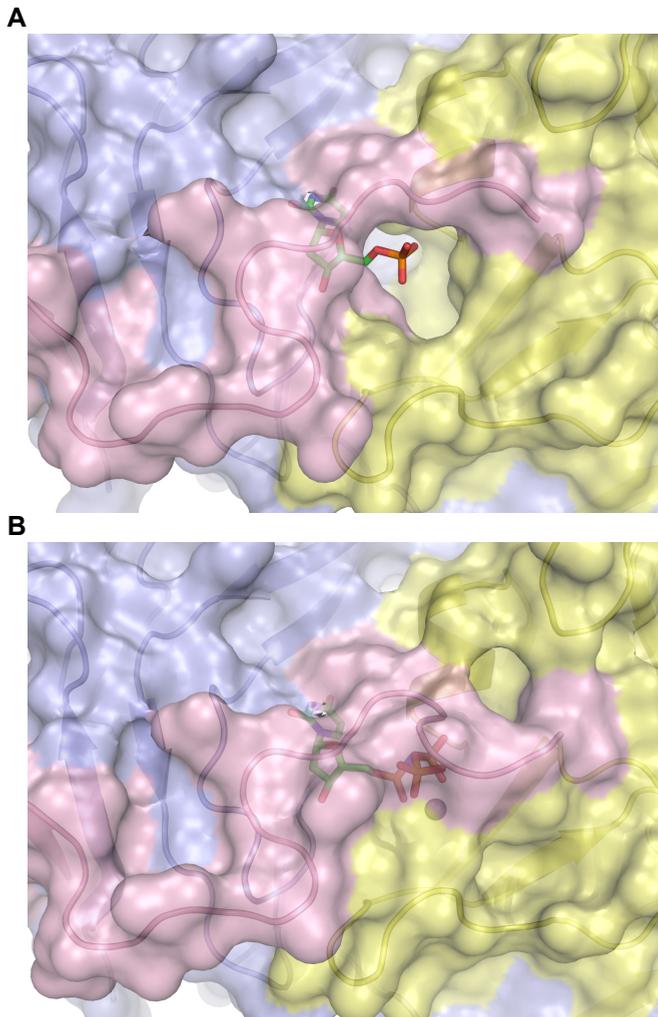


Figura S2.5. La conformación del motivo V inducida por el dUMP abre el centro activo. Vista cercana del centro activo de Dut80 α con (A) dUMP y (B) dUPNPP (PDB 3ZEZ) mostrada como superficie semi-transparente para ver el nucleótido unido (en *sticks* con los átomos de carbono en verde). Cada subunidad se muestra coloreada en amarillo, azul y rosa. El motivo V corresponde a la subunidad coloreada en rosa. En la estructura con dUMP unido (A) el fosfato α se encuentra expuesto al solvente a través del canal que podría utilizarse para liberar el pirofosfato producto de la reacción, mientras que en la estructura con dUPNPP unido (B) el nucleótido se encuentra completamente sellado por el motivo V.

CAPÍTULO 2: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Strains	Description	Reference
RN4220	Restriction-defective derivative of RN450	Kreiswirth <i>et al.</i> (1983)
RN10359	RN450 lysogenic for 80 α	Ubeda <i>et al.</i> (2007)
JP3603	RN10359 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	Tormo <i>et al.</i> (2008)
JP6032	RN10359 Δ <i>dut</i>	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
JP6132	RN10359 Δ <i>dut</i> SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
JP12844	RN10359 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ <i>stl</i>	This work
JP12845	RN10359 Δ <i>dut</i> SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ <i>stl</i>	This work
JP6774	RN4220 Δ <i>spa</i> SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
JP9026	JP6774 (pJP821)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
JP12398	JP6774 (pJP1701)	This work
JP9032	JP6774 (pJP1159)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
JP12834	JP6774 (pJP1703)	This work
JP12853	JP6774 (pJP1553)	This work
JP6789	JP6774 (pJP813)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
JP13469	JP6774 (pJP1820)	This work
JP12397	JP6774 (pJP1789)	This work
JP13470	JP6774 (pJP1821)	This work
JP13472	JP6774 (pJP1823)	This work
JP13477	JP6774 (pJP1827)	This work
JP13478	JP6774 (pJP1840)	This work
JP13474	JP6774 (pJP1825)	This work
JP13475	JP6774 (pJP1839)	This work
DH5 α	<i>E. coli</i> laboratory strain	Invitrogen
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> expression strain	Stratagene
JP5359	BL21(DE3) (pJP753)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
JP9351	BL21(DE3) (pJP1146)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
JP8434	BL21(DE3) (pJP1147)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
JP8474	BL21(DE3) (pJP1132)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
JP9350	BL21(DE3) (pJP1145)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
JP10636	BL21(DE3) (pJP1562)	Frígols <i>et al.</i> (2015)
JP12843	DH5 α (pJP1704)	This work
JP12471	DH5 α (pJP1702)	This work
JP13393	DH5 α (pJP1838)	This work
JP13434	DH5 α (pJP1843)	This work
JP4560	BL21(DE3) (pJP666)	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
JP13337	DH5 α (pJP1828)	This work
JP12365	DH5 α (pJP1795)	This work
JP13338	DH5 α (pJP1829)	This work
JP13339	DH5 α (pJP1830)	This work
JP13432	DH5 α (pJP1841)	This work
JP13433	DH5 α (pJP1842)	This work
AMC130707	BL21 (DE3) pETNKI-Stl	This work

Tabla S2.1. Cepas utilizadas.

CAPÍTULO 2: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Plasmid	Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
pJP1701	orf32phi80alpha-16mS	ACGCGTCGACATTATGGCAGGTCAAGTTGTC
	dutphi80alpha-VI-2c	ACTGTCATTCTTGATATTAATCCC
	dutphi80alpha-VI-1m	GGGATTAATATCAAGAATGACAGTAACGGTAGTTACCGTATCGAAAAAGG
	orf32phi80alpha2cB	CGCGGATCCTCACCAAACCTCCTTGACTC
pJP1703	orf32phi80alpha-16mS	ACGCGTCGACATTATGGCAGGTCAAGTTGTC
	dutphi80alpha-5cB	CGCGGATCCTCACCAAACCTCCTTGACTCTATCTAATATGCTTTACACTCCGCT ACTTCTGCGCCTTTTCTCCACGTTCC
pJP1820	orf32phi80alpha-16mS	ACGCGTCGACATTATGGCAGGTCAAGTTGTC
pJP1821	dutphi11-10cB	CGCGGATCCTTAAACACTTTTGAATTCCTCC (these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)
pJP1789	orf32phi80alpha-16mS	ACGCGTCGACATTATGGCAGGTCAAGTTGTC
	dutphi80alpha-VI-2c	ACTGTCATTCTTGATATTAATCCC
	dutphi11-VI-1m	GGGATTAATATCAAGAATGACAGTAACGGAACCTATCAAATCAACG
	orf25phi11-5cB	CGCGGATCCTTGACTCGATCTAAGATGTC
pJP1823	orf32phi80alpha-16mS	ACGCGTCGACATTATGGCAGGTCAAGTTGTC
	dutphi11-4cB	CGCGGATCCTTGACTCGATCTAAGATGCTTTTACACTCCGCTACTTCTGCGCC TTTTTCTCCACGTTCC
pJP1827	orf32phi80alpha-16mS	ACGCGTCGACATTATGGCAGGTCAAGTTGTC
pJP1840	dutphi80alpha-9c	CATATAGGTACAATAACTAATTGAGCTAGTTGTCTCTTTTTCGATACGGTAACT AC
	dutphi80alpha-8m	GTAGTTACCGTATCGAAAAAGGAGACAACTAGCTCAATTAGTTATTGTACCTAT ATG
	orf32phi80alpha2cB	CGCGGATCCTCACCAAACCTCCTTGACTC (these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)
pJP1825	orf32phi80alpha-16mS	ACGCGTCGACATTATGGCAGGTCAAGTTGTC
pJP1839	dutphi11-9c	CCATATAGGCACGATAACCAATTGAGCTATACGTTCTCCTTCTGTTGATTGATAA GTTCC
	dutphi11-8m	GGAACCTATCAAATCAACGAAGGAGAAGCTATAGCTCAATTGTTATCGTGCCT ATATGG
	orf25phi11-5cB	CGCGGATCCTTGACTCGATCTAAGATGTC (these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)
pJP1702	orf32phi80alpha-12mB	CGCGGATCCATGACTAACACATTACAAGTAAAAC
pJP1704	orf32phi80alpha-13cS	ACGCGTCGACTCTTTACACTCCGCTACTTCC
pJP1838		(these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)
pJP1843		
pJP1795	orf25phi11-8mB	CGCGGATCCATGACTAACACATTACAAGTAAAGG
pJP1841	orf25phi11-9cS	ACGCGTCGACCTTTACACTCCGCTACTTCCG
pJP1842		(these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)

Tabla S2.2. Oligonucleótidos utilizados.

CAPÍTULO 2: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Plasmid	Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
pJP1828	orf25phi11-8mB	CGCGGATCCATGACTAACACATTACAAGTAAGG
pJP1829	dutphi11-11c5	ACGCGTTCGACTTAAACACTTTCGAATTCCTCC
(these plasmids were constructed using the same oligonucleotides but different DNA templates)		
pJP1830	orf25phi11-8mB	CGCGGATCCATGACTAACACATTACAAGTAAGG
	dutphi11-5c5	ACGCGTTCGACTTACACTCCGCTACTTCCTGCGCCTTTTTCTCCAG
pETNKI-StI	StI-M1SUMO-FW	CCAGCAGCAGACGGGAGGTATGGAAGGAGCTGGTCAAATGGCAG
	StI-N267 SUMO-RV	GGCGGCGGAGCCCGTTAATTAGTGTCTTTTCAAGTATGATTTTTTTTTG
Southern blot	Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
SaPIbov1 probe	SaPIbov1-112mE	CCGGAATCAATTGCTGAGGCAAACCTC
	SaPIbov1-113cB	CGCGGATCCTAATTCTCCACGTCTAAAGC

Tabla S2.2. Oligonucleótidos utilizados (continuación).

CAPÍTULO 2: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Plasmid	Description	Reference
pCN51	Expresion vector	Charpentier <i>et al.</i> (2004)
pJP821	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{80α}	Iormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
pJP1701	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔVI} 80α	This work
pJP1159	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔV} 80α	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
pJP1703	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{F165A} 80α	This work
pJP1553	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{G164S} 80α	Frigols <i>et al.</i> (2015)
pJP813	pCN51-3xflag- <i>dut</i> 11	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
pJP1820	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔV} 11	This work
pJP1789	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔVI} 11	This work
pJP1821	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔV-ΔVI} 11	This work
pJP1823	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔVI-F164A} 11	This work
pJP1827	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔVI-IV11} 80α	This work
pJP1840	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{IV11} 80α	This work
pJP1825	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{ΔVI-IV80α} 11	This work
pJP1839	pCN51-3xflag- <i>dut</i> ^{IV80α} 11	This work
pET28a	Expresion vector	Novagen
pJP753	pET28a- <i>dut</i> 80α	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
pJP1146	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔV} 80α	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
pJP1147	pET28a- <i>dut</i> ^{D81A C-C} 80α	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
pJP1132	pET28a- <i>dut</i> ^{D81A} 80α	Iormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
pJP1145	pET28a- <i>dut</i> ^{Y84I} 80α	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2013)
pJP1562	pET28a- <i>dut</i> ^{G164S} 80α	Frigols <i>et al.</i> (2015)
pJP1704	pET28a- <i>dut</i> ^{F165A} 80α	This work
pJP1702	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔVI} 80α	This work
pJP1838	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔVI-IV11} 80α	This work
pJP1843	pET28a- <i>dut</i> ^{IV11} 80α	This work
pJP666	pET28a- <i>dut</i> 11	Tormo-Mas <i>et al.</i> (2010)
pJP1828	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔV} 11	This work
pJP1795	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔVI} 11	This work
pJP1829	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔV-ΔVI} 11	This work
pJP1830	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔVI-F164A} 11	This work
pJP1841	pET28a- <i>dut</i> ^{ΔVI-IV80α} 11	This work
pJP1842	pET28a- <i>dut</i> ^{IV80α} 11	This work
pETNKI-1.10	Expresion vector (hisSUMO3-LIC)	NKI Protein Facility
pETNKI-Stl	pETNKI-1.10-Stl	This work

Tabla S2.3. Plásmidos utilizados.

CAPITULO

3.

Una para todas y todas para una. La función señalizadora de las dUTPasas de fagos de *S. aureus* depende de un dominio β -*hairpin* situado en el motivo no conservado

Contribución personal

Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran como las dUTPasas (Duts) codificadas por fagos de *Staphylococcus aureus* son capaces de inducir la transferencia de islas de patogenicidad (SaPIs) de este organismo mediante su unión al represor StI, represor codificado por la propia isla. Nuestro trabajo previo había mostrado que el motivo específico de las Duts de estos fagos, que denominamos motivo VI, juega un papel relevante en la unión de StI. No obstante, este motivo VI presenta gran variabilidad de secuencia en las Duts de diferentes fagos. Como todas estas Duts son capaces de reconocer al mismo StI, nos preguntamos cómo un motivo tan diverso interacciona con una misma proteína.

En este capítulo abordamos esta cuestión. Nuestro trabajo previo había tomado la Dut del fago $\phi 80\alpha$ como enzima modelo. En este capítulo introducimos el estudio de las Duts de los fagos $\phi 11$, $\phi 85$ y $\phi 71\text{bel}$; y a través de su análisis estructural y funcional mostramos que pese a la diversidad en secuencia del motivo VI, esencial para la inducción de la isla de patogenicidad, este adopta una misma conformación estructural en las diferentes Duts estudiadas, todas ellas con capacidad inductora. En concreto, este motivo adopta una conformación en β -hairpin, que proyectándose desde el cuerpo del enzima, ubica su extremo próximo a los motivos IV y V, elementos estructurales que nuestros estudios han mostrado que intervienen en la unión al represor. Proponemos que la ubicación espacial de estos tres motivos es esencial para el reconocimiento de la proteína StI y la inducción de la isla, de acuerdo a los resultados mostrados en el capítulo 2.

Mi contribución en este capítulo ha sido la caracterización y el análisis estructural de la forma salvaje de las Duts de los fagos $\phi 11$, $\phi 85$ y $\phi 71\text{bel}$ de *S. aureus*. Para ello ha sido necesario la sobre-expresión de las proteínas; el uso de diferentes técnicas de purificación, que incluyen la cromatografía de afinidad

y exclusión molecular; así como la cristalización y resolución de las estructuras tridimensionales de las 3 proteínas 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, Reino Unido y ALBA en España).

Resumen

Los resultados obtenidos hasta ahora han mostrado el mecanismo a través del cual las dUTPasas (Duts) de *Staphylococcus aureus* son capaces de participar en procesos de señalización. En concreto, hemos estudiado como la Dut triméricas del fago $\phi 80\alpha$ de *S. aureus* es capaz de inducir la movilidad de islas de patogenicidad en este organismo a través de un mecanismo similar al de las proteínas G protoncogénicas eucariotas; donde tanto la presencia de un nucleótido, dUTP, que funciona como segundo mensajero, activando o inhibiendo la unión mediante el cambio conformacional de un *loop*; como la presencia de un motivo característico de la familia de enzimas, denominado motivo VI, son elementos necesarios para realizar la actividad señalizadora.

Utilizando técnicas de cristalografía de macromoléculas para resolver y analizar las estructuras tridimensionales de varias de estas Duts, en este capítulo se muestra que, pese a la variabilidad en secuencia, el motivo VI adopta una misma conformación estructural y disposición espacial necesaria para la inducción de la isla que incluye un dominio *β -hairpin*, el cual no solamente parece ser esencial para el mecanismo de inducción de islas de patogenicidad de *S. aureus*; sino que, además, abre la puerta a nuevas interacciones con proteínas que pueden tener un papel crucial en la biología del fago.

Introducción

Las dUTPasas (Duts) son las enzimas responsables de mantener unos niveles bajos de dUTP en la célula, evitando su incorporación en el ADN y que causaría un incremento en la tasa de mutaciones que puede derivar en muerte celular (Vértessy and Tóth, 2009). Las Duts son enzimas ubicuas que se encuentran presentes en organismos vivos que van desde procariotas a eucariotas, incluidos un alto número de virus (Baldo and McClure, 1999). Los virus son organismos que presentan un genoma muy limitado por lo que hacen un elevado uso de la maquinaria celular de los organismos hospedadoras para poder replicarse. Así pues, no deja de ser una cuestión intrigante por qué los virus necesitan sus propias Duts y no usan las de las células hospedadoras.

Diferentes Duts víricas han sido relacionadas con procesos celulares independientes de la hidrólisis de dUTP, por ejemplo: las Duts de fagos de *Staphylococcus aureus* inducen la movilidad de islas de patogenicidad de estos organismos (Baldo and McClure, 1999; Tormo-Más *et al.*, 2010); la Dut del *Epstein-Barr* virus (EBV) activa la expresión de NF- κ B, a través del receptor TLR2, y produce la des-regulación del sistema inmune del hospedador (Ariza *et al.*, 2009); el mismo receptor es diana para la Dut del retrovirus endógeno humano K (HERV-K), que contribuye a la fisiopatología de la psoriasis (Ariza and Williams, 2011); o la Dut viral del MHV-68 es esencial para su proceso de infección bloqueando la vía de señalización del interferón tipo I (Leang *et al.*, 2011).

Basado en su estado de oligomerización, las Duts se pueden clasificar en tres familias: monoméricas, diméricas y triméricas. Las Duts triméricas es la familia más ampliamente distribuida y el análisis de secuencias muestran la presencia de cinco motivos conservados (McGeoch, 1990). Estos cinco motivos son necesarios para formar el centro activo de la enzima (Vértessy and Tóth, 2009). Algunas Duts, adicionalmente, presentan motivos no conservados. El papel de

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

estos motivos adicionales ha sido relacionado con procesos de señalización, como en el caso de la Duts de fagos de estafilococos donde un motivo extra característico de estas Duts, al que hemos llamado motivo VI, se ha relacionado con la inducción de movilidad de islas de patogenicidad en *S. aureus* (SaPIs) (Tormo-Más *et al.*, 2010; 2013).

La inducción de la movilidad de la isla se produce por la interacción de la Dut con el represor específico de la isla denominado StI (Tormo-Más *et al.*, 2010). De este modo, la isla SaPI_{bov1} es inducida por las Duts de los fagos $\phi 80\alpha$ (Dut 80α) y $\phi 11$ (Dut $\phi 11$), aunque datos *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la eficiencia en la inducción y la afinidad de estas Duts por StI es diferente (Tormo-Más *et al.*, 2010). Dut 80α y Dut $\phi 11$ están conservadas en secuencia con la excepción del motivo VI. Tal como hemos mostrado en capítulos anteriores, la presencia de este motivo VI junto con los motivos IV y V son necesarios para la inducción de la isla en Dut 80α y Dut $\phi 11$, (Tormo-Más *et al.*, 2013).

En este capítulo, mostramos que las Duts de los fagos $\phi 85$ (Dut $\phi 85$) y $\phi 71\text{bel}$ (Dut $\phi 71\text{bel}$) también son capaces de inducir la isla SaPI_{bov1} mediante la unión a StI con una eficacia similar o superior a Dut $\phi 11$. A partir de esta observación, en el presente capítulo se describe el análisis estructural y funcional de las Duts de estos fagos (Dut $\phi 85$ y Dut $\phi 71\text{bel}$), junto con la Dut $\phi 11$ y la comparación con nuestros resultados previamente descritos de Dut 80α . Sorprendentemente, las estructuras muestran que a pesar de la variabilidad de secuencia, el motivo VI de todas estas Duts presenta una región con idéntico plegamiento y disposición espacial, la cual proponemos que es necesaria adoptar para la inducción de la isla.

Material y métodos

Manipulación y trabajo con *S. aureus*

Los procedimientos para la preparación y el análisis de los lisados de fagos, además de la transducción y transformación de *S. aureus*, fueron realizados por el grupo del Dr. Penadés (Institute of Infection, Immunity and Inflammation; University of Galsgow), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), como se encuentran previamente descritos (Ubeda *et al.*, 2008; 2007).

Métodos de ADN

Realizado por el grupo del Dr. Penadés, las manipulaciones generales de ADN se realizaron utilizando los procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El marcaje de las sondas y la hibridación del ADN fueron llevados a cabo de acuerdo al protocolo facilitado con el *PCR-DIG DNA-labelling and Chemiluminiscent Detection Kit* (Roche) utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla S3.1.

Construcción de plásmidos

Las construcciones de los plásmidos para expresar las diferentes Duts fueron realizadas por el grupo del Dr. Penadés. Los mutantes delecionales en el motivo VI, Dut80 α^{AGS} Dut ϕ 85^{AGS}, fueron generados sustituyendo por Gly-Ser los residuos comprendidos entre R107-F115 y D106-L112 Dut80 α y Dut ϕ 85, respectivamente.

Para la expresión de Duts en *S. aureus* los genes se clonaron en el vector de expresión pCN51, como se ha descrito previamente (Tormo-Más *et al.*, 2010). En este vector la expresión de las proteínas esta controlada por el promotor *Pcad* que es regulado por cadmio.

Para la sobre-expresión en *E. coli*, las Duts de los fagos ϕ 85 y ϕ 71bel de *S. aureus* fueron clonadas en el vector pET28a por el grupo del Dr. Penadés.

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

En este vector, las proteínas expresadas se encuentran fusionadas a una cola de seis histidinas en su extremo N-terminal.

La Dut de fago $\phi 11$ de *S. aureus*, clonada y cedida inicialmente en el vector pET28a por el grupo del Dr. Penadés, fue reclonada en el vector pNIC-Bsa4 utilizando los cebadores listados en la Tabla S3.1 mediante técnica *LIC cloning* (*Ligation-Independent Cloning*) (Savitsky *et al.*, 2010). En este vector de expresión, la proteína clonada se encuentra fusionada en su extremo N-terminal a una cola de seis histidinas seguida de un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV, lo que permite eliminar la cola de histidinas durante el proceso de purificación de la proteína. La clonación se llevo a cabo en células de *E. coli* DH5 α . Los clones seleccionados fueron comprobados mediante secuenciación de ADN.

El listado completo de plásmidos utilizados en este estudio se encuentran en la Tabla S3.2.

Expresión heteróloga de proteínas

Los plásmidos pET28a-Dut $\phi 85$ y pET28a-Dut $\phi 71$ bel (Tabla S3.2) para la expresión de Dut $\phi 85$ y Dut $\phi 71$ bel, respectivamente, fueron transformados en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). El plásmido pNIC28-Dut $\phi 11$ (Tabla S3.2), para la expresión de Dut $\phi 11$, fue transformado en la cepa de *E. coli* RosettaII (Novagen). La expresión de Dut $\phi 85$, Dut $\phi 71$ bel y Dut $\phi 11$ fue realizada en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL kanamicina. Para el caso de Dut $\phi 11$ el medio LB se suplementó además con cloramfenicol a una concentración final de 30 μ g/mL. La células se crecieron a 37 °C con agitación a 250 r.p.m. hasta que los cultivos alcanzaran su fase exponencial de crecimiento (densidad óptica de 0.6 medida a $\lambda = 600$ nm). La expresión de las proteínas fue inducida mediante la adición de 1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma)

a 20 °C *overnight*, tras la cual, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 5000 g durante 20 min y 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células fueron conservadas a -80 °C.

Purificación de proteínas

Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel fueron purificadas siguiendo idéntico procedimiento. El *pellet* del cultivo de *E. coli* sobre-expresando el enzima se resuspendió en tampón A (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), suplementado con 1 mM de fluoruro de fenilmetilosulfonilo (PMSF). Todos los pasos siguientes de purificación se llevaron a cabo a 4 °C, a no ser que se mencione lo contrario. La lisis de las células se realizó mediante sonicación y los restos no solubles se eliminaron mediante centrifugación durante 30 min a 25000 g. El sobrenadante se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna *HisTrap FF* (GE Healthcare) pre-equilibrada con tampón A. Tras cargar toda la muestra, la columna fue lavada con 10 volúmenes de tampón A suplementado con 75 mM de imidazol y la proteína fue eluida con tampón A suplementado con 500 mM de imidazol. La pureza de las fracciones fue determinada con geles SDS-PAGE y tinción de *Coomasie*. Las fracciones más puras se unieron y fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna *HiLoad 16/60 Superdex 200pg* (Ge Healthcare), previamente equilibrada con tampón A. La pureza de las fracciones fue determinada con geles SDS-PAGE y tinción de *Coomasie*. Las fracciones más puras fueron unidas, concentradas utilizando *Amicon Ultra-15 30kDa* (Millipore), congeladas rápidamente con nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C. La concentración final fue determinada por absorbancia a 280 nm y los coeficientes de extinción molares 15930 M⁻¹·cm⁻¹ y 12950 M⁻¹·cm⁻¹ para Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel respectivamente y un *Nanodrop 1000 spectrophotometer* (Labtech).

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

Dut ϕ 11 fue purificada a partir de *pellets* de cultivos de *E. coli* que sobre-expresaban esta enzima resuspendidos en tampón B (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5% glicerol), suplementado con 1 mM PMSF. Todos los pasos siguientes de purificación se llevaron a cabo a 4 °C, a no ser que se mencione lo contrario. La lisis de las células se realizó mediante sonicación y los restos no solubles después de sonicar se eliminaron mediante centrifugación durante 30 min a 25000 g. El sobrenadante se cargó en una columna de afinidad *HisTrap FF* (GE Healthcare) pre-equilibrada con tampón B. La columna fue lavada con 10 volúmenes de columna de tampón B suplementado con 20 mM de imidazol, tras los cuales se llevó a cabo la elución de las proteínas con tampón B suplementado con 350 mM de imidazol. La pureza de las fracciones fue determinada con geles SDS-PAGE y tinción de *Coomasie*. Con el objetivo de eliminar la etiqueta de poli-Histidinas utilizada en la purificación por afinidad, las fracciones más puras se unieron y se digirieron con la proteasa TEV (relación 1:20 TEV:Dut). La proteasa TEV reconoce específicamente la secuencia de amino ácidos ENLYFQS situada entre nuestra proteína y la etiqueta de seis histidinas situada en el extremo N-terminal. La digestión se realizó *overnight* a 4 °C mientras la muestra se dializaba frente a tampón B suplementado con 0.5 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 1mM de ditioneitol (DTT). Se realizaron al menos dos cambios de tampón para eliminar la mayor cantidad posible de imidazol presente en la muestra. Después de ser dializada, la proteína fue purificada utilizando una columna de afinidad *HisTrap FF* (GE Healthcare) pre-equilibrada con tampón B. La fracción no retenida por la columna, la cual contenía la proteína resultante de la digestión con la proteasa TEV, fue recogida y la eliminación del *Tag* de histidinas fue comprobado por SDS-PAGE y tinción *Coomasie*. La proteína fue concentrada por centrifugación utilizando *Amicon Ultra-15 30kDa* (Millipore) al mismo tiempo que se cambiaba el tampón de la solución a

tampón para la cristalización (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.02% NaN₃) mediante pasos secuenciales de concentración y dilución. La concentración final de la proteína fue calculada por absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 14440 M⁻¹·cm⁻¹ y un *Nanodrop 1000 spectrophotometer* (Labtech). La proteína fue congelada rápidamente con nitrógeno líquido y conservada a -80 °C.

Cristalización, recogida de datos de difracción de rayos-X y determinación de la estructura tridimensional

Las diferentes proteínas Dut fueron co-cristalizadas junto con 1 mM de dUMpNpp (Jena Biosciences) y 5 mM de MgCl₂. Los ensayos de cristalización para Dut ϕ 85, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11 fueron realizados a una concentración de proteína de 10 mg/mL utilizando la técnica difusión de vapor en gota sentada a 21 °C. Las condiciones iniciales que rindieron cristales fueron optimizadas hasta rendir condiciones cuyos cristales difractaban los rayos-X a resoluciones mejores de 3 Å. Las condiciones finales para cada una de las proteínas fueron las siguientes: 20% metanol, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 10 mM CaCl₂ para Dut ϕ 85; 50% MPD para Dut ϕ 71bel; y 70% MPD, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 para Dut ϕ 11. Los cristales de Dut ϕ 85 fueron crio-protectados incrementando el etanol hasta un 40%, mientras que las condiciones donde crecían los cristales de Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11 presentaban condiciones crio-protectoras. Los cristales se congelaron en nitrógeno líquido y la difracción con rayos-X fue llevada a cabo a 100 K haciendo uso de los sincrotrones DLS y ALBA.

El procesado de los datos recogidos se realizó utilizando los programas iMosflm (Powell *et al.*, 2013) para Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 85, y XDS (Kabsch, 2010) para Dut ϕ 11. Las estadísticas del procesado se muestran en la Tabla 3.1.

Las estructuras fueron resueltas mediante reemplazo molecular utilizando el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y como modelo la estructura de

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

Dut80 α (PDB 3ZEX), previamente resuelta por nuestro grupo (Tormo-Más *et al.*, 2013), excluyendo el extremo C-terminal (amino ácidos 142-170) y la región correspondiente al motivo VI (amino ácidos 95-127) para evitar sesgar los modelos iniciales. Los pasos de trazado, afinamiento y validación se realizaron con los programas Coot y Phenix (Adams *et al.*, 2010; Emsley *et al.*, 2010). Las estadísticas de las estructuras finales se muestran en la Tabla 3.1.

	Dut ϕ 85 dUMpNpp	Dut ϕ 71bel dUMpNpp	Dut ϕ 11 dUMpNpp
Data collection			
Beamline	DLS-I03	ALBA-XALOC	DLS-I04.1
Wavelength (Å)	0.9793	0.9795	0.9795
Space group	H3	P3 ₁ 21	I23
Cell dimensions (Å)	a=b=166.886 c=95.352	a=b=101.28 c=100.29	a=100.90
Resolution (Å) ^a	28.80-2.30 (2.42-2.30)	40.18-2.24 (2.36-2.24)	50.00-2.80 (2.95-2.80)
Unique reflections	43262 (6430)	29207 (4221)	4328 (622)
Completeness (%)	98.3 (100)	100 (100)	99.6 (99.7)
Multiplicity	5.8	7.4	4.3
Mean I/ σ (I)	13.7 (3.0)	13.8 (2.8)	13.7 (2.8)
Rpim	0.034 (0.209)	0.036 (0.277)	0.031 (0.272)
CC (1/2)*	99.9 (91.5)	99.8 (72.8)	99.9 (74.7)
Refinement			
Rwork	0.1620	0.1734	0.2786
Rfree	0.1898	0.2041	0.3387
Rmsd, bonds (Å)	0.005	0.005	0.008
Rmsd, angles (°)	1.016	0.989	1.347
Ramachandran plot			
Preferred (%)	96.4	98.6	90.7
Allowed (%)	2.7	1	6.8

^aLos números entre paréntesis indican los valores para la celda de mayor resolución.

*CC (1/2): porcentaje de correlación significativa a un nivel de 0.1% entre las intensidades obtenidas a partir de la mitad los datos escogidos al azar (Karplus and Diederichs, 2012).

Tabla 3.1. Estadísticas cristalográficas para Dut ϕ 85, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11.

Resultados

Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel inducen la movilidad de SaPIbov1

Previo a nuestro trabajo se había demostrado que Dut80 α y Dut ϕ 11 eran capaces de inducir la movilidad de la isla SaPIbov1 (Tormo-Más *et al.*, 2010). Para saber si Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel tenían capacidad inductora y poder compararlas con Dut80 α y Dut ϕ 11, el equipo del Dr. Penadés infectó cepas no lisogénicas de *S. aureus* con los diferentes alelos de Duts clonadas en el vector pCN51 inducible por cadmio utilizando en todas ellas la zona de unión al ribosoma de Dut80 α (Frigols, 2015; García-Caballer, 2015). Los resultados obtenidos a través de la detección de SaPIbov1 mediante *southern blot*, muestran que la isla SaPIbov1 también es inducida por Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel (resultados no publicados) (Figura 3.1). Además, la comparación de los niveles de inducción de SaPIbov1 por las cuatro Duts estudiadas en función de los niveles de proteína Dut expresada, sugiere que no todas las Duts presentan una capacidad inductora similar para SaPIbov1 (Figura 3.1). Anteriormente, y comparando la capacidad inductiva de Dut80 α y Dut ϕ 11, ya se había observado que diferentes Duts presentaban diferente capacidad inductiva, habiéndose relacionado con la variabilidad del motivo VI característico de las Duts fágicas (Maiques *et al.*, 2016; Tormo-Más *et al.*, 2010). Estos resultados muestran que Dut ϕ 11, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 85 inducen la isla con una eficiencia mayor que Dut80 α , siendo su eficiencia muy baja, aún expresándose Dut80 α a niveles extremadamente altos.

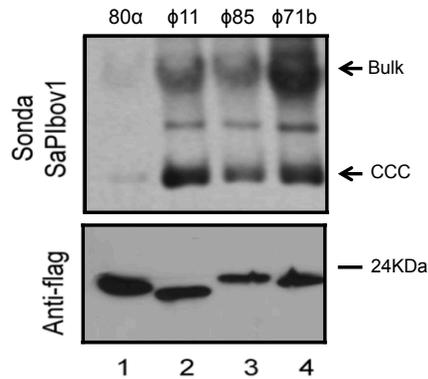


Figura 3.1. Inducción y replicación de SaPIbov1 por diferentes proteínas Dut. **Panel superior:** Escisión y replicación de SaPIbov1 después de inducir los alelos clonados de *dut* de los fagos φ80α (80α), φ11, φ85 y φ71bel (φ71b). Una cepa no lisogénica derivada de la cepa RN4220 portadora de SaPIbov1 fue complementada con plásmidos derivados del pCN51 para la expresión de las diferentes Duts fusionadas a cola 3xFLAG. Un mililitro de cada uno de los cultivos ($OD_{540} = 0.3$) fue recogido después de 2 horas de tratamiento con 2 mM $CdCl_2$ y utilizado para preparar minilisados, los cuales fueron resueltos en gel 0.7% de agarosa del que se realizó *southern blot* para la detección del ADN marcado mediante sonda de SaPIbov1. La banda superior “*bulk DNA*” corresponde a la cantidad total de ADN incluyendo el cromosomal, el del fago y el de la SaPI en fase de replicación. La banda CCC indica el ADN circular de la SaPI que se encuentra covalentemente cerrado y en fase de replicación. En estos experimentos, realizados sin presencia de fago ayudante, el ADN de la SaPI escindido aparece como CCC y no como moléculas lineares, las cuales se observan debido a la inducción y posterior encapsidación mediada por el fago. **Panel inferior:** *western blot* realizado con el anticuerpo frente a la cola FLAG fusionada a las proteínas Dut (García-Caballer, 2015).

Estructuras de Dutφ85, Dutφ71bel y Dutφ11 en complejo con dUMpNpp

El alineamiento de las secuencias proteicas de Dut80α, Dutφ11, Dutφ85 y Dutφ71bel con el programa *Clustal Omega* muestra una identidad de secuencia de entre 79-82% (Figura 3.2 y Tabla S3.3). Esta identidad no está distribuida de forma homogénea, si no que se observan dos zonas altísimamente conservadas, que incluyen los cinco motivos consenso de las Duts triméricas (Vértessy and Tóth, 2009), flanqueando a una zona de alta variabilidad de secuencia y tamaño (desde 25 residuos en Dutφ11 hasta 40 residuos en Dutφ85), que denominamos motivo VI (Figura 3.2), implicado en el

reconocimiento del represor Stl (Tormo-Más *et al.*, 2010; Maiques *et al.*, 2016). Por el contrario, la comparación de secuencia de los represores de diferentes islas que son movilizadas por Duts entre las que se encuentran SaPIbov1, SaPIbov5 y SaPIov1 (Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010); muestran total identidad de secuencia. Es por lo tanto desconcertante que una región tan altamente divergente en las Duts interaccione con la misma proteína.

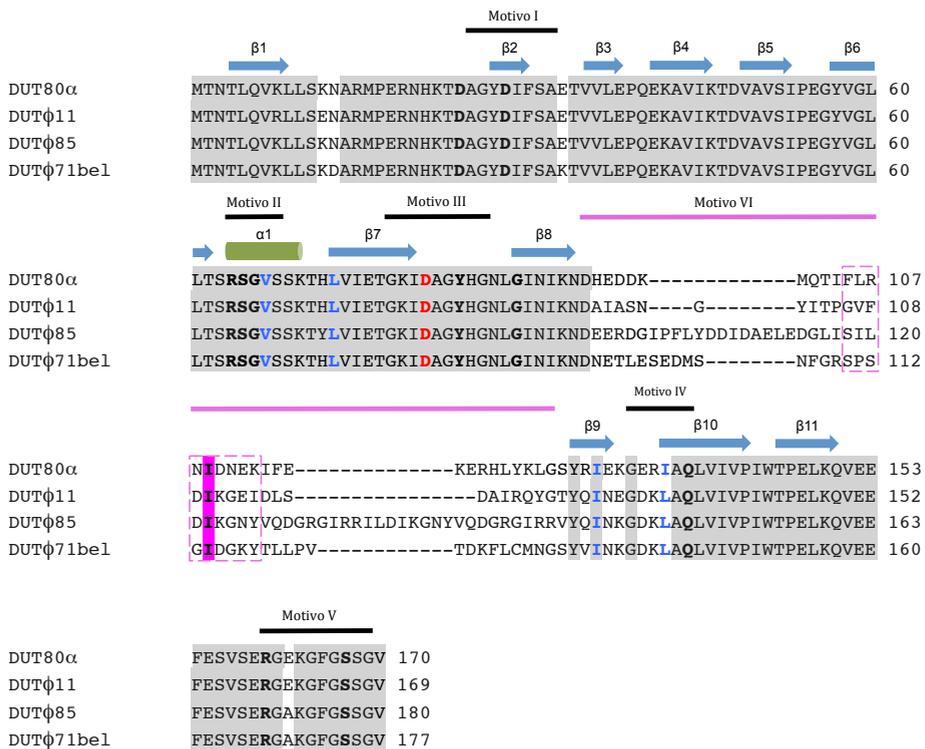


Figura 3.2. Alineamiento de secuencias de Duts fágicas. Las secuencias de Dut80α, Dutφ11, Dutφ85 y Dutφ71be1 se muestran alineadas. Las hebras β se muestran con flechas de color azul y la única hélice α con un cilindro de color verde. Los aminoácidos que componen los motivos consenso (I-V) están delimitados con líneas negras sólidas, así como el motivo no conservado (VI) delimitado con línea sólida magenta. La región central del motivo VI, que conforma el β-hairpin, está delimitada por el recuadro de líneas discontinuas magenta e incluye la isoleucina conservada (sombreada con color magenta). Los aminoácidos hidrofóbicos que contribuyen al posicionamiento de esta lle aparecen resaltados con color azul. Los aminoácidos conservados están sombreados en color gris, incluyendo aquellos residuos que participan en la unión del ligando (resaltados en negro) y el aspártico catalítico (resaltado en rojo).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

Para proveer información estructural sobre este punto, cristalizamos y resolvimos las estructuras tridimensionales de Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel en presencia de dUMpNpp, un análogo no hidrolizable del sustrato dUTP (Tabla 3.1, Figura 3.3), a una resolución de 2.8, 2.3 y 2.24 Å, respectivamente. Aunque las unidades asimétricas de los diferentes cristales mostraban contenidos diferentes con una, tres y cuatro moléculas en el caso de Dut ϕ 11, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 85, respectivamente; todas las proteínas formaban los esperados homotrimeros explotando la simetría cristalográfica cuando el contenido de la celda unidad no permitía contener esta organización cuaternaria.

La estructura global para todas estas Duts (Figura 3.3), basadas en los datos cristalográficos (Tabla 3.1), guarda la misma arquitectura que la Dut80 α , previamente caracterizada por nuestro grupo (Tormo-Más *et al.*, 2013). Aunque, las estructuras no muestran la totalidad de los residuos para todas las proteínas estudiadas, la densidad obtenida a partir de los datos experimentales ha permitido observar el rango de residuos Thr4-Ser167 para la Dut ϕ 11, Met1-Val180 para la Dut ϕ 85 y Met1-Val177 para la Dut ϕ 71bel. Las subunidades que componen cada una de estas tres Duts presenta el plegamiento típico de hebras β antiparalelas descrito para las Duts triméricas (Figura S3.1). Cada una de las Duts se compone de tres subunidades, organizándose los monómeros alrededor de un canal central que delimita el eje del trímero que le hace tomar una apariencia piramidal (Figuras 3.3, S3.2 y S3.3) y definiendo tres centros activos, cada uno situado en la superficie de la zona de interacción donde los tres monómeros interaccionan. Cada uno de los monómeros está definido por un cuerpo central compuesto por una estructura de barril de hebras β , compuesto por nueve hebras β y una sola hélice α (Figuras 3.2 y S3.1). En todas estas Duts, se proyecta desde el cuerpo central un largo *loop* que corresponde al extremo C-terminal que contiene el motivo conservado V (Figuras 3.2 y S3.1). Cabe destacar que con anterioridad el grupo

de la Dra. Vertessy caracterizó la Dut ϕ 11 (Leveles *et al.*, 2013). No obstante, el grupo espacial de dicha estructura, P4₃22, difiere de la nuestra, I23. En comparación a la estructura obtenida por nuestro grupo, Leveles y colaboradores no pudieron observar el extremo C-terminal completo en ninguno de los seis monómeros que componían la unidad asimétrica (Leveles *et al.*, 2013), pese a que todos los centros activos se encontraban en presencia del análogo dUMpNpp y de un ión de magnesio. Sobre el centro activo Leveles y colaboradores posicionan la Phe164, la cual se sugirió que tiene un papel tanto en el ordenamiento del motivo V, situado en el extremo C-terminal (Figura 3.2), como en la actividad hidrolítica de la Dut (Mol *et al.*, 1996; Pecsí *et al.*, 2010).

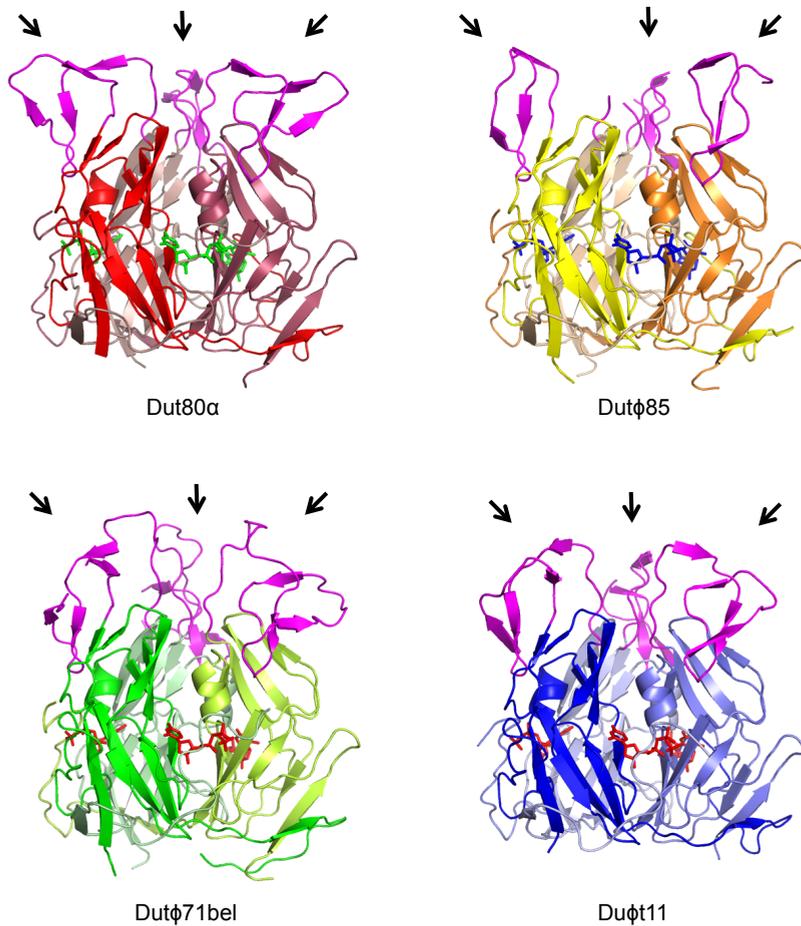


Figura 3.3. Estructuras de Dut80 α , Dut ϕ 85, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11. Estructura global de los homotrimeros de Dut80 α (PDB 3ZEZ) (tonalidades de rojos), Dut ϕ 85 (tonalidades de amarillos), Dut ϕ 71bel (tonalidades de verdes) y Dut ϕ 11 (tonalidades de azules), cada uno de los monómeros que forman el trímtero está coloreado con una tonalidad diferente del color correspondiente. El motivo VI está coloreado en color magenta y señalado mediante flechas de color negro en todas las estructuras. Las moléculas de dUMP Npp se encuentran representadas en *sticks* de color verde (Dut80 α), azul (Dut ϕ 85) y rojo (Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 11).

El motivo VI, el cual contiene dos pares de hebras β antiparalelas muy cortas, de cada uno de los monómeros se sitúa en la parte superior del cuerpo central y se proyecta hacia exterior, replegándose posteriormente sobre el cuerpo central del trímero. La proyección inicial de cada uno de los motivos VI aumenta en el trímero la superficie del polo de la molécula que correspondería al pico de la pirámide (Figura 3.3), confiriéndole una forma globular que le distingue de otras Duts homotriméricas. No obstante, este motivo VI no se observa en su totalidad en las estructuras de Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, faltando los residuos Asp109-Leu116 en Dut ϕ 85 y Thr124-K126 en Dut ϕ 71bel; sugiriendo que posiblemente presente flexibilidad. Cabe destacar que en el mismo polo donde se encuentra situado el motivo VI, y coordinado con el Asp95 conservado en las Duts estudiadas y en la Dut80 α , encontramos un ión magnesio. Este ión magnesio, que también se encuentra en el caso de Dut80 α en presencia de dUMP (PDB 5CCO), y que se sitúa dentro del canal definido por el trímero de Dut, se ha observado en otras estructuras de Duts triméricas, sugiriéndose que tenga un papel en la estabilidad del trímero, como en el caso de la Dut humana (Kovari *et al.*, 2004; Leveles *et al.*, 2013; Varga *et al.*, 2007). De hecho, y aunque futuros experimentos deben realizarse para estudiar el papel de este ión en estas Duts, se ha sugerido que este ion pueda tener un papel para la estabilización del motivo VI específico de las Duts codificadas por fagos de *S. aureus* y como consecuencia un papel importante en la función de estas Duts, en nuestro caso la unión a StI (Leveles *et al.*, 2013).

Con el fin de saber si existen diferencias estructurales entre las estructuras de Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel obtenidas por nuestro grupo y la previamente caracterizada Dut80 α (capítulo 1), se superpusieron las estructuras con el programa *Superpose*, dentro de CCP4 (Winn *et al.*, 2011), y se calcularon los valores RMSD. El valor RMSD es un indicador de la distancia espacial entre dos átomos que ocupan una misma posición al superponer dos estructuras

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

(Maiorov and Crippen, 1994). La superposición de las estructuras de los monómeros individuales de cada una de las Duts muestran valores de RMSD por debajo de 0.5 Å cuando se comparan los 134 residuos que conforman el cuerpo central de la molécula excluyendo los residuos que definen el motivo VI (Figura 3.2 y Tabla 3.2). Estas diferencias pueden considerarse mínimas, propias de las diferencias intrínsecas en la resolución de las estructuras. De hecho cuando se comparan entre si los diferentes monómeros encontrados en la unidad asimétrica de un cristal para Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 85, que presentaban tres y cuatro subunidades, respectivamente; se obtuvieron valores similares, indicando que estas diferencias son intrínsecas de la flexibilidad de la proteína. Estos datos indican que la variabilidad del motivo VI no tiene repercusión estructural sobre el cuerpo principal del enzima.

	Dut80 α (4-95/127-168)	Dut ϕ 11 (4-95/126-167)	Dut ϕ 85 (4-95/137-178)	Dut ϕ 71bel (4-95/134-175)
Dut80 α (4-95/127-168)	-	0.520	0.268	0.291
Dut ϕ 11 (4-95/126-167)	0.520	-	0.457	0.480
Dut ϕ 85 (4-95/137-178)	0.268	0.457	-	0.172
Dut ϕ 71bel (4-95/134-175)	0.291	0.480	0.172	-

Tabla 3.2. Valores de RMSD de la superimposición de monómeros de Duts. Los valores de RMSD obtenidos (en Å), corresponden a la superimposición por parejas de uno de los monómeros que forma cada trímero de Dut.

El centro activo de las Duts codificadas por fagos de *S. aureus* se encuentra altamente conservado

Cada uno de los trímeros contiene tres centros activos independientes formados, cada uno de ellos, por la interacción de los tres monómeros y ocupados por una molécula de dUMpNpp (Figura 3.3). Como anticipaba la identidad de secuencia de la zona común de estas proteínas con respecto a otras Duts (Figura 3.2), los residuos que contactan con el nucleótido y las

interacciones que realizan con este son virtualmente idénticas en todos ellos y, además, similares a los observados en los centros catalíticos de otras Duts, confirmando la alta conservación de los cinco motivos consenso que participan en la formación del centro activo (Vértessy and Tóth, 2009). De esta manera, y al comparar junto con el centro activo de Dut80 α en presencia de dUMpNpp (PDB 3ZEE), los centros activos de las Duts estudiadas Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, presentan estructuralmente conservados los residuos: (i) Asp81, que se encuentra coordinando la molécula de agua responsable de la hidrólisis del ligando; (ii) Tyr84, responsable de la especificidad por el dUTP; (iii) Arg, en posición 159, 170 y 167 en Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, respectivamente; (iv) Ser, en posición 166, 177 y 174 en Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, respectivamente; estos dos últimos se encuentran coordinando el grupo fosfato del ligando haciendo que adopte la correcta orientación para la hidrólisis del ligando; y (v) Phe en posición 164, 175 y 172 en Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, respectivamente, la cual se ha sugerido que tenga un papel en la reacción de hidrólisis (Figura 3.4).

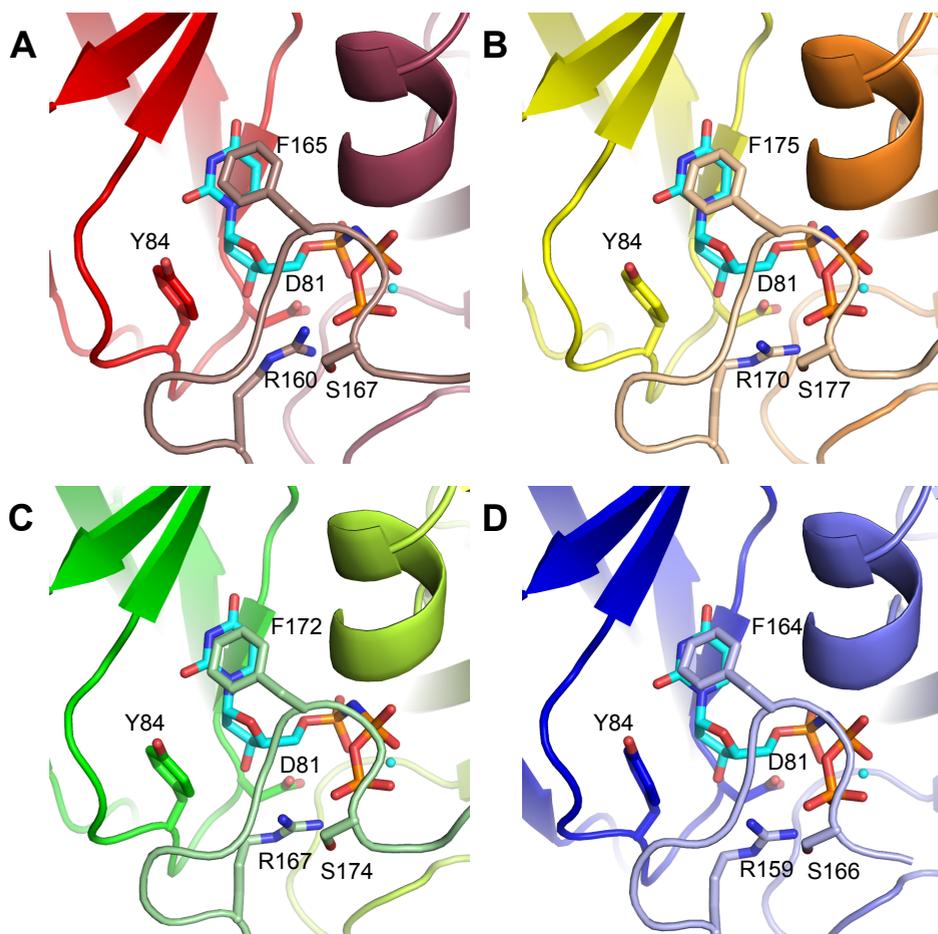


Figura 3.4. Centro activo de las Duts. Vista del centro activo de (A) Dut80 α , (B) Dut ϕ 85, (C) Dut ϕ 71bel y (D) Dut ϕ 11. Cada uno de los monómeros que forman el trímero aparece representado en diferentes tonalidades de un color para cada Dut (rojos para Dut80 α , amarillos para Dut ϕ 85, verdes para Dut ϕ 71bel y azules para Dut ϕ 11). Los aminoácidos que interaccionan con el nucleótido presentes en el centro activo se encuentran etiquetados y representados mediante *sticks* de la misma tonalidad que el monómero del que forman parte. El nucleótido aparece representado como *sticks* coloreado en función de sus átomos (cian para los carbonos, azul para los nitrógenos, naranja para el fósforo y rojo para el oxígeno). El ión Mg²⁺ se encuentra representado mediante una esfera de color cian.

El elemento estructural que suele presentar mayor diferencia conformacional en las estructuras tridimensionales resueltas de Duts corresponde al *P-loop* C-terminal, siendo no visible en muchas de las estructuras de Duts depositadas

en el PDB. La presencia de dUMpNpp y del Mg^{2+} en las estructuras de Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel ayuda a la estabilización de este elemento y hace que sea visible prácticamente en su totalidad en todas ellas. La conformación en las tres estructuras es muy similar respecto a la Dut80 α (Figuras 3.4 y S3.4). Los valores de RMSD obtenidos para cada pareja de Duts al superponer estructuralmente la secuencia SERGEKGFSS, correspondiente al motivo V, se sitúan por debajo de 0.7 Å, indicando que en estas Duts el motivo V adopta una disposición prácticamente idéntica a la observada para Dut80 α en presencia del mismo nucleótido. El hecho de mantener un centro activo tan conservado, y que el plegamiento del motivo VI no afecte a la estructura global de la molécula, hace pensar que la actividad enzimática en todas ellas debe ser muy parecida como se ha descrito previamente para el caso de Dut80 α y Dut ϕ 11 (Maiques *et al.*, 2016).

El motivo VI adopta un plegamiento común en β -hairpin pese a su gran variabilidad de secuencia

Recientemente, nuestro grupo ha corroborado la importancia del motivo VI en la unión de StI para la inducción de la isla SaPIbov1 (Maiques *et al.*, 2016). No obstante, este motivo es altamente divergente entre Duts codificadas por fagos de *S. aureus*. Además, dado que se ha sugerido que este motivo VI sirve como punto de anclaje principal para la unión de StI en las Duts (Maiques *et al.*, 2016), sigue siendo un misterio como el represor reconoce esta zona de unión. Las estructuras obtenidas en este estudio, junto con la estructura previamente caracterizada de Dut80 α , han permitido aportar más datos sobre esta cuestión.

El motivo VI (Glu96-Ser126 en Dut80 α , Glu96-Thr125 en Dut ϕ 11, Glu96-Ser136 en Dut ϕ 71bel y Glu96-Val133 en Dut ϕ 85) se sitúa entre los motivos conservados III y IV, y tanto su longitud como su secuencia es altamente variable (Figura 3.2). En el caso de Dut80 α , Dut ϕ 11 y Dut ϕ 71bel se ha podido resolver la estructura de este motivo en su totalidad en al menos

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

uno de los monómeros que forma la unidad asimétrica dentro del cristal. No ocurre lo mismo para la Dut ϕ 85, que presenta el motivo VI más extenso de las cuatro. No obstante en esta Dut, las áreas asentadas sobre el cuerpo central de la molécula se han podido resolver pudiendo trazar 29 de los 41 residuos que componen el motivo VI (D96-G100/E113-V136). El hecho de no poder trazar el resto del motivo VI en esta Dut, sugiere que este motivo presenta una alta flexibilidad para esta zona.

Sorprendentemente, y pese a la variabilidad de secuencia, espacialmente este motivo presenta un plegamiento similar para todas estas Duts. El motivo VI adopta un plegamiento en forma de L que se pliega sobre el cuerpo central del trímero (Figuras S3.1 y S3.2). Esta L está formada por cuatro láminas β que interaccionan de forma antiparalela dos a dos y que se disponen formando un ángulo de 65 grados entre ellas para generar la forma de L invertida en los casos de Dut80 α y Dut ϕ 11. Para los casos de Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel se observan las dos láminas β apicales antiparalelas, pero no la pareja restante (Figura S3.5). Las dos láminas β apicales encontradas en todas las Duts estudiadas, se encuentran formando un plegamiento *β -hairpin* (BH-MVI) (Phe105-Lys113 en Dut80 α , Ser118-Tyr126 en Dut ϕ 85, Ser110-Tyr118 en Dut ϕ 71bel y Gly106-Ile114 en Dut ϕ 11) posicionando esta horquilla muy cercana al centro activo de la molécula donde se sitúan los motivos conservados IV y V implicados en la unión de StI (Maiques *et al.*, 2016) (Figuras 3.5 y S3.5). Sorprendentemente, y aunque existe variabilidad en la secuencia de residuos que forman este BH-MVI, los valores RMSD al comparar el BH-MVI por parejas no superan en ninguno de los casos el valor de 1 Å (Tabla S3.4), indicando que esta zona dentro del motivo VI mantiene una identidad estructural que se conserva en todas las Duts estudiadas (Figura S3.5). Dado el plegamiento similar en forma de L para todas estas Duts, y dado que este motivo es necesario para la unión del represor StI (Maiques *et al.*, 2016), cabría

esperar que estas Duts, todas capaces de inducir SaPIbov1, presentaran elementos comunes en la zona delimitada como punto de anclaje para StI (y que incluyen a los motivos IV, V y VI de las Duts codificadas por fagos de *S. aureus*) (Maiques *et al.*, 2016).

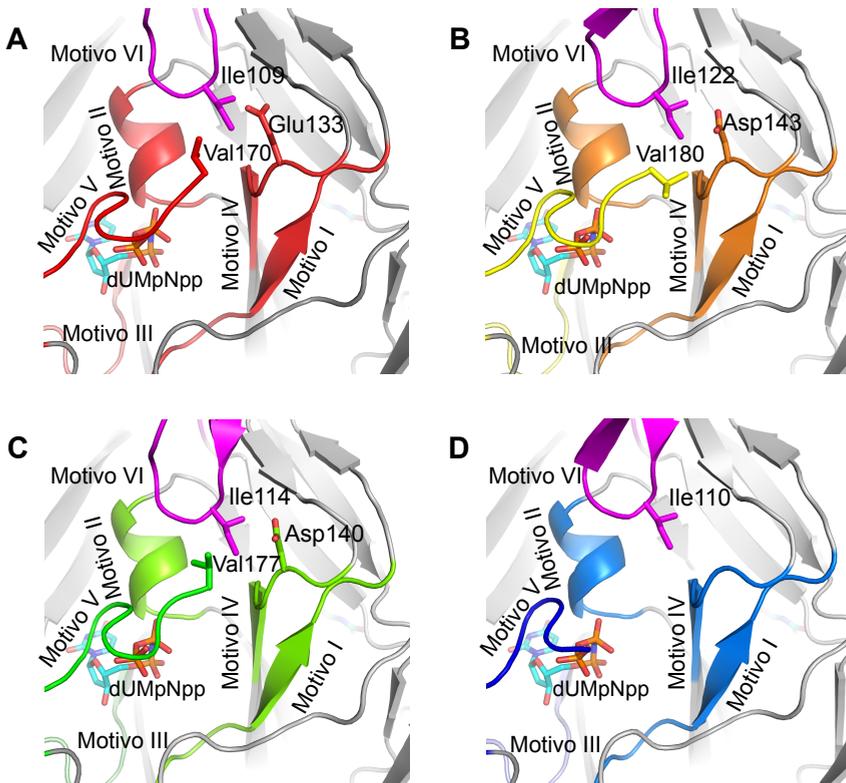


Figura 3.5. Posicionamiento estructural del motivo VI respecto al resto de motivos en las Duts. (A) Dut80 α , (B) Dut ϕ 85, (C) Dut ϕ 71bel y (D) Dut ϕ 11. Los motivos conservados en Duts triméricas (I-V) aparecen etiquetados y coloreados en diferentes tonalidades de un mismo color según la Dut (rojos para Dut80 α , amarillos para Dut ϕ 85, verdes para Dut ϕ 71bel y azules para Dut ϕ 11). El Glu133 en Dut80 α , Asp143 en Dut ϕ 85, Asp140 en Dut ϕ 71bel, situados en el motivo conservado IV, y la Val conservada, situada en el extremo C-terminal aparecen representados como *sticks*, coloreados y numerados en función de la Dut. El motivo específico VI aparece coloreado de magenta. La Ile estructuralmente conservada aparece representada como *stick*, de color magenta, y numerada según la secuencia de residuos de su respectiva Dut. El ligando, dUMpNpp, aparece representado como *stick* y coloreado en función de sus átomos (cian para los carbonos, azul para los nitrógenos, naranja para el fósforo y rojo para el oxígeno).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

El alineamiento estructural de los aminoácidos que forman parte del BH-MVI muestra una Ile conservada en todas las Duts estudiadas que ocupa la misma posición en todas ellas (Ile109 en Dut Dut80 α , Ile122 en Dut ϕ 85, Ile114 en Dut ϕ 71bel, Ile110 en Dut ϕ 11) (Figuras 3.2, 3.5 y S3.5). Esta isoleucina ocupa un entorno hidrofóbico creado por los residuos conservados Val67, Leu73 e Ile129, en Dut80 α , junto con un residuo semi-conservado, la Ile135, en Dut80 α , posición ocupada por una leucina en el resto de las Duts estudiadas (Figuras 3.2 y S3.6). Esta red de interacciones hidrofóbicas permitirían afianzar el BH-MVI haciéndolo visible frente a las partes más flexibles del resto del motivo VI, en especial en la Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel que presentan motivos más extensos y de los que no ha sido posible resolver su estructura en todas las moléculas que componen el cristal.

La disposición espacial del BH-MVI lo sitúa muy próximo tanto al centro activo de la molécula como al extremo C-terminal cuando este se encuentra ordenado en presencia de ligando (Figura 3.5). Al igual que la Ile en posición 109 de Dut80 α , que se encuentra manteniendo interacciones con la Val170 del motivo conservado V, en el caso de las Duts Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, la Ile122 e Ile114, respectivamente, se encuentra interaccionando con la valina en posición 180 y 177 de la Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, respectivamente (Figura 3.5). Esta valina ocupa la última posición en el extremo C-terminal de la proteína y no es observable en el caso de Dut ϕ 11. La isoleucina que interacciona con la valina, además, se sitúa muy cercana al Asp en posición 143 y 140 en el caso de Dut ϕ 85 y Dut ϕ 71bel, respectivamente, localizado en el motivo conservado IV, ocupada por el Glu133 en el caso de Dut80 α (Figura 3.5). En el caso de Dut80 α y de Dut ϕ 11 se ha comprobado que el intercambio de este residuo, junto con los dos siguientes, afecta a la especificidad de la unión con Stl (Maiques *et al.*, 2016). Estos datos sugieren que el mecanismo de interacción entre las Duts

estudiadas y el represor StI debe ser muy similar al modelo propuesto para la Dut80 α , donde el motivo VI junto con el motivo IV juegan un papel importante en la unión StI:Dut (Maiques *et al.*, 2016), y apoyan los datos presentados en el capítulo 2 para el caso de Dut ϕ 11. Además, los resultados obtenidos sugieren que este BH-MVI puede jugar un papel importante en la unión de StI, dado que es un elemento estructural común en todas las Duts inductoras de SaPIbov1 estudiadas.

El dominio β -hairpin es un elemento esencial para la inducción de SaPIbov1

Dado que el BH-MVI es estructuralmente idéntico en todas las Duts estudiadas y que forma parte del motivo implicado en la unión a StI, nos preguntamos si este elemento estructural juega un papel principal en esta función. Para comprobar esta posibilidad se diseñaron mutantes truncados para este dominio para Dut80 α (R107-E112), Dut ϕ 11 (F108-E113) y Dut ϕ 85 (D106-L112) a los que denominamos mutantes Δ GS (Dut80 α ^{AGS}, Dut ϕ 11^{AGS} y Dut ϕ 85^{AGS}, respectivamente). Resultados previos han mostrado, tanto para el caso de Dut80 α como de Dut ϕ 11, que este motivo no está implicado en la actividad catalítica de la enzima (Leveles *et al.*, 2013; Maiques *et al.*, 2016). La capacidad inductora de estos mutantes respecto a las formas salvajes de las correspondientes Duts fue realizada por el grupo del Dr. Penadés, transformando cepas no lisogénicas de *S. aureus* que contuvieran la isla SaPIbov1 con los correspondientes mutantes de las Duts clonados en el vector inducible por cadmio pCN51 (García-Caballer, 2015). Tras inducir la expresión de las Duts, la movilización de SaPIbov1 fue monitorizada por *southern blot* (Figura 3.6) (García-Caballer, 2015). Tal como muestran los resultados, en todos los casos al delecionar el BH-MVI en las correspondientes Duts se observó una fuerte disminución en la capacidad inductora de SaPIbov1. En concreto, para Dut80 α , cuya capacidad inductora es baja, el mutante

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

Dut80 α ^{AGS} casi pierde completamente esta capacidad. Para el caso de los mutantes Dut ϕ 11^{AGS} y Dut ϕ 85^{AGS} se observa una fuerte reducción de su capacidad comparada con sus respectivas formas salvajes. Por consiguiente, el efecto observado es similar en todas ellas. La posibilidad de que los niveles de expresión de ambos genes fuera responsable de estas diferencias se descartó mediante *western blot* (Figura 3.6), cuyo resultado confirma unos niveles de expresión para las Duts casi idénticos.

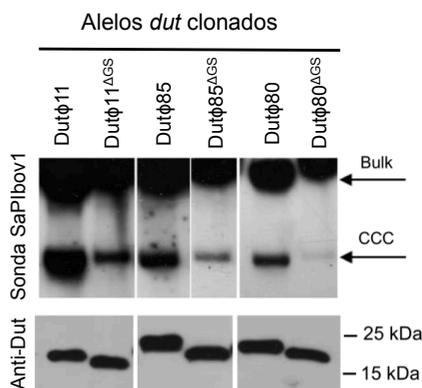


Figura 3.6. Inducción de SaPIbov1 por diferentes alelos de Duts y sus correspondientes mutantes Δ GS. Panel superior: Escisión y replicación de SaPIbov1 después de la inducción de las formas salvajes de *dut* clonadas (Dut ϕ 11, Dut ϕ 85 y Dut80 α) y los correspondientes mutantes truncados para el motivo VI (Δ GS). **Panel inferior:** *Southern blot* para la detección del ADN marcado mediante sonda de SaPIbov1. La banda superior “*bulk DNA*” corresponde a la cantidad total de ADN incluyendo el cromosomal, el del fago y el de la SaPI en fase de replicación. La banda CCC indica el ADN circular de la SaPI que se encuentra covalentemente cerrado y en fase de replicación (García-Caballer, 2015).

Dado que el BH-MVI presenta conservación estructural pero no de secuencia, puede pensarse que este elemento estructural juega un papel principal dentro del motivo y que las variaciones de secuencia dan cuenta de las diferencias en su capacidad inductiva como se observa en la figura 3.6. De esta manera, el esqueleto de C α del BH-MVI representaría un andamiaje para el anclaje de StI. La decoración de este andamio por las diferentes cadenas

laterales regularía el grado de afinidad entre ambas proteínas. No obstante, otras partes del motivo VI también participarían en el proceso de unión, ya que mutantes de Dut80 α donde se deletiona totalmente el motivo VI parecen presentar una menor capacidad de inducción que el correspondiente mutante Δ GS (comunicación personal del grupo del Dr. Penadés). Aunque más datos se requieren para entender cómo el motivo VI participa en la unión de StI y, en consecuencia en la inducción de islas de patogenicidad, los datos obtenidos sugieren que el BH-MVI presenta un papel importante en la función señalizadora de las Duts codificadas por fagos de *S. aureus*.

Discusión

Las Duts fágicas se comportan como proteínas *moonlighting* que median la inducción de islas de patogenicidad a través de su unión al represor de la isla (Tormo-Más *et al.*, 2010). Las Duts triméricas mantienen una estructura global muy conservada compuesta por cinco motivos consenso (Vértessy and Tóth, 2009). Estos motivos, junto con un motivo adicional, están presentes en las Duts triméricas codificadas por fagos de *S. aureus* como Dut80 α , Dut ϕ 11, Dut ϕ 71bel y Dut ϕ 85. Este motivo adicional, llamado motivo VI, es un elemento diferenciador en estas Duts. El alineamiento de las secuencias de estas Duts muestra una alta variabilidad en cuanto a secuencia para este motivo. Dado el hecho de que existan dos zonas diferentes a nivel de conservación en la secuencia, hace pensar que esta proteína sufre una presión evolutiva diferenciada en cada una de estas zonas. Por una parte existe una presión purificadora para la zona conservada de las Duts, que mantiene el plegamiento y actividad catalítica de estas proteínas. Por otro lado, una presión positiva sobre el motivo VI hace que cambien a una velocidad muy alta como indica la gran variabilidad (Frigols *et al.*, 2015). Esta presión evolutiva positiva sobre el motivo VI puede tener un cierto sentido biológico si pensamos en el hecho de que la inducción de islas de patogenicidad interfieren en la replicación del fago (Ram *et al.*, 2012) y que podría dar explicación a como los fagos intentan evitar, mediante diferentes variantes alélicas, la interacción con el represor de la isla para su propio beneficio. No obstante, aún sigue siendo un misterio el por qué las Duts codificadas por fagos de *S. aureus* no han eliminado esta región o por qué todas ellas no presentan una misma variante alélica optimizada con una afinidad mínima por el represor Stl.

A pesar de estas preguntas, y dada la variabilidad en secuencia del motivo VI, la adaptación por parte de las Duts a evitar la interacción con el represor de la isla se podría traducir en diferentes conformaciones del motivo VI.

CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN

No obstante, los datos estructurales muestran un plegamiento generalizado en forma de L, el cual contiene un β -hairpin, que incluye nueve residuos, de entre los que destaca una isoleucina conservada, cercano al centro activo de la molécula. Este motivo VI está involucrado en el mecanismo de señalización mediada por Duts fágicas que inducen la isla de patogenicidad SaPIbov1 (Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010), siendo un elemento esencial en este proceso de señalización (Maiques *et al.*, 2016). Tal como, se ha descrito en los capítulos 1 y 2, este elemento es esencial pero no suficiente y requiere del motivo V para realizar su función señalizadora, una función dependiente de nucleótido (Maiques *et al.*, 2016). De hecho, los resultados obtenidos previamente por el grupo del Dr. Penadés ponen de manifiesto como afecta el intercambio de los motivos VI entre Dut80 α y Dut ϕ 11 con respecto a la eficacia con la que se induce la isla SaPIbov1 (Tormo-Más *et al.*, 2010). De la misma manera, resultados recientes obtenidos por el mismo grupo (no publicados) ponen de manifiesto la importancia del β -hairpin en la especificidad de la inducción de SaPIbov1 (García-Caballer, 2015). Es más, mutaciones puntuales en la isoleucina conservada hacia alanina o aspártico producen un aumento en la inducción de la isla de patogenicidad, indicando que esta isoleucina juega un papel clave dentro del proceso de señalización (datos no publicados) (García-Caballer, 2015). Es llamativo, pues, que pese a la variabilidad de secuencia se mantenga una conformación estructural que va en contra de la propia biología del fago; luego lo esperable sería que elementos como el β -hairpin del motivo VI tendieran a estar sometidos a la misma presión evolutiva que el resto del dominio. A pesar de ello, todas las Duts estudiadas mantienen este dominio estructuralmente conservado mientras que para el resto del motivo VI existen mayores diferencias.

Una posible respuesta a la necesidad de conservar este β -hairpin es que se requiera para nuevas funciones *moonlighting* que favorezcan la biología

del fago. Esto abre la puerta a la interacción de Duts con nuevas proteínas diana. De hecho, resultados obtenidos mediante ensayos de doble híbrido realizados específicamente con proteínas de *S. aureus* y Dut80a Dut80us doble híbrido con proteínas involucradas en el ciclo biológico del fago, enzimas metabólicos de *S. aureus* o proteínas involucradas en el procesamiento de proteínas (datos no publicados). Aunque estos datos preliminares son muy interesantes, nada se conoce aún sobre qué efectos tiene para los fagos estas nuevas interacciones; sería esperable que la misma especificidad con la que las Duts interaccionan con el represor de la isla fuera similar a las interacciones con las nuevas dianas celulares. Si partimos de la idea de que estas interacciones son en beneficio del fago, las Duts que tengan una menor afinidad por Stl que otras se deberá a que seguramente también presenten una menor afinidad por sus dianas celulares, o bien porque han seguido otro mecanismo de escape a la unión de Stl. Este último punto abre la puerta a nuevos mecanismos reguladores, independientes de la estructura, que regulen los niveles de interacción entre Duts-Stl y Duts-dianas celulares.

Material suplementario

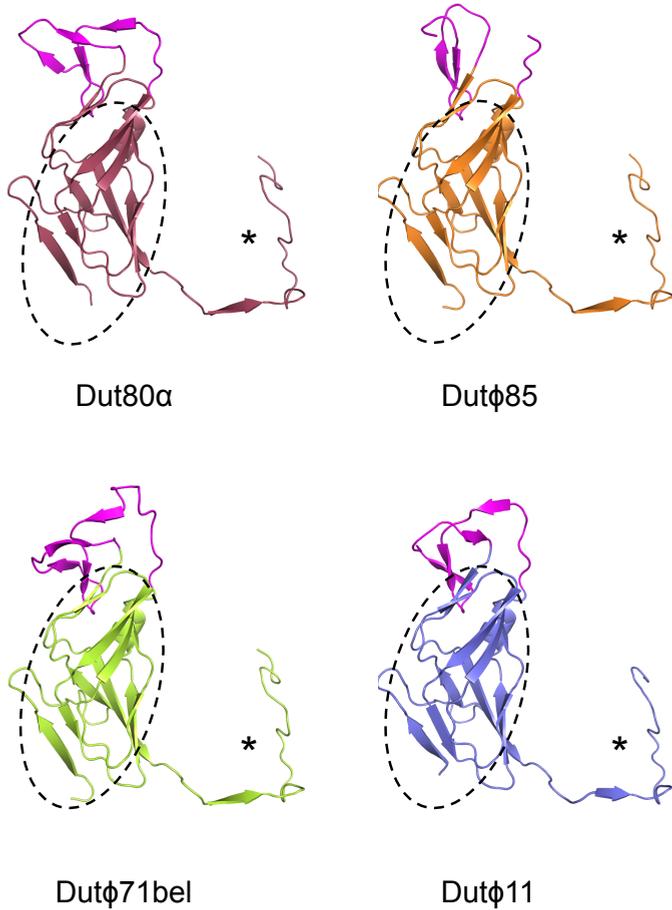


Figura S3.1. Monómeros de Duts fágicas. Dut80 α (rojo), Dut ϕ 85 (naranja), Dut ϕ 71bel (verde) y Dut ϕ 11 (azul). El cuerpo central del monómero está señalado mediante una elipse con línea discontinua negra. El motivo VI está coloreado en color magenta. El extremo C-terminal, que se proyecta desde el cuerpo central, queda señalado mediante (*).

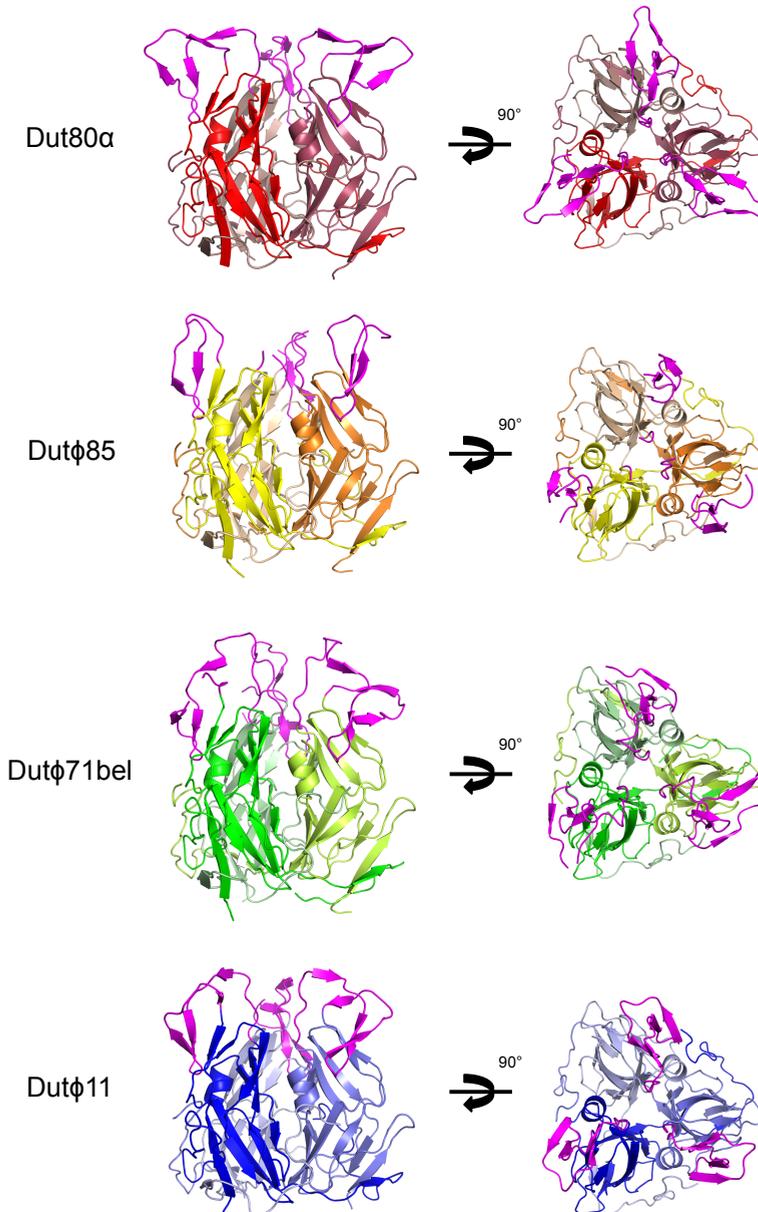
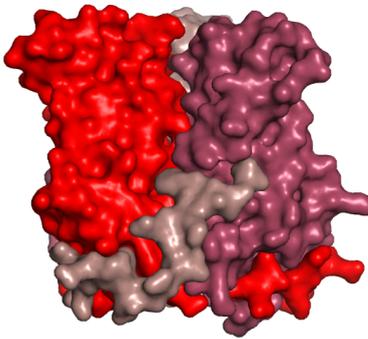
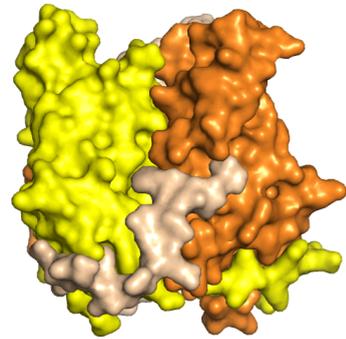


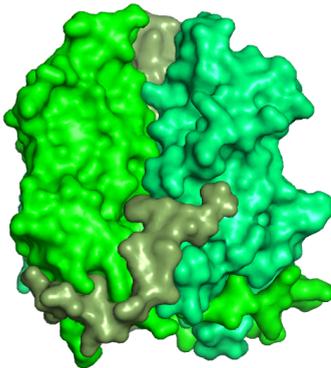
Figura S3.2. Vista global de las estructuras Duts triméricas fágicas. Las diferentes Duts están coloreadas en diferentes tonalidades de un mismo color: Dut80 α (rojos), Dut ϕ 85 (amarillos), Dut ϕ 71bel (verdes) y Dut ϕ 11 (azules). El motivo no conservado VI se encuentra coloreado con magenta.



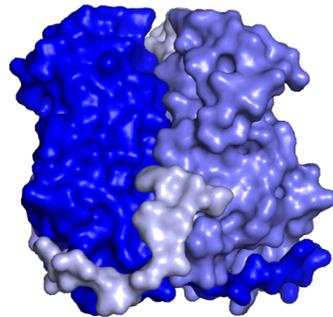
Dut80 α



Dut ϕ 85



Dut ϕ 71bel



Dut ϕ 11

Figura S3.3. Vistas en superficie de las Duts triméricas fágicas. Las diferentes Duts están coloreadas en diferentes tonalidades de un mismo color: Dut80 α (rojos), Dut ϕ 85 (amarillos), Dut ϕ 71bel (verdes) y Dut ϕ 11 (azules).

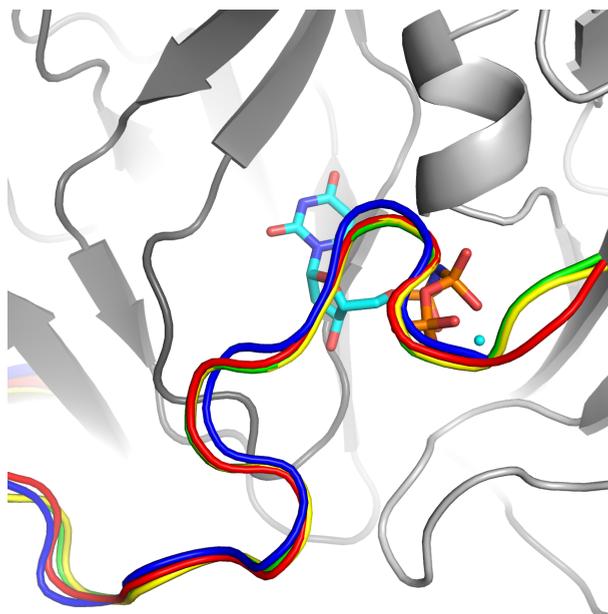


Figura S3.4. Posicionamiento estructural del extremo C-terminal. El extremo C-terminal (rojo en Dut80 α , amarillo en Dut ϕ 85, verde en Dut ϕ 71bel y azul en Dut ϕ 11) se encuentra posicionado sobre el centro activo ocupado por el dUMPnpp representado mediante *sticks*.

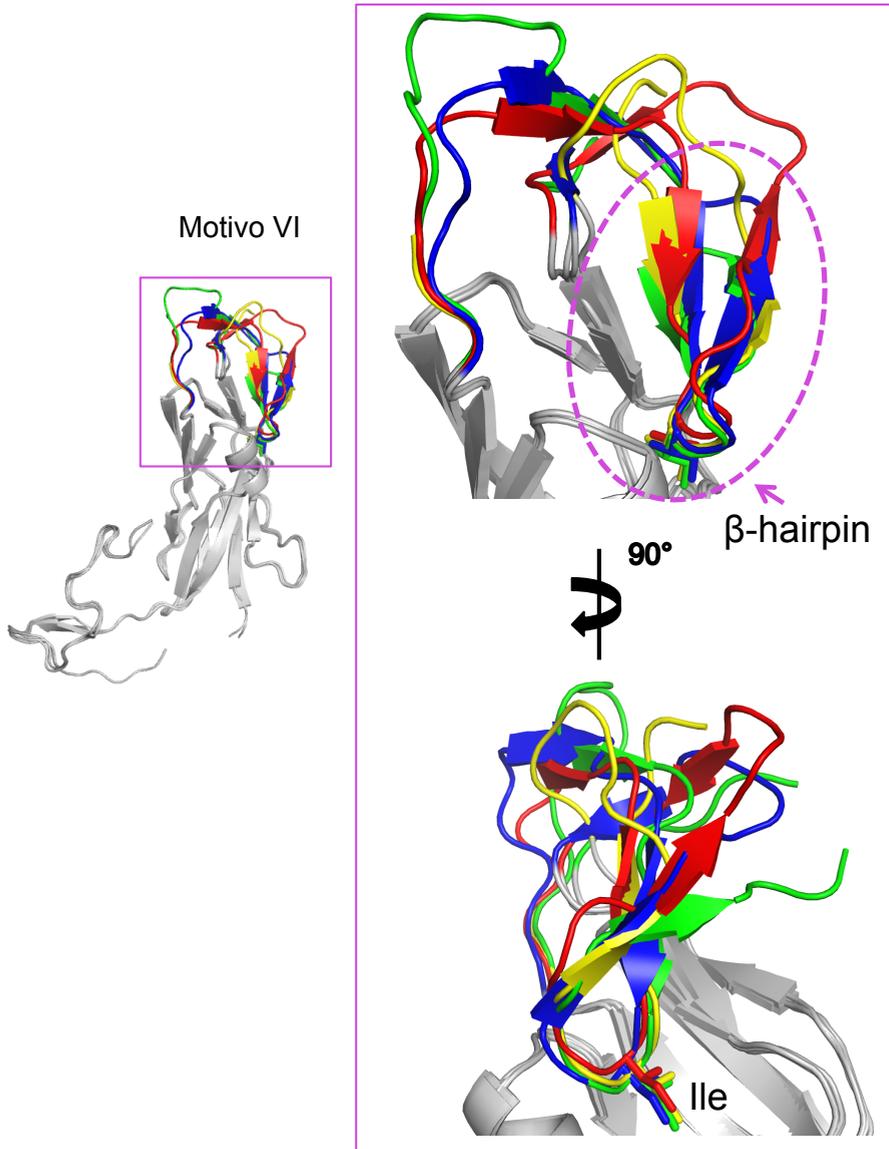


Figura S3.5. Visión del dominio β -hairpin del motivo VI. El motivo VI (rojo en Dut80 α , amarillo en Dut ϕ 85, verde en Dut ϕ 71bel y azul en Dut ϕ 11) contiene el dominio β -hairpin (líneas discontinua magenta y marcado con una flecha) que se encuentra estructuralmente conservado. La Ile estructuralmente conservada dentro de este β -hairpin se encuentra marcada y representada mediante sticks.

CAPÍTULO 3: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Sonda hibridación SaPIbov1	
SaPIbov1-112mE	CCGGAATTCAATTGCTGAGGAAAACCTTC
SaPIbov1-113cB	CGCGGATCCTAATTCTCCACGTCTAAAGC
Amplificación Dut ϕ 11	
Dut ϕ 11_FW	TACTTCCAATCCATGACTAACACATTACAAGTAAGGCTATTATCAG
Dut ϕ 11_RV	TATCCACCTTTACTGTTACACTCCGCTACTTCCGAAGCC

Tabla S3.1. Oligonucleótidos utilizados.

Plásmido	Descripción	Referencia
pCN51	Vector de expresión	(Charpentier et al., 2004)
pET28a	Vector de expresión	Novagen
pNIC-Bsa4	Vector de expresión	Addgene
pJP753	pET28a-dut80 α	(Tormo-Más et al., 2010)
pCH1001	pET28a-dut ϕ 85	(Frígols, 2015)
pCH1564	pET28a-dut ϕ 71bel	(Frígols, 2015)
pJP666	pET28a-dut ϕ 11	(Tormo-Más et al., 2010)
	pNIC-Bsa4-dut ϕ 11	This work
pJP821	pCN51-3xFlag-dut 80 α	(Tormo-Más et al., 2010)
pJP812	pCN51- 3xFlag-dut ϕ 11	(García-Caballer, 2015)
pJP1162	pCN51- 3xFlag-dut ϕ 71	(García-Caballer, 2015)
JP6792	pCN51- 3xFlag-dut ϕ 85	(García-Caballer, 2015)
pJP1660	pCN51-3xFlag dut80 $\alpha^{\Delta GS}$	(García-Caballer, 2015)
pJP1659	pCN51- 3xFlag dut ϕ 11 ΔGS	(García-Caballer, 2015)
pJP1661	pCN51-3xFlag dut ϕ 85 ΔGS	(García-Caballer, 2015)

Tabla S3.2. Plásmidos utilizados.

CAPÍTULO 3: MATERIAL SUPLEMENTARIO

	Dut80 α	Dut ϕ 11	Dut ϕ 85	Dut ϕ 71bel
Dut80 α	-	79.17	79.88	82.42
Dut ϕ 11	79.17	-	82.74	81.10
Dut ϕ 85	79.88	82.74	-	79.43
Dut ϕ 71bel	82.42	81.10	79.43	-

Tabla S3.3. Porcentaje de homología de secuencia entre Duts. Valores obtenidos mediante el programa *Clustal Omega*.

<u>BH-MVI comprados</u>	<u>RMSD (Å)</u>
Dut80 α -Dut85	0.667
Dut80 α -Dut11	0.506
Dut80 α -Dut71bel	0.326
Dut11-Dut85	0.845
Dut11-Dut71bel	0.533
<u>Dut71bel-Dut85</u>	<u>0.694</u>

Tabla S3.4. Valores de RMSD obtenidos para la superimposición del dominio β -*hairpin* de diferentes Duts.

CAPITULO 4.
**dUTPasas, una nueva familia de moléculas
señalizadoras**

Contribución personal

Dado el papel señalizador que tienen las dUTPasas (Duts) de fagos en la transferencia de islas de patogenicidad revelado por nuestro trabajo previo y descrito en el Capítulo 1, nos preguntamos de forma particular si esta capacidad había sido adquirida por las Duts de *Staphylococcus aureus* o por el contrario si Duts de otros organismos presentaban también actividad reguladora. Más aún, quisimos generalizar esta pregunta e intentar conocer si las Duts representan una familia de proteínas con actividad *moonlighting*. Para responder a estas preguntas comenzamos por analizar los datos disponibles en la bibliografía y diferentes bases de datos con respecto a la actividad *moonlighting* de Duts, interacciones con proteínas diana, secuencias proteicas y de ADN, así como otros datos. El resultado de este análisis se recopila en este capítulo y se publicó en forma de revisión en el año 2013 en *Current Opinion in Microbiology*. Dicho análisis corrobora que las Duts presentan actividades *moonlighting* y principalmente apoya el novedoso papel de estas proteínas como moléculas señalizadoras en diferentes organismos, desde virus hasta eucariotas, propuesto por nuestros resultados previos.

Mi contribución en este capítulo consistió en analizar la bibliografía acerca del papel regulador de las Duts en diferentes organismos, el análisis estructural de los diferentes tipos de Duts depositados en el *Protein Data Bank* (PDB) orientado a obtener claves relacionadas con un posible papel regulador y la redacción del manuscrito, incluyendo la participación en el apartado gráfico del mismo.

Como se ha indicado, estos resultados han sido publicados como revisión en *Current Opinion in Microbiology* con la siguiente referencia:

Penadés, J.R., Donderis, J., García-Caballer, M., Tormo-Más, M.Á., and Marina, A. (2013). dUTPasas, the unexplored family of signalling molecules. *Current Opinion in Microbiology*. 16, 163–170

Resumen

Descifrar los mecanismos moleculares que controlan procesos celulares relevantes es de suma importancia para entender cómo los virus, las células procariotas y eucariotas funcionan. La diversidad de los seres vivos sugiere que hay nuevos reguladores aún por descubrir que pueden revelar nuevos paradigmas regulatorios. Las dUTPasas (Duts) se supone que son enzimas ubicuas que regulan los niveles de dUTP celulares para evitar la incorporación errónea de uracilo en el ADN. Recientemente, sin embargo, las Duts han sido involucradas en el control de varios procesos celulares importantes, incluida la transferencia de elementos genéticos móviles, la regulación del sistema inmune, la autoinmunidad o apoptosis; lo que sugiere que desempeñan funciones reguladoras. Este capítulo tiene como objetivo investigar el inexplorado impacto de las Duts como novedosas moléculas señalizadoras.

En la actualidad, se asume que los genomas de todos los organismos de vida libre y muchos virus codifican la enzima Dut, que cataliza la hidrólisis de la desoxiuridina trifosfato (dUTP) dando lugar a desoxiuridina monofosfato (dUMP) y pirofosfato inorgánico (PPi) (Vértessy and Tóth, 2009). Como la mayoría de las ADN polimerasas celulares no pueden distinguir entre dUTP y dTTP, la Dut es responsable de mantener la relación de dUTP/dTTP celular en un nivel bajo para restringir la disponibilidad de dUTP como precursor de ADN. Además, las Duts proporcionan el dUMP, precursor del dTTP (Vértessy and Tóth, 2009). Relacionado con las funciones antes mencionadas, una disminución de la actividad dUTPasa puede conducir a un mayor aumento en el contenido de uracilo en el ADN, lo cual conlleva la fragmentación cromosómica y la muerte celular como se ha descrito en diferentes organismos (Koehler and Ladner, 2004; Kouzminova and Kuzminov, 2004; Whittingham *et al.*, 2005).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la uracilación del ADN puede ser absolutamente necesario en algunos escenarios específicos. Así, la presencia de uracilo en el cromosoma de las células B favorece la generación de la diversidad de los anticuerpos (Maul and Gearhart, 2010). De la misma manera, Yan y colaboradores demostraron que el ADN del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) sintetizado tras la infección de las células inmunes primarias está muy uracilado y que este proceso protege el ADN del VIH de la vía suicida de autointegración, facilitando la integración cromosómica (Yan *et al.*, 2011). Finalmente, en un estudio reciente utilizando un modelo completamente diferente, Muha y colaboradores han demostrado que en algunas etapas específicas de su desarrollo, *Drosophila* tolera la acumulación de uracilo en el ADN, sugiriendo un nuevo papel del ADN que contiene uracilo en la metamorfosis de *Drosophila* (Muha *et al.*, 2012). Por lo tanto, los resultados anteriores confirman que la uracilación del ADN sirve claramente para funciones específicas en algunos procesos biológicos. Puesto que la enzima celular Dut está presente en estos escenarios y además muy extendida en la naturaleza, parece probable que estas enzimas realicen una gama de funciones críticas en la célula. Los resultados recientes muestran que las proteínas Duts desempeñan papeles adicionales distintos a la prevención de la incorporación de dUTP en el ADN. En este capítulo discutimos como las Duts controlan diferentes procesos celulares, que van desde los fagos hasta los seres humanos. La figura 4.1 resume brevemente las actividades y procesos identificados controlados por diferentes Duts.

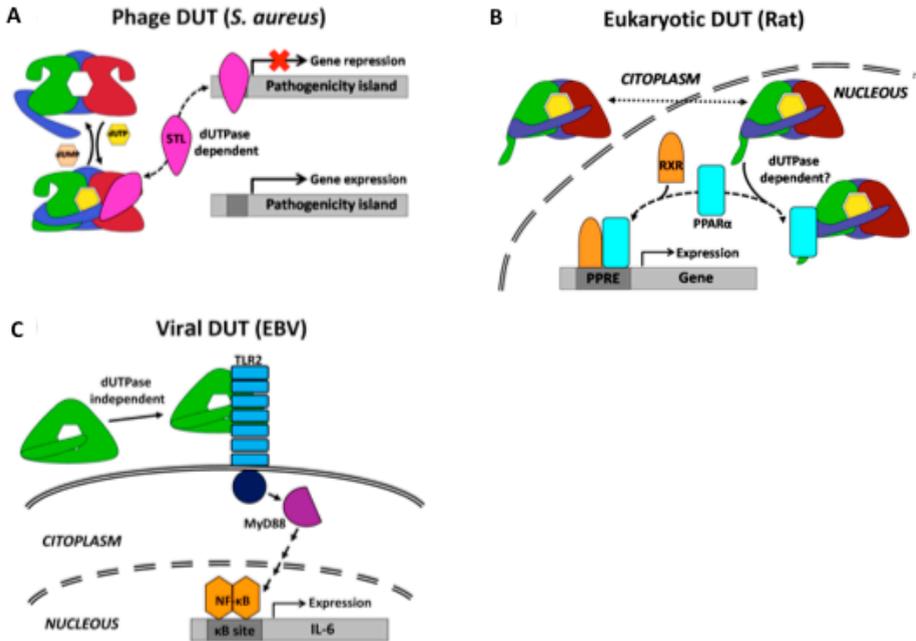


Figura 4.1. Estrategias reguladoras en la señalización mediada por Duts. (A) Las Duts triméricas codificadas por fagos estafilocócicos inducen la transferencia de islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs) mediante la interacción con el represor Stl codificado por la SaPI. Este mecanismo es dependiente de la actividad dUTPasa ya que sólo la forma activa unida a dUTP, pero no el estado inactivo apo, es capaz de inducir la de-represión de la SaPI, asemejándose al mecanismo de señalización dependiente de nucleótidos de las proteínas eucariotas G. (B) La señalización mediada por Dut en eucariotas se ejemplifica por la capacidad de la Dut de rata para interactuar con el receptor alfa activado por el peroxisoma (PPAR α). La Dut citoplasmática de rata se transfiere al núcleo donde interactúa con PPAR α evitando su heterodimerización con RXR, causando la represión de la activación transcripcional mediada por PPAR α . Esta función reguladora de la Dut depende de una región N-terminal adicional. (C) Las Duts monoméricas virales controlan el sistema inmunológico. El *Epstein-Barr* virus (EBV) codificada una Dut que induce la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6 a través de la activación de NF- κ B. La Dut del EBV interactúa con el receptor de tipo *Toll* 2 (TLR2) e induce el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88, provocando la respuesta del hospedador a través de la estimulación de NF- κ B. Se ha propuesto que esta actividad de señalización es independiente de la actividad enzimática dUTPasa, dado que EBV codificantes para una Dut deficiente en actividad enzimática mantienen la capacidad de promover la respuesta de las células.

Revisión

Estructura de las Duts

Teniendo en cuenta su estado de oligomerización, las Duts se han dividido en tres familias: monoméricas, homodiméricas y homotriméricas. La familia homotrimérica comprende el mayor número de Duts. Se encuentran en la mayoría de los eucariotas, procariotas, algunos virus de ADN, y en un número de retrovirus que infectan células de no primates. Varias estructuras, las cuales muestran que estas proteínas presentan un plegamiento mayoritario en hojas β , obtenidas por rayos-X de las Duts de esta familia están disponibles, siendo las Duts de *Escherichia coli* y humana los prototipos de la familia (Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1992; Mol *et al.*, 1996). En estas enzimas, el sitio activo está formado por cinco motivos conservados que se distribuyen sobre toda la secuencia, estando cada subunidad del trímero implicada en la formación de todos los sitios activos presentes en el trímero (Figuras 4.2 y 4.3) (Cedergren-Zeppezauer *et al.*, 1992). Mientras que los cuatro primeros motivos están bien ordenados en todas las estructuras resueltas, un motivo *P-loop* conservado (motivo V) correspondiente a la parte C-terminal de los monómeros se encuentra normalmente desordenado y sólo se observa en algunas estructuras en complejo con análogos de dUTP no hidrolizables (Freeman *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2007; Vértessy *et al.*, 1998). El motivo V C-terminal comparte un número limitado de características con los motivos *P-loop* presentes en muchas ATPasas y GTPasas, conocidas como *P-loop* NTPasas, incluyendo las quinasas, los motores del citoesqueleto y del ADN, bombas y transportadores de membrana (Pecsi *et al.*, 2011). Este dominio cierra el centro activo tras la unión del ligando y es necesario para una discriminación eficiente del sustrato y la hidrólisis del dUTP (Pecsi *et al.*, 2011). El mecanismo catalítico de las Duts triméricas se ha elucidado a partir de enfoques estructurales y enzimológicos (Vértessy and Tóth, 2009).

La segunda familia de Duts incluye las enzimas homodiméricas que están presentes en los tripanosomátidos *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*, en algunas especies bacterianas tales como *Campylobacter jejuni*, o en algunos bacteriófagos que infectan bacterias (Hemsworth *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2004). Las Duts diméricas son proteínas compuestas por hélices α que comparten un módulo básico que consta de dos hélices α que forman un dominio rígido, dos hélices α que forman un dominio móvil y los lazos de conexión (Figura 4.2). Como se espera de la completa falta de homología de secuencia, su estructura no está relacionada con los Duts triméricas (Figura 4.2). Sin embargo, el centro activo de las Duts diméricas también está formado por cinco motivos, aunque estos son bastante diferentes a los presentes en las enzimas triméricas (Hemsworth *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2004). Además, las propiedades bioquímicas y de especificidad por sustrato de las enzimas de esta familia se diferencian de otras Duts, incluyendo la capacidad de estas enzimas para hidrolizar tanto dUTP como dUDP (Hemsworth *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2004).

Las Duts monoméricas forman la tercera familia. Las Duts monoméricas clásicas están codificadas por herpesvirus de aves y mamíferos. A pesar de tener una homología limitada con las enzimas triméricas, los cinco motivos conservados que forman el centro activo presentes en las Duts triméricas también lo están en las Duts monoméricas, pero reordenados y distribuidos a largo de una única cadena polipeptídica de doble longitud en secuencia que las que forman cada una de las subunidades en las Duts triméricas y la cual se pliega emulando estructuralmente el centro activo de estas (Figura 4.2) (Tarbouriech *et al.*, 2005). De acuerdo con la conservación de los motivos, el centro activo de las Duts monoméricas es virtualmente idéntico al de las Duts triméricas (Figura 4.2), apoyando el que las Duts monoméricas hayan evolucionado a partir de un gen codificante para una Dut trimérica. Además de

las Duts monoméricas codificadas por herpesvirus, la búsqueda en base de datos ha revelado la existencia de una nueva familia de Duts monoméricas representadas por aquellas presentes en *Drosophila virilis* (XP_002051780) o en *Caenorhabditis elegans* (CAB03175). Estas enzimas monoméricas se generan por fusión de tres copias de un monómero similar al presente en Duts triméricas en un único polipéptido, prediciéndose su plegamiento como el de una Dut trimérica. Sin embargo, el funcionamiento de estas enzimas queda por determinar, ya que ningún miembro de esta familia se ha caracterizado enzimática o estructuralmente.

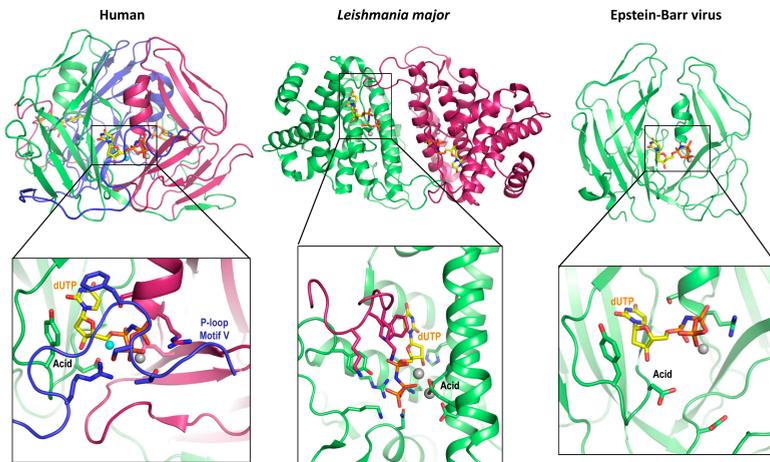


Figura 4.2. Tipos de Duts y sus centros activos. Las estructuras de los diferentes tipos de Duts se muestran en forma de dibujos con el dUTP en sticks. Las enzimas homotrimérica (protómeros en azul, verde y rojo intenso), homodimérica (verde y rojo oscuro) y monomérica (verde) están ejemplificadas por las estructuras de las Duts humana (PDB: 3EHW), *Leishmania major* (PDB: 2YAY) y Epstein-Barr virus (PDB: 2BT1), respectivamente. Una vista cercana de los respectivos centros activos se muestran con el nucleótido y los residuos conservados responsables de la catálisis y unión del sustrato en sticks. Los carbonos del sustrato son de color amarillo mientras que los de los residuos de las enzimas están en el color de la subunidad correspondiente. Los átomos diferentes de carbono son de color rojo, azul y naranja para el oxígeno, el nitrógeno y el fosfato, respectivamente. Los residuos ácidos catalíticos están etiquetados. Los iones de Mg se muestran como esferas grises. El agua catalítica en la Dut trimérica se muestra como una esfera cian. En este centro activo el nucleótido se encuentra cubierto por el *P-loop* del motivo V. Nótese que el lazo del motivo V no es visible en la Dut monomérica, incluso aún estando el nucleótido trifosfato presente en el centro activo.

CAPÍTULO 4: REVISIÓN

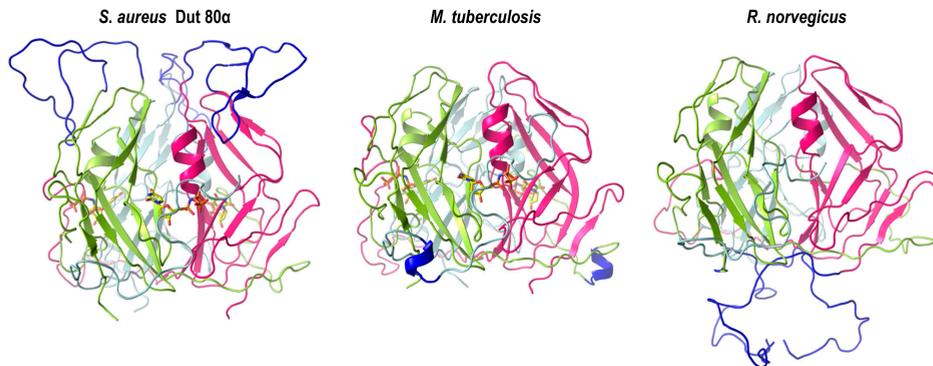
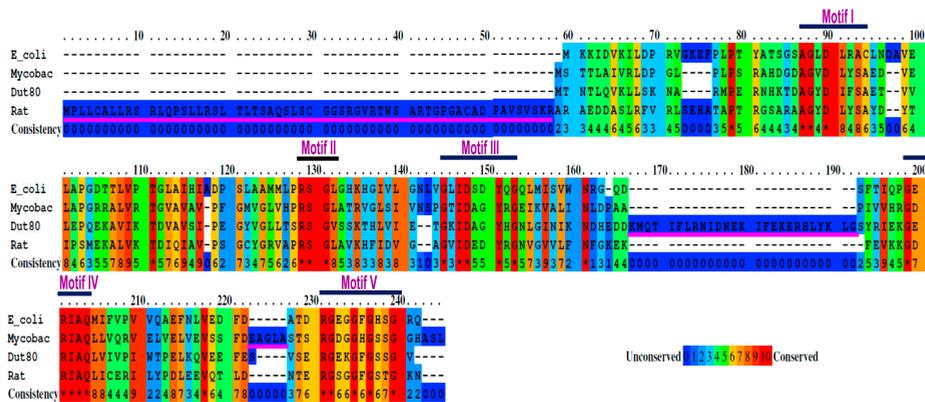


Figura 4.3. El motivo VI extra es una característica común en las Duts triméricas. **Panel superior:** El alineamiento de secuencia de diferentes Duts implicadas en procesos de señalización muestra una inserción (motivo VI) variable que está ausente en *E. coli*, prototipo de Dut triméricas. Las secuencias de las Duts triméricas de *E. coli* (*E. coli*), *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobac*), el fago $\phi 80\alpha$ de *Staphylococcus aureus* (Dut80) y *R. norvegicus* (rata) se alinearon con el software PRALINE y los residuos fueron coloreados de acuerdo con su conservación relativa (código de color en la esquina inferior derecha del panel). Los motivos conservados I-V se indican. La motivos VI adicionales están subrayados en color magenta en cada secuencia. **Paneles inferiores:** Los modelos estructurales de los trímeros (subunidades en lima, rosas fuertes y cian) de las Duts alineados con motivo VI adicional se muestran en forma de dibujos. Los motivos VI se destacan en azul intenso. Cuando está presente, el nucleótido se muestra en sticks. Los modelos del fago $\phi 80\alpha$ de *S. aureus* y de *M. tuberculosis* fueron realizados a partir de datos experimentales (PDBs: 3ZEZ y 2PY4, respectivamente). El modelo de la Dut de rata se generó usando el servidor MetaTASSER.

Como se ha mencionado, se ha asumido tradicionalmente que el único papel de las Duts intracelulares era controlar los niveles de dUTP. Sin embargo, la existencia de diferentes formas de la enzima, incluso en el mismo organismo, sugiere que están bajo presión selectiva, y que hay diversas fuerzas, distintas a la hidrólisis del dUTP, que dirigen su evolución. Esto se hace aún más evidente en la mayoría de Duts que presentan dominios adicionales involucrados en funciones distintas de la catálisis (Figura 4.3) y que pensamos que median las vías de señalización controladas por Duts. La Tabla 4.1 resume los principales resultados que apoyan esta hipótesis.

Organismo	Estructura Dut	Ruta de señalización	Región de interacción
Epstein-Barr virus	Monomérica	NF-κB	ND
MHV-68	Monomérica	Interferón Tipo I	ND
Virus del sarcoma de Kaposi	Monomérica	Bloqueo de células NK	ND
Rata	Trimérica	PPARα	Dominio VI extra N-terminal
Fagos estafilocócicos	Trimérica	Inducción y transferencia de SaPIs	P-loop del motivo V y dominio extra motivo VI

Tabla 4.1. Duts involucrada en señalización.

Las Duts virales controlan el sistema inmune

Es sorprendente que la mayoría de los virus codifiquen Duts, ya que esta enzima está presente en sus células hospedadoras eucariotas o procariontas. Dado que la expresión de la Dut codificada por la células está vinculada con el ciclo celular, se ha propuesto que la función de las Duts virales pueda estar asociada con la capacidad de estos virus para replicarse en células que no se dividan. Sin embargo, hay muchas excepciones a la regla. Por ejemplo, a pesar de que la mayoría de los lentivirus de rumiantes más pequeños codifican para una Dut, algunos genotipos naturales carecen de esta enzima, pero todavía son capaces de replicarse eficientemente en macrófagos derivados de monocitos (Juganaru *et al.*, 2011).

Estudios recientes han demostrado que algunas Duts codificadas por virus modulan el sistema inmune del hospedador infectado para evitar una respuesta

inmune eficiente. El *Epstein-Barr* virus (EBV) puede infectar monocitos y macrófagos mediante el control de la expresión de diversas citoquinas. Esto se produce por dos vías completamente diferentes, una de las cuales implica la Dut viral. La Dut codificada por EBV induce la regulación de IL-10 y las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, y IL-8 en células de macrófagos humanas a través de la activación de la vía NF-kB. La activación de NF-kB observada en respuesta a un tratamiento con la Dut codificada del EBV está mediada por la interacción de Dut con el receptor *Toll-like receptor 2* (TLR2), que recluta la molécula adaptadora MyD88 y desencadena la vía de señalización (Figura 4.3) (Ariza *et al.*, 2009)

En un estudio más reciente utilizando un modelo diferente, Leang y colaboradores también revelaron que la Dut viral MHV-68 no se requiere para la replicación del virus, pero establece de manera eficiente la latencia mediante el bloqueo de la vía de señalización para la expresión del interferón de tipo I (Leang *et al.*, 2011). Asimismo, se ha documentado que la Dut del sarcoma de Kaposi disminuye la respuesta inmune por su unión a varios receptores de citoquinas, un proceso que no depende de la actividad enzimática de la proteína (Madrid and Ganem, 2012). Los linfocitos *Natural Killer* (NK) marcan células infectadas por virus para su destrucción. Para ello, las células NK activadas reconocen ligandos en las células infectadas. En un estudio reciente, Madrid y colaboradores demostraron que la expresión de Dut asociada al herpesvirus del sarcoma de Kaposi (VHSK) regula a la baja NKp44L, uno de los ligandos reconocidos por las células NK (Figura 4.3) (Madrid and Ganem, 2012), evitando la destrucción de las células infectadas. Curiosamente, las proteínas relacionadas de otros herpesvirus humanos no controlan el ataque de las NK, pero realizan otras funciones específicas, como se mencionó anteriormente. Estos resultados sugieren que las Duts virales han adquirido nuevas funciones inmunorreguladoras de las que dependen al infectar células. De hecho, las Duts

codificadas por MHV-68 y VHSK enzimáticamente inactivas son capaces de realizar sus funciones de regulación, lo que sugiere fuertemente que el papel de estas proteínas es regulador y no enzimático. Un análisis más detallado, incluyendo mutagénesis y análisis estructural acerca de estas diferentes interacciones, será clave para descifrar el mecanismo que implica las Duts en el control del sistema inmune.

Las Duts de fagos controlan la transferencia de factores de virulencia codificados por islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) son elementos genéticos móviles ampliamente distribuidos que portan y dispersan genes de virulencia (Novick *et al.*, 2010). En ausencia de un fago ayudante inductor, las SaPIs residen pasivamente en el cromosoma del hospedador bajo el control de StI, un represor global codificado por la SaPI (Ubeda *et al.*, 2008). Tras la infección de un fago ayudante, las SaPIs se escinden del cromosoma, se replican ampliamente, y son empaquetadas en partículas similares a fagos compuestas por las proteínas del virión del fago (Tormo *et al.*, 2008), dando lugar a partículas con una gran frecuencia de transferencia tanto inter- como intra-genéricas (Novick *et al.*, 2010). En función de la isla, el ciclo de la SaPI es inducido por una proteína específica codificada por el fago, la cual se une al represor StI codificado por la SaPI actuando como anti-represor (Tormo-Más *et al.*, 2010). Las Duts codificadas por fagos sirven como proteínas inductoras para un conjunto de SaPIs (Figura 4.1).

Sorprendentemente para una enzima metabólica, una comparación de las secuencias de Duts triméricas de varios fagos estafilocócicas reveló una alta similitud de secuencia, a excepción de una región central, que definimos como motivo VI (Figura 4.3), muy divergente entre las enzimas de fagos de *S. aureus*. Este motivo no se requiere para la actividad enzimática, ya que está ausente en algunas Duts relacionadas en función de fagos que infectan a otras bacterias.

Sin embargo, el motivo VI es necesario para la interacción con el represor StI (Tormo-Más *et al.*, 2010). Dado que la inducción del ciclo de la SaPI es completamente perjudicial para el fago, ya que afecta a su ciclo biológico (Ram *et al.*, 2012), la conservación del motivo VI a través de todas las Duts triméricas codificadas por fagos de *S. aureus*, así como la alta diversidad observada a través de este motivo, sugieren que esta región está implicada en funciones reguladoras requeridas para el ciclo del fago, tema que está siendo estudiado.

Señalización mediante Duts en células procariotas

En *Escherichia coli*, aquellas bacterias a las que el gen *dut* ha sido suprimido son letales (el-Hajj *et al.*, 1988). Hay que tener en cuenta que aunque se ha supuesto que la letalidad en estos mutantes de Dut en *E. coli* se encuentra asociada con su actividad enzimática (el-Hajj *et al.*, 1988), si esta proteína controla un proceso celular relevante, su eliminación también provocará la letalidad de las bacterias. Esto ocurre en *Mycobacterium smegmatis*.

M. smegmatis codifica para una proteína Dut que lleva un dominio extra de cinco residuos (motivo VI) próximos a la zona flexible C-terminal o motivo V (Figura 4.3), que es esencial para la viabilidad de las bacterias, pero no para la actividad de la Dut. Como en *E. coli*, el gen *dut* es esencial en *M. smegmatis* (Pecsi *et al.*, 2012). Curiosamente, la complementación de la cepa mutante *dut* con una Dut de *M. smegmatis* completamente activa enzimáticamente que carece del motivo VI específico de género fue incapaz de complementar el fenotipo (Pecsi *et al.*, 2012), lo que sugiere que la función de la proteína es reguladora y que controla procesos relevantes en esta bacteria. Curiosamente, este motivo extra no es exclusivo de *M. smegmatis*, estando presente en patógenos relevantes como *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae* (Chan *et al.*, 2004; Monot *et al.*, 2009), lo que sugiere que estas Duts también están involucrados en señalización. Sin embargo,

las vías celulares controladas por esta enzima en estas especies son todavía desconocidas.

Señalización mediante Duts en células eucariotas

Las células de *Drosophila melanogaster* contienen dos isoformas de Dut generadas por *splicing* alternativo, pero ambas se expresan bajo el control del mismo promotor dependiente del ciclo celular. Por lo tanto ambas están presentes sólo en células que se dividen activamente. Una de estas isoformas contiene una señal de localización nuclear, mientras que la otra no y por lo general se encuentra en el citoplasma (Muha *et al.*, 2009). El papel de la isoforma citoplasmática necesita más investigación para entender por qué la función de la Dut se encuentra en un compartimento celular independiente del lugar de síntesis y reparación del ADN. Evidentemente, una posibilidad es que esta proteína esté implicada en procesos de señalización, y tres evidencias apoyan esta posibilidad: (i) como se describe para Duts codificadas por fagos y bacterias, la Dut de *D. melanogaster* también tiene otro segmento polipeptídico específico de la especie de 28 residuos en la cola C-terminal de la enzima (Békési *et al.*, 2004); (ii) como se ha mencionado antes, el silenciamiento de la Dut no da lugar a una letalidad general, pero induce una fuerte letalidad en una etapa de desarrollo distinto (desarrollo temprano de la pupa), que implica a la enzima en el proceso de desarrollo (Muha *et al.*, 2012); y (iii) en *D. virilis*, los tres polipéptidos monoméricos están fusionados en una estructura monomérica la cual se predice que se puede plegar como la Dut trimérica clásica de *D. melanogaster*. Aunque las fuerzas evolutivas que inducen y apoyan este cambio deberán abordarse en el futuro, ahora es tentador especular que las diferentes formas observadas en estas dos especies estrechamente relacionadas resultan del desarrollo de funciones adicionales y diferenciadas.

En humanos, dos isoenzimas de Dut, una nuclear y la otra mitocondrial, se generan mediante el uso de promotores alternativos. La isoforma nuclear se encuentra bajo el control del ciclo celular, mientras que la isoforma mitocondrial es constitutiva, lo que plantea la interesante cuestión de por qué se necesita esta diferencia en el control (Ladner and Caradonna, 1997). Además, los estudios de interactómica han revelado dianas muy prometedoras para la Dut, aunque aún deben ser confirmadas. Por ejemplo, la implicación de la Dut humana en procesos como la autoinmunidad, apoptosis, autofagia o controlar la vía de señalización mediada por el factor de crecimiento epidérmico han sido sugeridos (Ariza and Williams, 2011; Behrends *et al.*, 2010; Blagoev *et al.*, 2003; Ewing *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009).

Finalmente, se ha involucrado la Dut de la rata en la señalización mediante la inhibición del receptor nuclear activado por el proliferador de peroxisoma, PPAR α (Figura 4.1) (Chu *et al.*, 1996). Como se ha publicado anteriormente para otras Duts, la función reguladora depende de la región adicional N-terminal de la proteína (Figura 4.3) (Chu *et al.*, 1996). En resumen, todos estos resultados apoyan la idea de que las Duts eucariotas también pueden actuar como moléculas de señalización.

Un mecanismo similar al de las proteínas G protooncogénicas controlan la señalización mediada por las Duts

Si las Duts son moléculas de señalización que interactúan con dianas celulares, deben tener un mecanismo de encendido/apagado que controle su papel como mensajeros celulares. Hemos tratado de descifrar esta cuestión a través del mecanismo por el cual las Duts codificadas por fagos estafilocócicos inducen el ciclo de SaPIs. Como se mencionó anteriormente, las Duts de fagos de estafilococos poseen una región extra (Motivo VI) que participan en la inducción de la SaPI mediante su unión al represor StI codificado por la SaPI. Aunque este dominio es necesario, no es suficiente para inducir el ciclo de la

SaPI. Inesperadamente, el motivo V, fuertemente conservado en las Duts triméricas, también está involucrado en la mediación de la inducción. La unión al dUTP ordena el motivo V C-terminal, similar a los *P-loop*, de la Dut codificada por el fago, haciendo que estas proteínas adopten la conformación requerida para la inducción de la SaPI. Por el contrario, la conversión a la conformación del estado apo, debido a la hidrólisis del dUTP unido, desordena el motivo V generando una Dut que es incapaz de inducir el ciclo de la SaPI (Figura 4.1) (Tormo-Más *et al.*, 2013). Como era de esperar de un mecanismo general que implica estas proteínas en la señalización celular, ninguno de los tres requisitos que implican las Duts en la transferencia de SaPIs (la ordenación del motivo V mediada por el dUTP, la presencia de motivos adicionales y la interacción específica proteína-proteína) es exclusiva de las proteínas estafilocócicas codificadas por del fago, lo que sugiere que las Duts definen una familia extendida de moléculas de señalización relevantes que actúan de una manera análoga a las proteínas G de eucariotas (Tormo-Más *et al.*, 2013).

Conclusiones

Las Duts han sido tratadas clásicamente como enzimas metabólicas implicadas en el metabolismo de nucleótidos. Además de esta función "clásica" y bien caracterizada, existen evidencias de que estas enzimas no sólo participan sino que también controlan diversos procesos celulares en diferentes organismos que van desde fagos a los seres humanos. Estas actividades *moonlighting* inesperadas son, en la caracterizada interacción Dut:Stl dependiente de la unión a dUTP, las que sugieren un papel emergente para el dUTP como segundo mensajero, como se había anticipado previamente por Williams y colaboradores que propusieron el dUTP como un segundo mensajero proapoptótico (Williams *et al.*, 2011).

Es obvio que se requieren nuevos experimentos para obtener ideas sobre esta familia inexplorada de reguladores celulares. A pesar de los conocimientos recientes en la comprensión de las vías de regulación que rigen las Duts, el trabajo futuro basado en el análisis del transcriptoma, proteoma y metaboloma es necesario para identificar dianas de las Duts y descifrar estas redes de regulación, así como la genética y los estímulos ambientales que controlan estas vías.

CAPITULO

5.

Las dUTPasas diméricas de fagos de *S. aureus* tienen capacidad de movilizar islas de patogenicidad

Contribución personal

Las dUTPasas (Duts) son moléculas a las que se les ha atribuido el apelativo de *moonlighting*, al presentar actividades que van más allá de su función enzimática de hidrolizar el dUTP a dUMP y PPi.. Estas funciones *moonlighting*, tal como se ha visto en el capítulo 4, no son únicamente propias de las Duts triméricas, las más abundantes, sino que también se han descrito para Duts monoméricas codificadas por varios organismos.

El mecanismo a través del cual las Duts triméricas llevan a cabo su papel regulador ha sido ampliamente estudiado en los capítulos 1 y 2. Para ello, hemos utilizado como modelo la inducción de islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) mediada por Duts triméricas codificadas por fagos. El análisis de secuencia de fagos de *S. aureus* muestra que codifican para Duts pero, sorprendentemente, muchos de ellos lo hacen para Duts diméricas y no triméricas.

Dado que las Duts triméricas y diméricas presentan plegamientos muy diferentes, es posible pensar que estos fagos han cambiado de Duts para evitar la inducción de las SaPIs manteniendo la misma actividad enzimática. Sin embargo, y sorprendentemente, datos obtenidos por el grupo del Dr. Penadés y descritos en este capítulo indican lo contrario, ya que algunas de estas Duts diméricas inducen la movilización de las mismas islas que sus análogos triméricos. Como hemos mostrado en los capítulos anteriores, esta actividad es dependiente de motivos específicos de Duts triméricas (motivos IV y V) y de motivos específicos de las Duts triméricas de *S. aureus* (motivo VI), por ello nos preguntamos si estas Duts diméricas siguen un mecanismo análogo al de las triméricas y si por lo tanto también presentan actividad señalizadora.

En este capítulo, y utilizando la Dut dimérica codificada por el fago ϕ DI de *S. aureus* como proteína modelo de este grupo de Duts, analizamos a nivel estructural las Duts diméricas de fagos de *S. aureus* para obtener información sobre las bases moleculares de la capacidad señalizadora de estas proteínas.

Mi contribución personal en el presente capítulo ha sido la comparación a nivel de secuencia y estructura de la Dut dimérica codificada por el fago ϕ DI con los prototipos de la familia *Campylobacter jejuni*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*, y así como con las Duts triméricas de fagos de *S. aureus*. Para ello, produje de forma heteróloga en *E. coli* la Dut dimérica del fago ϕ DI de *S. aureus* y la purifiqué a homogeneidad por técnicas cromatográficas. La proteína pura fue cristalizada en su forma apo y en presencia del dUMpNpp, un análogo no hidrolizable del dUTP. Para resolver la estructura tridimensional del enzima en presencia de dUMpNpp, utilicé técnicas de difracción anómala sobre cristales de proteína donde las metioninas habían sido substituidas por seleno-metioninas (protocolo hasta ahora no utilizado en el presente trabajo), en concreto la técnica utilizada se conoce como SAD, siglas en inglés de *Single-wavelength Anomalous Dispersion*. Además, para la obtención de monocristales difractables se utilizó la técnica *microseeding* para favorecer su crecimiento (técnica no utilizada hasta ahora en el presente trabajo). La estructura de la forma *apo* de la enzima fue resuelta por técnicas de reemplazo molecular utilizando como proteína modelo la estructura anterior. El análisis de estas estructuras, en el contexto de las estructuras de Duts diméricas disponibles en el PDB y de nuestra experiencia con Duts triméricas de fagos de *S. aureus*, sirvió para proponer un posible mecanismo de señalización para estas Duts que en la actualidad se está analizado en el laboratorio.

Resumen

Las dUTPasas (Duts) son enzimas codificadas por todos los organismos vivos, incluyendo algunos virus, que se encargan de evitar la incorporación del uracilo en el ADN. Recientemente, tanto las Duts monoméricas como triméricas han sido descritas como moléculas señalizadoras involucradas en el control de diferentes procesos celulares en distintos organismos y que actúan de una manera similar a como lo hacen las proteínas G protooncogénicas de eucariotas.

Utilizando como modelo las Duts triméricas de fagos de *S. aureus* y su capacidad de movilizar islas de patogenicidad de este organismo (SaPIs) vía la interacción con la proteína Stl, el represor para varias de dichas SaPIs, se han descrito los elementos estructurales implicados en la capacidad reguladora de dichas Duts. En primer lugar, un cambio conformacional restringido al *P-loop* C-terminal conservado en todas las Duts triméricas y que cubre el centro activo; y en segundo lugar, la presencia de elementos característicos de las Duts de fagos de *S. aureus* y que da la especificidad por Stl. Además, este mecanismo implica el dUTP como segundo mensajero controlando los estados encendido/apagado (*on/off*) de la molécula.

En este capítulo mostramos que, además de las Duts triméricas y monoméricas, las Duts diméricas también presentan actividades *moonlighting* que regulan procesos celulares. Al igual que ocurre con las Duts triméricas codificadas por fagos de *S. aureus*, Las Duts diméricas codificadas por fagos de este organismo, sorprendentemente regulan el mismo proceso, siendo un claro ejemplo de convergencia evolutiva. Utilizando como modelo la Dut codificada por el fago ϕ DI, en este capítulo se describe la estructura por primera vez de una Dut dimérica codificada por fago. No obstante, el mecanismo mediante el cuál ejercen su función *moonlighting* aún queda por elucidar y más experimentos deben llevarse a cabo para poder conocer dicho mecanismo.

No obstante, los datos presentados en este capítulo sustentan que las Duts diméricas presentan capacidad señalizadora, abriendo la puerta a que esta capacidad este presente en las Duts diméricas de otros organismos.

Introducción

Las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) son fragmentos de ADN que portan y difunden genes de virulencia (Novick *et al.*, 2010). Estas islas residen de forma pasiva en el cromosoma del hospedador bajo el control de Stl, un represor global codificado por la propia SaPI, que controla la expresión de la mayoría de los genes de la isla (Ubeda *et al.*, 2008). Tras la infección de un fago o la inducción de uno latente en el genoma de la bacteria, proteínas no esenciales expresadas por el fago se unen a Stl, separando a Stl del ADN e iniciando el ciclo de escisión, replicación y encapsidación de la isla en partículas compuestas por las proteínas del virión del fago con altas frecuencias de transferencias inter- e intra-genéricas (Novick *et al.*, 2010; Tormo-Más *et al.*, 2010). Las diferentes SaPIs codifican diferentes proteínas Stl, de manera que cada SaPI requiere una proteína específica del fago para su inducción (Tormo-Más *et al.*, 2010; 2013).

Las dUTPasas (Duts) triméricas son uno de los inductores de SaPIs que más curiosidad despiertan, ya que no se entiende la presencia del gen *dut* en fagos, un gen presente en el organismo hospedador. Las Duts triméricas codificadas por algunos fagos sirven como proteínas de-represoras para un subconjunto de SaPIs, incluyendo SaPIbov1, SaPIbov5 o SaPIov1 (Tormo-Mas *et al.*, 2010; 2013). Tradicionalmente, se ha asumido que las Duts son enzimas esenciales para la integridad y viabilidad en muchos organismos al reducir la reserva celular del dUTP, evitando su incorporación al cromosoma (Vértessy and Tóth, 2009). No obstante, algunos trabajos han cuestionado esta suposición, pues en algunos casos la uracilación del ADN puede ser beneficiosa (Penadés *et al.*, 2013).

La comparación de las secuencias de Duts triméricas de diferentes fagos de estafilococos, sorprendentemente para una enzima metabólica, revelan una alta similitud de secuencia, con la excepción de una región central no conservada

que hemos identificado como motivo VI. Este motivo, que es altamente divergente entre las Duts de fagos de *S. aureus*, no se requiere para la actividad de la enzima (Leveles *et al.*, 2013; Maiques *et al.*, 2016) y se encuentra ausente en algunas Duts relacionadas funcionalmente de otras especies. No obstante, el motivo VI es esencial para la interacción con el represor StI codificado por la SaPI (Maiques *et al.*, 2016; Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010). A pesar de ser necesario, el motivo VI no es suficiente para inducir el ciclo de la SaPI (Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010). Los motivos altamente conservados IV y V, situado en el extremo C-terminal, y presentes en todas las Duts triméricas caracterizadas, también juegan un papel clave en la inducción de la isla (Maiques *et al.*, 2016). De esta manera, se ha propuesto un mecanismo para el control de la inducción de SaPIs mediada por Duts similar al que tienen las proteínas G protooncogénicas, donde el dUTP actuaría como segundo mensajero inhibiendo la inducción (Maiques *et al.*, 2016; Szabó *et al.*, 2014; Tormo-Más *et al.*, 2013).

Durante un estudio paralelo hemos observado que algunos fagos de *S. aureus* codifican para Duts diméricas en lugar de triméricas (Frigols *et al.*, 2015). Estudios previos utilizando otros organismos modelos han demostrado que las Duts diméricas y triméricas no se encuentran relacionadas ni a nivel de secuencia ni a nivel estructural (Penadés *et al.*, 2013). Recientemente, se ha descrito la capacidad inductora de la Dut dimérica del fago ϕ NM1 (Dut ϕ NM1) sobre la isla SaPI_{bov1} (Hill and Dokland, 2016). Sorprendentemente para dos proteínas estructuralmente tan diferentes, el mecanismo utilizado por las Duts diméricas para inducir las SaPIs parece ser muy similar al de Duts triméricas, dado que Dut ϕ NM1 interacciona con el represor de la isla StI (Hill and Dokland, 2016). No obstante, las Duts diméricas y triméricas de algunos fagos de *S. aureus* guardan ciertas similitudes ya que al igual que las Duts triméricas,

las Duts diméricas con capacidad inductora alternan una zona altamente conservada con una región central muy divergente (Frigols *et al.*, 2015).

En este capítulo, abordamos la caracterización estructural mediante cristalografía de rayos-X de la Dut del fago ϕ DI (Dut ϕ DI), capaz de inducir la isla SaPIbov1. Además, la resolución la estructura de Dut ϕ DI ha permitido la comparación estructural con Duts previamente caracterizadas que permiten pensar en que al igual que en Duts triméricas, las Duts diméricas de diferentes organismos puedan ejercer funciones *moonlighting*.

Material y métodos

Manipulación y trabajo con *S. aureus*.

Los cultivos de *S. aureus*, preparación de fagos de este microorganismo, así como su transducción y transformación fueron realizados por el grupo del Dr. Penadés (Institute of Infection, Immunity and Inflammation; University of Glasgow) como se encuentran previamente descritos (Ubeda *et al.*, 2008; 2007).

Métodos de ADN

Las manipulaciones generales de ADN se realizaron utilizando los procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se encuentran descritos en la Tabla S5.1. El marcaje de las sondas y la hibridación del ADN fueron llevados a cabo de acuerdo al protocolo facilitado con el *PCR-DIG DNA-labelling and Chemiluminiscent Detection Kit* (Roche).

Constructos en plásmidos.

La construcción del plásmido para expresar las diferentes Duts en *S. aureus* o en *E. coli* fueron realizadas por el grupo del Dr. Penadés utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla S5.1. Los clones seleccionados fueron comprobados mediante secuenciación de ADN.

Para la expresión de Duts en *S. aureus*, los genes se clonaron en el vector de expresión pCN51, como se ha descrito previamente (Tormo-Más *et al.*, 2010). En este vector la expresión de las proteínas está controlada por el promotor *Pcad* que es regulado por cadmio.

Para la sobre-expresión en *E. coli*, la Dut ϕ DI fue clonada en el vector pET28a generando el plásmido pET28a-Dut ϕ DI. En este vector, las proteínas

expresadas se encuentran fusionadas a una cola de seis histidinas en su extremo N-terminal.

El listado completo de plásmidos utilizados en este estudio se encuentran en la Tabla S5.2.

Expresión heteróloga de proteínas.

Las proteínas Duts 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).

El plásmido pET28a-Dut ϕ DI (Tabla S5.2) para la expresión de Dut ϕ DI, fue transformado en cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). Para obtener una proteína donde los residuos de metionina fueran substitutos por seleno-metionina que pudiera ser utilizada en técnicas de difracción anómala, la expresión de la proteína se realizó en 2 L de medio *Seleno Met Medium Base plus nutrient mix* (Mollecular Dimensions) suplementado con 60 mg/ml de L-Seleno-metionina y kanamicina a una concentración final de 33 μ g/mL siguiendo el protocolo previamente descrito (Doublíé, 2007). Este medio inhibe la ruta de síntesis de metioninas de la célula mediante la adición de una mezcla de amino ácidos, obligando a la célula a utilizar la Seleno-Metionina presente en el medio para la síntesis de proteínas. Las células se crecieron a 37 °C con agitación a 250 r.p.m. hasta que los cultivos alcanzaran su fase exponencial de crecimiento (densidad óptica de 0.6 medida a $\lambda = 600$ nm). La expresión de las proteínas fue inducida mediante la adición de 1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 20 °C *overnigh*., tras la cual, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 5000 g durante 20 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, los *pellets* fueron procesados o almacenados a -80 °C para su uso posterior.

Purificación de la Dut ϕ DI.

El *pellet* del cultivo de *E. coli* sobre-expresando Dut ϕ DI fue resuspendido en tampón A (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 500 mM NaCl y 1 mM β -mercapto-etanol), suplementado con 1 mM de fluoruro de fenilmetilosulfonilo (PMSF). Todos los pasos siguientes de purificación se llevaron a cabo a 4 °C, de no ser que se mencione lo contrario. La lisis de las células se realizó mediante sonicación. El lisado fue centrifugado durante 30 min a 25000 g. El sobrenadante se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna *HisTrap FF* (GE Healthcare) pre-equilibrada con tampón A. Tras cargar la muestra, la columna fue lavada con 10 volúmenes de tampón A suplementadas con 25 mM de imidazol y la proteína fue eluida con tampón A suplementado con 350 mM de imidazol. La pureza de las fracciones fue determinada electroforéticamente por SDS/PAGE y tinción de *Coomasie*. Las fracciones más puras se unieron y fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna *HiLoad 16/60 Superdex 200 pg* (GE Healthcare), previamente equilibrada con tampón B (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl). La pureza de las fracciones recogidas fue determinada de nuevo por SDS/PAGE y tinción de *Coomasie*. Las fracciones más puras se unieron y concentraron por filtración centrifuga utilizando *Amicon Ultra-15 30kDa* (Millipore), congeladas rápidamente con nitrógeno líquido y conservadas a -80°C. La concentración final, cercana a 40 mg/ml, fue determinada por absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 24410 M⁻¹·cm⁻¹ utilizando un equipo *Nanodrop 1000 spectrophotometer* (Labtech).

Cristalización, recogida de datos de difracción de rayos-X y determinación de la estructura tridimensional.

Los cristales de las proteínas Dut ϕ DI apo y Dut ϕ DI con dUMpNpp fueron obtenidos mediante técnica de difusión de vapor en gota sentada a 21 °C

CAPÍTULO 5: MATERIAL Y MÉTODOS

utilizando una concentración de proteína de 10 mg/mL. Los cristales de ϕ DutDI en presencia de dUMpNpp se obtuvieron suplementando la proteína previamente a los ensayos de cristalización con 1 mM de dUMpNpp (Jena Bioscience) y 5 mM de $MgCl_2$. Las condiciones iniciales que rindieron cristales fueron optimizadas hasta rendir condiciones cuyos cristales difractaban los rayos-X a resoluciones mejores de 3 Å. Las condiciones finales para cada una de las proteínas fueron las siguientes: 28% PEG 6000, 0.5 M $LiCl_2$ y 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 para la forma *apo* de Dut ϕ DI ; y 8% PEG 3350, 0.1 M Na-HEPES pH 7.5; 0.2 M NaCl, 1.2 M sulfato amónico y 0.03 M acetato amónico para Dut ϕ DI suplementada con dUMpNpp.

Los cristales de Dut ϕ DI suplementados con dUMpNpp de mayor tamaño se obtuvieron mediante la técnica de *microseeding* (Luft and DeTitta, 1999). Esta técnica consiste en fragmentar cristales de baja calidad en una solución *seeding* que sirvan como centros de nucleación a partir de los cuales se obtienen nuevos cristales. Al añadir esta solución a nuevos ensayos de cristalización en las mismas condiciones podemos reproducir los cristales, aumentando su número y/o calidad, u obtener cristales en condiciones diferentes de las iniciales que no permitían la nucleación. El *microseeding* se llevo a cabo mezclando 0.4 μ L de proteína, 0,3 μ L de la condición de cristalización previamente obtenida para Dut ϕ DI suplementada con dUMpNpp y 0,1 μ L de la solución de *seeding* (dilución 1/100 de los cristales inicialmente obtenidos fragmentados y diluidos en solución de cristalización obtenida para Dut ϕ DI suplementada con dUMpNpp). Los cristales fueron crio-protectidos en N_2 líquido utilizando las soluciones de cristalización, incrementando el PEG 6000 hasta un 35% en el caso de Dut ϕ DI *apo*, e incrementando el PEG 3350 hasta 16% y suplementando con un 20% de sacarosa en el caso de Dut ϕ DI suplementada con dUMpNpp; como condiciones crio-protectoras. La difracción con rayos-X fue llevada a cabo a 100 K haciendo uso de los sincrotrones DLS y ALBA.

El procesado de los datos recogidos se realizó utilizando XDS (Kabsch, 2010). Las estadísticas del procesado se muestran en la Tabla 5.1.

Las estructuras fueron resueltas a 2.1 Å y 1.85 Å para los casos de DutφDI con y sin dUMpNpp, respectivamente. La resolución de la estructura de DutφDI en presencia de dUMpNpp se realizó mediante la técnica SAD. Para poder resolver la estructura de una macromolécula debemos partir de un mapa de densidad electrónica. Este mapa se construye a partir de las difracciones que se recogen en los detectores al hacer incidir un haz de rayos-X monocromático sobre un cristal de proteína. Las difracciones recogidas son fotones de los que, como ondas, tanto la amplitud como la frecuencia se pueden conocer. No ocurre lo mismo con las fases de dichas ondas, la cual se desconoce y es necesaria también para calcular un mapa de densidad electrónica. A esto se le conoce como el problema de las fases en cristalografía. La técnica SAD permite utilizar átomos pesados para resolver este problema. Esta técnica consiste en utilizar la capacidad que tienen los átomos pesados de dispersar de manera anómala los rayos-X cuando se hace incidir sobre ellos una longitud de onda (λ) cercana a su límite de absorción. El valor de este λ para el carbono, el oxígeno y el nitrógeno no se sitúa dentro de las λ de los rayos-X, y por lo tanto no muestran dispersión anómala en experimentos de difracción. La dispersión anómala debida a átomos pesados presentes en la muestra, crea diferencias tanto en la intensidad de reflexiones simétricas, las cuales deberían ser iguales, como en las fases de las ondas que llegan al detector donde se recoge la dispersión. Estas diferencias se utilizan para posicionar en el espacio dichos átomos pesados en el espacio y poder solventar así el problema de las fases (Rhodes, 2012). En el caso de DI, durante la expresión de la proteína se sustituyó las metioninas por Seleno-metioninas y el selenio en este caso es utilizado como átomo pesado para el experimento de SAD. La presencia de señal anómala se determinó mediante un escáner de fluorescencia alrededor de

la longitud de onda máxima de absorción para el selenio y se determinó el pico de absorción para el selenio dentro de la muestra ($\lambda=0.97925\text{\AA}$). Los datos procesados se utilizaron para localizar 24 átomos de selenio con el programa Autosol (Adams *et al.*, 2010) suficiente para calcular fases experimentales y generar un mapa de calidad que se utilizó en el programa Autobuild (Adams *et al.*, 2010). Para el proceso de afinamiento de Dut ϕ DI en presencia de dUMpNpp se utilizó un juego de datos nativos sin presencia de átomo pesado alguno. La estructura de la forma apo de Dut ϕ DI fue resuelta por reemplazo molecular mediante el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007) y utilizando como modelo la estructura de Dut ϕ DI en presencia de dUMpNpp en forma de cadena de poli-adeninas, excluyendo la región intermedia (aminoácidos 80-150). Los pasos de modelado, afinado y validación se realizaron con los programas Coot (Emsley *et al.*, 2010) y Phenix. (Adams *et al.*, 2010). Ambas estructuras presentan una buena geometría como indica el diagrama de Ramachandran (cada residuo está dentro de su región óptima). Un resumen de las estadísticas del proceso de afinado de las estructuras se muestra en la Tabla 5.1.

	DutφDI dUMpNpp	SeMet-DutφDI dUMpNpp	DutφDI Apo
Data collection			
Beamline	DLS-I.04	ALBA-XALOC	DLS-I.04
Wavelength (Å)	0.97942	0.97925	1.0721
Space group	P 2 ₁	P 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2
Cell dimensions (Å)	a=69.89	a=70.45	a=43.64
	b=81.44	b=81.23	b=51.94
	c=81.53	c=82.54	c=148.42
	α=γ=90	α=γ=90	α=β=γ=90
	β=106.92	β=107.41	α=β=γ=90
Resolution (Å) ^a	81.44 - 2.10 (2.21 - 2.10)	81.23 - 3.00 (3.16 - 3.00)	49.03 - 1.85 (1.95 - 1.85)
Unique reflections	50736 (7325)	17945 (2608)	29551 (4063)
Completeness (%)	99.24 (98.9)	99.9 (99.9)	99.5 (96.5)
Multiplicity	4.0 (3.7)	7.0 (7.2)	11.0 (5.2)
I/σ(I)	8.4 (2.1)	10.8 (2.2)	18.7 (2.2)
R merge	0.048 (0.350)	0.064 (0.449)	0.024 (0.351)
Refinement			
Rwork	0.2238		0.1775
Rfree	0.2653		0.2186
Number of atoms			
Protein	5388		2631
Ligand	112		-
Water	210		181
Others	8		-
Rmsd, bond (Å)	0.016		0.017
Rmsd, angles (°)	1.34		1.52
Ramachandran plot			
Preferred (%)	99		99
Allowed (%)	1		1

^aLos números entre paréntesis indican los valores para la celda de mayor resolución.

Tabla 5.1. Estadísticas cristalográficas.

Resultados

Presencia de variantes alélicas de Duts diméricas codificadas por fagos de *S. aureus*.

Muchos fagos de *S. aureus* codifican para Duts diméricas en lugar de triméricas. El análisis *in silico* del genoma de distintos fagos de *S. aureus* realizados por el grupo del Dr. Penadés muestra que en un mismo fago no coexisten simultáneamente genes codificantes para Duts triméricas y diméricas; además, estos mismos análisis muestran que los genes que codifican para Duts triméricas y diméricas ocupan un mismo lugar en el genoma de los fagos (García-Caballer, 2015). Estos resultados muestra que los fagos de *S. aureus* muestran sintenia, genes codificando para proteínas homólogas ocupan la misma posición en el genoma, aunque en el caso de las Duts triméricas y diméricas nos encontramos ante proteínas análogas. Dado que se ha descrito que las Duts triméricas codificadas por fagos de *S. aureus* presentan un gran número de variantes alélicas diferentes (Frigols, 2015), nos planteamos si esta variabilidad también se encuentra presente en las Duts diméricas.

Para analizar esta posibilidad, se alinearon las secuencias de aminoácidos de seis Duts diméricas codificadas por los fagos de *S. aureus* ϕ NM1 (Dut ϕ NM1), ϕ DII (Dut ϕ DII), ϕ 55(Dut ϕ 55), ϕ O46 (Dut ϕ O46), ϕ DI (Dut ϕ DI) y ϕ O11 (Dut ϕ O11) (Figura 5.1). La comparación de la secuencia de estas Duts, predichas como Duts diméricas, confirma la presencia de distintas variantes alélicas. Tal como se ha observado para las Duts triméricas, esta variabilidad se debe a la presencia de una zona de central de entre 50 y 60 residuos, la cual se encuentra flanqueada por dos zonas altamente conservadas que contienen los cinco motivos catalíticos propuestos para las Duts diméricas (Harkiolaki *et al.*, 2004; Moroz *et al.*, 2004) (Figura 5.1). Los resultados obtenidos con el servidor *PRALINE*

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

(<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) para el alineamiento múltiple de secuencias muestran que mientras las zonas conservadas presentan un porcentaje de identidad de secuencia del 83%, la región central, variable en secuencia, muestra un porcentaje de identidad del 16%. Análogamente a las Duts triméricas, hemos definido esta región altamente variable en secuencia como motivo VI.

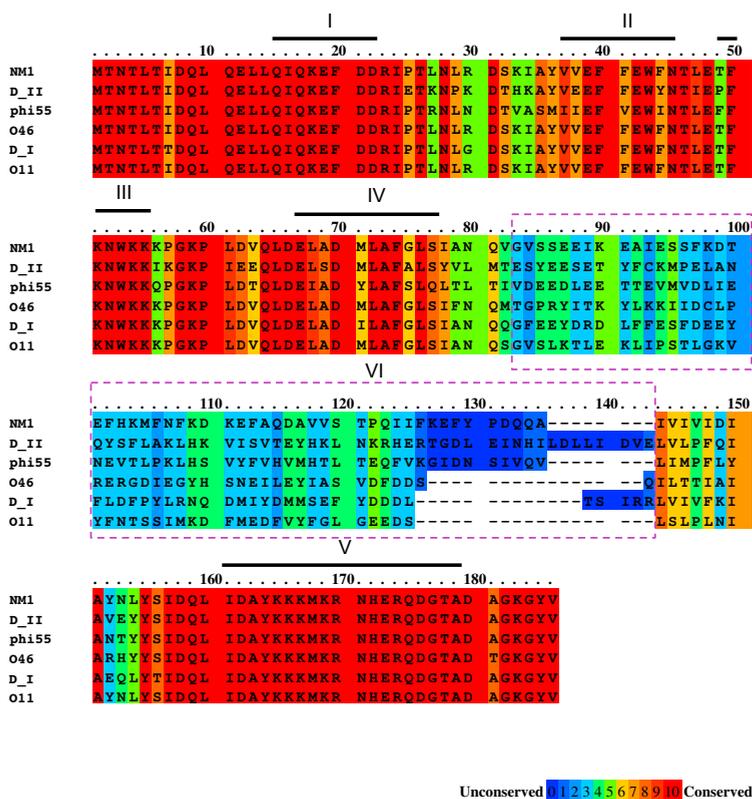


Figura 5.1. Alineamiento de secuencias de Duts diméricas de fagos. Las secuencias de las Duts codificadas por los fagos phiNM1 (NM1), phiDII (D_II), phi55 (phi55) y phiO46 (O46), phiDI (DI) y phiO11 (O11) se muestran alineadas (alineamiento generado mediante el servidor *PRALINE*). La homología de las secuencias se representa a través de los colores de los residuos conservados (rojo) y no conservados (azul). Los diferentes motivos se encuentran numerados con números romanos (I-VI). Los motivos conservados (I-V) se encuentran delimitados por un línea sólida de color negro, mientras que el motivo no específico (VI) se encuentra enmarcado en un recuadro de líneas discontinuas de color magenta.

Las Duts diméricas inducen el ciclo de las SaPIs.

Dado que los fagos de *S. aureus* muestran sintenia para el gen de las Duts, y dado que las diferentes variantes alélicas en el caso de Duts triméricas inducen el ciclo de SaPIs (Capítulo 3; Penadés *et al.*, 2013; Tormo-Más *et al.*, 2010), nos planteamos la posibilidad de que esta sintenia a nivel de secuencia se pudiera extender a la capacidad señalizadora y que ambos tipos de Duts pudiesen estar involucrados en las mismas funciones reguladoras.

Para comprobar esta idea, y siguiendo con nuestro modelo, se testó la capacidad inductora de diferentes Duts diméricas (Dut ϕ NM1, Dut ϕ DI, Dut ϕ DII, Dut ϕ O46, Dut ϕ 55 y Dut ϕ O11) codificadas en el genoma de varios fagos de *S. aureus*. Como modelo de isla de patogenicidad se utilizó SaPIbov1, una SaPI inducida por diferentes Duts triméricas como hemos mostrado previamente (Capítulo 3) (Tormo-Más *et al.*, 2010). Para este análisis, los genes que codifican para las diferentes proteínas Duts diméricas fusionadas a una cola 3xFLAG fueron clonados en el vector de expresión pCN51, bajo el control del promotor *Pcad* inducible por cadmio. La expresión de estos genes *dut* en una cepa de *S. aureus* portadora de la isla SaPIbov1 resultó en la inducción del ciclo de la isla cuando se expresa Dut ϕ NM1, Dut ϕ DI, , Dut ϕ O46 y Dut ϕ O11; mientras que no se obtuvo inducción con Dut ϕ DII ni Dut ϕ 55 (Figura 5.2). El resultado obtenido mediante *western blot* (Figura 5.2) muestra que los niveles de las Duts expresadas son comparables en todos los casos, indicando que: (i) ciertas Duts diméricas tienen capacidad para inducir la movilización de SaPIs; y (ii) a diferencia de las Duts triméricas, un subgrupo de Duts diméricas carece de esta capacidad inductora.

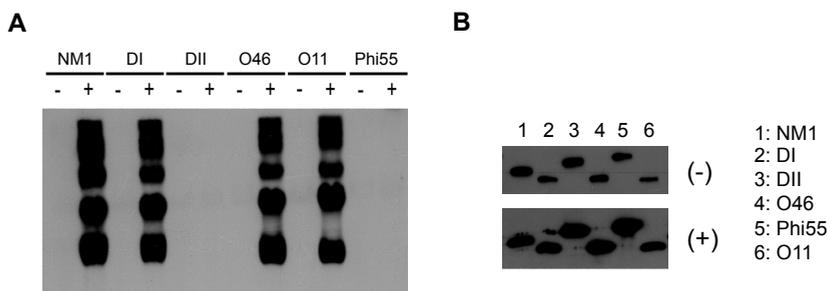


Figura 5.2. Replicación de SaPIbov1 mediante diferentes Duts diméricas de fagos de *S. aureus*. (A) *Southern blot* para la detección del ADN marcado mediante sonda de SaPIbov1. Una cepa no lisogénica de *S. aureus* portadora de SaPIbov1 fue complementada con un plásmido derivado de pCN51 capaz de inducir la proteína Dut dimérica fusionada a una cola 3xFLAG bajo el control del promotor *Pcad* inducible por cadmio: Dut ϕ NM1 (NM1), Dut ϕ DI (DI), Du ϕ DII (DII), Dut ϕ O46 (O46), Dut ϕ O11 (O11) y Dut ϕ 55 (Phi55). (-) no inducido; (+) inducido con CdCl₂. (B) *Western blot* realizado con el anticuerpo frente a la cola FLAG fusionada a las proteínas. (-) no inducido; (+) inducido con CdCl₂.

La inducción del ciclo de la SaPI tiene lugar mediante una interacción directa de la Dut y el represor Stl en el caso de Duts triméricas (Maiques *et al.*, 2016; Tormo-Más *et al.*, 2010). Un mecanismo similar al descrito para Duts triméricas ha sido descrito recientemente para el caso de la Dut dimérica Dut ϕ NM1 (Hill and Dokland, 2016). En el caso de las Duts triméricas, la capacidad de unir el represor Stl viene dada en parte por la presencia del motivo variable en la secuencia de las Duts codificadas por fagos de *S. aureus*, al que denominamos motivo VI, y que se posiciona muy cerca del centro activo (ver Capítulos 1, 2 y 3) (Maiques *et al.*, 2016; Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010). Además, en el caso de Duts triméricas la unión de Stl se ve inhibida por la presencia del dUTP (Maiques *et al.*, 2016; Szabó *et al.*, 2014). Dado que las Duts diméricas codificadas por fagos de *S. aureus* también presentan, análogamente a las Duts triméricas, un motivo VI y para esclarecer si este motivo VI de las Duts diméricas pudiera actuar de manera análoga al de las Duts triméricas, así como el papel del nucleótido en la unión del represor;

se resolvió la estructura de la Dut dimérica inductora Dut ϕ DI en presencia y ausencia de nucleótido.

Caracterización estructural de Dut ϕ DI en presencia de dUMpNpp.

Utilizando como modelo de Dut inductora la Dut ϕ DI, abordamos su estudio estructural por cristalografía de proteínas. Para favorecer una conformación más estable de la proteína que pudiera ayudar a su cristalización se utilizó dUMpNpp, un análogo no hidrolizable del dUTP, que podría bloquear a la enzima en una conformación catalíticamente competente. La estructura de Dut ϕ DI se resolvió mediante SAD a una resolución de 2.1Å en el grupo espacial P2₁, encontrándose cuatro moléculas de ϕ DI en la unidad asimétrica organizadas en dos homodímeros de idéntica conformación (RMSD de 0.32 Å obtenido para la superimposición de los dímeros) (Tabla 5.1) (Figura 5.3).

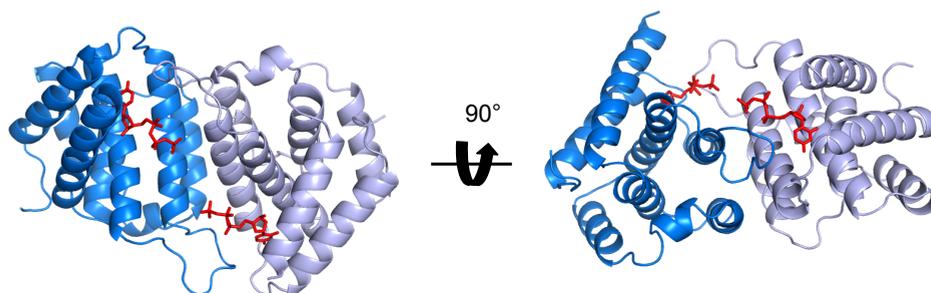


Figura 5.3. Estructura de la Dut ϕ DI en presencia de nucleótido. La Dut ϕ DI es un dímero formado por la interacción de dos monómeros idénticos (azul y violeta). El dímero presenta dos centros activos independientes, situados en la misma cara de la molécula, cada uno ocupado por una molécula del ligando, dUMpNpp, representado en *sticks* de color rojo.

A nivel estructural, el homodímero de Dut ϕ DI está compuesta por dos subunidades idénticas (RMSD de 0.174 Å para la superimposición de los monómeros que conforman el dímero) con dos centros activos, cada uno de ellos ocupado por una molécula de dUMpNpp y dos átomos de Mg²⁺ (Figura 5.3). La estructura muestra los aminoácidos 1-160, 2-164, 1-164 y 2-

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

163 del primero, segundo, tercero y cuarto monómero, respectivamente. El hecho de no poder trazar los últimos diez residuos del extremo C-terminal sugiere que este extremo presenta alta flexibilidad. Dut ϕ DI presenta un plegamiento hélice α , tal como fue descrito previamente para las Duts diméricas de *Trypanosoma cruzi* y *brucei*, *Campylobacter jejuni* y *Leishmania major* (Hemsworth *et al.*, 2013; 2011; Moroz *et al.*, 2004). Comparada con estas Duts, Dut ϕ DI representa una forma reducida dado que cada uno de los monómeros está formado por ocho hélices α (α 1, residuos T7-R23; α 2, L29-L47; α 3 L61-Q82; α 4, E86-E98; α 5, F104-R108; α 6, Q110-Y121; α 7, S127-L141 y α 8, I144-D163) (Figura 5.4) contrariamente a las 10-13 hélices α y, en algunos casos hojas β adicionales, observadas en las estructuras de las Duts diméricas previamente caracterizadas. No obstante, los datos estructurales disponibles correspondientes a las Duts diméricas de *C. jejuni*, *L. major*, *T. cruzi* y *brucei* han mostrado elementos altamente conservados que pueden ser utilizados para identificar esta familia de enzimas. Esta homología se basa en la presencia de estas ocho hélices α conservadas estructuralmente donde se localizan cuatro de los cinco motivos consenso que definen el centro activo de la enzima (Hemsworth *et al.*, 2011) (Figura 5.4A). Las diferencias en tamaño de Dut ϕ DI se deben a la longitud del extremo C-terminal, donde existe una diferencia de más de 50 residuos al compararla con el resto de Duts diméricas caracterizadas estructuralmente previamente (Figura S5.1). Además, también se observan diferencias a nivel del que hemos definido como motivo VI, una región que no solamente es variable en tamaño y secuencia entre los fagos de *S. aureus*, sino también entre todas las Duts diméricas (Figuras 5.1 y S5.1). Esta región, que se encuentra muy bien definida en la estructura de Dut ϕ DI, está compuesta por cuatro hélices α (α 4- α 7), pertenecientes al dominio rígido de la molécula, y se encuentra posicionada en la parte trasera del sitio de unión del nucleótido (Figura S5.2).

En las Duts diméricas previamente caracterizadas, cada monómero presenta dos dominios: uno rígido y otro móvil. El dominio móvil, al que se le ha atribuido el acomodamiento del sustrato en el centro activo, alterna entre una forma abierta de la enzima en su forma *apo* y una forma cerrada en presencia de ligando (Harkiolaki *et al.*, 2004; Hemsworth *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2004). En el caso de Dut ϕ DI este dominio móvil o flexible está compuesto por los amino ácidos 1-23 y 144-173 y estructuralmente contiene las hélices α 1 y α 8. En el caso de Dut ϕ DI en presencia de ligando, este dominio adopta un conformación cerrada, acercándose al dUMpNpp, al igual que se observa para otras Duts diméricas previamente caracterizadas (Figura S5.3). El dominio móvil delimita el dominio rígido que forma el cuerpo central del monómero y esta involucrado en la formación del dímero (Harkiolaki *et al.*, 2004; Hemsworth *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2004). En el caso de Dut ϕ DI, este dominio está compuesto por los aminoácidos 24-143 y estructuralmente contiene las hélices α 2- α 7 (Figura 5.4). En el caso de Dut ϕ DI, el dímero se forma alrededor de un eje de simetría tipo 2 mediante un interacción recíproca hélice-hélice de las hélices α 2 y α 6 de cada uno de los protómeros, y estabilizado en los polos a través de los contactos que establecen los lazos que conectan las hélices α 1- α 2 y α 2- α 3. Este último lazo contiene residuos catalíticos y se proyecta sobre el centro activo del protómero adyacente (Figuras 5.4 y S5.4). Tomado todo junto, la zona de interacción entre los dos protómeros ocupa una superficie de 1246 Å² e implica a 32 residuos de cada uno de los protómeros.

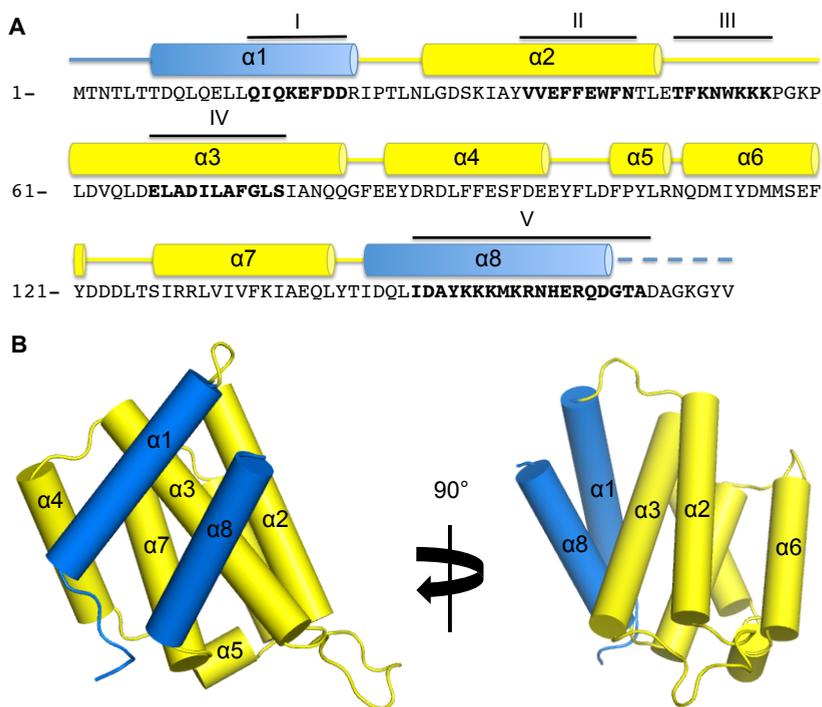


Figura 5.4. Dominio rígido y móvil de la DutφDI. (A) Secuencia de aminoácidos de DutφDI sobre la que se representan mediante cilindros las dos hélices α ($\alpha 1$ y $\alpha 8$) del dominio móvil en azul; y las seis hélices α ($\alpha 2$ - $\alpha 7$) del dominio rígido en amarillo. Los cinco motivos consenso conservados en las Duts diméricas (I-V) se encuentran delimitados por líneas negras continuas. Los residuos que componen cada uno de estos motivos se encuentra resaltado en color negro. (B) Vista de uno de los monómeros representados en la Figura 5.3 sobre el que se visualizan las ocho hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 8$). El dominio móvil y aparecen coloreados en azul y amarillo, respectivamente.

Arquitectura del centro activo.

El dímero presenta dos centros activos ocupados por una molécula de dUMpNpp y dos Mg^{2+} cada uno de ellos. Ambos centros activos se encuentran en la misma cara del dímero y conectados, formando un canal largo delimitado por las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 8$, y los lazos de unión entre $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (Figuras 5.3 y 5.5). El ligando queda acomodado dentro del centro activo entre el dominio rígido y móvil de cada monómero (Figura S5.5).

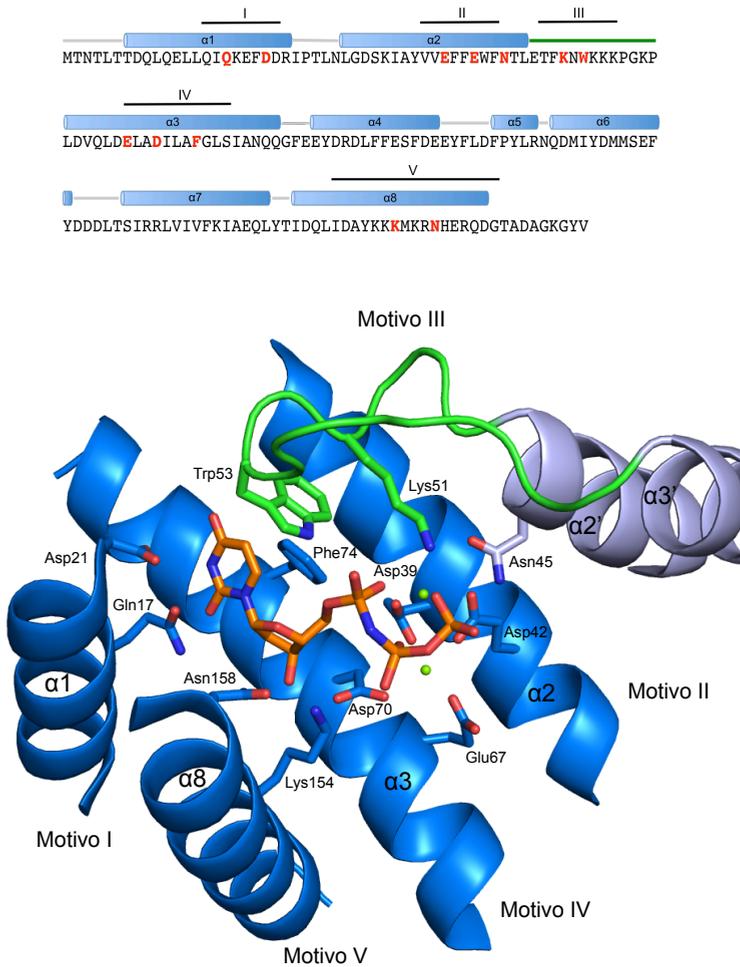


Figura 5.5. Centro activo de Dut ϕ DI en presencia de nucleótido. (Arriba) Secuencia de aminoácidos de Dut ϕ DI. Las hélices α se encuentran representadas como cilindros azules delimitando los residuos que las componen. Los cinco motivos necesarios para formar el centro activo están delimitados por líneas negras y etiquetados en números romanos. El lazo implicado en la formación del centro activo está delimitado por la línea de color verde. Los residuos implicados en la interacción con el ligando están resaltados en rojo. **(Abajo)** Vista cercana del centro activo de Dut ϕ DI. Cada uno de los monómeros está coloreado en azul y morado, respectivamente. La vista corresponde al centro activo de uno de los monómeros (azul), donde se marcan las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 8$ que componen el centro activo. El lazo de conexión entre las hélices $\alpha 2'$ y $\alpha 3'$ del monómero adyacente (morado), y que forma el centro activo, aparece de color verde. Los aminoácidos que intervienen en la unión e hidrólisis del ligando aparecen como *sticks* coloreados en función del átomo (carbono y fósforo en naranja, oxígeno rojo y nitrógeno azul). Los Mg^{2+} aparecen como esferas de color verde.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

En Duts diméricas previamente caracterizadas existen cinco motivos conservados que participan en la unión del ligando y la configuración del centro activo (Harkiolaki *et al.*, 2004; Hemsworth *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2004). En el centro activo, los motivos I, II, IV y V (situados en las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, y $\alpha 8$) pertenecen a uno de los monómeros; el motivo III (situado en el lazo de unión entre las hélices ($\alpha 2$ y $\alpha 3$)) lo aporta el segundo de los monómeros (Figura 5.5). No obstante, la Dut ϕ DI presenta estrictamente conservados cuatro de estos cinco motivos (motivos I-IV), mostrando variaciones en el motivo V.

El motivo I contribuye a la especificidad de la unión por el uracilo coordinando, a través de las cadenas laterales del Gln17 y el Asp21, el O2 y N3 del anillo de uracilo. El motivo II coordina, a través de dos glutámicos en posiciones Asp39 y Asp42, dos átomos de magnesio los cuales son requeridos para el mecanismo de hidrólisis de la molécula (Hemsworth *et al.*, 2013). Además, la Asn45 se encuentra coordinada con un oxígeno del último de los fosfatos del ligando. El motivo III estabiliza el centro activo a través del Trp53 y estabiliza el ligando mediante la Lys51 que, además de coordinar el magnesio que coordina los tres grupos fosfato, se coordina a oxígenos de los fosfatos α y γ del trinucleótido. Este mismo magnesio se coordina con la Asn45, que coordina uno de los oxígenos del fosfato en posición γ . El motivo VI coordina, mediante Glu67 y Asp70, el segundo de los átomos de magnesio junto con el motivo I; y estabiliza el centro activo gracias a la Phe74. Por último, el motivo V, el cual se encuentra reducido a una sola hélice ($\alpha 8$), se encuentra situado en la región móvil C-terminal en las Duts diméricas de fagos de *S. aureus*. La hélice $\alpha 8$ mantiene algunas de las interacciones características del motivo V. Principalmente contribuye a la unión del anillo de desoxirribosa a través de la Asn158 y dos interacciones con los fosfatos del ligando, mediadas por la Lys154 y la Arg161, pero el hecho de que el extremo C-terminal sea más corto que en otras Duts diméricas elimina otros contactos

adicionales con los fosfatos. Estos contactos son parcialmente recuperados por nuevas interacciones específicas de Duts diméricas de fagos de *S. aureus* mediante los residuos Asn45 y Lys59 del protómero vecino, los cuales no se encuentran incluidos en ninguno de los motivos conservados (Figuras 5.5 y S5.6). Estas nuevas interacciones vienen facilitadas por una reestructuración de la disposición de los monómeros, mostrando una superficie de dimerización en la Dut ϕ DI no tan paralela como en el resto de estructuras de las Duts diméricas previamente caracterizadas (Figura S5.3). No obstante, y exceptuando estas diferencias en el motivo V, y dado que los residuos de los motivos I-IV se encuentran conservados y con una disposición espacial cuasi idéntica, los datos estructurales obtenidos sugieren que el mecanismo de reacción para Dut ϕ DI será el propuesto para la familia de Duts diméricas (Hemsworth *et al.*, 2013). No obstante, se observa otra diferencia en el sitio de unión para el anillo del ligando. En las estructuras de las Duts previamente caracterizadas, la desoxirribosa se posiciona entre los anillos de las cadenas laterales de la His y la Phe conservadas del motivo IV. Estos residuos descartan el acceso de la ribosa al centro activo, debido a impedimentos estéricos entre el grupo hidroxilo adicional del azúcar con los anillos de la His y la Phe. Sorprendentemente, en Duts diméricas codificadas por fagos, la His se ha substituido por una Ala (Ala173 en Dut ϕ DI) (Figura S5.1), disminuyendo estas restricciones y abriendo la posibilidad de utilizar el UTP como ligando para este grupo de Duts diméricas.

La unión al dUMpNpp no provoca cambios conformacionales en la estructura de Dut ϕ DI.

Recientemente ha sido demostrado que el dUTP inhibe la interacción del represor StI con las Duts triméricas codificadas por fagos de *S. aureus* (Maiques *et al.*, 2016; Szabó *et al.*, 2014). La unión del dUTP en estas Duts induce un cambio conformacional en el extremo conservado C-terminal

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

(motivo V de las Duts triméricas) que cubre el centro activo cuando el ligando se encuentra unido, bloqueando el acceso de Stl a su sitio de unión (Maiques *et al.*, 2016).

Dada que nuestra hipótesis inicial era que las Duts diméricas codificadas por fagos mantendrían un mecanismo similar al de las Duts triméricas en la inducción de la SaPI, quisimos saber si la capacidad inductora de Duts diméricas venía dada por cambios conformacionales. Esta idea se apoya en dos aspectos. El primero de ellos, es que al igual que ocurre en Duts triméricas de fagos de *S. aureus*, datos obtenidos recientemente por nuestro grupo parecen sugerir que el dUTP inhibe también la unión entre Stl y Duts diméricas (comunicación personal). El segundo de ellos, es que en el caso de estructuras de Duts diméricas previamente caracterizadas se han observado dos conformaciones alternativas, abierta y cerrada, para la enzima en ausencia y presencia de ligando unido al centro activo, respectivamente (Harkiolaki *et al.*, 2004; Hemsworth *et al.*, 2013; Moroz *et al.*, 2004). Para corroborar esta idea se resolvió la estructura en ausencia de dUMpNpp con la idea de encontrar cambios conformacionales inducidos por la unión del nucleótido (Tabla 5.1). La estructura de Dut ϕ DI en su forma *apo* muestra un dímero en la unidad asimétrica que, sorprendentemente, es prácticamente idéntica a la forma con dUMpNpp unido, como se observa por las diferencias obtenidas al superimponer ambos dímeros (valor de RMSD de 0.36 Å) (Figura 5.6). Aunque prácticamente idénticas, la estructura de Dut ϕ DI en su forma *apo* muestra poca densidad electrónica para los últimos 14 residuos situados en la hélice $\alpha 8$ situada en el extremo C-terminal, sugiriendo que esta región es altamente flexible. De manera parecida, los últimos nueve residuos de la hélice $\alpha 8$ en la estructura obtenida con dUMpNpp unido también presentan poca densidad electrónica, confirmando la alta movilidad intrínseca que tiene esta región.

Contrariamente a lo observado en otras Duts diméricas previamente caracterizadas, el nucleótido no parece inducir ningún cambio conformacional en Dut ϕ DI, adoptando esta proteína una conformación cerrada constitutiva. La ausencia de cambios conformacionales inducidos por el nucleótido, sorprendentemente, se puede explicar por la presencia de un motivo V más corto en las Duts diméricas codificadas por los fagos de *S. aureus*. Como previamente se ha mencionado, este acortamiento causa la pérdida de algunas de las interacciones de este motivo con el nucleótido, la cual fuerza al dominio móvil de la molécula a adquirir una conformación cerrada.

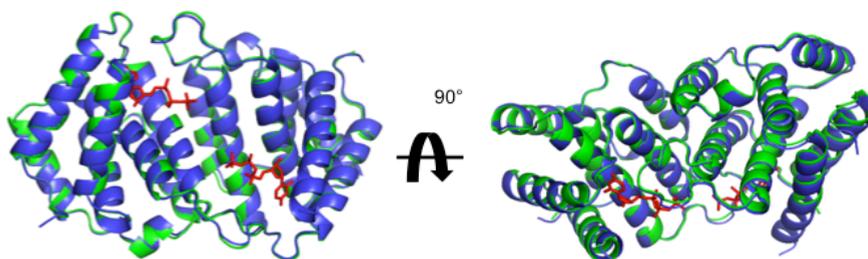


Figura 5.6. Superposición de la Dut ϕ DI apo y Dut ϕ DI en presencia de dUMpNpp. Las estructuras de Dut ϕ DI apo (verde) y Dut ϕ DI en presencia de dUMpNpp (azul) se muestran superpuestas. El ligando, dUMpNpp aparece representado en sticks de color rojo.

Otras Duts diméricas no fágicas presentan motivos adicionales no conservados.

Recientemente se ha descrito el papel de las Duts monoméricas y triméricas como moléculas señalizadoras (Penadés *et al.*, 2013). Pero, ¿qué ocurre con las Duts diméricas? ¿Se puede extrapolar el papel regulador de esta familia de Duts a otros organismos?

Aunque en la bibliografía no hay ejemplos descritos del papel regulador de las Duts diméricas o de su participación en rutas de señalización, algunos indicios nos indican que el papel regulador desempeñado por las Duts diméricas

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

codificadas por fagos también podría darse en otros escenarios celulares diferentes.

El primero de los indicios es que tal como describen Moroz y colaboradores (Moroz *et al.*, 2004), existen organismos que presentan más de un tipo de Dut. Teniendo en cuenta el coste que supone a la célula el mantener una proteína, lo lógico sería pensar que se limitara la existencia de una sola Dut para su función canónica (mantener unos niveles de dUTP compatibles con la vida). El hecho de codificar para varias Duts hace pensar que estas proteínas lleven a cabo diferentes actividades independientes a la hidrólisis del dUTP.

El segundo de los indicios es que a nivel de secuencia estas Duts están poco conservadas, a excepción de los cinco motivos consenso (Figura S5.1). El alineamiento de las secuencias de las Duts codificadas por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* y *Campylobacter jejuni* muestran regiones poco conservadas, incluso la presencia de elementos adicionales entre ellas, que crean diferencias a nivel estructural (Figuras 5.7 y S5.1).

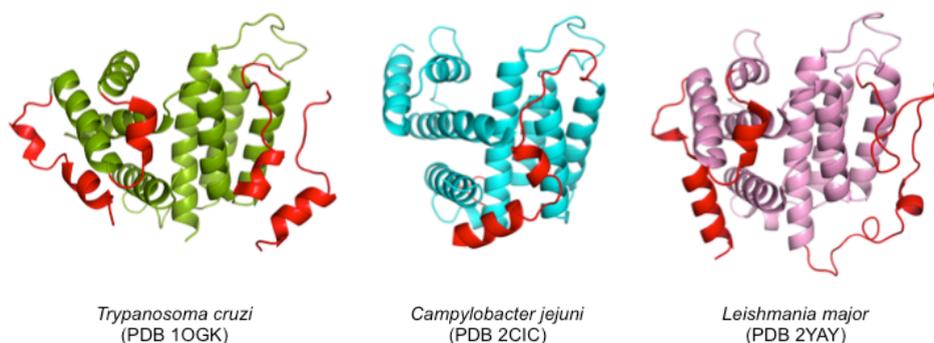


Figura 5.7. Motivos adicionales en Duts diméricas de organismos prototipo. Las estructuras de *Trypanosoma cruzi* (verde) *Campylobacter jejuni* (azul), y *Leishmania major* (morado) se muestran en verde, azul y morado, respectivamente. Los motivos considerados adicionales en estas Duts en base a su secuencia se muestran de color rojo.

¿Por qué existen estas regiones? ¿Cuál es el papel de estos elementos diferenciadores? En el caso de las Duts triméricas ya se ha descrito el posible papel que pueden tener estos mismos elementos en vías de señalización (Penadés *et al.*, 2013); ¿por qué no pensar que pueda tener un papel similar en Duts diméricas? Más estudios sobre el papel señalizador de estas regiones no conservadas son necesarios para llegar a alguna conclusión clara.

Discusión

Hasta la fecha se había descrito el papel tanto de Duts triméricas como monoméricas como moléculas señalizadoras (Penadés *et al.*, 2013). Uno de los ejemplos lo encontramos en las Duts triméricas codificadas por fagos de *S. aureus* que de-reprimen e inducen la transferencia de SaPIs a través de su unión a la proteína represora de la isla Stl (Tormo-Más *et al.*, 2010). El mecanismo a través del cual regulan esta función es muy parecido al de las proteínas G de eucariotas en dos sentidos: (i) es dependiente de nucleótido, y (ii) implica tres motivos de la Duts (IV, V y VI). Mientras el motivo conservado IV y el motivo VI, un motivo altamente variable en secuencia y característico de las Duts de fagos, dan especificidad por la unión a la proteína diana; el motivo V, altamente conservado en el extremo C-terminal, sirve como conmutador entre los estados activo/inactivo de la molécula (Maiques *et al.*, 2016).

Sorprendentemente, esta capacidad señalizadora no se restringe a Duts monoméricas y triméricas, ya que Duts diméricas, la tercera familia de este tipo de hidrolasas, también puede llevar a cabo este tipo de funciones. En nuestro caso, y al igual que ocurre en Duts de fagos descritas previamente (Tormo-Más *et al.*, 2010), hemos observado que Duts diméricas codificadas por fagos estafilocócicos son capaces de inducir la transferencia de SaPIs como SaPI_{bov1}, isla de patogenicidad modelo de nuestro estudio previo con Duts triméricas. Más aún, los datos obtenidos por Hill y Dokland sugieren que este papel regulador lo realizan a través de la interacción entre Dut y el mismo represor que en el caso de las proteínas triméricas, el represor Stl codificado por la SaPI (Hill and Dokland, 2016). No obstante, el mecanismo a través del cual son capaces de unirse a Stl, continúa aún siendo desconocido y más experimentos deben realizarse para poder ser descrito con precisión. No obstante, los datos obtenidos a partir del estudio de la Dut codificada por el

fago ϕ DI, como modelo de Dut que posee capacidad inductora, ha permitido conocer alguna pista sobre dicho mecanismo.

Contrariamente a lo que sucede en Duts triméricas, donde la unión del nucleótido induce un cambio conformacional en el motivo conservado V C-terminal necesario para la interacción con StI (Tormo-Más *et al.*, 2013); y a las estructuras de Duts diméricas previamente caracterizadas, como la de *Trypanosoma cruzi* (Harkiolaki *et al.*, 2001), que han mostrado que la presencia de ligando en el centro activo tiene como consecuencia un estado conformacional un poco más cerrado respecto a la conformación libre que se encuentra más relajada; en el caso de ϕ DI no se ha observado cambio conformacional dependiente de la unión al nucleótido (al menos al unir dUMpNpp). En nuestro caso no se observa esta diferencia y no podemos descartar que los resultados se deban a un efecto del empaquetamiento del cristal.

Otra posibilidad es que los mecanismos a través de los cuales las Duts diméricas y triméricas unan StI sean completamente diferentes. La variabilidad en secuencia y la presencia de zonas no conservadas entre diferentes Duts codificadas por fagos permite pensar en un papel análogo al motivo VI de las Duts triméricas de estas secuencias en las diméricas. Curiosamente, y contrariamente a lo que sucede en Duts triméricas, dicho motivo VI se encuentra presente tanto en Duts diméricas con capacidad inductora como no inductora con lo que probablemente la contribución a la manera en la que contribuye este motivo a la capacidad reguladora en este tipo de proteínas sea diferente a como lo hace en el caso de las triméricas, donde la presencia de este motivo es necesaria para su actividad inductora (Maiques *et al.*, 2016; Tormo-Más *et al.*, 2013; 2010). En las Duts triméricas la unión del nucleótido es necesaria para generar un cambio conformacional que acerque el motivo V, situado en el extremo C-terminal, al motivo no conservado VI y al

conservado IV, zona de interacción que reconoce y une StI (Maiques *et al.*, 2016). En las Duts diméricas esto no parece ocurrir así, ya que el motivo VI siempre permanece alejado tanto del centro activo como del extremo C-terminal de la molécula en ausencia o presencia de nucleótido, dejando como incógnitas el papel motivo VI y/o de la actividad catalítica de la enzima en la actividad inductora de estas proteínas. Dado que el motivo VI está alejado del centro activo, cabría esperar que no presente ninguna participación en la hidrólisis del sustrato, aunque más datos acerca de esta posibilidad son necesarios.

Además, dado que las Duts diméricas son capaces de hidrolizar además el dUDP (Camacho *et al.*, 2000), no podemos descartar que otros nucleótidos pudieran inducir un cambio conformacional parecido al que se observa en el motivo V de las triméricas; abriendo la puerta al papel de otros nucleótidos en este tipo de Duts para ejercer su capacidad señalizadora.

Esto nos lleva a plantearnos que tal vez el mecanismo a través del cual las Duts diméricas codificadas por fagos inducen la transferencia de SaPIs sea diferente al de las triméricas. No obstante, dadas las diferencias a nivel de secuencia, estructura y mecanismo enzimático; no deja de ser sorprendente cómo dos familias de proteínas con tantas diferencias reconocen la misma diana y regulan el mismo proceso celular.

Por otra parte, el estudio de las secuencias y estructuras de Duts diméricas caracterizadas como *L. major*, *T. cruzi* y *C. jejuni* nos permiten ver que dicho motivo VI no es algo restringido a las Duts codificadas por fagos, sino que también se encuentra presente en otros organismos. Estas regiones no conservadas se encuentran distribuidas en diferentes zonas de la proteína dependiendo del organismo y adoptan estructuralmente conformaciones diferentes en función del organismo. Aunque aún no hay descritos ejemplos de los procesos reguladores en los que estén participando estas Duts, no se puede descartar que estas proteínas estén implicadas en diferentes rutas de

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

señalización interactuando a través de estas regiones con diferentes dianas celulares que podrían depender del tipo de organismo al igual que ocurre en Duts triméricas y monoméricas donde estas regiones juegan un papel importante en funciones de señalización (Penadés *et al.*, 2013).

Los nuevos datos obtenidos sobre la capacidad inductora de SaPIs mediante Duts diméricas codificadas por fagos, así como la extrapolación de los elementos que participan en esta función a otros organismos que codifican el mismo tipo de Dut, apoya el papel regulador de estas proteínas (un papel que hasta la fecha estaba descrito para Duts triméricas y monoméricas), generalizando el papel de las dUTPasas como moléculas señalizadoras.

Material suplementario

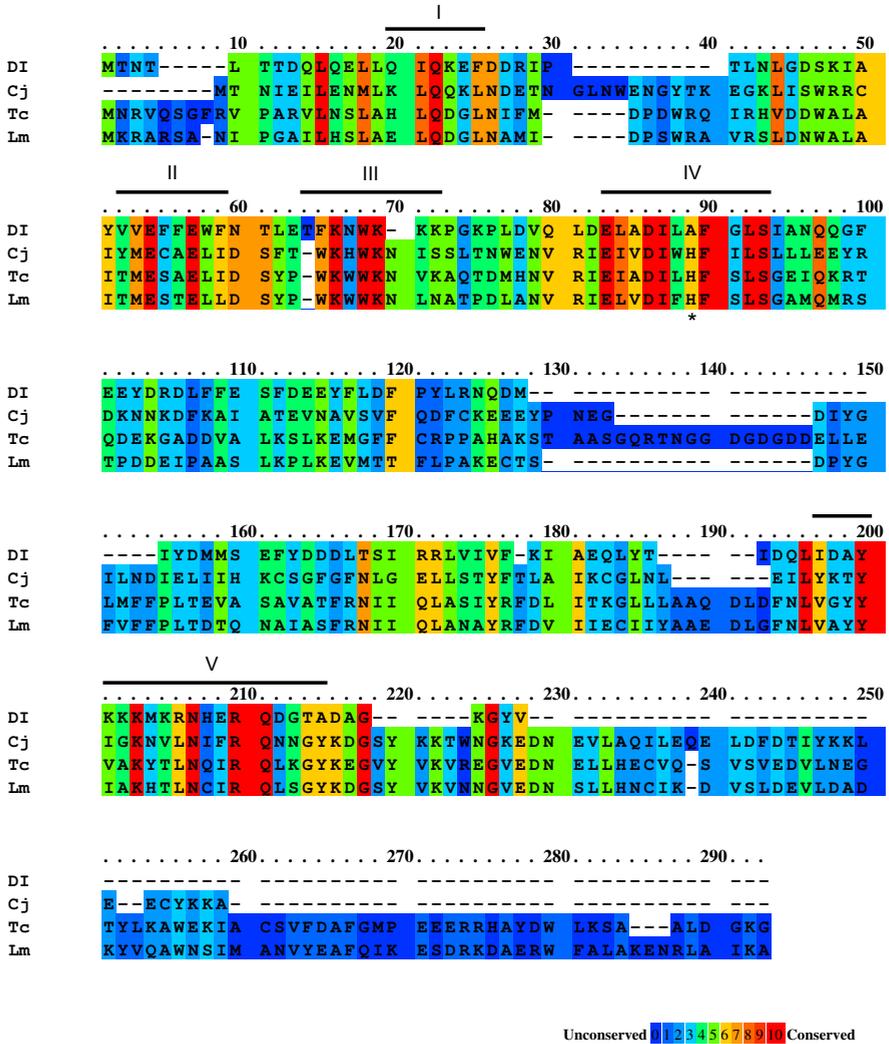


Figura S5.1. Alineamiento de secuencia de Duts diméricas prototipo junto con Duts DI. La secuencia de las Duts diméricas de *Campylobacter jejuni* (Cj), *Trypanosoma cruzi* (Tc) y *Leishmania major* (Lm) se encuentran alineadas (alineamiento generado mediante el servidor PRALINE). Los motivos consenso se encuentran delimitados y etiquetados en números romanos. La homología entre secuencias se muestra según coloración: residuos conservados (rojo), no conservados (azul).

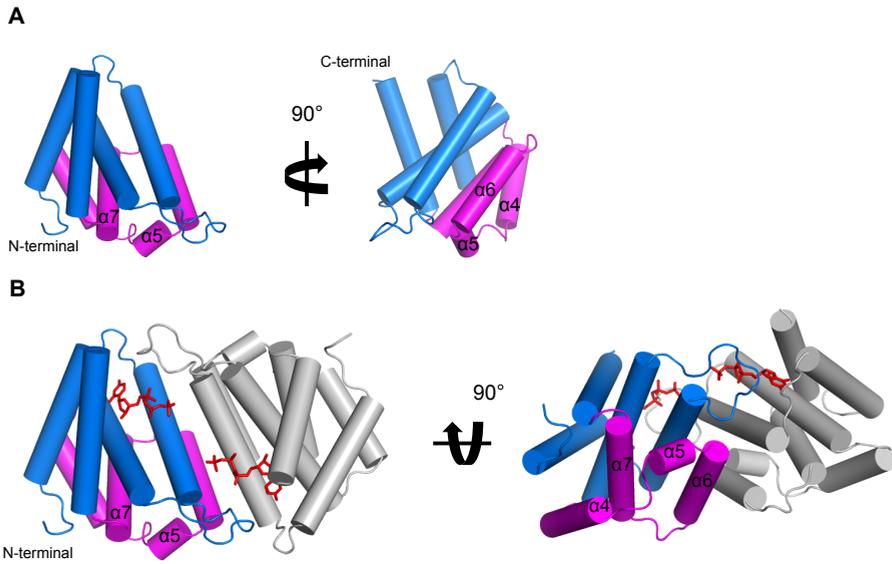


Figura S5.2. Posición del Motivo VI de DutφDI. Posición del motivo VI (morado) respecto a uno de los monómeros (azul) de DutφDI (**A**) y al dímero de DutφDI (**B**). Las hélices α se representan mediante cilindros. Las hélices α que forman parte del motivo se encuentran identificadas ($\alpha 4$ - $\alpha 7$).

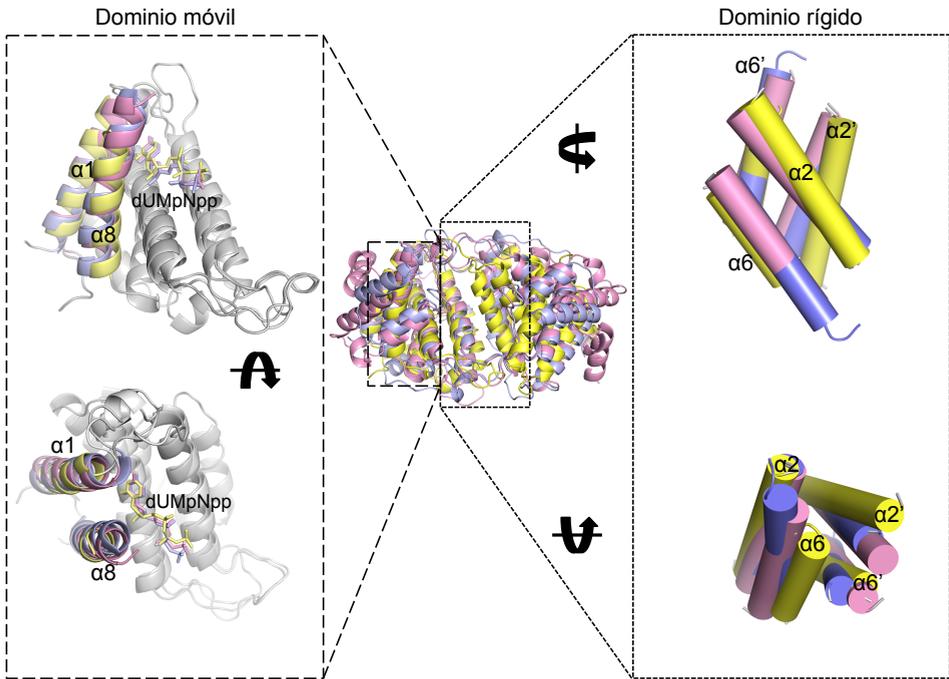


Figura S5.3. Superposición de los dominios rígido y móvil de Duts diméricas. Las Duts diméricas del fago ϕ D1 (amarillo), *Campylobacter jejuni* (PDB 2C1C) (azul) y *Leishmania major* (PDB 2YAY) en presencia de dUMpNpp, representados en sticks del mismo color que la estructura de la Dut correspondiente, aparecen representadas y superimpuestas (centro). El dominio móvil (panel de la izquierda), representado por las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 8$ Dut ϕ D1, se posiciona en conformación cerrada y cercana al ligando. El dominio rígido (panel de la derecha), representado por las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 6$ de uno de los monómeros y $\alpha 2'$ y $\alpha 6'$ del segundo de los monómeros de Dut ϕ D1, se orientan de manera diferente respecto las Duts de *C. jejuni* y *L. major*.

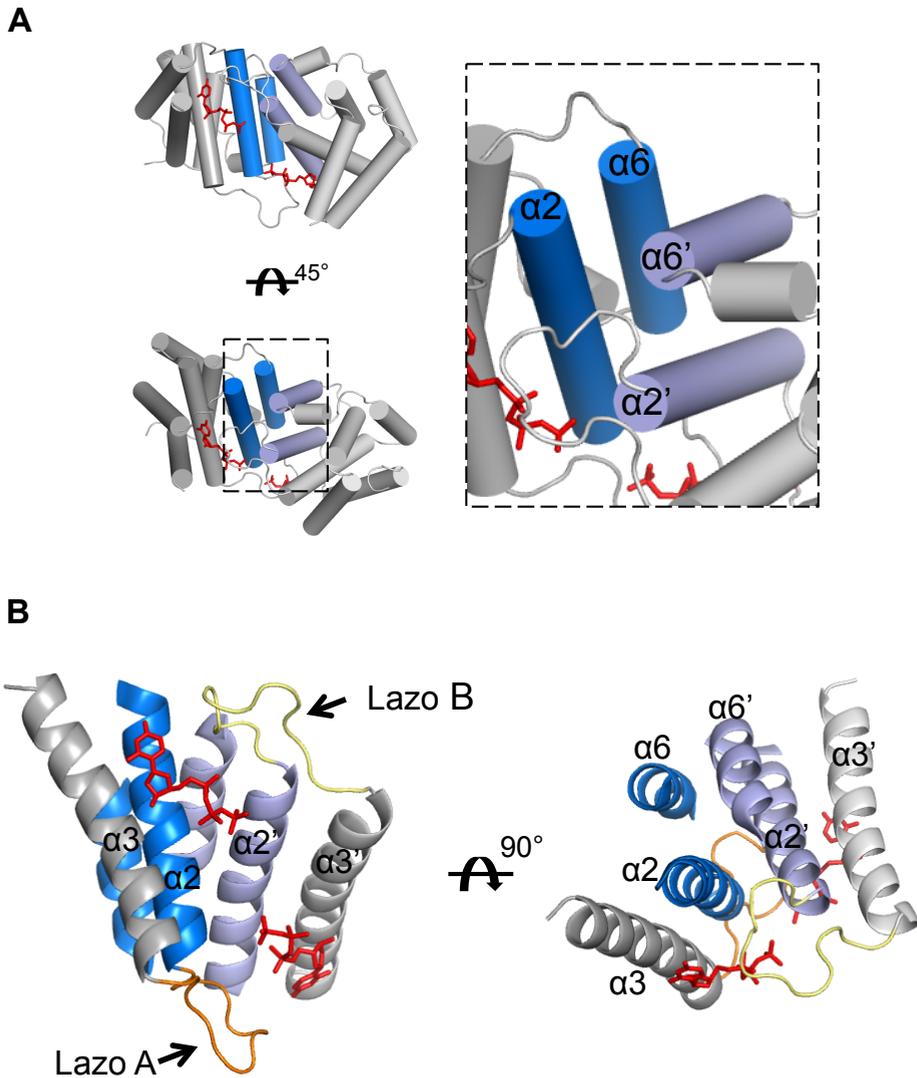


Figura S5.4 . Elementos para la formación del dímmero de Dut ϕ DI. (A) Las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 6$ del primero de los monómeros (azul), y $\alpha 2'$ y $\alpha 6'$ del segundo (morado) establecen el eje de dimerización orientándose de manera paralela. **(B)** El dímmero se estabiliza a través de interacciones establecidas por los lazos A y B (naranja y amarillo, respectivamente) que conectan las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de cada uno de los monómeros que forman el dímmero.

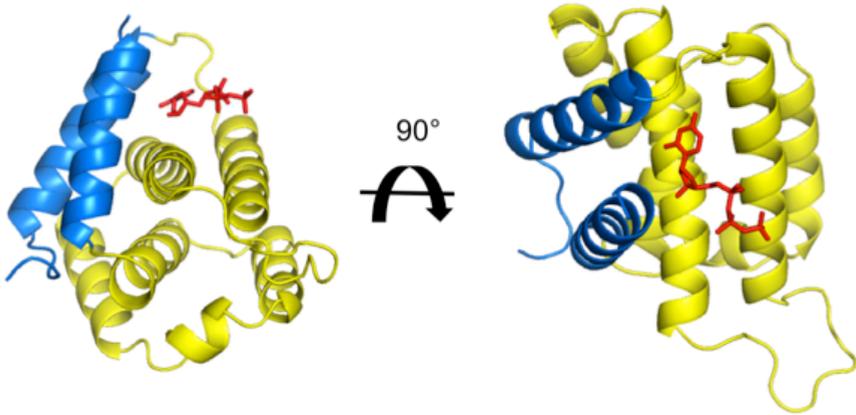


Figura S5.5. Disposición del nucleótido entre el dominio rígido y móvil. El nucleótido, dUMpNpp (*sticks* de color rojo), se posiciona entre el dominio rígido (amarillo) y móvil (azul) dentro del centro activo.

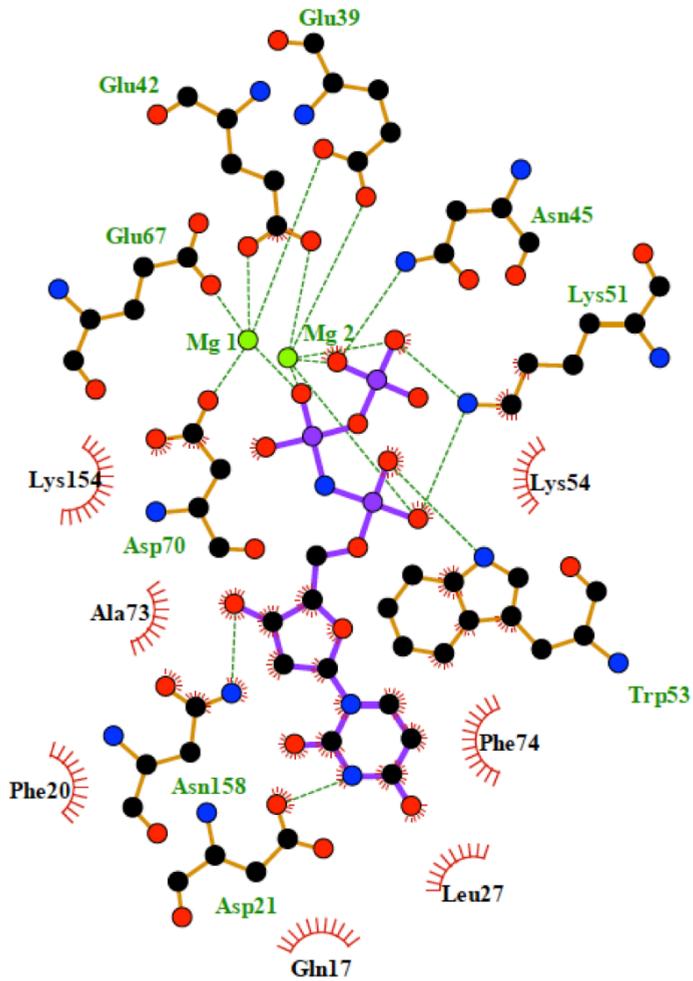


Figura S5.6. Red de interacciones del centro activo de DutD con su ligando. Las red de interacciones se han obtenido mediante el programa *LigPlus v1.4.5*. El ligando, dUMpNpp aparece coloreado de morado.

CAPÍTULO 5: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Oligonucleotides	Sequence (5'-3')
SaPIbov1-112mE	CCGGAATTC <u>CAATT</u> GCTGAGGCAA AA CTTC
SaPIbov1-113cB	CGCGGATC <u>CCTAATT</u> CTCCACGTCTAAAGC

Tabla S5.1. Oligonucleótidos utilizados.

CAPÍTULO 5: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Plásmido	Descripción	Referencia
pCN51	Vector de expresión	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pET28a	Vector de expresión	Novagen
pJP1673	pCN51-3xFlag <i>dut</i> DI (RBS ϕ 11)	(García-Caballer, 2015)
pJP1674	pCN51-3xFlag <i>dut</i> DII (RBS ϕ 11)	(García-Caballer, 2015)
pJP1670	pCN51-3xFlag <i>dut</i> O46 (RBS ϕ 11)	(García-Caballer, 2015)
pJP1671	pCN51-3xFlag <i>dut</i> O11 (RBS ϕ 11)	(García-Caballer, 2015)
	pCN51-3xFlag <i>dut</i> NM1 (RBS NM1)	(García-Caballer, 2015)
pET28a-dut ϕ DI	pET28a-dut DI	This work

Tabla S5.2. Plásmidos utilizados.

DISCUSIÓN GENERAL

Las Duts siempre han sido consideradas proteínas esenciales y universales dado su papel fundamental en la integridad del ADN (Vértessy and Tóth, 2009). De forma puntual se habían descrito en la bibliografía actividades alternativas para estas enzimas, que en este trabajo de tesis se recogen en el capítulo 4, pero no se había propuesto con anterioridad que pudieran configurar una familia de enzimas con funciones *moonlighting* generalizadas. La caracterización de la transferencia horizontal de SaPIs inducida por las Duts codificadas por fagos de *S. aureus* realizada por el grupo de Dr. Penadés (Tormo-Más *et al.*, 2010), suponía un claro ejemplo de actividad *moonlighting* adquirida por parte de estas proteínas. Utilizando este sistema biológico formado por *S. aureus*, sus fagos y sus SaPIs, estudiamos como estas Duts han adquirido su actividad *moonlighting* y las bases moleculares de esta actividad. Los datos presentados en esta tesis son solo el punto de partida de estos estudios, pero apoyan que la capacidad *moonlighting* es compartida por un amplio número de Duts desde virus a mamíferos y que las bases moleculares utilizadas por todas ellas para llevar a cabo esta actividad pueden ser también compartidas. Esta noción se sustenta en el análisis de la secuencia de Duts de la cuales se ha documentado actividad *moonlighting* vía interacción directa con proteínas diana, como en el caso de la Dut de rata (Chu *et al.*, 1996) o virales como el EBV (Ariza *et al.*, 2009); o en Duts donde se tienen evidencias indirectas de esta actividad como en el caso de mutantes defectivos para Dut en *E. coli* o mutantes de Dut truncados en *M. smegmatis* los cuales causan letalidad en ambos casos y que en el caso de *M. smegmatis* no se asocia a la actividad enzimática de la enzima (el-Hajj *et al.*, 1988; Pecsí *et al.*, 2012).

Un nuevo mecanismo de señalización mediado por nucleótido.

Los datos obtenidos a partir de las estructuras resueltas de la forma salvaje y mutantes de la Dut codificada por el fago $\phi 80\alpha$, así como de ensayos *in vivo* e *in vitro*, nos permitieron proponer un posible mecanismo molecular, el cual

DISCUSIÓN GENERAL

fue refinado posteriormente, que recordaba mucho al de las proteínas G de eucariotas en el sentido que: (i) ambas familias de proteínas funcionan como mecanismos señalizadores junto con un nucleótido que actúa como segundo mensajero, (ii) implican *P-loop(s)* (dos en el caso de las proteínas G) flexibles que cubren el centro activo en la unión de las proteínas diana, y (iii) la hidrólisis del nucleótido alterna entre la capacidad señalizadora activa/inactiva (*on/off*) de la proteína.

La transferencia de SaPIs mediada por Duts tiene lugar mediante la unión de Dut a la proteína represora de la isla StI (Tormo-Más *et al.*, 2010). El trabajo presentado en el capítulo 1 implicó como molécula señalizadora en el proceso al dUTP, funcionando por lo tanto este nucleótido como segundo mensajero. El uso de nucleótidos como segundos mensajeros es común y actuando como tales se ha descrito de una gran variedad de nucleótidos lineales tales como: GTP, ATP y (p)ppGpp, pppApp; así como nucleótidos cíclicos como: c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP sus implicaciones en procesos de señalización celular (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Kalia *et al.*, 2013; Roskoski, 2015). No obstante, los mecanismos a través de los cuales participan estos nucleótidos son muy diferentes. Comparando el dUTP con otros nucleótidos lineales, su mecanismo de acción se asemeja más al del GTP o (p)ppGpp que al del ATP. El ATP actúa como segundo mensajero en proteínas quinasas mediante la transferencia de su fosfato gamma a un residuo de tirosina, serina, treonina o histidina de la misma quinasa o de otra proteína sustrato, actuando esta fosforilación como transferencia de la señal (Roskoski, 2015). Por su parte, en el GTP, que actúa como segundo mensajero en proteínas G, la capacidad señalizadora depende de la hidrólisis del nucleótido, que induce cambios conformacionales en la propia proteína modificando la afinidad por dianas y transluciendo de este modo la señal (Figura 6.1) (Etienne-Manneville and Hall, 2002). En las Duts, el dUTP regula el cambio entre dos

estados conformacionales con afinidades diferentes por su dianas al igual que hace el GTP en las proteínas G. En base a esta observación describimos que el mecanismo de señalización de las Duts era del tipo “*G-like*”. Los resultados presentados en el capítulo 1 apuntaban a que la unión del dUTP producía un cambio conformacional en el *P-loop* C-terminal de la molécula que se relacionaba con la capacidad inductora de las Duts, de tal manera que aquellos mutantes que no eran capaces de ordenar el *P-loop* sobre el centro activo tampoco eran capaces de inducir la transferencia de la SaPI.

En nuestro modelo, explicado detalladamente en los capítulos 1, 2 y 3 (Figura 6.1), tres motivos son necesarios para la interacción Dut y Stl, represor de la isla de patogenicidad (Figura 6.1). El primero de ellos es el motivo VI, característico de las Duts codificadas por fagos de *S. aureus*. Este motivo se ha demostrado con anterioridad a este trabajo su necesidad para el reconocimiento de Stl, así como para la especificidad de la interacción (Tormo-Más *et al.*, 2010). El segundo de los motivos, el motivo V situado en el extremo C-terminal, se ordena sobre el centro activo, muy próximo al motivo VI tras la unión del trinucleótido, inhibiendo la interacción entre Dut y la proteína Stl. El tercero de los motivos, el motivo IV, se encuentra conservado en las Duts triméricas y se sitúa en las proximidades de los dos motivos anteriores. La hidrólisis del dUTP se ve relacionada con un cambio en la conformación del *P-loop*, como observamos en la estructura con dUMP, o confiriéndole mucha libertad a este *P-loop*, como se ve en la forma apo. Esto sugiere que la conformación que adquiere este *P-loop* en la unión con Stl es diferente a la que tiene en presencia de dUTP (Figura 6.1).

Nuestro modelo inicial (capítulo 1), fue rebatido por Szabo y colaboradores que proponían un modelo alternativo (Figura 6.1) (Szabó *et al.*, 2014). Este modelo alternativo propone que el dUTP compite con el represor Stl por el centro activo de la Dut, de tal manera que la unión del dUTP inhibe

DISCUSIÓN GENERAL

la interacción Dut-Stl. Además, este modelo alternativo propone que la unión Dut-Stl no requiere la participación del *P-loop* C-terminal y por lo tanto no puede considerarse “*G-like*”. Nuestros datos no indican lo mismo. Pese a ser cierto que la revisión de nuestro modelo inicial nos ha llevado a corroborar que el dUTP inhibe la interacción Dut-Stl; los nuevos datos obtenidos, y vistos en el capítulo 2, nos ayudan a corroborar la importancia del extremo C-terminal en la unión entre ambas proteínas: la unión a Stl sería consecuencia de la hidrólisis del dUTP y de la conformación que pueda adoptar el extremo C-terminal en ausencia del trinucleótido. No obstante, el modelo propuesto por Szabo también es dependiente de nucleótido, aunque en un modo inverso al inicialmente propuestos por nosotros, pero de cualquier manera también encajaría con el concepto “*G-like*”, en el sentido de que el nucleótido ejerce de interruptor molecular en la interacción con la proteína diana. En este sentido, el modelo modificado presentado por nuestro grupo en el capítulo 2 es capaz de explicar los resultados obtenidos por Szabo y colaboradores mientras que su modelo solo puede explicar algunos de nuestros datos experimentales. En primer lugar nuestros datos experimentales muestran que el motivo V es importante en la interacción ya que un mutante delecional en este motivo disminuye de forma muy importante su interacción con Stl. Más aún, no solo es importante este motivo sino también la conformación que adquiere ya que hemos mostrado que los mutantes que dificultaban la conformación competente del motivo V impedían la unión a Stl (mutantes D81A e Y84I de la Dut80 α). Si el extremo C-terminal no tuviera ninguna implicación en la unión de Stl, estos tres mutantes deberían comportarse de forma similar.

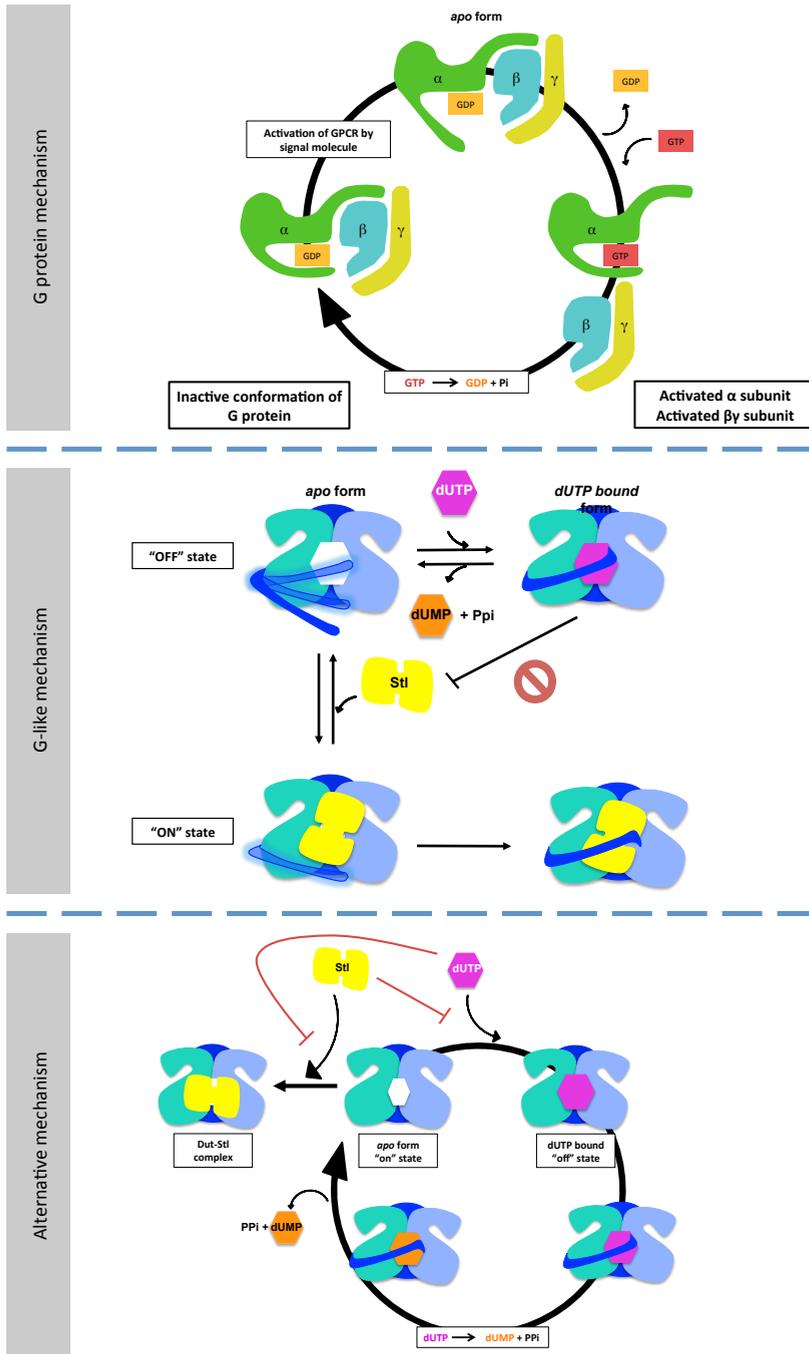


Figura 6.1. Comparación de los diferentes modelos de señalización.

DISCUSIÓN GENERAL

De forma paralela, la implicación del motivo VI en la interacción Dut-Stl también fue puesta en duda. A través de los trabajos realizados por el mismo grupo, utilizando la Dut del fago $\phi 11$ y de *Mycobacterium tuberculosis* (Hirmondo *et al.*, 2015; Nyíri *et al.*, 2015). Por una parte, la Dut de *M. tuberculosis* es capaz de interactuar con el represor Stl pese no tener el motivo VI característico de las Duts de fagos de *S. aureus* (Figura 6.2) (Hirmondo *et al.*, 2015). Además, estudios posteriores utilizando un mutante truncado para el motivo VI de la Dut del fago $\phi 11$ han mostrado como el patrón de interacción con Stl de este mutante, frente a la forma salvaje de la proteína, no varía; con lo que dicho motivo no sería necesario para la interacción con Stl (Nyíri *et al.*, 2015). Estos datos chocan con los datos obtenidos mediante EMSA por el mismo grupo, puesto que utilizando la Dut de *M. tuberculosis*, la cual no tiene el motivo VI característico de los fagos de *S. aureus*, observan interacción con Stl. La unión entre Stl y la zona de ADN a la que se une es separada en presencia de Dut, concretamente la de fagos como la Dut del fago $\phi 11$ (Tormo-Más *et al.*, 2010). Si el motivo VI no tuviera implicación en la unión en un EMSA, cuya finalidad es ver un desplazamiento de banda del ADN libre o unido a Stl, debería mostrar el mismo resultado en presencia de ambas Duts. Este no es el caso, y mientras que para la Dut del fago $\phi 11$ obtuvieron un desplazamiento de la banda no lo obtuvieron para la Dut de *M. tuberculosis* (Nyíri *et al.*, 2015). El resultado es explicado por este grupo como que la interacción Dut-Stl tiene sentido dentro del contexto del fago, argumento que choca con la propuesta de Stl como inhibidor universal de Duts realizada por el mismo grupo (Hirmondo *et al.*, 2015).

Trabajos anteriores ya habían demostrado la necesidad de la presencia de este motivo para la interacción con Stl utilizando fagos con y sin motivo VI (Tormo-Más *et al.*, 2010) y los resultados presentados en el capítulo 2 confirman que un mutante delecional en este motivo de Dut80 α pierde

completamente la interacción con Stl. Además, los datos obtenidos para Dut80 α se han corroborado en otras Duts de fagos como la Dut ϕ 85 y Dut ϕ 11, como se ha visto en el capítulo 3 a través de mutantes delecionales para el motivo *β -hairpin*, situado dentro del motivo VI. Tal como han mostrado los resultados obtenidos, este motivo *β -hairpin* es un elemento esencial para la unión de Stl y la inducción de la isla, puesto que su eliminación desemboca en una disminución en la eficacia de la inducción.

Como ya hemos indicado pensamos que nuestro modelo puede englobar al modelo de Szabo y colaboradores y que las diferencias observadas pueden radicar principalmente en el uso de diferentes Duts. En nuestro caso hemos trabajado principalmente con la Dut del fago 80 α mientras que el grupo de la Dra. Vertessy ha trabajado con la Dut del fago ϕ 11. Sin embargo, es difícil de integrar las observaciones correspondientes a la interacción de Stl con la Dut de *Mycobacterium* y la propuesta de este grupo en base a esta observación de que Stl sea un inhibidor universal de Duts (Hirmondo *et al.*, 2015; Szabó *et al.*, 2014). Más allá del sentido biológico que pueda tener el hecho de que Stl, un represor de una isla de patogenicidad de *S. aureus*, pueda interaccionar con una Dut de *Mycobacterium*; el ser un inhibidor universal implicaría que Stl interaccionaría con las Dut a través de motivos conservados en todas ellas y no de motivos específicos, como el motivo VI de las Duts de *S. aureus*, como nuestro trabajo ha demostrado. Además, los resultados obtenidos por Tormo-Mas y colaboradores han mostrado que la Dut del fago PH15 de *S. epidermis* (Figura 6.2) es incapaz de inducir la movilización de islas de patogenicidad reprimidas por Stl (Tormo-Más *et al.*, 2010) y mas aún, recientes trabajos de este grupo indican que la sobre expresión de la Dut de *Mycobacterium* en *S. aureus* tampoco es capaz de movilizar a estas islas de patogenicidad (Dr. Penadés, comunicación personal), poniendo en duda que

DISCUSIÓN GENERAL

tanto la Dut de PH15 como la de *Mycobacterium* interaccionen in vivo con Stl y consiguientemente que Stl sea un inhibidor universal de las Duts.

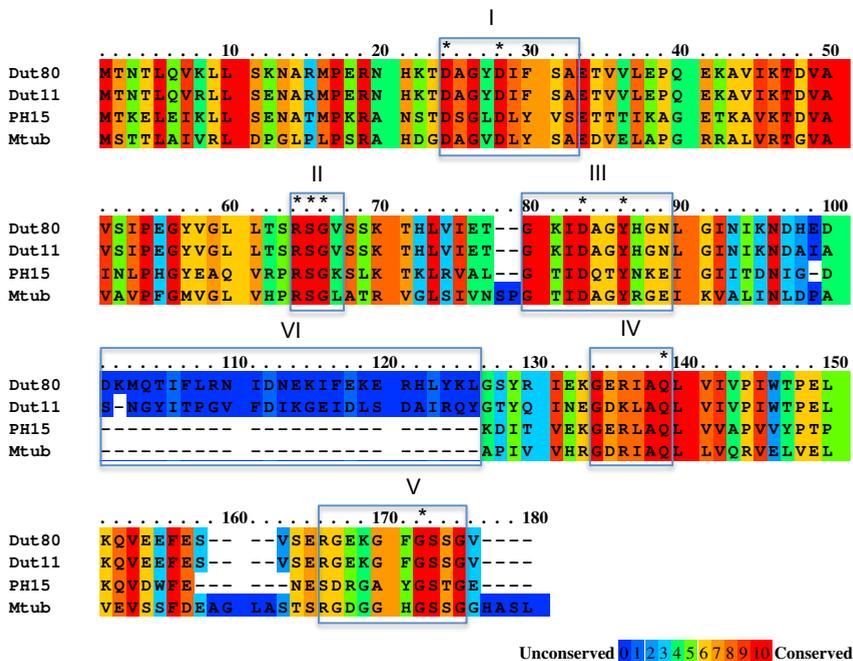


Figura 6.2. Alineamiento de secuencias de distintas Duts. Alineamiento de las secuencias de las Duts codificadas por los fagos $\phi 80\alpha$ (Dut80) y $\phi 11$ (Dut11) de *S. aureus*, ϕ PH15 de *S. epidermis* (PH15), y *M. tuberculosis* (Mtub). Los motivos conservados I-V y el motivo no conservado VI aparecen enmarcados en azul. Los residuos implicados en la unión e hidrólisis del ligando se encuentran señalados mediante (*). La homología entre secuencias se muestra según coloración: residuos conservados (rojo), no conservados (azul).

El dUTP como segundo mensajero.

Nuestro modelo de mecanismo de regulación de la actividad *moonlighting* de las Duts ha dejado claro el importante papel que tiene el dUTP. El dUTP actúa modulando los cambios conformacionales que regulan la actividad *moonlighting* y es por ello por lo que le atribuimos el papel de segundo mensajero. Los nucleótidos son profundamente explotados por todos los organismos como segundos mensajeros. Nucleótidos tales como el cAMP,

cGMP, c-di-GMP, c-di-AMP, (p)ppGpp han sido descritos como piezas claves en señalización, por ello no es de extrañar que otros nucleótidos, como el dUTP, puedan ejercer una función similar. De hecho, se ha descrito la posibilidad de que nucleótidos derivados de pirimidinas como el cCMP o el cUMP puedan ejercer funciones como segundos mensajeros. Además, ya se había propuesto con anterioridad que el dUTP ejerciese de segundo mensajero (Seifert, 2015; D. Williams *et al.*, 2011).

Williams y colaboradores (Williams *et al.*, 2011), a pesar de demostrar que la sobre-expresión de la isoforma mitocondrial de la Dut humana actúa como molécula anti-apoptótica frente a diferentes estímulos, no presentan evidencias del papel que juega el dUTP en este proceso (D. Williams *et al.*, 2011). El efecto de segundo mensajero en este caso lo atribuyen a la actividad de la Dut que disminuye los niveles de dUTP y evita su incorporación en la síntesis del ADN. En este trabajo, además, llama la atención, no obstante, que el dUTP funcione como segundo mensajero aún cuando los niveles altos de este nucleótido comprometen la viabilidad celular, tal como se ha visto en organismos como *E. coli* o levaduras (Vértessy and Tóth, 2009).

Una posible explicación a este hecho puede tener relación con el llamado mundo de ARN. Esta idea, que tuvo su inicio en los años 60, propone que la vida tuvo su inicio en un mundo primogénito dominado por el ARN (Pressman *et al.*, 2015). A día de hoy, el dogma central de la biología molecular coloca el ARN como una molécula intermedia entre ADN y proteínas; un sistema que, además, requiere de una maquinaria enzimática compleja. La idea de buscar un predecesor a este sistema complejo ha hecho que se proponga el ARN como candidato a molécula predecesora tanto por su papel central como por la de cofactores parecidos al ARN en el metabolismo actual (Pressman *et al.*, 2015). Además, el ARN es una molécula que puede adoptar estructuras complejas llegando a formar parte de proteínas o riboproteínas como el ribosoma

DISCUSIÓN GENERAL

(Pressman *et al.*, 2015). No obstante, el ARN es una molécula inestable en solución acuosa (Higgs and Lehman, 2015), y la mayor estabilidad del ADN frente al ARN puede ser la clave de su elección posterior como molécula para mantener la información genética.

El papel del ARN es clave en los procesos biológicos. Además de las funciones que llevan a cabo los ARN mensajeros, de transferencia o ribosomales (Lodish *et al.*, 2000), se ha descrito, más recientemente, el papel que realizan los *micro-*, *small-* o *long-* ARNs en cuanto a regulación (Eddy, 2001; Geisler and Coller, 2013; Tuck and Tollervey, 2011). Estos datos hacen pensar que en los inicios el ARN podría ejercer la doble función de mantener la información y ejercer funciones celulares tal como se ha llegado a plantear (Higgs *et al.*, 2015; Pressman *et al.*, 2015).

Siendo así, los nucleótidos presentes en el ARN como el uracilo, que serían más abundantes en un mundo donde el ARN era la molécula predominante, podrían jugar un mayor papel como segundos mensajeros. Al igual que ocurre en la actualidad con los derivados de nucleótidos de adenina o guanina, que regulan muchas de las rutas de señalización a través de segundos mensajeros como el cAMP o GTP; el uracilo podría estar llevando a cabo funciones similares dentro de un mundo de ARN. Esto nos haría pensar que el papel del dUTP como segundo mensajero no es novedoso sino todo lo contrario, considerándolo como un vestigio de ese mundo primogénito. Siendo así, se debería considerar la presencia del ARN y de sus funciones como una especie de “fósiles” moleculares procedentes de un metabolismo basado en el ARN como pueden ser los intrones auto-procesables o riboenzimas como la ribonucleasa P (Higgs and Lehman, 2015).

El hecho de que las Duts sean enzimas presentes en organismos que van desde procariotas a eucariotas e incluso en virus, y que la capacidad señalizadora propuesta por nuestro trabajo también se extienda a todos estos

reinos (como se ha visto en el capítulo 2), apoya la idea que este mecanismo de señalización apareciese de forma temprana y se haya mantenido durante la evolución. Además, las evidencias de que esta capacidad señalizadora se extienda a Duts diméricas y monoméricas refuerza la hipótesis del papel de que el dUTP sea un segundo mensajero universal.

Función biológica de las Duts codificadas por fagos.

Una pregunta latente en el campo es ¿por qué los virus, organismos con una altísima economía genética, codifican para una enzima codificada por la célula hospedadora? Al igual que en otros casos, una explicación plausible es que la Dut codificada por el fago tenga alguna función biológica para el propio fago. Esta hipótesis puede verse apoyada en resultados previamente descritos para proteínas codificadas por virus que encuentran su homólogo en sus células hospedadoras, como es el caso de la interleukina-10 codificada por el EBV para la que se ha postulado funciones relacionadas con el mantenimiento del virus en un estado de latencia junto con la replicación del virus y la generación de progenie (Sin and Dittmer, 2012). Otro ejemplo lo encontramos en el homólogo TubZ, una tubulina codificada por bacterias como *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis* y que ayuda a la segregación de los factores de virulencia codificados en plásmidos en estos organismos. El homólogo de TubZ codificado por el fago c-st de *Clostridium botulinum*, ORF CST189, ejerce un papel similar para el fago participando en el proceso de segregación del fago (Oliva *et al.*, 2012).

No obstante, existen evidencias para pensar que el papel que llevan a cabo las Duts en los fagos es no esencial. Si las Duts fueran esenciales para estos organismos, dado su alta tasa de replicación, todos ellos codificarían para alguna, pero este no es el caso ya que virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH), lentivirus de primates, gamma- y alfa-retrovirus (Hizi and Herzig, 2015) no codifican para esta proteína en su genoma. Esto podría

DISCUSIÓN GENERAL

deberse a características particulares de estos tipos de virus, ya que virus homólogos que infectan otras especies si que portan genes codificantes de Duts. Así, en el caso del VIH, se ha observado que un alto contenido de uracilo en el ADN del virus, tras el proceso de transcripción reversa, protege el ADN del virus de su recircularización por parte de las integrasas virales, proceso conocido como auto-integración, favoreciendo su integración en el genoma de la célula infectada (Yan *et al.*, 2011).

En otros casos, se ha visto que la expresión de Dut en virus puede tener implicaciones en su biología más allá de disminuir la cantidad de dUTP. La expresión de la Dut del virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) está ligada al ciclo celular, de manera que se expresa en altas cantidades en células proliferativas y en bajas cantidades en células ya diferenciadas que no se dividen (Chen *et al.*, 2002). Así, mutantes para el gen *dut* codificado por el virus CAEV ven reducida su capacidad de reproducirse en macrófagos, con lo que se relacionó la función de esta Dut con el proceso de replicación del virus dentro de la célula (Chen *et al.*, 2002). De la misma manera, en algunos genotipos de lentivirus que afectan a pequeños rumiantes, mutaciones en el gen *dut* no tienen efecto alguno sobre la capacidad replicativa del virus sino en la producción de lesiones menos severas en el caso de los mutantes (Juganaru *et al.*, 2011; Turelli *et al.*, 1997). Más ejemplos del carácter *moonlighting* lo encontramos en el virus *Epstein-Barr* (EBV) y el retrovirus κ endógeno humano (HERV-K) cuyas Duts interaccionan con el receptor de superficie celular (TLR2) presente en fagocitos e induciendo vía este receptor la expresión y secreción de citoquinas que contribuyen a las patologías derivadas del EBV y del HERV-K (Ariza *et al.*, 2009; Ariza and M. V. Williams, 2011; Glaser *et al.*, 2006). Estas Duts no son las únicas que interfieren con el sistema inmunológico del hospedador. La Dut del herpesvirus murino 68 (MHV-68) inhibe la señalización mediada por interferón de tipo I bloqueando su expresión

(Leang *et al.*, 2011). Igualmente, la Dut del herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) disminuye los niveles de NHP44L, ligando que activa las células *Natural Killers* (NK) del sistema innato inmunitario al unirse de manera específica al receptor NCR2 de estas células, confiriéndole una estrategia de evasión a la respuesta inmunitaria (Madrid and Ganem, 2012). De esta manera es de suponer que las Duts de virus son capaces de llevar a cabo funciones *moonlighting*, como las descrita en esta tesis para las Duts de los fagos de *S. aureus*, que además en casos como la Dut del KSHV no están asociadas a la actividad enzimática de la enzima (Madrid and Ganem, 2012).

Por esto, nuestra propuesta es que un amplio grupo de Duts víricas, entre las que se engloban las pertenecientes a los fagos de *S. aureus*, poseen actividades *moonlighting* que son relevantes para su biología. Hasta la fecha, todos los fagos secuenciados de *S. aureus* codifican para alguna Dut. Algunos de ellos como en el caso de $\phi 80\alpha$, $\phi 11$, $\phi 85$ y $\phi 71\text{bel}$ codifican para Duts triméricas, mientras que otros como ϕNM1 , ϕDI , ϕDII , $\phi 55$ o ϕO11 codifican para Duts diméricas. Curiosamente, los genomas de cepas de *S. aureus* secuenciados muestran que esta bacteria no presenta genes que codifique para Dut, a excepción de los correspondientes a profagos residentes que se encuentran integrados en su genoma (Comunicación personal Dr. Penadés; Szabó *et al.*, 2014). Szabo y colaboradores, han propuesto recientemente que las Duts de los profagos tendrían un papel de saneamiento al mantener unos niveles celulares de uracilo bajo durante el proceso de replicación del fago para evitar los efectos mutagénicos de este nucleótido (Szabó *et al.*, 2014). Sin embargo, esta observación es algo sorprendente, ya que implicaría que cuando el fago se encuentra silenciado los niveles de uracilo deben ser altos, lo que ha sido descrito como letal en otros organismos (Vértessy and Tóth, 2009), comprometiendo el nicho donde reside el fago. Además, la existencia de

DISCUSIÓN GENERAL

variantes alélicas de un mismo gen no tiene sentido si su única función es la de degradar el dUTP.

En términos de rendimiento a nivel de nuevas copias generadas, la inducción de la isla de patogenicidad debida a la expresión de la Dut codificada por el fago, tiene un alto coste para este, ya que compromete su ciclo biológico (Ram *et al.*, 2012). Por ello, lo esperable bajo la presión de las islas de patogenicidad, ampliamente distribuidas en los genomas de *S. aureus*, sería que los fagos hubieran tendido a perder el gen que codifica para la Dut si no realizara ninguna función biológica para ellos mismos. Contrariamente a la función propuesta por Szabo y colaboradores, nuestra hipótesis es que el fago requiere de la Dut para ejercer una función biológica para él mismo a través de la interacción de las Duts con alguna(s) diana(s) celular(es). Diferentes observaciones obtenidas en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Penadés apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, la generación de quimeras de fagos intercambiando las Duts entre los fagos $\phi 11$ y $\phi 85$ tiene un efecto tanto en el número de título de fago como en el tamaño de las calvas. Estas calvas representan una forma indirecta de cuantificar tanto el número de fagos, pues cada calva se genera en origen por la infección de un único fago, y de la capacidad infectiva del mismo, pues calvas de mayor tamaño son el resultado de fagos que se replican en alta cantidad e infectan las bacterias que se encuentran alrededor de la original con alta eficiencia. De esta manera, la inducción del fago $\phi 85$ portando la Dut del fago $\phi 11$ produce un menor título de fago respecto a la cepa salvaje además de una reducción del tamaño de calvas; de manera similar la inducción del fago $\phi 11$ portadora de la Dut del fago $\phi 85$ produce una reducción en el tamaño de las calvas pero no en el número de título respecto al fago $\phi 11$ salvaje (datos no publicados). Estas observaciones indican claramente que existe una interferencia entre las Duts de fagos diferentes y, aunque estudios más exhaustivos son necesarios, sugieren

que cada Dut se encuentra optimizada para realizar correctamente su función en el fago que la codifica. Finalmente, nuestra hipótesis de dianas celulares para las Duts en *S. aureus* nos llevó a buscar posibles candidatos mediante ensayos de doble híbrido. Estos ensayos nos han permitido identificar un número reducido de candidatos con los que las Duts de fagos de *S. aureus* son capaces de interactuar; proteínas de fagos y proteínas de *S. aureus*; corroborando la posibilidad de la actividad *moonlighting* de estas proteínas (datos no publicados). Actualmente, estas dianas han abierto una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio que pretende detallar que papel llevan a cabo la interacción de las Duts codificadas por los fagos con dichas dianas propias de *S. aureus* para la biología del propio fago.

En este contexto de interacciones con proteínas presentes en *S. aureus*, aún sigue siendo un misterio la interacción entre Dut y el represor de la isla StI, pues como bien se ha mencionado es perjudicial para el propio fago. Una posible explicación pudiera ser que el represor de la isla mimetice alguna de las conformaciones de las dianas de la Dut, y que la interacción entre Dut y represor fuese en realidad una tasa que el fago paga para poder sobrevivir. De hecho, resultados recientemente publicados muestran que en presencia de islas de patogenicidad los fagos sufren mutaciones específicamente en las proteínas utilizadas para inducir el ciclo biológico de las islas. Concretamente, y para el caso de Duts, en presencia de la isla SaPI_{bov1} las Duts codificadas por fagos van adquiriendo mutaciones que implican ventajas evolutivas para el fago (Frigols *et al.*, 2015). Estos datos apoyan nuestra hipótesis sobre el papel de la Dut en la biología del fago y el porqué no llegan a perder el gen que las codifica; porque les es necesaria. Pero esto no explica la presencia de diferentes variantes alélicas. ¿Por qué no todas las Duts codificadas por fagos son iguales?. Si tenemos en cuenta que se ha visto la clara implicación del motivo VI, divergente entre diferentes Duts de fagos de *S. aureus*, ¿por qué no

DISCUSIÓN GENERAL

eliminan este motivo VI?. Si tenemos en consideración que *S. aureus* puede contener varios fagos integrados en su genoma, y ante una situación de estrés donde se induzca el ciclo lítico de todos ellos, cada fago debe poseer mecanismos que le favorezcan a la hora de aprovechar la maquinaria celular para producir las proteínas necesarias para poder encapsidarse. El motivo VI podría jugar un papel clave en el reconocimiento de las dianas específicas en este sentido, ya que si pensamos que el motivo VI es necesario para la interacción con StI, como han mostrado nuestros resultados, y si el represor StI se encuentra mimetizando a alguna de las dianas, se podría pensar que el motivo VI interactuará con dichas dianas. Así pues, los diferentes motivos VI serían una muestra de la evolución y adaptación de los diferentes fagos a la presencia de la isla SaPIbov1 y la presencia de un motivo VI específico para cada Dut codificada por fago condiciona la tasa con la que el fago paga su supervivencia. Fagos que tengan motivos adicionales que interactúen fuertemente con sus dianas pagan la tasa de interacción fuerte con el represor de la isla o por el contrario fagos que interactúen débilmente con el represor de la isla también lo harán con sus proteínas diana.

El papel de StI como inhibidor general de Duts.

Visto que las Duts son proteínas que se encuentran en la gran mayoría de organismos y debido a que existen varias evidencias de estar implicadas en funciones de señalización, se puede pensar que existan proteínas que regulen la actividad de las Duts.

Recientemente, Szabo y colaboradores han postulado que StI pueda ser un inhibidor general de Duts (Szabó *et al.*, 2014). Szabo y colaboradores atribuyen el papel de inhibidor general de StI al hecho de que se produce una inhibición de la actividad de la Dut codificada por el fago $\phi 11$ incubándola con StI previamente a añadir el sustrato de la reacción, dUTP, con el cual compite por unirse al centro catalítico de la enzima (Szabó *et al.*, 2014). De la misma

manera, el mismo grupo posteriormente confirmó que Stl podría ser un inhibidor general de Duts utilizando la Dut de *M. tuberculosis* obteniendo unos resultados similares a los de la Dut codificada por el fago $\phi 11$ previamente descritos por este grupo (Hirmondo *et al.*, 2015). No obstante, la idea que proponen tanto Szabo como Hirmondo, acerca del papel de Stl como un inhibidor general de Duts, no casa con los resultados obtenidos por nuestro grupo donde se ha observado que Stl es incapaz de unirse a la Dut codificada por el fago PH15 (Tormo-Más *et al.*, 2010) y que cuestiona el papel general de Stl como represor de las Duts. Además, cabe destacar qué funciones llevan a cabo las Duts, esenciales en el metabolismo de replicación y la viabilidad celular, y de qué manera pueden estar relacionadas con Stl.

A nuestro entender Stl no es un inhibidor de Duts, sino más bien una proteína que reconoce e interacciona con las Duts de fagos de *S. aureus* para llevar a cabo una función, percibir la movilización de los fagos para movilizar la isla de patogenicidad en sincronía con el ciclo lítico del fago. Dado que las diferentes islas de patogenicidad de *S. aureus* presentan diferentes tipos de Stl (Novick *et al.*, 2010) y que estos reconocen diferentes tipos de proteínas expresadas por los fagos (Tormo-Mas 2010, Figols 2015), es factible pensar que la interacción Dut-Stl es el resultado de una adaptación evolutiva particular y conjunta del fagos e islas de *S. aureus*, de la que la isla saca provecho del fago aún más cuando requiere de proteínas codificadas por el propio fago para poder encapsidarse. Siendo así, carecería de sentido biológico que Stl inhibiese a una Dut de un organismo tan lejano como *M. tuberculosis* y además proponer, en base a dos ejemplos, que sea un inhibidor universal de las Duts parece arriesgado. Sin duda, más evidencias sobre interacción entre Duts de varios organismos y el represor Stl serían requeridos para poder considerarlo como un inhibidor universal de Duts. Además del sentido biológico, se debe considerar el mecanismo de interacción entre Duts codificadas por fagos y el represor de la

DISCUSIÓN GENERAL

isla ya que nuestros datos muestran que la eliminación del motivo VI de Dut80 α tiene un efecto drástico en la interacción de Stl con esta Dut, apoyando que aquellas Duts que no cuenten con este motivo, el cual solo hemos podido encontrar en Duts de fagos de *S. aureus*, deben tener una menor afinidad por Stl. Además, la sobreexpresión de la Dut de *M. tuberculosis* en cepas de Stl portadoras de islas controladas por Stl muestra que es incapaz de movilizar dichas islas (comunicación personal del grupo del Dr. Penadés), apoyando que *in vivo* la interacción Dut-Stl o no tiene lugar o es muy débil.

Estas observaciones hacen tener muchas reticencias sobre el papel de Stl como inhibidor general de las Duts, y mucho más aún sobre su significado biológico. Además, el represor utilizado en los estudios de Hirmondo y Szabo es específico para la isla de patogenicidad SaPIbov1 de *S. aureus*, y no puede por ello considerarse global. Sin duda alguna un análisis mucho más exhaustivo tanto *in vitro* como *in vivo* debe realizarse con Stl y con diferentes Duts para proponer Stl como un inhibidor de Duts, pero sin olvidar el contexto biológico donde nos encontramos y donde la Dut se expresa.

El mecanismo de interacción Dut-Stl podría explicar las actividades moonlighting de otras Duts.

Las Duts codificadas por fagos de *S. aureus* presentan una actividad *moonlighting* relacionada con la transferencia de SaPIs. El mecanismo de señalización que regula estas actividades, parece exigir, al menos en Duts triméricas, tres motivos de las Duts. Por una parte el motivo conservado V sería el interruptor que controla los estados *on/off* de la molécula, mientras que el motivo conservado IV y el no conservado VI serían responsables de la especificidad por la diana.

Existen evidencias, no obstante, que indican que este mecanismo no es exclusivo de estas Duts. Tal como se ha recogido en el capítulo 4 es asumido

que todos los organismos vivos codifican para algún tipo de Dut (Vértessy and Tóth, 2009) con un plegamiento conservado que es suficiente para realizar la actividad catalítica del enzima y que muchas de ellas presentan motivos adicionales. Por analogía con lo observado en las Duts de *S. aureus*, es posible que estos motivos adicionales, no conservados, estén involucrados en las actividades *moonlighting* de otras Duts. Así lo sugieren los datos sobre mutantes truncados para este motivo de Duts de fagos de *S. aureus* y sobre la Dut del fago de *S. epidermis* PH15, la cual no presenta motivo adicional similar a los fagos de *S. aureus*, en ambos casos incapaces de unirse a StI (Tormo-Más *et al.*, 2010). En el caso del virus del mono *Mason-Pfizer*, la Dut que codifica se encuentra fusionada a la proteína de la nucleocápside (NC-Dut) (Barabás *et al.*, 2003). En este caso se ha sugerido que NC-Dut pueda interactuar con proteínas como la integrasa, proteínas de la cápside, nucleocápside o cápside-nucleocápside abriendo nuevas preguntas sobre el papel que puede tener la Dut en el ciclo biológico de este virus (Németh-Pongrácz *et al.*, 2006).

En el caso de procariontas, la Dut codificada por *Mycobacterium smegmatis* codifica una proteína Dut que tiene un dominio extra de cinco residuos (motivo VI) adyacente al motivo V. La delección de estos cinco residuos no afecta a la actividad de la enzima, pero, no obstante, si a la viabilidad celular (Pécsi *et al.*, 2012). Curiosamente, y dado que *M. smegmatis* codifica para MazG, enzima que puede degradar dUTP (Lu *et al.*, 2010), se sugiere que la función principal de la Dut no es degradar dUTP sino regular y controlar procesos importantes en esta bacteria.

En el caso de eucariotas hemos mencionado en el capítulo 4 las Duts codificadas por la rata o por *Drosophila melanogaster*. En el caso de la Dut codificada por la rata, esta presenta un motivo adicional en el extremo C-terminal la ausencia del cual afecta a la unión entre PPAR α y esta Dut (Chu *et al.*, 1996; Tormo-Más *et al.*, 2010). Esta unión sugiere que la Dut de la

DISCUSIÓN GENERAL

rata puede tener funciones *moonlighting* relacionadas con la expresión génica ya que dificulta la interacción y formación del complejo PPAR α -RXR (Chu *et al.*, 1996; Tormo-Más *et al.*, 2010). En el caso de *D. melanogaster* existen dos isoformas de Dut diferenciadas por la longitud de su extremo N-terminal (Békési *et al.*, 2004). Estas dos isoformas se presentan en localizaciones celulares diferentes. La primera de las isoformas, con una señal NLS, se localiza en el núcleo, mientras que la segunda de las isoformas, sin señal NLS, presenta una localización mayoritariamente citoplasmática (Muha *et al.*, 2009; Róna *et al.*, 2014). Al contrario que en el caso de la Dut de rata, no se han descrito dianas que puedan unirse a la Dut de *D. melanogaster*. No obstante, existen evidencias que sugieren que esta Dut pueda estar implicada en funciones *moonlighting*. La primera, la localización de la segunda de las isoformas alejada del núcleo, compartimiento donde se da la síntesis de ADN y la reparación *in situ*. Por otra parte, y análogamente a lo descrito para Duts de fagos, la Dut codificada por *D. melanogaster* presente una región adicional en su extremo C-terminal respecto a otras Duts (Békési *et al.*, 2004) que podría intervenir en el reconocimiento de proteínas diana en el citoplasma. Además, los niveles de Dut codificadas por *D. melanogaster* sufren cambios en función del estadio de desarrollo de la mosca, siendo necesaria su expresión durante la fase de pupa para llevar a cabo un desarrollo normal del proceso de metamorfosis (Horváth *et al.*, 2013; Muha *et al.*, 2012).

Estos datos, tomados conjuntamente, ofrecen una visión generalizada de las funciones *moonlighting* que pueden llevar a cabo las Duts en todos los organismos tanto en virus, como en organismos procariotas y eucariotas, dada la ubicuidad de la enzima y la presencia de motivos adicionales no conservados.

Además, y en cuanto a mecanismo de señalización se refiere, nuestro modelo propone que tanto el motivo IV y V, ambos conservados en todas las Duts triméricas y monoméricas, participan en la unión de la proteína diana.

Cómo se puede regular la función *moonlighting* de Duts en otros organismos aún sigue siendo un misterio. El hecho que estos motivos se encuentren conservados permite correlacionar el mecanismo para realizar su función. La estabilización del motivo V es inducida por el correcto posicionamiento del nucleótido en el centro activo, en el que participa el motivo IV, originando una conformación característica observada desde virus a humanos (García-Nafría *et al.*, 2011). Esta conformación se ha mostrado en las estructuras de las Duts de *M. tuberculosis*, humana o los fagos de *S. aureus*, y no es descartable que, al igual que en Duts de fagos, este motivo pueda desarrollar el mismo papel de interruptor molecular en otras Duts regulando sus funciones *moonlighting*.

El papel señalizador para Duts de *S. aureus* mostrado en este trabajo de tesis, y nuestra propuesta de que esta actividad *moonlighting* puede ser general en las Duts, podría explicar múltiples observaciones de la literatura sobre estas enzimas que en estos momentos son poco atribuibles a la actividad de una enzima metabólica.

CONCLUSIONES

1. Las dUTPasas triméricas de fagos de *S. aureus* presentan, además de su capacidad hidrolítica sobre dUTP, como actividad *moonlighting* la capacidad de inducir la movilización de islas de patogenicidad por su interacción con la molécula represora StI. Esta actividad depende de tres motivos; dos de ellos, motivos IV y V, catalíticos y presentes en todas las dUTPasas, y uno, motivo VI, variable y específico de ellas.

2. El motivo V, un *P-loop* que es estabilizado sobre el centro activo del enzima por el sustrato dUTP, funciona como interruptor molecular en la interacción con StI, impidiendo la unión a este en presencia del sustrato y estabilizando la unión en su ausencia.

3. El motivo IV actúa como punto de anclaje para la unión con StI y por ello variaciones en su secuencia tiene alta repercusión en la afinidad dUTPasas-StI.

4. El motivo VI es propio de las dUTPasas de fagos de *S. aureus* y pese a que presenta una alta variabilidad en su secuencia, una porción de este adquiere una conformación en β -*hairpin* y una disposición espacial idéntica en todas ellas, indicando que este armazón estructural juega un papel relevante para la unión a StI. Los datos biológicos con mutantes delecionales de este fragmento del motivo VI confirman esta propuesta.

5. El mecanismo de interacción entre las dUTPasas de fagos de *S. aureus* y StI es análogo al que presentan las proteínas G con sus dianas, aunque en este caso el nucleótido señalizador funciona de forma inversa. Esta analogía sugeriría un papel de segundo mensajero para el dUTP.

6. La presencia de motivos adicionales no conservados en dUTPasas triméricas de diferentes organismos que podrían tener funciones análogas al motivo VI de las dUTPasas de fagos de *S. aureus*, así como los datos recogidos en la bibliografía de la interacción de diferentes dUTPasas con proteínas diana,

CONCLUSIONES

sugieren que la actividad señalizadora de estas enzimas y su mecanismo de acción pueden ser general.

7. Algunas dUTPasas diméricas de fagos de *S. aureus* también presentan capacidad para movilizar las mismas islas de patogenicidad que sus análogas triméricas. Esta capacidad se basa en la interacción con el mismo represor StI, aunque no todas las dUTPasas diméricas de estos fagos la presentan. No obstante, los datos bioquímicos y estructurales indican que el mecanismo molecular mediante el cual se da esta actividad señalizadora difiere del descrito para dUTPasas triméricas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., *et al.* (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), 213–221.
- Alibayov, B., Baba-Moussa, L., Sina, H., Zdeňková, K. & Demnerová K. (2014). Staphylococcus aureus mobile genetic elements. *Molecular Biology Reports*, 41(8), 5005–5018.
- 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.
- Baldo, A. M., & McClure, M. A. (1999). Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts. *Journal of Virology*, 73(9), 7710–7721.
- Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(6), 1126–1145.
- Barabás, O., Rumlová, M., Erdei, A., Pongrácz, V., Pichová, I., & Vértessy, B. G. (2003). dUTPase and nucleocapsid polypeptides of the Mason-Pfizer monkey virus form a fusion protein in the virion with homotrimeric organization and low catalytic efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38803–38812.

BIBLIOGRAFÍA

- Barabás, O., Pongrácz, V., Kovári, J., Wilmanns, M., & Vértessy, B. G. (2004). Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42907–42915.
- 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.
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature*, 466(7302), 68–76.
- 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.
- Bernier-Villamor, V., Camacho, A., Hidalgo-Zarco, F., Pérez, J., Ruiz-Pérez, L. M., & González-Pacanoska, 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.
- Bessman, M. J., Lehman, I. R., Adler, J., Zimmerman, S. B., Simms, E. S., & Kornberg, A. (1958). ENZYMATIC SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID. III. THE INCORPORATION OF

PYRIMIDINE AND PURINE ANALOGUES INTO DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(7), 633–640.

Blagoev, B., Kratchmarova, I., Ong, S.-E., Nielsen, M., Foster, L. J., & Mann, M. (2003). A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nature Biotechnology*, 21(3), 315–318.

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.

Castillo-Acosta, V. M., Aguilar-Pereyra, F., García-Caballero, D., Vidal, A. E., Ruiz-Pérez, L. M., & González-Pacanowska, D. (2013). Pyrimidine requirements in deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase deficient *Trypanosoma brucei* mutants. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 187(1), 9–13.

BIBLIOGRAFÍA

- Cedergren-Zeppezauer, E. S., Larsson, G., Nyman, P. O., Dauter, Z., & Wilson, K. S. (1992). Crystal structure of a dUTPase. *Nature*, 355(6362), 740–743.
- Chan, S., Segelke, B., Lakin, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6076–6085.
- Chen, J., & Novick, R. P. (2009). Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910), 139–141.
- 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.
- Chen, R., Wang, H., & Mansky, L. M. (2002). Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 10), 2339–2345.
- 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.
- Copley, S. D. (2012). Moonlighting is mainstream: paradigm adjustment required. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 34(7), 578–588.

- 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., & Nilsen, H. (2006). Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Reports*, 7(10), 1046–1051.
- Doublé, S. (2007). Production of selenomethionyl proteins in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 363, 91–108.
- Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews. Genetics*, 2(12), 919–929.
- el-Hajj, H. H., Zhang, H., & Weiss, B. (1988). Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170(3), 1069–1075.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of coot. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66, 486-501.
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), 629–635.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., *et al.* (2007). Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Molecular Systems Biology*, 3, 89.
- Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 61(2), 136–169.
- 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. (2015). Las islas de patogenicidad dirigen la evolución de los fagos de. *Tesis Doctoral, Universitat de València*, 1–152.
- Frigols, B., Quiles-Puchalt, N., Mir-Sanchis, I., Donderis, J., Elena, S. F., Buckling, A., *et al.* (2015). Virus Satellites Drive Viral Evolution and Ecology. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005609.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(9), 722–732.
- García-Caballer, M. (2015). Las Duts fágicas controlan la transferencia de genes de virulencia mediante un mecanismo similar al de las proteínas G proto-oncogénicas. *Tesis Doctoral, Universitat de València*, 1–166.
- 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-Nafria, J., Harkiolaki, M., Persson, R., Fogg, M. J., & Wilson, K. S. (2011). The structure of *Bacillus subtilis* SP β prophage dUTPase and its complexes with two nucleotides. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 3), 167–175.
- García-Nafria, 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.
- Geisler, S., & Collier, J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(11), 699–712.
- Glaser, R., Litsky, M. L., Padgett, D. A., Baiocchi, R. A., Yang, E. V., Chen, M., *et al.* (2006). EBV-encoded dUTPase induces immune dysregulation: Implications for the pathophysiology of EBV-associated disease. *Virology*, 346(1), 205–218.
- 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.
- Gonçalves, A. M. D., de Sanctis, D., & McSweeney, S. M. (2011). Structural and functional insights into DR2231 protein, the MazG-like nucleoside

BIBLIOGRAFÍA

- triphosphate pyrophosphohydrolase from *Deinococcus radiodurans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30691–30705.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Higgs, P. G., & Lehman, N. (2015). The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. *Nature Reviews. Genetics*, 16(1), 7–17.
- Hill, R. L. L., & Dokland, T. (2016). The Type 2 dUTPase of Bacteriophage ϕ NM1 Initiates Mobilization of *Staphylococcus aureus* Bovine Pathogenicity Island 1. *Journal of Molecular Biology*, 428(1), 142–152.
- Hirmondo, R., Szabó, J. E., Nyíri, K., Tarjányi, 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*, 30, 21–27.
- Hizi, A., & Herzig, E. (2015). dUTPase: the frequently overlooked enzyme encoded by many retroviruses. *Retrovirology*, 12:70, 1-15.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S.-L., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 415(6868), 180–183.
- Horváth, A., Békési, A., Muha, V., Erdélyi, M., & Vértessy, B. G. (2013). Expanding the DNA alphabet in the fruit fly: uracil enrichment in genomic DNA. *Fly*, 7(1), 23–27.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., & Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4569–4574.
- Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8–11.
- Jeffery, C. J. (2009). Moonlighting proteins--an update. *Molecular bioSystems*, 5(4), 345–350.
- Juganaru, M., Reina, R., Bertolotti, L., Stella, M. C., Profiti, M., Armentano, M., *et al.* (2011). In vitro properties of small ruminant lentivirus genotype E. *Virology*, 410(1), 88–95.
- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 376–393.
- Kabsch, W. (2010). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), 133–144.
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., *et al.* (2013). Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 305–341.
- Kim, D.-M., Chung, K.-S., Choi, S.-J., Jung, Y.-J., Park, S.-K., Han, G.-H., *et al.* (2009). RhoB induces apoptosis via direct interaction with TNFAIP1 in

- HeLa cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 125(11), 2520–2527.
- Kim, S. Y., Kim, M.-J., Jung, H., Kim, W. K., Kwon, S. O., Son, M. J., *et al.* (2012). Comparative proteomic analysis of human somatic cells, induced pluripotent stem cells, and embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 21(8), 1272–1286.
- Koehler, S. E., & Ladner, R. D. (2004). Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition. *Molecular Pharmacology*, 66(3), 620–626.
- Kouzminova, E. A., & Kuzminov, A. (2004). Chromosomal fragmentation in dUTPase-deficient mutants of *Escherichia coli* and its recombinational repair. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1279–1295.
- Kovári, J., Imre, T., Szabó, P., & Vértessy, B. G. (2004). Mechanistic studies of dUTPases. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 23(8-9), 1475–1479.
- 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., Lofdahl, S., Betley, M. J., O'Reilly, M., Schlievert, P. M., Bergdoll, M. S., & Novick, R. P. (1983). The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 305(5936), 709–712.

BIBLIOGRAFÍA

- Ladner, R. D., & Caradonna, S. J. (1997). The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 19072–19080.
- 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.
- Leang, R. S., Wu, T.-T., Hwang, S., Liang, L. T., Tong, L., Truong, J. T., & Sun, R. (2011). The anti-interferon activity of conserved viral dUTPase ORF54 is essential for an effective MHV-68 infection. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002292.
- Leveles, I., Németh, V., Szabó, J. E., Harmat, V., Nyíri, K., Bendes, Á. Á., *et al.* (2013). Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 12), 2298–2308.
- 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*. *Molecular Microbiology*, 29(2), 527–543.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, *et al.* (2000). The Three Roles of RNA in Protein Synthesis. *Molecular Cell Biology*. 4th edition (New York: W. H. Freeman), Section 4.4.
- Luft, J. R., & DeTitta, G. T. (1999). A method to produce microseed stock for use in the crystallization of biological macromolecules. *Acta*

Crystallographica. Section D, Biological Crystallography, 55(Pt 5), 988–993.

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.

Maiorov, V. N., & Crippen, G. M. (1994). Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, 235(2), 625–634.

Maiques, E., Ubeda, C., Tormo, M. A., Ferrer, M. D., Lasa, Í., Novick, R. P., & Penadés, J. R. (2007). Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5608–5616.

Maiques, E., Quiles-Puchalt, N., Donderis, J., Ciges-Tomas, J. R., Alite, C., Bowring, J. Z., *et al.* (2016). Another look at the mechanism involving trimeric dUTPases in *Staphylococcus aureus* pathogenicity island induction involves novel players in the party. *Nucleic Acids Research*, 1-13.

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

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(Pt 4), 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.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Mol, C. D., Harris, J. M., McIntosh, E. M., & Tainer, J. A. (1996). Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure (London, England : 1993)*, 4(9), 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., Zagyva, I., Venkei, Z., Szabad, J., & Vértessy, B. G. (2009). Nuclear localization signal-dependent and -independent movements of *Drosophila melanogaster* dUTPase isoforms during nuclear cleavage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(2), 271–275.

- Muha, V., Horváth, A., Békési, A., Pukáncsik, M., Hodoscsek, B., Merényi, G., *et al.* (2012). Uracil-containing DNA in *Drosophila*: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genetics*, 8(6), e1002738.
- Németh-Pongrácz, V., Snasel, J., Rumlova, M., Pichova, I., & Vértessy, B. G. (2006). Interacting partners of M-PMV nucleocapsid-dUTPase. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 25(9-11), 1197–1200.
- Novick, R. P. (2003). Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 49(2), 93–105.
- Novick, R. P., Christie, G. E., & Penadés, J. R. (2010). The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(8), 541–551.
- Nyíri, K., Papp-Kádár, V., Szabó, J. E., Németh, V., & Vértessy, B. G. (2015). Exploring the role of the phage-specific insert of bacteriophage ϕ 11 dUTPase. *Structural Chemistry*, 1–8.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299–304.
- Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., & Andreu, J. M. (2012). Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7711–7716.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Pecsi, I., Leveles, I., Harmat, V., Vértessy, B. G., & Tóth, J. (2010). Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 7179–7186.
- Pecsi, I., Szabó, J. E., Adams, S. D., Simon, I., Sellers, J. R., Vértessy, B. G., & Tóth, J. (2011). Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(35), 14437–14442.
- Pecsi, I., Hirmondo, R., Brown, A. C., Lopata, A., Parish, T., Vértessy, B. G., & Tóth, J. (2012). The dUTPase Enzyme Is Essential in *Mycobacterium smegmatis*. *PloS One*, 7(5), 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. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 163–170.
- Penadés, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., & Novick, R. P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, 23C, 171–178.

- Penadés, J. R., & Christie, G. E. (2015b). 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.
- Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S., & Neuberger, M. S. (2002). AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*, 418(6893), 99–103.
- 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.
- 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.
- Prasad, G. S. (2001). Glycine rich P-loop motif in deoxyuridine pyrophosphatase. *Current Protein & Peptide Science*, 2(4), 301–311.
- Pressman, A., Blanco, C., & Chen, I. A. (2015). The RNA World as a Model System to Study the Origin of Life. *Current Biology*, 25(19), R953–R963.

BIBLIOGRAFÍA

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*. *Molecular Microbiology*, 91(3), 423–437.

Ram, G., Chen, J., Kumar, K., Ross, H. F., Ubeda, C., Damle, P. K., *et al.* (2012). Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16300–16305.

Ram, G., Chen, J., Ross, H. F., & Novick, R. P. (2014). Precisely modulated pathogenicity island interference with late phage gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), 14536–14541.

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

Rhodes, G. (2012). *Crystallography Made Crystal Clear*. Academic Press.

Róna, G., Pálinkás, H. L., Borsos, M., Horváth, A., Scheer, I., Benedek, A., *et al.* (2014). NLS copy number variation governs efficiency of nuclear import: case study on dUTPases. *The FEBS Journal*, 281, 5463–5478.

Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research : the Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 100, 1–23.

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.
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14–56.
- Seeberg, E., Eide, L., & Bjørås, M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10), 391–397.
- Seifert, R. (2015). cCMP and cUMP: emerging second messengers. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(1), 8–15.
- Sin, S.-H., & Dittmer, D. P. (2012). Cytokine homologs of human gammaherpesviruses. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 32(2), 53–59.
- Szabó, J. E., Németh, V., Papp-Kádár, V., Nyíri, K., Leveles, I., Bendes, A. Á., *et al.* (2014). Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Research*, 42(19), 11912–11920.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S. M., Campoy, S., Lasa, Í., *et al.* (2010). Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature*, 465(7299), 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. *Molecular 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33572–33582.
- Tuck, A. C., & Tollervey, D. (2011). RNA in pieces. *Trends in Genetics : TIG*, 27(10), 422–432.
- Tungteakkhun, S. S., & Duerksen-Hughes, P. J. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Archives of Virology*, 153(3), 397–408.

- Turelli, P., Guiguen, F., Mornex, J. F., Vigne, R., & Quérat, G. (1997). dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *Journal of Virology*, 71(6), 4522–4530.
- Ubeda, C., Tormo, M. A., 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. *Molecular Microbiology*, 49(1), 193–210.
- Ubeda, 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. *Molecular Microbiology*, 56(3), 836–844.
- Ubeda, C., Barry, P., Penadés, J. R., & Novick, R. P. (2007). 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.
- Ubeda, 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.
- Ubeda, 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Ubeda, 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.
- Ubeda, 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.
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1299–1304.
- Vértessy, B. G. (1997). Flexible glycine rich motif of *Escherichia coli* deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase is important for functional but not for structural integrity of the enzyme. *Proteins*, 28(4), 568–579.

- 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. (2009). Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Accounts of Chemical Research*, 42(1), 97–106.
- Viana, D., Comos, M., McAdam, P. R., Ward, M. J., Selva, L., Guinane, C. M., *et al.* (2015). A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host tropism. *Nature Genetics*, 47(4), 361–366.
- Whittingham, J. L., Leal, I., Nguyen, C., Kasinathan, G., Bell, E., Jones, A. F., *et al.* (2005). dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors. *Structure (London, England : 1993)*, 13(2), 329–338.
- Williams, D., Norman, G., Khoury, C., Metcalfe, N., Briard, J., Laporte, A., *et al.* (2011). Evidence for a second messenger function of dUTP during Bax mediated apoptosis of yeast and mammalian cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1813(2), 315–321.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., *et al.* (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 4), 235–242.

BIBLIOGRAFÍA

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9244–9249.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8.
- Yu, H., Braun, P., Yildirim, M. A., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., *et al.* (2008). High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5898), 104–110.

ta ep sil m sup re eue par mar B
 sil da p f g φ hz 4 P tr n ur
 h p to ga da mah de Du d h de p f g
 u mer b D yr u x q UT h
 m h uere V (T ga Par p m d/T sil re h
 mer b Dsil u m hz um b f Dsil
 (Du v ey p eu de P u mal g la Lz
 man m de f y q ma mah utlz de yo hz y
 D er m de coa pypoe yo fa vo y
 hz al mah yo HLI ma p eu
 dUPN P f ta er eue f ma sup sil De (T
 C ma m u ta te al huz mer eue b y f ma
 al de Dsil (Dsil v m d HLI p ur de q Du ma
 na al f u Dsil u A P sil
 fiada sup sil De eu h u m gata yet eu
 eu m gata yet mer b Du (T D ma
 mper'ca ur u do D φ v p ur ta ma fiada p b
 u n hu b p Dsil v (T ta de
 er f per Dsil m de d
 h/Du y ur ta (T H L ferre eu
 fiada y eue m Dsil re da p y huz ma
 mer u ma sup per Dsil v ma kg 6
 mer y ta ta eada yet an y tra
 Luy Dsil TT 6 m y al Du W C tr m m
 dHM B f ta h m m m b h m

